



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**NANOENCAPSULAMENTO DE CAROTENOIDES EM DISPERSÃO: UMA
REVISÃO**

LARISSA DE AGUIAR ANDRADE

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**NANOENCAPSULAMENTO DE CAROTENOIDES EM DISPERSÃO: UMA
REVISÃO**

LARISSA DE AGUIAR ANDRADE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul para obtenção do Título de
Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Alessandro de Oliveira Rios
Co-orientadora: Simone Hickmann Flores

Porto Alegre

2015

LARISSA DE AGUIAR ANDRADE

NANOENCAPSULAMENTO DE CAROTENOIDES EM DISPERSÃO: UMA REVISÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do Título de Engenheiro de Alimentos.

Aprovado em: ___/___/___

Alessandro de Oliveira Rios
(Orientador)

Doutor em Ciência de Alimentos
ICTA-UFRGS

BANCA1

Simone Hickmann Flores
(Co-Orientadora)

Doutora em Engenharia de Alimentos
ICTA-UFRGS

BANCA2

Carlos Henrique Pagno

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

ICTA/UFRGS

Vanessa Stahl Hermes

Doutora em Ciência de Alimentos

ICTA/UFRGS

*Dedico esse trabalho à minha querida família
que me ama muito e que me apoiou em todos
os momentos de alegrias e dificuldades.
Aos meus pais, Dalva e João, e ao meu tio Luíz
Ao meu companheiro amado Renato
À minha eterna companheira canina, Aurora.
Obrigada família, amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço com todo meu amor a minha família por estar junto comigo, mesmo à 1200 Km de distância. Em especial à minha amada mãe, protetora, inspiradora e guerreira, meu porto seguro e minha calmaria em meio à tempestade.

Ao meu pai herói, por batalhar dia a dia para me proporcionar estudo em uma universidade de alto nível.

Ao meu amado tio, que esteve comigo em um momento difícil de saúde e por me amar como filha.

Ao meu querido companheiro Renato, por me apoiar em todos os momentos, me ajudar e me amar.

Ao meu querido orientador, Alessandro de Oliveira Rios, por acreditar no meu potencial e me amadurecer como profissional.

Aos funcionários e demais professores por toda competência e dedicação à minha formação como profissional e como pessoa.

À minha amiga Danielle, por estar sempre comigo, por estudar até altas horas, por me apoiar emocionalmente e por vencer uma fase de saúde muito difícil durante a faculdade.

Ao meu bom Deus, que dá sentido a tudo, me guia e me abençoa, ilumina os meus passos.

E por fim, à minha amada cachorrinha Aurora, minha companheira de todos os momentos, me tratando sempre com amor e carinho e me inspirando a seguir meu caminho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

RESUMO

Com a alimentação há possibilidade de proteger o organismo contra doenças crônicas, tais como desenvolvimento de células tumorais e doenças cardiovasculares. Devido a isto, a comunidade científica e a indústria de alimentos têm como comum objetivo desenvolver alimentos ricos em compostos que sejam biologicamente ativos e que proporcionem benefícios à saúde. Portanto, muitos estudos sobre compostos bioativos têm sido realizados. Os carotenoides são uma classe de compostos bioativos utilizados na indústria de alimentos para enriquecer o alimento nutricionalmente e para pigmentar os produtos. Alguns dos carotenoides usados para estes fins incluem a astaxantina, a cantaxantina, o β -caroteno, a bixina, a norbixina e o licopeno. Entretanto, a utilização dos carotenoides na indústria de alimentos se depara com o problema da baixa estabilidade e hidrofobicidade frente aos diversos processos industriais. Dessa forma, a nanotecnologia pode ser uma técnica promissora para esses pigmentos, uma vez que ela pode proporcionar a esses compostos estabilidade e solubilidade em meio aquoso. Assim, este trabalho tem como objetivo reunir as pesquisas científicas e utilização da nanotecnologia para encapsular esses compostos em dispersão, e avaliar os resultados obtidos.

Palavras-chave: *Compostos bioativos, Carotenoides, Nanoencapsulamento.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos carotenoides predominantes no plasma humano	19
Figura 2. Estrutura básica dos carotenoides	22
Figura 3. Possíveis reações quelantes dos carotenoides	25
Figura 4. Estrutura química e clivagem do β -caroteno	26
Figura 5. Condições experimentais e resultados.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade pró-vitamina A (%) de acordo com a conversão total do β -caroteno.	26
---	----

LISTA DE SIGLAS

BIX-LNC	Nanocápsulas de bixina
CCl_3^-	Íon triclorometil
CCT	Triglicerídeo caprílico/cáprico
DMF	Dimetilformamida
EC	Etilcelulose
HPMCP	Hidróxipropilmetilcelulose
LYC-LNC	Nanocápsulas de licopeno
MET	Microscopia Eletrônica por Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica por Varredura
NL	Nanopartículas lipídicas
PBS	Tampão de fosfato
PB4	<i>poly(vinylalcohol-co-vinyl-4-methoxycinnamate)</i>
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PCPLC	<i>poly(ethylene oxide)-4-methoxycinnamoylphthaloylchitosan</i>
PLA	Ácido polilático
R	Radicais livres
RESS	Expansão Rápida da Solução Supercrítica
RESS-SC	Expansão Rápida Supercrítica Cosolvente
RMN^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
r-CM	Nanoencapsulamento de Micelas de Caseína por Autojunção
SAS	Supercrítico Anti-Solvente de Precipitação
Span 60	Monoesterato de sorbitano
Tween 80	Polisorbato
UV	Luz ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia de Absorção de Luz Ultravioleta Visível
β -ionona	Trimetil ciclohexano conjugado
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio triplete

*CAR

Carotenoide no estado excitado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	COMPOSTOS BIOATIVOS	16
3.2	CAROTENOIDES	19
3.2.1	Descrição Geral	19
3.2.2	Estrutura	22
3.2.3	Carotenoides e Saúde	23
3.2.3.1	Atividade Antioxidante	24
3.2.3.2	Precursores de Vitamina A	25
3.2.3.3	Proteção da pele e filtragem da luz solar	27
3.2.4	Biodisponibilidade e Absorção	27
3.2.5	Importância Comercial e Industrial	28
3.3	NANOTECNOLOGIA	30
3.3.1	Compostos Bioativos Nanoencapsulados	31
3.3.1.1	Nanoencapsulamento por Nanopartículas de Lipídios	32
3.3.1.2	Nanoencapsulamento por Fluidos Supercríticos	33
3.3.1.3	Nanoencapsulamento por Micelas de Caseína por Autojunção	34
3.3.2	Descrição dos Estudos com Carotenoides Nanoencapsulados em Dispersão	35
3.3.2.1	Astaxantina	35
3.3.2.2	β-caroteno	37
3.3.2.3	Bixina	39
3.3.2.4	Licopeno	43
3.3.2.5	Luteína	44
4.	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Por meio da ingestão de alimentos há possibilidade de proteção do organismo contra doenças crônicas tais como obesidade, *diabetes mellitus*, dislipidemias, hepatopatias e cânceres. Isto atrai a atenção de pesquisadores e da indústria de alimentos, que objetivam desenvolver alimentos ricos em compostos biologicamente ativos para a promoção da saúde (DEMBITSKY et al., 2011). Devido a isso, muitos estudos sobre compostos bioativos têm sido realizados. Segundo a Resolução RDC nº2 de 07 de janeiro de 2002, os compostos bioativos são aqueles que são encontrados nos alimentos, tanto de origem natural quanto sintética e que possuem ação metabólica ou fisiológica específica, desde que comprovada a sua segurança para o consumo humano (BRASIL, 2002).

Os compostos fenólicos e os carotenoides são classes de maior importância biológica e química. Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis que conferem as colorações amarelo, laranja e vermelho nos vegetais, pássaros, crustáceos, peixes e insetos. Aproximadamente 600 compostos são encontrados na natureza e dentre eles se destacam o β -caroteno, α -caroteno, luteína, zeaxantina, licopeno, astaxantina e bixina. Esses compostos são considerados promotores da saúde humana, pois são excelentes antioxidantes e auxiliam na prevenção de doenças crônicas, como o câncer e doenças cardiológicas (GOMES, 2007; OHMIYA et al., 2008).

Comercialmente os carotenoides são utilizados como corantes, suplementos nutricionais e em cosméticos. Na indústria alimentícia esses compostos são utilizados para enriquecer os alimentos nutricionalmente e como corantes. Alguns dos carotenoides usados para estes fins incluem a astaxantina, a cantaxantina, o β -caroteno, a bixina, a norbixina e o licopeno (AKSU e EREN, 2007; HAMERSKI et al., 2013).

A nanotecnologia compreende a manipulação de materiais a escalas nanométricas (40 a 70 nm), o que aumenta a área de superfície das partículas por massa e as torna mais biologicamente ativas. Essa tecnologia mostra seu grande potencial em produtos fitoterápicos e alimentos funcionais para proporcionar maior biodisponibilidade, por exemplo, de compostos bioativos que pode agregar melhorias à saúde humana (CHAU et al., 2007). Na indústria alimentícia a nanotecnologia é usada para modificar a estrutura e qualidade dos alimentos, para

melhorar o aspecto sensorial, a absorção e biodisponibilidade de nutracêuticos e suplementos, embalagens, poder antimicrobiano e nanosensores que rastreiam e acompanham o estado dos alimentos durante o transporte e armazenamento (FERNÁNDEZ et al., 2008).

Considerando que, a utilização dos carotenoides na indústria de alimentos se depara com o problema da baixa estabilidade e hidrofobicidade frente aos diversos processos industriais, a nanotecnologia pode ser uma técnica promissora para esses pigmentos, proporcionando estabilidade e solubilidade em meio aquoso a esses compostos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo reunir as pesquisas científicas sobre a utilização da nanotecnologia para encapsular carotenoides em dispersão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

Com a dieta há proteção do organismo contra doenças crônicas tais como obesidade, *diabetes mellitus*, dislipidemias, hepatopatias e cânceres. Isto atrai a atenção da comunidade científica e da indústria alimentícia que tem como comum objetivo desenvolver alimentos ricos em composto(s) biologicamente ativo(s) que apresentam benefícios à saúde. (DEMBITSKY et al., 2011). Devido a isso, muitos estudos sobre compostos bioativos têm sido realizados.

Segundo AJILA et al., (2007) pesquisas demonstram melhoria na saúde e diminuições de doenças crônicas devido ao consumo de vegetais, frutas e grãos. Isso ocorre não somente pela ingestão de nutrientes básicos, mas também pela ação associada de compostos bioativos, pois estes interferem em processos químicos e biológicos causadores de enfermidades. CLARDY e WALSH (2004), por exemplo, já relataram que os vegetais são excelentes fontes de compostos bioativos que podem atuar como preventivos de cânceres, doenças infecciosas e imunomodulação.

Os compostos bioativos são substâncias químicas sintetizadas por organismos vivos, que apresentam efeitos biológicos em humanos e animais. Podem ser produzidos como mecanismo de defesa contra fatores adversos, sendo chamados metabólitos secundários (DENNY e BUTTRISS, 2007) e podem ser classificados como substâncias funcionais. Estes compostos têm atividades biológicas promotoras à saúde, tais como atividades antioxidantes, antiinflamatórias e hipocolesterolêmica (KWAK e JUKES, 2001).

Segundo a Resolução RDC nº2 de 07 de janeiro de 2002, os compostos bioativos são aqueles que estão presente em fontes alimentares, sendo de origem natural ou sintética, que possuem ação metabólica ou fisiológica específica, desde que comprovada à segurança para o consumo humano (BRASIL, 2002).

Os estudos dos compostos bioativos foram a inspiração do conceito de alimentos funcionais. Em 1980, no Japão, o termo se originou, pois substâncias bioativas foram utilizadas por indústrias alimentícias para a descrição de alimentos fortificados com ingredientes específicos que trouxeram benefícios à saúde humana (CÂNDIDO e CAMPOS, 2005).

Há uma gama de compostos bioativos que é estudada devido aos efeitos positivos de uma dieta enriquecida de frutas e hortaliças. Esses compostos apresentam características em comum: pertencem ao reino vegetal, são substâncias orgânicas geralmente de baixo peso molecular, não indispensáveis e nem sintetizadas pelo organismo humano e apresentam características promotoras da saúde quando consumidos em quantidades adequadas (HOLST e WILLIAMSON, 2008).

CARRATÚ e SANZINI (2005) afirmam que os compostos bioativos agem biologicamente em atividades antioxidantes, modulação de enzimas de detoxificação, estímulo do sistema imune, redução à agregação plaquetária, modulação do sistema hormonal, redução da pressão arterial e atividade antibacteriana e antiviral.

A oxidação nos sistemas biológicos acontece pela ação de radicais livres (moléculas eletronegativas) que são gerados por fontes endógenas e exógenas. As fontes exógenas podem ser o tabaco, poluição, radiação solar, estresse, entre outros. As fontes endógenas provêm de processos biológicos naturais do organismo. Os diferentes tipos de radicais livres englobam espécies reativas de oxigênio, tais como íon superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), alcóxila (RO^-), peróxila (ROO^-), peridroxila (HOO^-), oxigênio singlete (1O_2), complexos com metais de transição como Fe^{3+}/Fe^{2+} e Cu^{2+}/Cu^+ , radicais de carbono como triclorometil (CCl_3^-), radicais de enxofre como tiol (RS^-) e também espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico (NO^-) (SOARES, 2002).

A integridade de macromoléculas ocorre devido à proteção antioxidante contra os danos ocasionados pelos radicais livres. Essa proteção diminui conforme ocorre o envelhecimento celular e também é agravada por fatores do meio. A defesa acontece pela combinação da ação de compostos como vitaminas C e E, carotenoides, enzimas antioxidantes que dependem do cobre, magnésio, selênio e zinco e outros fitonutrientes que, agregados, reagem e proporcionam renovação e regeneração celular. Assim, a deficiência de algum desses compostos pode causar danos severos ao sistema imune (DAMODARAN et al., 2010).

Os compostos bioativos podem ser nomeados de fitoquímicos e têm sido isolados de frutas e vegetais. Eles podem ser divididos em classes, sendo os carotenoides e os compostos fenólicos as classes com maior importância biológica e química (DAMODARAN et al., 2010).

Os compostos fenólicos estão distribuídos amplamente no reino vegetal e são a maior categoria de agentes fitoquímicos. Estes compostos apresentam um ou mais grupos hidroxila ligados a um anel aromático e sua classificação pode ser realizada de acordo com o número de anéis fenólicos e elementos estruturais ligados a estes: flavonas, flavononas, flavonóis, isoflavonas, flavanois (catequinas) e antocianinas (KING e YOUNG, 1999).

A maioria desses polifenóis apresenta características biológicas e químicas em comum: atividade antioxidante, capacidade de sequestrar eletrófilos, capacidade de quelar metais (como ferro e cobre), potencial para produzir peróxido de hidrogênio na presença de alguns metais e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares. Os flavonoides ajudam a prevenir doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e alguns cânceres (DAMODARAN et al., 2010).

Dentre os compostos fenólicos com propriedade antioxidante, destacam-se as antocianinas e os flavonois. As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis, e conferem as variações de cores entre laranja, vermelho e azul que são encontradas em frutas, vegetais, flores, folhas e raízes. Os flavonois são pigmentos de cores branca ou amarela clara, também encontrados no reino vegetal. Considerando a tendência mundial em utilizar pigmentos naturais como corantes em alimentos, destacam-se as antocianinas com papel primordial nessa categoria. Esse interesse também é influenciado pelas observações de seu potencial benéfico à saúde decorrente de sua ação antioxidante (ESPÍN et al., 2000).

A classe de carotenoides possui dois grupos: os carotenos, que consistem em hidrocarbonetos puros, e as xantofilas, que constituem em hidrocarbonetos e grupos oxigenados. Eles conferem as cores amarelo, laranja e vermelho nos vegetais. Aproximadamente 600 pigmentos constituem essa classe e são encontrados na natureza destacando-se o β -caroteno, o α -caroteno, a luteína, a zeaxantina, o licopeno, a astaxantina e a bixina. Esses pigmentos são fundamentais na saúde humana, pois são excelentes antioxidantes e auxiliam na prevenção de doenças crônicas, como o câncer e doenças cardiológicas (GOMES, 2007; OHMIYA et al., 2008).

3.2 CAROTENOIDES

3.2.1 Descrição Geral

Os carotenoides são uma classe de pigmentos lipossolúveis sintetizados em plantas, algas e bactérias fotossintetizantes. Tem como estrutura química uma cadeia de 40 carbonos que deriva do isopreno. Eles são responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho nos vegetais. Estima-se que exista na natureza cerca de 600 carotenoides, sendo que aproximadamente 50 se fazem presente na alimentação. Destes compostos o β -caroteno, o α -caroteno, o β -criptoxantina, a luteína, a zeaxantina e o licopeno (Figura 1) são responsáveis por aproximadamente 90% das concentrações plasmáticas dos carotenoides encontrados em humanos (VOUTILAINEN et al., 2006).

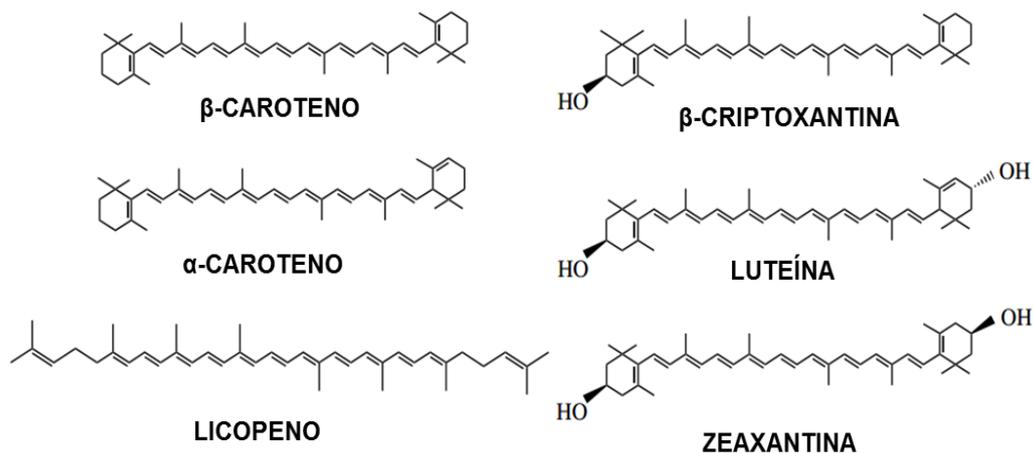


Figura 1. Estrutura dos carotenoides predominantes no plasma humano, adaptado de KRINSKY e JOHNSON, 2005.

As fontes de carotenoides mais comuns são: tomates (licopeno), cenouras (α e β -caroteno), milho (luteína e zeaxantina), pimentas vermelhas (capsantina), urucum (bixina) e batata doce (β -caroteno). Outras fontes destes compostos são: abóbora, pimentão vermelho e amarelo, inhame, cará, azeitona roxa, repolho roxo, folhas verde-escuras (como brócolis e espinafre), alface, aipo, maçã, damasco, manga, ameixa, frutas vermelhas, melancia, laranja, tangerina, nectarina e mamão (DAMODARAN et al., 2010).

Dentre as características biológicas e químicas dos carotenoides encontra-se um sistema de ligações duplas conjugadas que são responsáveis por fornecer cor e, também, pela ação antioxidante. Contudo, esse mesmo sistema é responsável pela instabilidade, isomerização e oxidação dos carotenoides durante o processamento e armazenamento. Apesar dessas moléculas serem suscetíveis à oxidação, a sua biodisponibilidade pode ser melhorada pela aplicação de processamento, resultado da dissociação ou enfraquecimento da ligação entre os carotenoides e a matriz das células vegetais (FENÁNDEZ et al., 2012).

Além disso, a forma de preparação dos alimentos que contém carotenoides pode interferir na sua biodisponibilidade. Em folhas verdes, estes pigmentos estão presentes nos cloroplastos como complexos de pigmento-proteína e para sua liberação, requerem a desintegração do composto. Em outras frutas e hortaliças podem se encontrar em gotículas de gordura, das quais podem se liberar facilmente. O cozimento dos alimentos contribui para a liberação dos carotenoides, porém se for prolongado, pode causar a degradação oxidativa dos mesmos (SAUNDERS et al., 2000).

Para OHMIYA et al. (2008) os carotenoides são fundamentais para a saúde humana devido a função anticancerígena, a diminuição de doenças cardiovasculares, doenças crônicas, doenças oftálmicas, redução da degeneração macular relacionada ao envelhecimento e, também por serem precursores de vitamina A (retinol). O amarelo brilhante das xantofilas, luteína e zeaxantina podem se acumular na fóvea da retina, atuando como antioxidantes e filtros de luz. Nas plantas esses pigmentos desempenham papéis fundamentais como pigmento acessório na fotossíntese para captar energia e proteger contra a foto-oxidação.

HAMMOND e RENZI (2013) constataram que nenhum dos carotenoides são considerados nutrientes essenciais. Não há compostos diretamente envolvidos numa via metabólica essencial e, nem a ausência relativa de um carotenoide é associada exclusivamente com a indução de uma deficiência específica ou de uma doença crônica. Por estas razões o *Food and Drug Administration* (FDA) ainda não aprovou as alegações de saúde para esses compostos.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) concede alegação de saúde funcional a alimentos que contenham no produto final licopeno, zeaxantina e luteína. Utilizando a luteína como exemplo, no rótulo do alimento deve constar que: "A luteína tem ação antioxidante que protege as células contra os

radicais livres. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. É exigido que se acrescente os requisitos específicos: a quantidade de carotenoide, contida na porção do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação. Produtos em cápsulas, tabletes, comprimidos e similares, devem declarar a quantidade do carotenoide na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Deve-se ainda apresentar o processo detalhado de obtenção e padronização da substância, o que inclui solventes e outros compostos utilizados, bem como o laudo com o teor do (s) resíduo(s) do(s) solvente(s) e do laudo com o grau de pureza do produto (BRASIL, 1999).

Mesmo consumido em doses elevadas, como suplementos purificados, os carotenoides em geral não são considerados tóxicos. Entretanto, altas doses de cantaxantina podem causar uma forma de retinopatia reversível. Além disso, a elevada ingestão de β -caroteno (na forma de suplemento, 20-30 miligramas diárias) é contraindicada para fumantes devido ao risco aumentado de câncer de pulmão e câncer de estômago. A ingestão excessiva de alguns dos principais carotenoides também pode causar carotenemia, um amarelecimento reversível da pele (DRUESNE et al., 2010).

O estudo populacional ATBC (*Alpha-Tocopherol Beta-Carotene*) realizado com fumantes, no qual se administrou suplementação de β -caroteno e α -tocoferol mostra que no grupo suplementado com β -caroteno houve aumento da tendência do desenvolvimento ao câncer de pulmão e da mortalidade. O estudo populacional posterior, CARET (*The Beta Carotene and Retinol Efficacy Trial*), também realizado com fumantes, apresentou a mesma tendência no desenvolvimento do câncer de pulmão e da mortalidade no grupo em que foi administrado β -caroteno, diferentemente do grupo suplementado com vitamina E (ATBC, 1994). Ainda não há consenso entre os pesquisadores sobre os efeitos pró-oxidantes dos carotenoides, porém, devido aos estudos existentes, é possível concluir que os efeitos antioxidantes dependem do meio no qual se encontram os sistemas biológicos (CERQUEIRA et al., 2007).

3.2.2 Estrutura

Os carotenoides foram caracterizados quimicamente pela primeira vez por Willstatter em 1907. A maioria dos compostos apresenta como estrutura básica um tetraterpeno com esqueleto de 40 átomos carbono, formado por 8 unidades de isopreno ligadas de forma que a simetria é invertida no centro (Figura 2) (DELGADO et al., 2000).

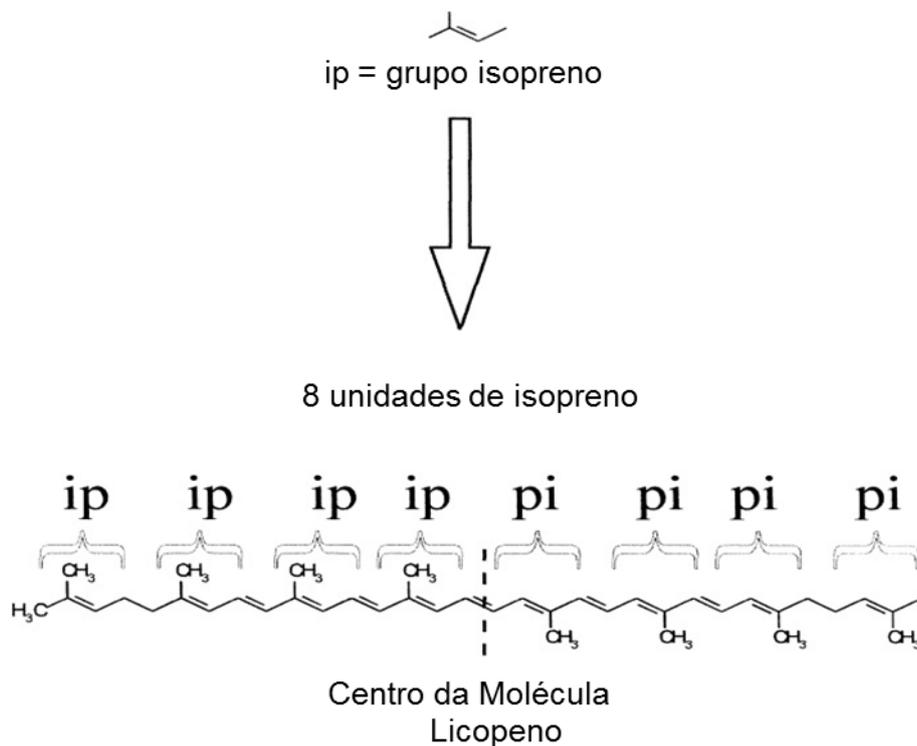


Figura 2. Estrutura básica dos carotenoides, adaptado de DELGADO et al., 2000.

Os carotenoides podem ser divididos em dois grupos: (a) caroteno: são hidrocarbonetos que apresentam ligações diretas entre carbono e hidrogênio (CH) (ex. α e β -caroteno e licopeno) e (b) xantofilas: apresentam ligações diretas entre carbono e hidrogênio (CH), mas apresentam também ligações com oxigênio, que podem ser em grupos hidroxila (OH), grupos carbonila (C=O) ou como uma combinação de ambos (ex. luteína, zeaxantina e astaxantina). Alguns carotenoides são precursores de vitamina A pois apresentam a estrutura cíclica β -ionona (trimetil ciclohexano conjugado) em suas moléculas (ex. α , β e γ -caroteno e β -criptoxantina) (HAMMOND e RENZI, 2013). Além dessa estrutura, para que um carotenoide apresente atividade pró-vitáminica A, o composto deve apresentar também uma

cadeia lateral poliênica ligada. A outra extremidade da molécula pode variar quanto à estrutura, mas não deve conter menos do que 11 carbonos. Por esta razão, nem todos os carotenoides apresentam função de pró-vitamina A (FERNÁNDEZ et al., 2012).

O sistema de duplas ligações conjugadas atua como cromóforo, ou seja, capacidade de absorção de luz na região visível (400 a 500 nm), o que confere cor aos alimentos. São necessárias aproximadamente sete ligações duplas conjugadas para que o carotenoide apresente coloração. As duplas ligações conjugadas conferem a estes pigmentos alta reatividade química e por isso podem ser facilmente isomerizados e oxidados. O aumento do número dessas ligações conjugadas resulta em maiores bandas de absorção, em maiores comprimentos de onda o que torna os carotenoides mais avermelhados (MELÉNDEZ et al., 2007; BORGHESI et al., 2011).

3.2.3 Carotenoides e Saúde

MAIANI et al. (2008) designaram a esses compostos atividades biológicas importantes. A mais reconhecida e estudada é sua função como pró-vitamina A. Todavia, destacam-se outras atividades, como capacidade antioxidante, filtração da luz solar, facilitação da comunicação celular e atuação na resposta imune.

O licopeno é o carotenoide presente em produtos avermelhados como o tomate. Este caroteno previne a oxidação do colesterol ruim LDL (Low Density Lipoproteins), reduz o risco do desenvolvimento de arteriosclerose e doenças coronárias. Alguns estudos demonstram que o consumo diário de produtos derivados de tomate reduz a oxidação deste colesterol. A absorção do licopeno provido de alimentos processados é mais eficiente que o tomate in natura, pois durante o processamento térmico o licopeno se liga quimicamente a outros compostos; que o deixa mais biodisponível. Demais pesquisas sugerem que o licopeno pode reduzir o risco de câncer de próstata, pulmão, pele e bexiga (KRINSKY e JOHNSON, 2005; HAMERSKI et al., 2013). Estudos também demonstram que a quantidade de licopeno presente no sangue humano é inversamente proporcional à quantidade de tumores cancerígenos na próstata (ISHIDA e CHAMPMAN, 2009).

PANG et al. (2010) sugerem que o consumo de β -caroteno pode inibir alguns tipos de câncer e outras doenças por meio da eliminação de radicais livres. Os carotenoides atuam no sistema imune, na comunicação intracelular e apresentam efeitos benéficos contra doenças relacionadas ao envelhecimento. Além disso, há efeito sinérgico entre carotenoides e outros nutrientes dos vegetais como, por exemplo, a associação entre o β -caroteno e as vitaminas C e E. Essa combinação auxilia na proteção celular, que, provavelmente decorre da capacidade do β -caroteno em destruir os radicais livres e reparar as moléculas de tocoferol produzidos pela ação do α -tocoferol.

A astaxantina, é um dos diversos pigmentos carotenoides encontrada em animais aquáticos, tais como camarões, caranguejos e salmão. A aplicação de astaxantina como um nutracêutico, ingrediente funcional para a prevenção e tratamento de várias doenças, bem como para a melhoria das respostas imunes, vem crescendo cada vez mais. Estudos demonstram que a astaxantina é significativamente mais eficaz a impedir a passagem de luz UV do que β -caroteno e luteína, e possui 10 vezes maior atividade antioxidante que o β -caroteno e 100 vezes maior atividade antioxidante que a vitamina E. É uma molécula altamente insaturada que se decompõe facilmente quando é exposta ao calor, luz e oxigênio (TACHAPRUTINUNA et al., 2009).

A luteína é um pigmento natural amplamente distribuído em frutas, legumes, flores e algumas algas. Ela tem sido aplicada como um aditivo alimentar e é conhecida por prevenir o envelhecimento, proteger os olhos, ter elevada capacidade antioxidante, prevenir doenças cardíacas e tem função anticancerígena. Devido à instabilidade térmica e óptica aplicação de luteína nos alimentos é limitada. Portanto, são necessários estudos de métodos de utilização desse pigmento que promovam aumento na estabilidade (JIN et al., 2009).

3.2.3.1 Atividade Antioxidante

Os carotenoides, em geral são antioxidantes alimentares com capacidade de inativar os oxigênios reativos e proteger o organismo contra os danos oxidativos (MAIANI et al., 2008). Oxigênios reativos são gerados internamente pelo metabolismo, através da atividade física e alimentação. Isso pode causar danos oxidativos à célula, devido a uma série de reações em cadeia de danos às

macromoléculas. O oxigênio reativo, singlete ($^1\text{O}_2$) pode ser formado através da transferência de energia de um composto em excitação para o oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$). Quando formado o carotenoide no estado excitado (*CAR), este pode retornar ao estado fundamental com dissipação de energia na forma de calor. As reações dos carotenoides com radicais livres levam à transferência de elétrons ou possíveis reações adicionais. A reação do *CAR com uma molécula de oxigênio pode levar à formação de um peróxido (Figura 3). Alguns estudos mostram que a capacidade do carotenoide quelar o oxigênio singlete se deve a quantidade de ligações duplas conjugadas aos grupos ligados às extremidades das cadeias (YOUNG e LOWE, 2001).

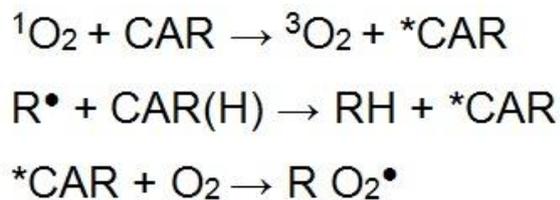


Figura 3. Possíveis reações quelantes dos carotenoides, adaptado de YOUNG e LOWE, 2001.

3.2.3.2 Precusores de Vitamina A

No organismo a vitamina A exerce funções importantes como auxiliar os processos normais de crescimento e desenvolvimento, proteger a pele, integridade do funcionamento do sistema imune e formação de pigmentos fotossensíveis da retina (rodopsol). Esta é considerada a principal função nutricional dos carotenoides. (FERNÁNDEZ et al., 2012).

Aproximadamente 50 carotenoides apresentam atividade pró-vitamínica A, sendo o β -caroteno (Tabela 1) é o principal carotenoide com essa atividade. Esse composto apresenta excelente eficiência de conversão, uma vez que sua clivagem resulta em 2 moléculas de vitamina A (Figura 4). Outros precursores importantes de vitamina A são o α -caroteno e o β -criptoxantina, pois apresentam pelo menos um anel ionona no final de sua estrutura (MELÉNDEZ et al., 2004).

Tabela 1. Atividade pró-vitamina A (%) de acordo com a conversão total do β -caroteno.

Carotenoide	Atividade (%)
<i>trans</i> - β -caroteno	100
9- <i>cis</i> - β -caroteno	38
13- <i>cis</i> - β -caroteno	53
<i>trans</i> - α -caroteno	53
9- <i>cis</i> - α -caroteno	13
13- <i>cis</i> - α -caroteno	16
<i>trans</i> - β -criptoxantina	57
9- <i>cis</i> - β -criptoxantina	27
15- <i>cis</i> - β -criptoxantina	42
5,6-epóxi- β -caroteno	21
5,8-epóxi- β -caroteno	52
γ -caroteno	42-50
β -zeacaroteno	20-40

Fonte: Adaptado de FERNÁNDEZ et al., 2012.

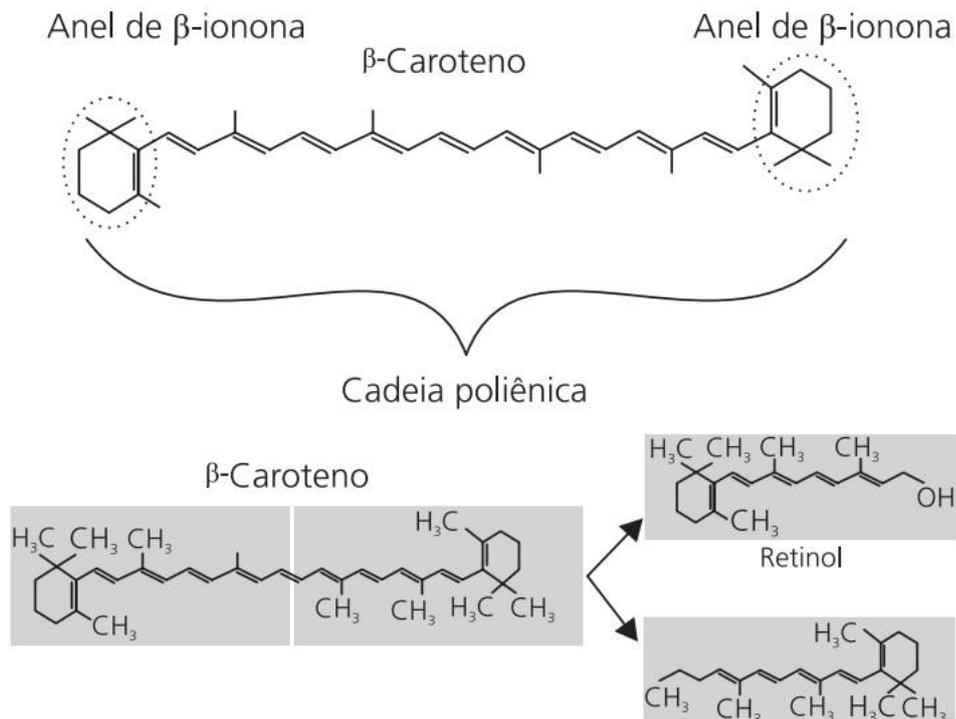


Figura 4. Estrutura química e clivagem do β -caroteno, SAUNDERS, 2000.

3.2.3.3 Proteção da pele e filtragem da luz solar

A exposição da pele a raios solares ultravioletas (UV's) emitidos no comprimento de onda na faixa da luz azul (430 a 500 nm), resulta em reações biológicas e químicas. Essas reações são denominadas de estresse foto oxidativo. Biomoléculas celulares podem ser afetadas devido a essa exposição e causar eritema (vermelhidão da pele), envelhecimento precoce da pele, desenvolvimento de fotodermatoses e câncer de pele. Compostos com função pró-vitâmica A auxiliam na manutenção, crescimento e diferenciação epiteliais. O β -caroteno foi considerado muitas vezes um protetor solar, por esse motivo observa-se que possa ser benéfico o consumo de suplementos orais de carotenoides quando haja exposição prolongada ao sol (SIES e STAHL, 2004).

BAYERL (2008) afirma que o β -caroteno é indicado na forma de suplemento a portadores de protoporfiria eritropoiética, uma doença que tem como característica a fotossensibilidade incomum da pele. Esse carotenoide também é utilizado no tratamento de outras doenças induzidas ou agravadas pela exposição a raios UV, como urticária solar, erupções polimórficas, reações alérgicas a fármacos e lúpus eritematoso.

A longa cadeia dos carotenoides confere a eles a capacidade de filtrar a luz visível. Essa propriedade é importante, em específico aos olhos, onde carotenoides absorvem a luz azul, para proteção das células contra de danos oxidativos. A região chamada de mácula lútea da retina deve sua cor amarelada pelo acúmulo de luteína e zeaxantina. A capacidade de filtragem de luz, atribuída aos carotenoides, foi classificada na seguinte sequência decrescente: luteína, zeaxantina, β -caroteno e licopeno (KRINSKY e JONHSON, 2005).

3.2.4 Biodisponibilidade e Absorção

A biodisponibilidade é afetada pelo tipo de matriz alimentar onde se encontram os carotenoides. Outros fatores, além da matriz alimentar, também podem diminuir a biodisponibilidade desses compostos tais como: enzimas, digestibilidade, acidez estomacal, tabagismo, consumo de álcool, idade, composição corporal, sexo, processamento do alimento, outros nutrientes, fibras dietéticas

solúveis, infecções, ineficiência de enzimas e fatores genéticos (LAKSHMINARAYANA e BASKARAN, 2013).

Para HOF et al. (2000) o alimento processado por aquecimento pode aumentar até seis vezes a biodisponibilidade dos carotenoides. Isso ocorre porque o aquecimento e a homogeneização dissociam ou enfraquecem o complexo formado entre as proteínas e os pigmentos. No entanto, o aquecimento prolongado causa a isomerização dos compostos da forma *trans* para a *cis* que é menos biodisponível.

Na presença de fibras os carotenoides são pouco absorvidos, pois as fibras são polímeros de alta massa molecular e isso impede a formação de micelas, o que implica na redução da entrada dos compostos para células de absorção. A liberação se inicia através da mastigação e ação de enzimas salivares e, posteriormente são emulsificados em pequenas gotículas de gordura no estômago. A partir dessas gotículas lipídicas, os carotenoides são transferidos para micelas mistas formadas pela ação de sais biliares, fosfolipídios biliares, lipídios dietéticos e seus produtos de hidrólise. As micelas mistas migram por difusão simples para os eritrócitos intestinais e estas são transportadas, da mucosa intestinal, por quilomícrons e lipoproteínas para o sistema linfático que fará esses carotenoides circularem na corrente sanguínea. Após, eles são armazenados no fígado e no tecido adiposo; e a sua distribuição depende de sua hidrofobicidade e da lipoproteína envolvida (LAKSHMINARAYANA e BASKARAN, 2013).

3.2.5 Importância Comercial e Industrial

Comercialmente, os carotenoides são usados como corantes alimentícios, suplementos nutricionais e em cosméticos. A maioria dos carotenoides utilizados industrialmente é obtida por via química ou por extração de plantas ou algas. Outra alternativa em destaque é a obtenção de carotenoides através de microrganismos. Devido à preocupação do uso de aditivos em alimentos há grande interesse nessa alternativa, pois pode se obter, naturalmente, carotenoides por processos biotecnológicos. As principais características desse método são: produção em pequeno espaço, não influência das condições ambientais, possibilidade de controle do cultivo e utilização de substratos de baixo custo (AKSU e EREN, 2007).

Apesar do custo de produção reduzido à aplicação de carotenoides quimicamente sintetizados, na indústria de alimentos e de cosméticos, é restrita

devido à sua toxicidade relacionada aos solventes utilizados. Por esta razão a produção por microrganismos cresce cada vez mais. Nos últimos anos, muitos estudos sobre a síntese de carotenoides por microrganismos foram apresentados, incluindo, as bactérias *Flavobacterium* e *Micrococcus*, as algas *Dunaliella* e *Haematococcus*, os fungos *Blakeslea trispora*, e as leveduras do gênero *Phaffia*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (CHEN et al., 2006).

Os carotenoides servem também de base para a produção de aromatizantes. As damasconas e iononas são bastante difundidas na indústria de aromas e fragrâncias. Esses compostos apresentam baixo limite de percepção, então, são compostos de aroma altamente potentes, o que os torna importantes aditivos na indústria alimentícia. Estes conferem atributos florais e frutados em vinhos, chás, tabacos e uvas. Contudo, a obtenção de compostos aromáticos através da extração de plantas é um processo de baixo rendimento, portanto, sua principal fonte é sintética (WANG et al., 2012).

Na indústria de alimentos os carotenoides são utilizados para enriquecer o alimento nutricionalmente e como corantes para pigmentar alimentos incolores ou para uniformizar a coloração dos produtos. Alguns dos carotenoides usados para estes fins incluem a astaxantina, a cantaxantina, o β -caroteno, a bixina, a norbixina e o licopeno. O urucum é uma importante fonte de bixina, pois não é tóxico e apresenta alto valor nutritivo; a sua utilização na indústria de alimentos é como corante, principalmente, em derivados lácteos, embutidos, queijos, doces, massas e licores. O licopeno é mais utilizado na indústria como aditivo para manter a qualidade nutricional e sensorial do produto, pois evita a oxidação do alimento durante o processamento e o armazenamento. O β -caroteno é utilizado para pigmentar iogurtes, bebidas, margarina, queijos, bolos, massas, entre outros (HAMERSKI et al., 2013).

AKSU e EREN (2007) afirmam que além do uso tradicional dos carotenoides como corantes, esses compostos também são utilizados como aditivos em rações para aquicultura e avicultura. As rações aditivadas com carotenoides têm como objetivo de promover a pigmentação adequada de alguns animais ou subprodutos animais, como por exemplo, o uso da astaxantina e cantaxantina na ração de salmão e camarão, o uso da luteína e zeaxantina para pigmentação da gema dos ovos de galinha.

Contudo, a utilização dos carotenoides na indústria de alimentos se depara com o problema da baixa estabilidade desses compostos e sua hidrofobicidade frente aos diferentes processos. Dessa maneira a nanotecnologia pode ser uma técnica promissora para esses pigmentos, uma vez que essa técnica pode proporcionar compostos nanoencapsulados com maior estabilidade e solubilização desses pigmentos em meio aquoso (MOZAFARI et al., 2008; SAÍZ-ABAJO et al., 2013).

3.3 NANOTECNOLOGIA

O primeiro conceito de nanotecnologia foi estabelecido em 1959 pelo físico Richard Feynman em sua palestra *There's plenty of room at the bottom*. Feynman abordou a possibilidade de materiais que manipulasse átomos e moléculas individuais, imaginando que toda biblioteca britânica estivesse escrita na cabeça de um alfinete; assim previu a capacidade de estudar a matéria em nanoescala. No início do ano de 1970 a indústria objetivou o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos (em microscópicas partículas) em chips de silício. O prefixo nano se refere a uma escala de medida, na qual um nanômetro é equivalente um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro (SAHOO et al., 2007).

A nanotecnologia compreende a manipulação de materiais a escalas nanométricas (40 a 70 nm) atômicas, molecular e macromolecular, o que aumenta a área de superfície das partículas por massa e as torna mais biologicamente ativas (maior interação com sua matriz). Essa tecnologia emergente mostra seu grande potencial em produtos nutracêuticos e alimentos funcionais para proporcionar maior biodisponibilidade aos compostos bioativos, o que pode agregar melhorias na saúde humana (CHAU et al., 2007).

Segundo PÉREZ-ESTEVE et al. (2013) os nanomateriais apresentam diferentes propriedades físicas e químicas, tais como tamanho, forma, área superficial, estado de aglomeração, composição química que não são aparentes em macromateriais. Na última década as aplicações nanotecnológicas cresceram muito na indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia, construção civil, entre outras.

Na indústria de alimentos a nanotecnologia é aplicada para modificar a estrutura e qualidade dos alimentos, para melhorar o aspecto sensorial, a absorção

e biodisponibilidade de nutracêuticos e suplementos, para embalagens, podendo ter ação antimicrobiana, bem como de nanosensores que rastreiam e acompanham o estado dos alimentos durante o transporte e armazenamento (FERNÁNDEZ et al., 2008).

Há uma diversidade de aplicações para a nanotecnologia, como nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões, nanocápsulas, nanocompósitos para embalagens de alimentos, entre outras. Entretanto a utilização da micro e a nanonanoencapsulação em alimentos é crescente devido às importantes vantagens que essas tecnologias conferem ao material encapsulado. Com essas técnicas o material ganha mais estabilidade, porque são protegidos das ações enzimáticas e de alterações químicas do meio (MOZAFARI et al., 2008).

Há muitos estudos e investimentos no campo da nanotecnologia para desenvolver partículas de ensaio e sistemas de micro/nano que serão aplicadas nas indústrias de alimentos. Entretanto, as indústrias alimentícias estão relutantes na utilização de nanopartículas em produtos alimentares, devido à falta de uma legislação sobre a segurança dos nanocompostos e suas implicações para a saúde (SAÍZ-ABAJO et al., 2013). A falta de informações sobre a possível toxicidade dos produtos nanotecnológicos faz com que seja difícil avaliar a segurança da quantidade de ingestão diária aceitável. Além disso, a toxicidade potencial de nanopartículas de acordo com o seu tamanho, forma, composição química, estrutura da superfície, quantidade e vias de exposição, também deve ser avaliada, pois suas propriedades podem mudar na escala nanométrica (PÉREZ-ESTEVE et al., 2013; CHAU et al., 2007).

3.3.1 Compostos Bioativos Nanoencapsulados

Para GUTIÉRREZ et al. (2013) as técnicas de nanonanoencapsulamento do β -caroteno e outros carotenoides que são facilmente adaptáveis para a agricultura, indústria de alimentos e que são compatíveis com compostos lipofílicos e lábeis são: nanonanoencapsulamento por nanopartículas de lipídios, nanonanoencapsulamento por fluídos supercríticos e nanonanoencapsulamento por micelas de caseína por autojunção.

3.3.1.1 Nanoencapsulamento por Nanopartículas de Lipídios

As nanopartículas lipídicas (NL) são sistemas coloidais de transporte e são utilizadas para nanoencapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos funcionais, como, por exemplo, lipídios bioativos e drogas. A fase líquida lipídica e uma solução aquosa de surfactante são homogeneizados em uma temperatura acima da temperatura de fusão (geralmente acima de 40°C) o que produz uma fina dispersão de emulsão de óleo em água (o/a). A partícula se estabiliza por surfactantes. A emulsão é arrefecida em temperaturas abaixo da temperatura de cristalização do lipídio transportador, que auxilia a formação de partículas sólidas. O tamanho das nanopartículas lipídicas variam de 40 a 1000 nanômetros. O núcleo lipídico em nanopartículas se encontra em estado sólido (HELGASON et al., 2009).

A utilização de lipídios sólidos ao invés de lipídios líquidos aumenta o controle sobre a velocidade de liberação dos compostos nanoencapsulados e melhora a estabilidade desses compostos. Isso ocorre devido aos fenômenos físico-químicos associado ao estado físico da fase lipídica. Em uma matriz sólida a mobilidade de agentes reativos é menor que em uma matriz líquida o que proporciona menores velocidades de reações químicas degradativas. Dentre as técnicas utilizadas para a obtenção de nanopartículas de lipídios sólidos a homogeneização sob alta pressão a quente ou a frio é a mais utilizada na indústria de alimentos (WISSING et al., 2004).

Na homogeneização a quente o lipídio está fundido em todas as etapas de produção (a temperatura do processo é acima da temperatura de fusão do lipídio), o que permite maior migração do composto bioativo do núcleo para a fase aquosa e acarreta uma baixa eficiência de retenção. O composto bioativo é dissolvido no lipídio líquido e a massa resultante é dispersada em uma solução aquosa surfactante quente. A nanoemulsão é homogeneizada a alta pressão (100 a 1500 bar). Em seguida o arrefecimento da nanoemulsão leva à cristalização de lipídios em nanopartículas. Em contrapartida, na homogeneização a frio o composto bioativo é incorporado no lipídio fundido e a mistura é solidificada em nitrogênio líquido e triturada, para obter micropartículas lipídicas; essas micropartículas são misturadas a uma solução aquosa fria de surfactantes. A pré-suspensão obtida é submetida a homogeneização sob alta pressão formando a nanopartícula de lipídio sólida. O estado sólido da matriz minimiza a partição do composto bioativo para a fase aquosa (ÜNER, 2006).

Para a indústria alimentícia as vantagens da homogeneização a alta pressão incluem a não utilização de solventes orgânicos, o equipamento homogeneizador de alta pressão, é de uso constante nesse tipo de indústria, a massa final contém poucas micropartículas e há maior teor de lipídios nas dispersões. A escolha da técnica a ser aplicada depende das propriedades físico-químicas do composto bioativo e da aplicação do produto final. Para o β -caroteno, embora termosensível, a maioria dos estudos indica o processamento de homogeneização a quente. Essa técnica demonstrou estabilidade para vários compostos e os problemas associados a cristalização (perda do composto bioativo para a fase aquosa) pode ser solucionado escolhendo constituintes apropriados da matriz, agentes surfactantes e produção de parâmetros (GUTIÉRREZ et al., 2013).

3.3.1.2 Nanoencapsulamento por Fluidos Supercríticos

Através de suas propriedades físicas os fluidos supercríticos oferecem vantagens, pois muitas propriedades dos gases são semelhantes às dos líquidos, em condições críticas. Como por exemplo, a densidade de um fluido supercrítico pode ser modificada facilmente por pequenas variações de pressão e temperatura. O dióxido de carbono é o fluido supercrítico mais utilizado devido às suas propriedades ecológicas: não inflamável, não tóxico, inerte, temperatura e pressão críticas de fácil acesso (304 K e 7,1 MPa, respectivamente). Estas propriedades, junto com o poder solvente e de eliminação completa no processo, são ideais para a produção de partículas livres de solventes, o que evita a degradação e a oxidação térmica (PINTO et al., 2006).

Na literatura há uma grande variedade de diferentes processos de obtenção de nanopartículas baseados em fluidos supercríticos; eles são classificados de acordo com a função do fluido. Dentre as técnicas utilizadas em compostos bioativos as principais são a Expansão Rápida da Solução Supercrítica (RESS) e Supercrítico Anti-Solvente de Precipitação (SAS) (GUTIÉRREZ et al., 2013).

No processo Expansão Rápida Supercrítica, o soluto desejado é solubilizado no fluido supercrítico e a solução resultante é expandida através de um bico para causar uma diminuição súbita da solubilidade e, portanto, a formação de partículas. A nucleação homogênea nesse processo é causada pela sobressaturação e vários modelos matemáticos foram apresentadas para explicar este processo teoricamente.

Na Expansão Rápida Supercrítica Convencional, cada partícula é rodeada pelo mesmo tipo de partículas na zona de dilatação que resulta em partículas maiores devido à coagulação. Uma variante desse método é utilizar um sólido cosolvente, este processo denomina-se Expansão Rápida Supercrítica Cosolvente (RESS-SC). Na zona de expansão o cosolvente sólido ultrapassa o crescimento das partículas; este evita uma superfície de interação com outras partículas, o que impede o seu crescimento para resultar em nanopartículas. O cosolvente é removido por sublimação através de um liofilizador.

No processo Supercrítico Anti-Solvente, o soluto desejado é dissolvido num solvente orgânico e depois injetado no fluido supercrítico para formar partículas pequenas por expansão volumétrica e remoção de solvente (THAKUR & GUPTA, 2006).

3.3.1.3 Nanoencapsulamento por Micelas de Caseína por Autojunção

As caseínas são proteínas conjugadas com grupos fosfato esterificados e resíduos de serina. Diversos fatores devem ser considerados na avaliação da estabilidade das micelas de caseína, tais como a presença de cátions de cálcio (Ca^{2+}), pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, forças de Van der Waals, estabilização estérica, teor de sal, pH, temperatura, tratamento térmico ou desidratação (presença de etanol) (DALGLEISH, 2011).

As vantagens da utilização de micelas de caseína no nanoencapsulamento do β -caroteno e de outros compostos hidrofóbicos envolvem a incorporação direta de compostos hidrofóbicos miscelados nos produtos finais, a alta penetração cutânea, a liberação intestinal de compostos bioativos miscelados, o aumento da biodisponibilidade do composto bioativo, a estabilidade das micelas de caseína em comparação com emulsões ou lipossomas, a redução de custos e proteção ambiental. Além disso, as caseínas são facilmente digeríveis, o que proporciona uma aplicação viável na indústria de alimentos, sem afetar as propriedades nutricionais do alimento e, assim, assegurando a liberação do composto bioativo é assegurada na fase de digestão (SHAPIRA et al., 2012).

3.3.2 Descrição dos Estudos com Carotenoides Nanoencapsulados em Dispersão

3.3.2.1 Astaxantina

TACHAPRUTINUNA et al. (2009) utilizaram o deslocamento de solvente para comparar os nanoencapsulamentos de astaxantina com três diferentes transportadores poliméricos, variando o tamanho e a natureza hidrofílica entre os escolhidos - polímeros PCPLC (*poly (ethylene oxide)-4-methoxycinnamoylphthaloylchitosan*), PB4 (*poly(vinylalcohol-co-vinyl-4-methoxycinnamate)*) e nanoesfera de etilcelulose (EC). A nanoencapsulação foi realizada por diálise de 100 mL de uma solução contendo 0,06 g de polímero e 0,04 g de astaxantina em dimetilformamida (DMF) e em água Milli-Q[®] como padrão. A suspensão de nanopartículas de astaxantina nanoencapsuladas em água foi sujeita às análises MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) e MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão). Para eficiência e capacidade de carregamento dos polímeros, a quantidade de astaxantina recuperada no dialisado foi determinada usando espectroscopia de absorção UV (a 473 nm de comprimento de onda) com o auxílio de uma curva de calibração. A quantidade de astaxantina nanoencapsulada foi determinada pela subtração da quantidade de astaxantina usada com a quantidade de astaxantina encontrada no dialisado.

A estabilidade térmica da astaxantina nanoencapsulada com PCPLC foi determinada através 45 mL de suspensão aquosa de astaxantina carregada com PCPLC (24 mg de astaxantina e 36 mg de PCPLC) submetido ao refluxo em 70°C por 2 horas seguido de liofilização. O produto seco foi submetido às análises de RMN¹H (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio) e UV-VIS. Para a estabilidade térmica da astaxantina livre foi utilizado 45 mL de $8,94 \times 10^{-4}$ M de astaxantina livre em solução de etanol submetida aos mesmos processos que a astaxantina carregada com PCPLC.

O tamanho de partícula do nanoencapsulamento de astaxantina com PCPLC foi de $68,3 \pm 0,35$ nm e apenas uma pequena quantidade de astaxantina foi detectada no dialisado. Quando a concentração de PCPLC diminuiu para 600 ppm o tamanho hidrodinâmico da nanoesfera aumentou para $312 \pm 5,83$ nm. A eficiência de nanoencapsulação foi de 98% e a carga das partículas foi de aproximadamente 40

W/40 W. A cor da suspensão foi rosa claro e as partículas secas eram rosadas. As partículas foram redispersas com frequência de 40 kHz à temperatura ambiente e o tamanho das partículas foi semelhante ao das partículas recém preparadas ($319 \pm 7,87$ nm). Os autores não descreveram o valor do pH e da viscosidade.

O uso de PB4 mostrou uma quantidade significativa (22%) de astaxantina presente no dialisado. Os precipitados eram de cor púrpura e a solução de cor rosa. O precipitado de astaxantina indica excesso desse carotenoide no processo de nanoencapsulação. A eficiência do procedimento foi inferior a 78% o que indica baixa interação das moléculas de astaxantina com as cadeias poliméricas de PB4, nessa concentração. Uma concentração de 600 ppm foi utilizada na solução aquosa e as partículas foram menores, com maior dispersibilidade em água. Os valores de potencial zeta foram de -18,2 e -29,1 mV para suspensões coloidais aquosas de nanoesferas encapsuladas (PB4-astaxantina) e partículas PB4 não encapsuladas, respectivamente. Os autores não descreveram o tamanho de partícula, o potencial zeta (para as nanopartículas em DMF), o pH e a viscosidade das nanoesferas com esse polímero, e também não utilizaram concentrações diferentes de PB4 na solução em DMF para analisar os resultados como avaliaram com o PCPLC.

Para o CE houve muita precipitação de astaxantina no dialisado e também no tubo de diálise. Os autores não variaram a concentração de CE e concluíram que a incapacidade do CE para nanoencapsular a astaxantina é provavelmente um resultado da incompatibilidade entre o interior (grupos etoxi) da nanoesfera e a molécula astaxantina.

Quando a solução de astaxantina (em etanol) foi aquecida a 70°C durante 2 horas, a maioria das moléculas de astaxantina foram degradadas. O espectro de absorção de UV-VIS da solução aquecida mostrou um desaparecimento da absorção em 475 nm. No entanto, o espectro de RMN¹H da astaxantina aquecida nanoencapsulados por PCPLC (suspensão aquosa) não indicou qualquer alteração evidente. O resultado indicou que a degradação térmica da astaxantina que envolve a perda de funcionalidade olefínica, pode ser prevenida pela nanoencapsulação do pigmento por PCPLC. Os autores não relataram a análise de estabilidade térmica do nanoencapsulamento por PB4 e CE.

Por fim, os pesquisadores concluíram que o PCPLC possui maior capacidade de nanoencapsulamento de astaxantina que o PB4, e que isso ocorre devido ao grau de substituição de porções hidrofóbicas presentes no PCPLC que o PB4.

3.3.2.2 β -caroteno

O estudo de SAÍZ-ABAJO et al. (2013) demonstrou a adequabilidade da caseína para nanoencapsular compostos termolábeis, tais como β -caroteno, para proteção contra a degradação durante os processos de estabilização industriais mais comuns. As micelas de caseínas foram preparadas com 18 mL de β -caroteno (0,3 mM) em acetona, previamente filtrado em 0,45 μ m e 4 mL de tricitrato de sódio (1 M) adicionados a 200 mL de caseinato de sódio (5%). Depois disso, um volume de 24 mL de fosfato de potássio (0,2 M) e 20 mL de cloreto de cálcio (0,2 M) foram adicionados, a cada 15 minutos, oito vezes. As dispersões foram agitadas em banho termostático a 37°C. Durante as últimas adições o pH foi ajustado para 6,7 com ácido clorídrico (0,1 M) ou hidróxido de sódio (0,1 M). Por fim, água desionizada foi adicionada até um volume final de 400 mL. O pH foi novamente ajustado para 6,7 e a dispersão final foi suavemente agitada durante 1 h.

O tamanho das partículas foram em média 80 nm e o potencial zeta encontrado foi de aproximadamente -34 mV, o que indica uma estabilidade moderada das partículas. A eficiência do nanoencapsulamento se deu entre 100 ± 1 % (todo o β - caroteno estava dentro das micelas) e o rendimento do procedimento apresentou valores de 60 ± 5 % (40% do β - caroteno utilizado no início do processo foi degradado). A pesquisa mostrou uma menor degradação de β -caroteno sob tratamento de alta pressão hidrostática em comparação com diferentes processos térmicos. Também demonstrou que é possível proporcionar um efeito de proteção térmica, por meio de uma estrutura micelada à base de caseína. O método utilizado para o nanoencapsulamento do β -caroteno foi o Nanoencapsulamento de Micelas de Caseínas por Autojunção (r-CM) e para os processos de estabilização industriais utilizou o cozimento na produção de pães e biscoitos, a esterilização, a pasteurização e a alta pressão hidrostática. Os autores não determinaram demais características como viscosidade, pH e cor das nanocápsulas produzidas.

CAO-HOANG et al. (2011) estudaram a oxidação do β -caroteno (natural e sintético) no nanoencapsulamento com ácido poliláctico (PLA). Como o β -caroteno é hidrofóbico uma solução padrão de comparação foi feita com Tween 80. Para as soluções padrão (duas soluções, uma com β -caroteno natural e outra com β -caroteno sintético) o pigmento foi disperso em Tween 80 (10%) e homogeneizado durante 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 500 mL de

clorofórmio sob agitação magnética moderada. O solvente foi retirado através de evaporador rotativo sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em EDTA (0,25%), filtrado e depois tamponado com fosfato (PBS, pH 8, 50 mM). Para a dispersão do carotenoide (natural e sintético) em PLA foi utilizado 50 mg de β -caroteno e Tween 80 (10%). Em seguida dissolveu-se a dispersão em 300 mL de clorofórmio e adicionou-se 25 mL de PLA. A mistura foi agitada a temperatura ambiente durante 10 minutos antes da adição de 100 mL de PBS. A fase orgânica foi evaporada a vácuo e o resíduo foi filtrado e diluído em PBS até a concentração desejada. Através de análises com espectroscopia constataram que houve perda de 97% do carotenoide (natural e sintético) durante a preparação da solução padrão e que na solução com PLA 85% de β -caroteno natural e 35% de β -caroteno sintético foram perdidos durante o preparo. Nas duas preparações o carotenoide de origem sintética juntamente com a preparação de PLA com o pigmento natural apresentaram diâmetro de partícula semelhante (abaixo de 90 nm) diferentemente da preparação da solução padrão com pigmento natural (acima de 575 nm). O potencial zeta das soluções com pigmento natural, padrão e PLA, foram positivos ($4,8 \pm 1,2$ e $9,1 \pm 2,8$ mV, respectivamente). O potencial zeta das soluções com o carotenoide sintético, padrão e PLA, foram negativos ($-31,1 \pm 2,1$ e $-23,8 \pm 4,6$ mV, respectivamente).

A oxidação das soluções foram estudadas através da autooxidação em um reator a 37°C sob agitação e da adição de enzima xantina oxidase (27×10^{-3} IU/mL) com acetaldeído (48 mM) a um volume de 100 mL. A cinética da reação foi analisada através de UV-VIS. A concentração inicial das soluções foram com 90 mg/L de carotenoide (natural e sintético). Observou-se que nas primeiras 2 horas mais que a metade de β -caroteno em todas as formulações foi consumido e que a taxa de degradação das soluções padrão foram ligeiramente mais elevadas que a taxa das soluções com PLA e quase todo substrato (acima de 90%) foi degradado depois de 23 horas. Nesse mesmo período de tempo a autooxidação degradou menos que a metade do pigmento sintético nas soluções e um pouco mais da metade do pigmento natural nas soluções. A taxa de degradação foi maior nas formulações com o pigmento natural que nas formulações com o pigmento sintético, independentemente da presença da enzima. Em comparação com dispersão em Tween 80 as micelas do nanoencapsulamento de β -caroteno em partículas de ácido poliláctico geram uma organização molecular mais estável e oferece uma melhor

proteção contra a oxidação, o que resulta em menos compostos de oxidação. A degradação antes do nanoencapsulamento ocorre devido a oxidação durante a extração a partir de materiais naturais. A dispersão é mais dificultada uma vez que a amostra já continha produtos de oxidação, o que, conseqüentemente, diminui a eficiência da nanoencapsulação. Contudo, os autores não avaliaram a cor e a viscosidade das soluções.

3.3.2.3 Bixina

LOBATO et al. (2013) caracterizaram as nanocápsulas de bixina, extraídas das sementes de urucum, bem como sua estabilidade. Para a obtenção de bixina padrão as sementes de urucum (25 g) foram lavadas duas vezes com hexano (100 mL) e após o descarte do solvente as sementes foram novamente lavadas duas vezes com metanol (100 mL). O metanol foi eliminado e mais duas lavagens com acetato de etila (100 mL) foram feitas. Cada lavagem foi sob agitação magnética durante 15 minutos. O extrato foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo. Após concentração, o extrato foi colocado em banho frio e diclorometano (5 mL) foi lentamente adicionado. Em seguida, 20 mL de etanol (99,7%) foi adicionado cuidadosamente para que não houvesse mistura entre os solventes. Esta solução foi mantida a -18°C durante 12 h para a cristalização de bixina. Os cristais formados foram filtrados, lavados com 50 mL de etanol (99,7%) e secos sob pressão reduzida (temperaturas menores que 30°C). A pureza da bixina padrão foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As nanocápsulas lipídicas de bixina (BIX-LNC) foram produzidas pela técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados. A fase orgânica foi preparada pela dissolução de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (250 mg), triglicerídeo caprílico/cáprico (CCT) (400 μL), Span 60 (monoesterato de sorbitano) (95 mg) e bixina em solução acetona/etanol (60 mL/7,5 mL) sob agitação magnética a 40°C na ausência de luz. Uma fase aquosa (130 mL) com Tween 80 (polisorbato) (195 mg) foi adicionada a fase orgânica; essa mistura foi agitada por 10 minutos. Os solventes foram removidos e a suspensão foi concentrada em um evaporador rotativo até um volume final de 25 mL.

As distribuições de tamanho nas formulações com concentração de bixina de 11, 16, 37, 58 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foram periodicamente avaliadas durante 3 semanas de

armazenamento a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A formulação ótima (concentração bixina de $16,92 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$) foi caracterizada em termos de distribuição dimensional das partículas, potencial zeta, teor de bixina e eficiência de encapsulação.

A pureza do padrão de bixina foi de $98,7 \pm 0,20 \%$. As formulações de 11 e 16 $\mu\text{g/mL}$ de bixina apresentaram uma boa distribuição do tamanho de partículas e estabilidade após o tempo de armazenamento. Contudo, foi escolhida a formulação de 16 $\mu\text{g/mL}$ para outros experimentos, devido à maior concentração do carotenoide. A eficiência da nanoencapsulação foi superior a 98,63 % o que indicou que a suspensão de bixina estava presente na estrutura das nanocápsulas. A elevada eficiência de nanoencapsulação ocorreu provavelmente devido ao núcleo das nanocápsulas conterem triglicerídeos (CCT), o que facilita solubilização de bixina.

Em comparação com a bixina pura a suspensão de bixina nas nanocápsulas apresentaram um aumento na luminosidade e cor amarela, que foi associada a uma diminuição na cor vermelha. O comportamento da suspensão de nanocápsulas de bixina foi de um fluido newtoniano, uma vez que o aumento da tensão de corte foi proporcional ao aumento da taxa de cisalhamento. A viscosidade das nanocápsulas de bixina foi de $11,4 \pm 0,24 \text{ mPa.s}$. e a suspensão mostrou um pH médio de $5,89 \pm 0,70$. Uma maneira de avaliar a estabilidade química da suspensão das nanocápsulas pode ser através do pH, uma vez que a sua diminuição pode estar relacionada com a degradação do polímero ou outro ingrediente. Durante os primeiros 63 dias de armazenamento, não houve alteração significativa nos valores de pH ($p < 0,05$); no entanto, no 119 dia, o pH diminuiu para $4,48 \pm 0,32$. Uma maneira de minimizar as alterações de pH é a utilização de um agente tamponante na fase aquosa.

A suspensão de bixina nas nanocápsulas apresentou um potencial zeta médio de $-14,45 \pm 0,92 \text{ mV}$ após a preparação, e após 119 dias de armazenamento diminuiu para $-25,85 \pm 6,58 \text{ mV}$. A mudança da carga ocorreu devido à hidrólise de polissorbato 80, uma vez que o potencial zeta negativo é consequência da densidade negativa de carga dos grupos carboxilato na cadeia principal de PCL.

A análise de difração a laser mostrou uma distribuição monomodal estreita das nanocápsulas de bixina, com um diâmetro médio ponderado de volume ($D_{4,3}$) de $195 \pm 27 \text{ nm}$, um diâmetro médio ponderado de superfície ($D_{3,2}$) de $138 \pm 13 \text{ nm}$ e

valor de amplitude de $1,4 \pm 0,1$. Além disso, 90 % das nanocápsulas apresentaram diâmetros menores que 124 ± 5 nm. As nanocápsulas de bixina foram consideradas estáveis, pois não apresentaram qualquer evidência de coalescência, ou floculação em qualquer análise sobre os 119 dias de armazenamento a 25°C . Após todo o período de armazenamento, observou-se um teor de bixina de $45,7 \pm 1,1\%$. Isto indica que nanoencapsulação foi altamente eficaz em inibir a perda do composto durante o armazenamento.

LOBATO et al. (2015) avaliaram a estabilidade da bixina em nanocápsulas de lipídeos essenciais (BIX-LNC) durante a fotossensibilização ($5\text{-}25^{\circ}\text{C}$) e aquecimento ($65\text{-}95^{\circ}\text{C}$) no sistema modelo de etanol/água (2 mL/8 mL). A extração da bixina das sementes de urucum foi realizada de acordo com (RIOS e MERCADANTE, 2004) e apresentou uma pureza de $98,7 \pm 0,2$ g / 100 g.

As nanocápsulas lipídicas de bixina (BIX-LNC) foram produzidas pela mesma técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados. A solução contendo fotossensibilização de BIX-LNC foi preparada pela diluição da suspensão BIX-LNC e uma alíquota de uma solução de rosa de bengala em etanol/água (2 mL/8 mL). As concentrações de bixina e rosa bengala aplicadas foram de $8 \mu\text{mol/L}$ ($3,16 \mu\text{g/mL}$) e $10 \mu\text{mol/L}$, respectivamente. Alíquotas de 10 mL dessa solução foram iluminadas com uma lâmpada de 150 W (36.000 lux) acoplada a um filtro de corte de acrílico laranja exclusivamente para excitar o sensibilizador (em comprimentos de onda acima de 520 nm). O experimento de fotossensibilização foi realizado em modelo de sistema de etanol/água (2 mL/8 mL) para a comparação com a bixina livre, que é insolúvel em água. As experiências de fotossensibilização foram realizadas em três temperaturas (5, 15 e 25°C). Em cada temperatura, duas condições diferentes foram testadas. A primeira condição foi em ausência de oxigênio com injeção de nitrogênio (99,99% de pureza) para a célula de fotossensibilização e a segunda condição foi conter ar saturado.

Para os experimentos de aquecimento, uma solução de nanocápsulas foi preparada através da diluição de uma alíquota da suspensão BIX-LNC em etanol/água (2 mL/8 mL) até uma concentração de bixina de $8 \mu\text{mol/L}$ ($3,16 \mu\text{g/mL}$). Alíquotas da solução preparada (2 mL) foram aquecidas em tubos de ensaio de vidro com tampas de rosca (20 mm de diâmetro e espessura de 1 mm) e, banho de aquecimento a 65, 80 e 95°C . Após o aquecimento, cada amostra foi arrefecida em banho de gelo. O aquecimento da bixina livre ($8 \mu\text{mol/L}$) foi realizado sob as

mesmas condições das nanocápsulas de BIX-LNC em sistema modelo de etanol/água (2 mL/8 mL) sem luz. O teor de bixina foi medido periodicamente por HPLC nos seguintes períodos: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 minutos.

As nanocápsulas tiveram uma distribuição granulométrica monomodal (todas as partículas com diâmetros menores que 1 μm) e um diâmetro médio de 190 ± 9 nm, um índice de polidispersão de $0,1 \pm 0,03$, um diâmetro médio ponderado de volume ($D_{4,3}$) de 195 ± 27 nm, um diâmetro médio ponderado por superfície ($D_{3,2}$) de 138 ± 13 nm e uma amplitude média ponderada de $1,4 \pm 0,1$ em função da superfície. O potencial zeta encontrado foi de $14,45 \pm 0,92$ mV, o pH de $5,9 \pm 0,70$, a eficiência da nanoencapsulação de aproximadamente 100% e uma viscosidade de $11,4 \pm 0,24$ mPas.

Em um experimento preliminar, a suspensão BIX-LNC foi diluída em etanol/água (2 mL/8 mL) a 25°C e os diâmetros médios das BIX-LNC foram determinados periodicamente (0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos). Este procedimento foi feito para verificar se as nanocápsulas seriam fisicamente estáveis durante a fotossensibilização. Após a preparação, a BIX-LNC exibiu uma distribuição monomodal de tamanho de partícula com um diâmetro médio de partícula de $199,9 \pm 1,8$ nm e um índice de polidispersão de $0,12 \pm 0,01$. Nenhuma mudança significativa ($p < 0,05$) foi constatada nas nanocápsulas sugerindo que BIX-LNC seria fisicamente estável na solução etanol/água (2 mL/8 mL) durante o processo de fotossensibilização.

O consumo de bixina ocorreu apenas na presença de luz (luz filtrada). A taxa de perda de bixina (livre e em BIX-LNC) aumentou com a variação de temperatura do sistema de 5 a 25°C , na presença e na ausência de oxigênio (condições de saturação de nitrogênio). A presença de oxigênio no sistema de fotossensibilização aumentou a taxa de perda de bixina (livre e em BIX-LNC), uma vez que o oxigênio singlete e o sensibilizador rosa de bengala atuaram na degradação da bixina. Todas as condições de degradação da bixina foram testadas seguindo uma reação cinética de primeira ordem com um coeficiente de correlação R^2 acima de 0,99. As constantes de velocidade (k) para a perda de bixina durante fotossensibilização foram maiores para bixina livre do que para bixina na BIX-LNC, em ambas condições. Este resultado pode estar relacionado com a capacidade das nanocápsulas de liberar lentamente o seu núcleo, o que resulta em bixina livre no meio aquoso. Outra explicação para as constantes de taxa mais baixa de BIX-LNC

pode estar relacionada com a permeabilidade de oxigênio singlete na estrutura nanocápsulas. Estes resultados indicam que a perda de bixina é mais demorada quando nanoencapsulada.

Um estudo preliminar de aquecimento de bixina livre e BIX-LNC a 40 °C durante 120 minutos foi realizada para verificar uma possível perda de bixina no processo. No entanto, observou-se que a concentração de bixina foi constante durante o experimento. Com base nestes resultados, os testes de aquecimento foram realizados a 65, 80 e 95°C durante 120 minutos. Em todas as condições, a taxa de perda de bixina (livre ou na BIX-LNC) aumentaram com o aumento da temperatura e seguiu-se uma reação cinética de primeira ordem com um coeficiente de correlação R^2 maior que 0,99. Durante o aquecimento, a perda da bixina livre ocorreu mais rapidamente do que a da bixina na BIX-LNC, pois a bixina livre apresentou maiores valores de constantes de velocidade e energias de ativação. A eficiência da nanoencapsulação foi de $100 \pm 0,2$ o que pode aumentar a estabilidade da bixina em BIX-LNC.

Por fim, os autores concluíram que utilizando a técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado foi possível produzir nanocápsulas de bixina com boa distribuição de tamanho de partícula e uma alta estabilidade em solução etanol/água (2 mL/8 mL) durante 5 horas de armazenagem a 25°C. A nanoencapsulação também aumentou a estabilidade da bixina em ambos os experimentos de fotossensibilização e aquecimento no sistema modelo, pois obtiveram maiores valores das constantes cinéticas de reação e das energias de ativação da bixina livre. Além de tudo o estudo indicou que a nanoencapsulação pode prolongar a capacidade de quelar o sensibilizador e o oxigênio singlete.

3.3.2.4 Licopeno

Na literatura consultada foi encontrado um estudo publicado sobre a caracterização e avaliação da estabilidade do licopeno nanoencapsulado. Na pesquisa de SANTOS et al. (2015) foram desenvolvidas nanocápsulas de lipídios com núcleo lipídico carregadas de licopeno (LYC-LNCs) pela deposição interfacial de polímero pré-formado (ϵ -caprolactona) (PCL), e foram caracterizadas na distribuição de tamanho, potencial zeta, eficiência de nanoencapsulação, pH, viscosidade e cor. O extrato de licopeno (93,9%) foi obtido a partir de tomates; a

fase orgânica foi preparada com o polímero (PCL), triglicerídios caprílico/cáprico, monoesterato de sorbitano e licopeno em uma mistura de acetona e etanol sob agitação magnética a 40°C. A camada orgânica foi injetada na fase aquosa com polissorbato 80 e a suspensão foi concentrada sob pressão reduzida. A formulação LYC-LNC (85 µg/mL) apresentou valores estáveis para o diâmetro médio ($193 \pm 4,7$ nm) e potencial zeta ($-11,5 \pm 0,40$ mV). Apesar do pH mais baixo e mudança de cor da suspensão, as nanocápsulas mostraram estabilidade satisfatória e valores de aproximadamente 50% de teor de licopeno após 14 dias de armazenamento à temperatura ambiente (25°C).

3.3.2.5 Luteína

JIN et al. (2009) caracterizaram a luteína nanoencapsulada através do método de supercrítico anti-solvente de precipitação (SAS) com gás carbônico supercrítico (em acetona) e ftalato de hidróxipropilmetilcelulose (HPMCP) como material de revestimento por este ter alta resistência ao suco gástrico. O gás carbônico foi injetado em um sistema de refrigeração até atingir a sua forma líquida e depois bombeado em um vaso de precipitação ($V= 200 \text{ cm}^3$) por uma bomba de pistão. O fluído supercrítico passa sobre um trocador de calor e segue para um separador coletor de precipitação e retorna para a refrigeração e recircula. Depois de atingir uma pressão e temperatura pré-ajustada a solução líquida foi injetada e misturada com o dióxido de carbono supercrítico antes de passar pelo vaso separador. O fluxo da solução foi ajustado através de um sistema ligado a um cromatógrafo. Após a passagem de toda solução a pressão foi reduzida e as nanocápsulas são precipitadas no vaso de precipitação. Algumas propriedades do gás carbônico supercrítico podem alterar as nanopartículas. O autor não descreve sobre a preparação da solução de luteína com HPMCP.

Em três experimentos (1, 2 e 3) a temperatura de gás carbônico supercrítico foi mantida a 40°C e as pressões variaram conforme mostra a figura abaixo. Foi observado que com o aumento de pressão, o rendimento do produto aumentou e a carga de luteína diminuiu (Figura 5). O diâmetro médio correspondente das partículas aumentaram. Ao comparar os experimentos 1, 4 e 5 onde a pressão permaneceu constante a 11 MPa e a temperatura variou, o rendimento do produto teve um máximo à temperatura de 45°C (experimento 4). Com o aumento da

temperatura a solubilidade do gás carbônico supercrítico aumenta e mais nanocápsulas de luteína se precipitam. No entanto, o aumento de temperatura tem limite, pois, na temperatura mais elevada (50°C) a luteína e o HPMCP tem maior solubilização na solução em que estão contidos, e isso impede maiores interações entre o fluido supercrítico e o carotenoide. A razão da diminuição da carga da luteína é atribuída a uma alta degradação desse composto em temperaturas mais elevadas. Em conformidade, a carga de luteína e a eficiência da nanoencapsulação diminuem conforme a temperatura aumenta.

No	C _{HPMCP} (mg/mL)	C _{luteína} (mg/mL)	V _{solução} (mL/min)	V _{fluidosc} (kg/h)	T (°C)	P (Mpa)	Rendimento (%)	Carga de luteína (%)	Eficiência (%)	Dpartícula (nm)
1	1	0,1	1	1,5	40	11	57,58	1,37	90,1	163
2	1	0,1	1	1,5	40	13	64,24	0,13	80,52	171
3	1	0,1	1	1,5	40	15	69,09	0,07	78,44	314
4	1	0,1	1	1,5	45	11	74,24	0,18	75,21	188
5	1	0,1	1	1,5	50	11	72,42	0,73	93,97	164
6	1	0,1	1	0,88	40	11	65,33	0,19	81,29	185
7	1	0,1	1	2	40	11	37,33	0,18	86,92	159
8	1	0,1	2	1,5	40	11	28,33	0,47	95,81	226
9	8	0,8	1	1,5	40	11	95,35	6,74	79,4	219
10	4	0,8	1	1,5	40	11	86,04	15,8	88,41	207
11	2	0,8	1	1,5	40	11	83,2	3,2	67,9	187

Figura 5. Condições experimentais e resultados, adaptado de JIN et al. (2009).

Um ponto importante no estudo foi controlar o tamanho das nanocápsulas. As nanopartículas foram produzidas quando a pressão de funcionamento foi acima do ponto crítico da mistura. A temperatura e pressão foram controladas acima do ponto crítico do sistema binário gás carbônico-acetona com 0,98 de fração molar de gás carbônico. Nos experimentos de 1 a 5, quando a temperatura e pressão foram iguais ou superiores 40°C e 11 Mpa, respectivamente, o tamanho das nanopartículas encontradas estavam no intervalo de 163 a 314 nm.

A taxa do fluido supercrítico influencia a transferência de massa entre o solvente e o fluido e altera a saturação do soluto. Os experimentos 1, 6 e 7 mostram que o rendimento diminuiu quando a taxa de gás carbônico aumentou. Da mesma maneira a carga de luteína e a eficiência da nanoencapsulação diminuem. A razão disto é que o fluxo de gás carbônico transporta a solução para fora do vaso de precipitação. Quando a taxa do fluxo da solução foi aumentada de 1 mL/min (experimento 1) para 2 mL/min (experimento 8) o rendimento e carga de luteína diminuíram, devido à perda de solução.

Uma maior concentração de HPMCP aumenta a saturação da solução, o que faz com que haja mais precipitado de soluto. Ao comparar o experimento 1 com o 9 o rendimento e a carga de luteína foram inferiores no 1. Entretanto, a eficiência de nanoencapsulação no experimento 1 foi maior que no 9. A possível razão para esse resultado é que a maioria do pigmento da superfície da nanocápsula seja perdida pelo solvente no experimento 1, enquanto no 9 uma grande quantidade de luteína foi depositada na superfície da nanocápsula.

No experimento 9, HPMCP e luteína estavam nas suas concentrações saturadas à temperatura ambiente, de modo que o rendimento mais elevado, 95,35%, foi obtido. Além disso, o diâmetro médio das cápsulas aumentou cerca de 50 nm. A redução da proporção entre o material de revestimento e o núcleo geralmente aumenta com o carregamento de luteína. No entanto, se a proporção entre solvente/soluto for demasiadamente baixa, o resultado será oposto. No experimento 11, o carregamento de luteína foi o mais baixo entre os experimentos de 9 à 11. A possível razão disto é que a luteína pode ser levada pelo gás carbônico supercrítico. Portanto, a carga de luteína nem sempre aumenta à medida que a quantidade de HPMCP diminui. Para a eficiência de encapsulação, a tendência foi semelhante.

O autor não descreveu o potencial zeta, a viscosidade, o pH e a cor das nanopartículas.

4. CONCLUSÃO

Por meio da avaliação dos estudos da literatura observa-se que os carotenoides apresentam maior estabilidade à diferentes condições expostas na forma nanoencapsulada que na forma livre no meio. Frente a diversos processos industriais e no armazenamento os compostos nanoencapsulados, apresentam uma uniformidade no tamanho de partícula, com menor diâmetro e maior área superficial por volume. A taxa de degradação é reduzida significativamente e, conseqüentemente, a perda da cor na preparação das soluções diminui. A solubilidade desses compostos lipossolúveis aumenta em meio aquoso, bem como a estabilidade do pH.

Devido às essas informações, esses pigmentos nanoencapsulados apresentam alto potencial na utilização para enriquecimento nutricional de alimentos e coloração. Entretanto, são necessários mais estudos sobre a técnica, pois os parâmetros avaliados são em pesquisas *in vitro* o que não demonstra o comportamento dos compostos nanoencapsulados *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ATBC (The ATBC Cancer Prevention Study Group). The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: design, methods, participant characteristics, and compliance. **AEP**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 1994.
- ATBC (The ATBC Cancer Prevention Study Group). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 15, p. 1029-1035, 1994.
- AJILA, C., M.; NAIDU, K., A.; BHAT, S., G.; PRASADA RAO, U., J., S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 982–988, 2007.
- AKSU, Z.; EREN, T., A. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 107-113, 2007.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v. 35, n. 2-3, p. 171-176, 2002.
- BAYERL, C. Beta-carotene in dermatology: does it help? **Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.**, v. 17, n. 4, p. 160-166, 2008.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Alegação de propriedades funcionais aprovadas, 1999. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/wuE>>. Acesso em 22 de jul, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº2, de 02 de janeiro de 2002**. Aprova o regulamento técnico das substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e ou de saúde. Brasília, DF. ANVISA, 2002. Disponível em :<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em: 10 mai. 2015.
- BORGHESI, E.; GONZÁLEZ, M., M., L.; ESCUDERO, G., M., L.; MALORGIO, F.; HEREDIA, F., J.; MELÉNDEZ, M., A., J. Effects of Salinity Stress on Carotenoids, Anthocyanins, and Color of Diverse Tomato Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11676-11682, 2011.
- CAO-HOANG, L.; FOUGERE, R.; WACHE, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 124, n.1, p. 42-49, 2011.
- CARRATÚ, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. **Ann. Ist. Super Sanità**, v. 41, n. 1, p. 7-16, 2005.
- CÂNDIDO, L., M., B.; CAMPOS, A., M. Alimentos funcionais. Uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.

CERQUEIRA, F., M.; MEDEIROS, M., H., G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

CHEN, D.; HAN, Y.; GU, Z. Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1773-1778, 2006.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

DALGLEISH, G., D. On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2265-2272, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K., L.; FENNEMA, O., R. Substâncias Bioativas: Nutracêuticas e Tóxicas. **Química de Alimentos de Fenemma**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p. Tradução de: Adriano Brandelli, Alessandro de Oliveira Rios, Ana Lyl Oliveira de Carvalho, Florencia Cladeira-Oliveira, Itaciara Nunes, Plinho Francisco Hertz. Título original: Fennema's Food Chemistry. p. 585-608.

DELGADO, V. F.; JIMENEZ, A., R.; PAREDES, L., O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DEMBITSKY, V., M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. **Food Research International**. v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DENNY, A. e BUTTRISS, J. Synthesis Report No 4: Plants Foods And Health: Focus on plant bioactives. **British Nutrition Foundation**, 2007. Disponível em: <http://www.ipfn.ie/download/pdf/eurofir_report_plant_bioactives.pdf>. Acesso em: 11 mai. 2015.

DRUESNE, P., N.; LATINO, M., P.; NORAT, T.; BARRANDON, E.; BERTRAISS, S.; GALAN, P.; HERCBERG, S. Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 1, p. 172-84, 2010.

ESPÍN, J., C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H., J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1588-1592, 2000.

FERNÁNDEZ, A.; CAVA, D.; OCIO, M., J.; LAGARÓN, J., M. Perspectives for biocatalysis in food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 4, p.198-206, 2008.

FERNÁNDEZ, G., E.; CARVAJAL, L., I.; JARÉN, G., M.; GARRIDO, F., J.; PÉREZ, G., A.; HORNERO, M., D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 438-450, 2012.

GOMES, F., S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.

GUTIÉRREZ, J., F.; ALBILLOS, M., S.; CASAS-SANZ, E.; CRUZ, Z.; GARCÍA-ESTRADA, C.; GARCÍA-GUERRA, A.; GARCÍA-REVERTER, J.; GARCÍA-SUÁREZ, M.; GATÓN, P.; GONZÁLEZ-FERRERO, C.; OLABARRIETA, I.; OLASAGASTI, M.; RAINIERI, S.; RIVERA-PATIÑO, D.; ROJO, R.; ROMO-HUALDE, A.; SAÍZ-ABAJO, M.-J.; MUSSONS, M.-L. Methods for the nanoencapsulation of β -carotene in the food sector. **Food Science & Technology**, v. 32, n. 2, p. 73-83, 2013.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M., J., C.; SILVA, B., V. Usando as Cores da Natureza para Atender aos Desejos do Consumidor: Substâncias Naturais como Corantes na Indústria Alimentícia. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.

HAMMOND, B., R., RENZI, L., M. Carotenoids. **Advances In Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 474-476, 2013.

HELGASON, T.; AWAD, T. S.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science**, Oxford, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.

HOF, K., V., H.; WEST, C., E.; WESTSTRATE, J., A.; HAUTVAST, J., A., G. Dietary Factors That Affect the Bioavailability of Carotenoids. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 3, p. 503-506, 2000.

HOLST, B., WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 73-82, n. 2, 2008.

ISHIDA, K., B.; CHAMPMAN, H., M. Carotenoid Extraction from Plants Using a Novel, Environmentally Friendly Solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 1051-1059, 2009.

JIN, H.; XIA, F.; JIANG, C.; ZHAO, Y.; HE, L. Nanoencapsulation of Lutein with Hydroxypropylmethyl Cellulose Phthalate by Supercritical Antisolvent. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 4, p. 672-677, 2009.

KING, A., YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association** v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KRINSKY, N., I.; JOHNSON, E., J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459-516, 2005.

KWAK, N.; JUKES, D., J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**. v. 12, n. 2, p. 99-107, 2001.

LAKSHMINARAYANA, R.; BASKARAN, V. Influence of olive oil on the bioavailability of carotenoids. **European journal of lipid science and technology**, v. 115, n. 10, p. 1085-1093, 2013.

LOBATO, K., B., S.; PAESE, K.; FORGEARINI, J., C.; GUTERRES, S., S.; JABLONSKI, A.; RIOS, A., O. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3906-3912, 2013.

LOBATO, K., B., S.; PAESE, K.; FORGEARINI, J., C.; GUTERRES, S., S.; JABLONSKI, A.; RIOS, A., O. Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. **Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 8-14, 2015.

MAIANI, G.; PERIAGO, C., M., J.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I., G.; BYSTED, A.; LORENCIO, G., F.; ALONSO, B., O.; KNUTHSEN, P.; VALOTI, M.; BÖHM, V.; MIEBACH, M., E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 2, p. 194-218, 2008.

MELÉNDEZ, M., A., J.; VICARIO, M., I.; HEREDIA, J., F. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, n. 2, p. 149-155, 2004.

MELÉNDEZ, M., A., J.; VICARIO, M., I.; HEREDIA, J., F. Carotenoids, Color, and Ascorbic Acid Content of a Novel Frozen-Marketed Orange Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1347-1355, 2007.

MORAES, F., P.; COLLA, L., M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios a saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MOZAFARI, M., R.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 4, p. 309-27, 2008.

OHMIYA, A.; SASAKI, N.; TANAKA, Y. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 733-749, 2008.

PANG, Y.; JONES, G., A.; PRANTIL, M., A.; FLEMING, G., R. Unusual Relaxation Pathway from the Two-Photon Excited First Singlet State of Carotenoids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 7, p. 2264-2273, 2010.

PÉREZ-ESTEVE, E.; BERNARDOS, A.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; Barat, J. M. Nanotechnology in the development of novel functional foods or their package. An overview based in patent analysis. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 5, n.1, p. 35-43, 2013.

PINTO, R., C.; NEUFELD, R., J.; RIBEIRO, A., J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RIOS, A., O.; MERCADANTE, A.; Z. Otimização das condições para obtenção e padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em “snacks” extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 203-213, 2014.

SAÍZ-ABAJO, M-J.; GONZÁLEZ-FERRERO, C.; MORENO-RUIZ, A.; ROMO-HUALDE, A.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C., J. Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1581-1587, 2013.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SANTOS, P., P; PAESE, K.; GUTERRES, S., S.; POHLMANN, R., A.; COSTA, H., T; JABLONSKI, A.; FLÔRES, H., S.; RIOS, O., A. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, p. 1-11, 2015.

SAUNDERS, C.; RAMALHO, A.; ACCIOLY, E.; PAIVA, F. Utilização de tabelas de composição de alimentos na avaliação do risco de hipovitaminose A. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 50, n. 3, p. 237-242, 2000.

SIES, H. e STAHL, W. Carotenoids and UV Protection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 8, p. 749-752, 2004.

SHAPIRA, A.; DAVIDSON, I.; AVNI, N.; ASSARAF, Y. G.; LIVNEY, Y. D. β -Casein nanoparticle-based oral drug delivery system for potential treatment of gastric carcinoma: stability, target-activated release and cytotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 298-305, 2012.

SOARES, S., E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

TACHAPRUTINUNA, A.; UDOMSUPA, T.; LUADTHONGA, C.; WANICHWECHARUNGRUANGA, S. Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, n. 1-2, p. 119-124, 2009.

THAKUR, R.; GUPTA, R., B. Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 1-2, p.190-199, 2006.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEM, T., H. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1265-1271, 2006.

WANG, S., L.; JIAO, X., L.; LI, H., Y.; FAN, T., M. Degradation of β -Carotene to Volatile Compounds in an Aqueous Model System to Simulate the Production of Sea Buckthorn Wine. **International Journal of Food Properties**, v. 15, n. 6, p. 1381-1393, 2012.

WISSING, S., A.; KAYSERB, O.; MÜLLER, R., H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p.1257-1272, 2004.

YOUNG, A., J.; LOWE, G., M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n.1, p. 20-27, 2001.