



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE
NANOCÁPSULAS DE LUTEÍNA

AELSON ALOIR SANTANA BRUM

PORTO ALEGRE - RS

2018

AELSON ALOIR SANTANA BRUM

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE
NANOCÁPSULAS DE LUTEÍNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Co-orientador: Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres

PORTO ALEGRE - RS

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Brum, Aelson Aloir Santana
Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de
nanocápsulas de luteína / Aelson Aloir Santana Brum.
-- 2018.
135 f.
Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Coorientadora: Simone Hickmann Flôres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Luteína. 2. Nanocápsulas poliméricas. 3.
Estabilidade. 4. Oxigênio singlete. 5. Fluido
supercrítico. I. Rios, Alessandro de Oliveira,
orient. II. Flôres, Simone Hickmann, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

TESE
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE
NANOCÁPSULAS DE LUTEÍNA

Submetido como parte dos requisitos para obtenção do grau de
DOUTOR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:...../...../.....
Pela Comissão Examinadora

Homologada em:...../...../.....
Por:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Orientador
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos.
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Coordenador do Programa de Pós Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA/UFRGS)

Prof^a. Dra. Simone Hickmann Flôres
Coorientadora
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos.
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos
(ICTA/UFRGS)

Banca: Prof^a. Dra. Melissa dos Santos Oliveira
Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos
IFFAR

Banca: Prof^a. Dra. Ligia Damasceno Ferreira Marczak
Doutora em Engenharia Mecânica
PPGENQ/UFRGS

Banca: Prof^a. Dra. Florencia Cladera Olivera
Doutorado em Engenharia Química
PPGCTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Seu José e Dona Valkíria. A caminhada seria impossível sem o apoio deles.

À minha irmã, Arlene e meu sobrinho, José Alfredo.

Ao meu orientador, Professor Dr. Alessandro de Oliveira Rios, por compartilhar seus conhecimentos, por sua atenção, pela oportunidade e sobretudo, pela paciência.

À minha co-orientadora Professora Dra. Simone Flôres, pela sabedoria, pela disponibilidade e sua simplicidade cativante.

Gracias à Dra. Elena Ibáñez, minha orientadora no Doutorado Sanduíche na Universidad Autónoma de Madrid/CIAL e ao chefe do Grupo *Foodomics*, Dr. Alejandro Cifuentes.

Gracias ao Dr. Jose Mendiola (UAM), pelos ensinamentos práticos e domínio das técnicas de Extração com Fluido Supercrítico.

Gracias ao Dr. Gerardo Álvarez pela valiosa ajuda com os dados analíticos do trabalho realizado no Laboratório de *Foodomics* – CIAL.

Aos colegas do Laboratório de Compostos Bioativos - ICTA/UFRGS. Impossível nominar um a um neste pequeno espaço. Nos últimos quatro anos foram muitas pessoas que passaram por lá e só tenho a agradecer a todos!

Às minhas boas amigas Carolina Galarza, Liana Stoll e Aline Yahnke. Parceria iniciada numa disciplina do primeiro semestre do curso e mantida até hoje, fora dos muros da academia. ¡*Y muchas gracias a mi hermano ecuatoriano* Santiago Tupuna!

Às amigas Médellin Silva e Priscilla Pereira, antecessoras na linha de pesquisa deste trabalho, pela sabedoria compartilhada, fosse ela prática ou teórica. Vocês foram pessoas de grande importância na realização desta Tese e o agradecimento é eterno.

À Juliana Wohlfahrt, pela amizade, apoio e companheirismo!

Aos amigos de longa data, Luiz Viríssimo, Braulio Brum e Maximiliano Chiappetta.

Aos colegas do Laboratório de *Foodomics* na UAM/CIAL, pela amizade construída em meio aos diversos idiomas que usávamos para nos comunicar. Obrigado em especial a:

Lydia, Andrea, Bienve, Tanize, Hajar, Romana, Giusy, Mahshid, Flavia, Oumayma, Berenice, Sabine, Lourdes, Joana, Fabrício e Veronica.

À Cristina, Robert, Ella e Ariel que sempre me receberam de braços abertos em sua casa em Zurique. Obrigado pelas longas discussões científicas e culturais.

Muchas gracias aos amigos e amigas que deixei em Madri: Borja, Juan, Catarina, Ivanna, Mariana, Luz Emília e Ana.

E obrigado ao Instituto Federal Farroupilha, pela concessão do afastamento para a realização deste Doutorado.

RESUMO

Os carotenoides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza e estão presentes, em sua maioria, nos tecidos vegetais. Nos últimos anos, diversos estudos sugerem que o consumo de frutas e verduras com elevado teor destes compostos bioativos, está associado à diminuição da incidência de algumas doenças em seres humanos. No entanto, os carotenoides apresentam algumas características indesejáveis como a instabilidade frente à luz, ao calor e ao oxigênio, além da insolubilidade em meio aquoso, o que os torna, sob certo aspecto, inviáveis para a utilização em formulações alimentares e farmacêuticas. Neste contexto, o presente estudo desenvolveu nanocápsulas poliméricas, contendo luteína, com o objetivo de melhorar a solubilidade e estabilidade deste carotenoide. As nanocápsulas de luteína foram desenvolvidas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado poli (ϵ -caprolactona). Os cristais de luteína foram obtidos a partir de flores de *Tagetes patula* por extração exaustiva usando tetrahidrofurano para obtenção de luteína 92% pura. Paralelamente, os ésteres de luteína foram extraídos utilizando-se um sistema de extração com fluido supercrítico de CO₂ e etanol a 10%. As nanocápsulas foram preparadas, caracterizadas e sua estabilidade investigada. Os resultados mostraram distribuição de tamanho monomodal com índice de polidispersão de $0,11 \pm 0,02$, diâmetro médio de $191,90 \pm 3,24$ nm, potencial *zeta* de $-5,14 \pm 2,22$ mV e eficiência de encapsulação de 99,51%. As propriedades físico-químicas da suspensão de nanocápsulas poliméricas foram avaliadas em função do tempo de armazenamento para determinar a estabilidade da formulação. Após 60 dias de armazenamento (4 °C), a nanocápsula manteve-se estável, sem alterações significativas no diâmetro e cor ($p \geq 0,05$); e o conteúdo residual de luteína foi de 36% em relação ao valor inicial. No entanto, a nanocápsula armazenada a 25 °C apresentou alterações no potencial *zeta*, pH, valores de cor e conteúdo residual ao longo do tempo, quando comparada às nanocápsulas armazenadas a 4 °C. O teor de luteína nas nanocápsulas após 90 dias de armazenamento a 4 °C e 25 °C apresentou valores superiores aos da luteína livre, após 30 dias de armazenamento nas mesmas condições. Outro estudo realizado neste trabalho foi a avaliação da estabilidade da luteína

(92% de pureza) nas nanocápsulas produzidas, durante fotossensibilização (5-25 °C) e aquecimento (70-90 °C) em sistema modelo. Durante a fotossensibilização e aquecimento, a luteína nanoencapsulada exibiu energia de ativação (E_a) de 24,67 kcal/mol e 9,96 Kcal/mol, respectivamente, e estes valores foram superiores aos valores para luteína livre relatados em outros estudos para ambos os experimentos. Assim, a nanoencapsulação permitiu a solubilização da luteína em meio aquoso, aumentou a estabilidade da luteína frente ao tratamento térmico e radiação luminosa.

Palavras-chave: solubilidade; estabilidade; nanocápsula; luteína

ABSTRACT

Carotenoids are pigments widely distributed in nature and are mostly present in plant tissues. In recent years, several studies have suggested that the consumption of fruits and vegetables with a high content of these bioactive compounds are associated with a decrease in the incidence of some diseases in humans. However, carotenoids exhibit some undesirable characteristics such as instability against light, heat and oxygen, as well as insolubility in aqueous media, which makes them in some ways unviable for use in food and pharmaceutical formulations. In this context, the present study developed polymeric nanocapsules, containing lutein, with the aim of improving the solubility and stability of this carotenoid. Lutein nanocapsules were developed by the technique of interfacial deposition of the preformed polymer poly- ϵ -caprolactone. The lutein crystals were obtained from *Marigold* flowers by exhaustive extraction using tetrahydrofuran to obtain lutein 92 % pure. In parallel, the lutein esters were extracted using a supercritical fluid extraction system with CO₂ and ethanol 10%. The nanocapsules were prepared, characterized and their stability investigated. The results showed monomodal size distribution with polydispersity index of 0.11 ± 0.02 , z-average of 191.90 ± 3.24 nm, zeta potential of -5.14 ± 2.22 mV and encapsulation efficiency of 99.51%. The physicochemical properties of polymeric nanocapsules suspension were evaluated in function of storage time to determine the formulation stability. After 60 days of storage (4 °C) the nanocapsules were stable without significant changes in diameter and color ($p \geq 0.05$); and residual content of lutein was 36 % relative to initial value. However, nanocapsules stored at 25 °C presented changes in zeta potential, pH, color values and residual content over time when compared to nanocapsules stored at 4 °C. Lutein content in the nanocapsules after 90 days of storage at 4 °C and 25 °C presented superior values than free lutein after 30 days of storage in same conditions. Thus, the nanoencapsulation allowed the solubilization of lutein in aqueous medium and increased the stability of lutein in different temperatures. Another study carried out in this work was to evaluate the stability of lutein (92% of purity) in lipid-core nanocapsules, prepared by interfacial deposition of preformed polymer, during photosensitization (5-25 °C) and heating (70-90 °C). During photosensitization and heating,

nanocapsules exhibited activation energy (E_a) of 24.67 kcal/mol and 9.96 Kcal/mol, respectively, and these values to nanocapsules were superior than free lutein values reported in other studies for both experiments. The results obtained in this study suggest that nanotechnology can improve the stability of lutein. Thus, the nanoencapsulation allowed the solubilization of lutein in aqueous medium, increased the stability of lutein against heat treatment and light radiation.

Keywords: solubility; stability; nanocapsule; lutein.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3	19
Figura 1. Estruturas químicas de alguns carotenoides importantes em alimentos.....	20
Figura 2. Dipalmitato de luteína.....	24
Figura 3. Flor de <i>Tagetes patula</i> L.....	26
Figura 4. Modelo ilustrativo de uma partícula lipídica sólida.....	39
CAPÍTULO 5	50
Figure 1. TEM image of Lutein-LNC [bar 100 nm (500,000)].....	64
Figure 2. Rheological behavior of Lutein-LNC, in triplicate.....	66
Figure 3. Size distribution (volume) obtained by LD (a and b) and by DLS (c and d) during 90 days of storage at 4°C (a and d) and 25°C (b and d).....	69
Figure 4. Lutein content in lutein-LNC and Free Lutein solution stored at 4°C and 25°C for 90 days.....	73
CAPÍTULO 6	83
Figure 1. Lutein concentration during heating of Lutein-LNC.....	91
Figure 2. Stability of Lutein-LNC during photosensitization in different temperatures in air-saturated (a) and in same temperature and in different conditions (b).....	93
CAPÍTULO 7	100
Figura 1. Diagrama de fases para uma substância pura.....	101
Figura 2. Extrator de fluido supercrítico PrepMaster da Suprex.....	108
Figura 3. Cromatograma de CLAE do extrato bruto de <i>Tagetes patula</i> extraído com ScCO ₂ e etanol 10%.....	111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3	19
Tabela 1. Benefícios para a saúde humana de alguns carotenoides.....	21
Tabela 2. Concentração de ésteres de luteína em flores de <i>Tagetes</i>	23
Tabela 3. Teor de luteína de alguns vegetais.....	25
Tabela 4. Constantes de reação de desativação (k_q) de oxigênio singlete de alguns carotenoides em sistema-modelo utilizando benzeno.....	33
Tabela 5. Algumas formulações nanométricas de luteína encontradas na literatura.....	43
CAPÍTULO 5	50
Table 1. Stability of Lutein-LNC during 90 days of storage at 4 °C and 25 °C: z-average and Polydispersity Index (PDI).....	68
Table 2. Stability of Lutein-LNC during storage for 90 days at 4 °C and 25 °C on pH and color (L, a* and b*).....	71
CAPÍTULO 6	83
Table 1. Rate constant (k_{obs}) and activation energy for lutein loss during photosensitization and heating of Lutein-LNC.....	92
CAPÍTULO 7	
Tabela 1. Rendimento da extração das flores de <i>Tagetes patula</i> utilizando CO ₂ e etanol em condição supercrítica.....	110
Tabela 2. Ésteres detectados em flores de <i>Tagetes patula</i> , obtidos por ScCO ₂ + 10% de etanol.....	113

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1 INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 2	18
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.1.1 Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 3	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 Os carotenoides	19
3.2 Luteína.....	21
3.3 Fontes de luteína.....	24
3.4 Pigmentos de <i>Tagetes</i>	25
3.5 Isolamento e purificação da luteína.....	27
3.6 Ação antioxidante.....	29
3.7 Luteína, sensibilizadores e oxigênio singlete.....	30
3.8 Estabilidade térmica	35
3.9 Nanotecnologia	36
3.9.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).....	37
3.9.2 Difusão de solvente	38
3.9.3 Nanoemulsões	38
3.10 Nanoencapsulamento de carotenoides	39
CAPÍTULO 4	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Materiais.....	44
4.2 Extração e saponificação.....	45
4.3 Cristalização	45
4.4 Confirmação da identidade dos carotenoides e quantificação do teor de luteína.....	46
4.5 Desenvolvimento das nanocápsulas contendo luteína	47
4.6 Determinação do teor de luteína e eficiência de encapsulação.....	47
4.7 Determinação de diâmetro médio e o potencial zeta	47
4.8 Viscosidade	48
4.9 pH	48
4.10 Análise colorimétrica.....	48
4.11 Morfologia	49

4.12 Fotossensibilização e aquecimento das nanocápsulas de luteína.....	49
4.13 Análise estatística	50
CAPÍTULO 5	51
ARTIGO 1: Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability evaluation	51
CAPÍTULO 6	84
ARTIGO 2: Heating and photosensitization influence on stability of lutein-loaded lipid-core nanocapsules	84
CAPÍTULO 7	100
Extração e caracterização de compostos bioativos de flores de <i>Tagetes patula</i> utilizando fluido supercrítico (CO₂) e co-solvente etanol.....	100
1 Introdução	100
1.1 Fluido supercrítico	100
1.2 Processo de extração supercrítica.....	103
1.3 Extração supercrítica de carotenoides.....	104
2 Objetivos	106
2.1 Objetivo geral.....	106
2.1 Objetivos específicos	106
3. Materiais e métodos	107
3.1 Materiais.....	107
3.2 Métodos	107
3.2.1 Extração com fluido supercrítico.....	107
3.2.2 Identificação de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	108
3.2.3 Caracterização dos extratos obtidos através CLAE acoplada a Espectrômetro de Massa	109
3.3 Análise estatística	109
4 Resultados e Discussão.....	110
4.1 Avaliação do rendimento de extração para extratos de <i>Tagetes patula</i>	110
4.2 Caracterização dos extratos de <i>Tagetes patula</i> utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massa	111
CONCLUSÃO.....	115
CAPÍTULO 8	116
DISCUSSÃO GERAL.....	116
CAPÍTULO 9	121
CONCLUSÃO GERAL	121
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o aumento da preocupação com a saúde e a qualidade de vida tem levado os consumidores a uma preferência por alimentos contendo compostos naturais e com propriedades benéficas à saúde. Destacam-se dentre tais compostos bioativos, os carotenoides, sobretudo devido à sua atividade biológica e propriedades antioxidantes.

Dependendo das características estruturais, os carotenoides podem ser classificados como carotenoides pró-vitamina A (β -caroteno, α -caroteno, γ -caroteno) e carotenoides não precursores da vitamina A, como por exemplo, luteína, zeaxantina, astaxantina e violaxantina (PRIYADARSHANI, 2017).

Muitos estudos sugerem que os carotenoides podem conferir vantagens significativas à saúde humana, mantendo as principais funções corporais e prevenindo enfermidades relacionadas à inflamação, como doenças cardiovasculares, oftalmológicas, pulmonares e neurodegenerativas, bem como alguns tipos de câncer (MADAAN et al., 2017; SURH et al., 2017; KRINSKY et al., 2003; ALVES-RODRIGUES e SHAO, 2004; DAGNELIE et al., 2000; BROW et al., 1999).

A luteína é o segundo carotenoide prevalente no plasma sanguíneo humano (o β -caroteno é o primeiro), e esse carotenoide está abundantemente presente em vegetais como couve e espinafre (KAULMANN e BOHN, 2014). Além de vegetais, as flores também podem ser usadas como fonte de luteína para a produção de suplementação dietética (VECHPANICH e SHOTIPRUK 2011). No entanto, a produção comercial de luteína é restrita apenas a poucas espécies, e apenas as flores de *Tagetes* são comercialmente cultivadas como fonte deste carotenoide (BENÍTEZ-GARCÍA et al. 2014; KHALIL et al. 2012).

Usualmente designadas como "pigmentos da mácula", a luteína e seu isômero, a zeaxantina, são conhecidas por fornecerem proteção contra a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), mediada por sua capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio prejudiciais, que são formadas nos fotorreceptores (LANDRUM e BONE, 2001).

Apesar de possuir importantes atividades biológicas, a luteína é uma molécula instável e com biodisponibilidade muito baixa, causada principalmente, por sua baixa solubilidade em meio aquoso. A estabilidade da luteína varia amplamente no processamento e na estocagem, dependendo da temperatura, da disponibilidade de oxigênio, exposição à luz, atividade de água, umidade, acidez, presença de metais, peróxidos, lipoxigenases, antioxidantes e prooxidantes (EL-AGAMEY et al., 2004).

Os carotenoides têm capacidade de estabilizar moléculas eletronicamente excitadas, tais como oxigênio singlete e sensibilizadores. A estabilização pode ocorrer de duas maneiras: química e fisicamente. Na estabilização química, há a união entre o carotenoide e a molécula excitada, por sua vez na estabilização física, a molécula excitada transfere sua energia para o carotenoide, tornando-se com menor energia. Em seguida, o carotenoide libera energia em forma de calor para o ambiente, retorna ao seu estado fundamental e pode realizar novos ciclos de estabilização. Entretanto, pode ocorrer a degradação do carotenoide, impedindo a realização de novos ciclos de estabilização (YAHIA; ORNELAS-PAZ, 2010).

Uma estratégia alternativa para aumentar a bioacessibilidade e absorção de carotenoides e outros bioativos lipofílicos, é a encapsulação dos compostos dentro de micro e nanoestruturas para adição em alimentos e bebidas. Essas abordagens têm mostrado aumentar a estabilidade dos compostos durante o processamento e armazenamento, e melhoraram a recuperação e bioacessibilidade após a digestão (ÁLVAREZ-HENAO et al. 2018).

Atualmente, a nanotecnologia é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de sistemas de transporte de carotenoides, óleos essenciais, vitaminas e outros extratos vegetais, como os polifenóis, tanto na área farmacêutica como na indústria de alimentos.

A nanotecnologia inclui todos os sistemas de tamanho submícron (<1000 nm), preferencialmente aqueles que medem 100-500 nm. Sua maior área de superfície por massa em comparação com partículas maiores de mesma composição química torna os nanossistemas mais estáveis e biologicamente ativos, permitindo a incorporação de substâncias hidrofóbicas e/ou ativas que não alteram muito sua aparência ou transparência,

mantendo suas características originais e ainda auxiliam no aumento da vida útil dos alimentos (ZARAGOZA-ZARAGOZA et al. 2018).

Dentre as opções de encapsulamento de bioativos, as nanopartículas poliméricas têm apresentado resultados satisfatórios no transporte e liberação destes compostos. Dependendo da composição, as nanopartículas podem ser chamadas de nanocápsulas ou nanoesferas. A presença de óleo nas nanocápsulas conduz a uma estrutura vesicular, enquanto a sua ausência em nanoesferas proporciona uma organização matricial das cadeias poliméricas. As nanocápsulas podem ser preparadas utilizando polímeros pré-formados por deposição interfacial do polímero (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Diante do exposto, o uso da nanoencapsulação apresenta-se como uma excelente alternativa para melhorar a estabilidade de pigmentos como a luteína, tornando possível sua incorporação em sistemas alimentícios hidrossolúveis sem a perda de suas propriedades.

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo luteína e avaliar a estabilidade destas durante o armazenamento e em testes de fotossensibilização e aquecimento a diferentes temperaturas.

2.1.1 Objetivos específicos

- Isolar e purificar luteína utilizando como matéria-prima as pétalas de *Tagetes patula* L. por método de cristalização.
- Extrair os compostos bioativos presentes nas flores de *Tagetes patula* L. empregando o dióxido de carbono supercrítico como solvente e etanol como co-solvente.
- Desenvolver nanocápsulas de luteína a partir de cristais de alta pureza pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando poli-(ϵ -caprolactona) (PCL).
- Caracterizar as suspensões de nanocápsulas de luteína através da determinação da eficiência de encapsulamento, viscosidade, pH, análise colorimétrica, morfologia, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial *zeta*.
- Avaliar a estabilidade das nanocápsulas pela determinação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial *zeta*, pH, análise colorimétrica e concentração de luteína durante armazenamento em temperatura ambiente e refrigerada.

CAPÍTULO 3

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Os carotenoides

Os carotenoides são compostos lipofílicos coloridos, geralmente apresentando coloração amarela, laranja ou vermelha e estão amplamente distribuídos na natureza. A maioria dos carotenoides apresenta uma estrutura carbônica de espinha dorsal, constituída por unidades de isopreno, e estão divididos em dois grupos: os carotenos e as xantofilas. Na Figura 1 estão exemplificadas algumas estruturas químicas de carotenoides.

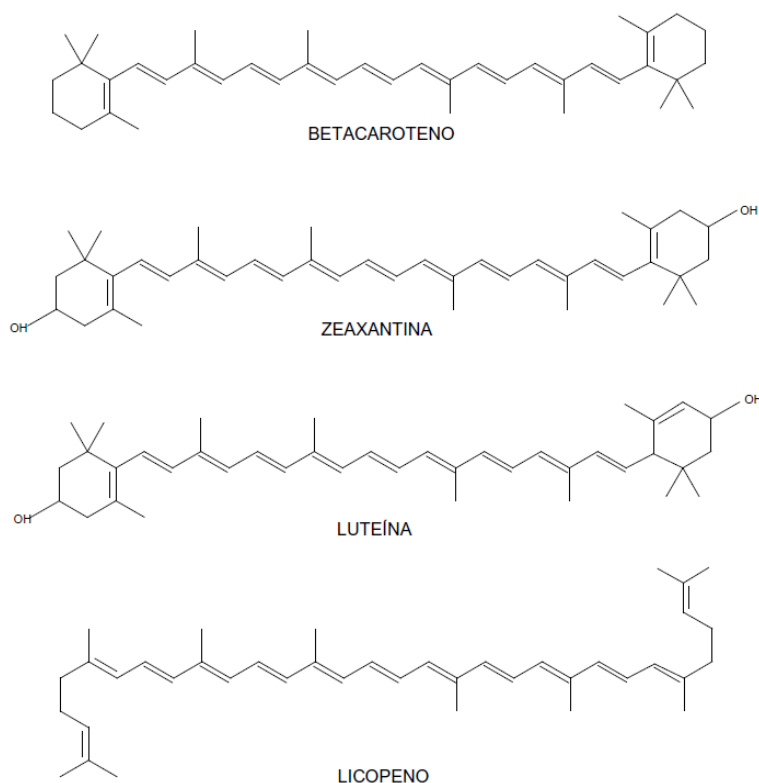
Embora sejam micronutrientes, presentes em níveis muito baixos (microgramas por grama), esses compostos estão entre os constituintes alimentícios mais importantes. São pigmentos naturais responsáveis pelas cores de muitas frutas, hortaliças e gema de ovo. Além disso, estão presentes em muitos organismos marinhos, incluindo algas, crustáceos e microrganismos, tais como microalgas, cianobactérias, fungos e bactérias heterotróficas (GALASSO et al. 2017).

São também substâncias bioativas com efeitos benéficos à saúde (Tabela 1), e alguns deles apresentam atividade pró-vitáminica A (RODRIGUEZ-AMAYA et al. 2008).

Dietas ricas em luteína têm sido associadas à redução do risco de falha da visão devido à Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), a principal causa de cegueira irreversível entre as populações idosas (WANG et al. 2006).

Os carotenoides compreendem dois grupos estruturais: os carotenos, que possuem cadeia caracterizada pela presença de carbono e hidrogênio e as xantofilas que apresentam oxigênio na cadeia e consistem em derivados que geralmente contêm grupos hidroxila, epóxido e aldeído (SCHWARTZ, 2010).

Figura 1. Estruturas químicas de alguns carotenoides importantes em alimentos.
Fonte: LIU et al. (2014)



Carotenoides compostos somente por hidrocarbonetos (p.ex.: β -caroteno, licopeno) são denominados simplesmente de carotenos e aqueles com funções químicas oxigenadas são chamados de xantofilas. Os grupos substituintes oxigenados mais comuns são os grupos hidroxila (como da β -criptoxantina), ceto (como da cantaxantina), epóxido (como da violaxantina) e aldeído (como da β -citraurina). Os carotenoides podem ser acíclicos (como o licopeno), monocíclicos (como o γ -caroteno) ou bicíclicos (como o α - e β -caroteno). Na natureza, os carotenoides se apresentam predominantemente na forma *all trans* (ou *all-E*), que é mais estável, embora pequenas quantidades de isômeros *cis* (ou *Z*) também possam ser encontradas (RODRIGUEZ-AMAYA et al. 2008).

Tabela 1. Benefícios para a saúde humana de alguns carotenoides.

Benefícios		Referências
Luteína	Prevenção da catarata	Manayi <i>et al.</i> (2015); Bone e
	Ação Antioxidante	Landrum (2003);
	Prevenção de doenças cardiovasculares	Vijayapadma <i>et al.</i> (2014)
β-Caroteno	Prevenção da cegueira noturna	Dufossé <i>et al.</i> (2005)
	Propriedade antioxidante	Shaish <i>et al.</i> (2006)
	Prevenção de fibrose hepática	Virtamo <i>et al.</i> (2014)
Licopeno	Anticancerígeno	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2014)
	Prevenção de doenças cardiovasculares	Srinivasan <i>et al.</i> (2009)
	Proteção contra radiações	Devasagayam <i>et al.</i> (2004)
	Propriedade antioxidante	
Fucoxantina	Prevenção à obesidade	Abidov <i>et al.</i> (2010)
	Propriedade antioxidante	Nanba e Toyooka (2008)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.2 Luteína

Entre os carotenoides importantes para a saúde humana, destaca-se a luteína (3,3-dihidroxi- α -caroteno), uma xantofila que se acumula na mácula, parte central da retina humana responsável pela acuidade visual. A luteína, juntamente com a zeaxantina, é responsável pela pigmentação amarela característica dessa região ocular (NWACHUKWU *et al.* 2016).

Ao contrário de outros carotenoides, como o β -caroteno, a luteína não é um precursor da vitamina A; no entanto, descobriu-se que este fitoquímico de cor laranja brilhante tem muitos efeitos benéficos para a saúde. Desta forma, este bioativo é um dos componentes essenciais para o sustento de funções fisiológicas humanas vitais. Uma vez que o corpo humano não pode sintetizar luteína por si só, sua necessidade precisa ser

satisfeita de fontes dietéticas como verduras de folhas verdes escuras como espinafre, feijão e couve, vegetais como o milho e frutas contendo luteína como kiwi, uva e laranja.

Com o aumento da expectativa de vida da população, e conseqüentemente, o maior número de idosos no mundo, a utilização da luteína como forma de combate e prevenção de doenças degenerativas é uma alternativa interessante e sua aplicação como ingrediente em bebidas e alimentos pode ser bastante conveniente e atrativa (MAUS, 2011).

A luteína apresenta grupos terminais β e ϵ , enquanto a zeaxantina é simétrica e possui dois grupos terminais β . Tanto a luteína quanto a zeaxantina são dihidroxicarotenoides com grupos hidroxila localizados nos carbonos 3 e 3'.

O extensivo sistema de duplas ligações conjugadas é uma característica distintiva que dá aos carotenoides propriedades e funções especiais (FRASER; BRAMLEY, 2004). Esta estrutura altamente insaturada torna estes pigmentos sensíveis ao oxigênio, à luz e ao calor.

A luteína é um oxicarotenoide ou xantofila (4', 5'-dide-hidro-5', 6'-di-hidro-beta, β -caroteno-3,3'-diol), contendo dois grupos terminais cíclicos (um anel β e um anel α -ionona) e a estrutura isoprenoide C40 básica, comum a todos os carotenoides. Embora as duplas ligações presentes na cadeia da luteína pudessem gerar conformações *cis* e *trans*, o que elevaria para um número maior de isômeros mono-*cis* e poli-*cis*, a grande maioria dos carotenoides se encontram preferencialmente na configuração *trans* (RICE-EVANS et al., 1997).

Na natureza apresenta-se como uma mistura das formas *trans* (60-90%) e *cis* (10-40%), apresentando maior estabilidade na conformação *trans*. Os isômeros *cis* da luteína apresentam coloração menos intensa quando comparado aos isômeros *trans*. (SOWBHAGYA, 2004).

A luteína é encontrada principalmente em vegetais folhosos verde escuros, mas a mais importante fonte de ésteres de luteína são as espécies de flores conhecidas como *Tagetes*, nas quais a luteína se encontra quimicamente ligada a alguns tipos de ácidos graxos, tais como o ácido láurico, mirístico e palmítico (BHATTACHARYYA et al., 2010)

Dessa forma, os extratos de luteína são ricos em diésteres de ácidos graxos (Figura 2) e alguns monoésteres (Tabela 2). Isto ocorre pelo fato de a molécula da luteína ser

assimétrica e possuir anéis β e ϵ ionona, sendo monoacilada e diacilada por dois ácidos graxos diferentes, que formam os regioisômeros.

Tabela 2. Concentração de ésteres de luteína em flores de *Tagetes*.

Ésteres de luteína ($\mu\text{g/g}$)					
Cor	Dimiristato	Miristato Palmitato	Dipalmitato	Palmitato Estearato	Total
Amarelo brilhante	-	2,74	5,29	-	8,03
Amarelo	-	4,61	82,17	91,93	178,71
Laranja	0,41	116,46	202,87	-	323,40
Laranja e marron	30,29	356,39	404,41	-	791,09

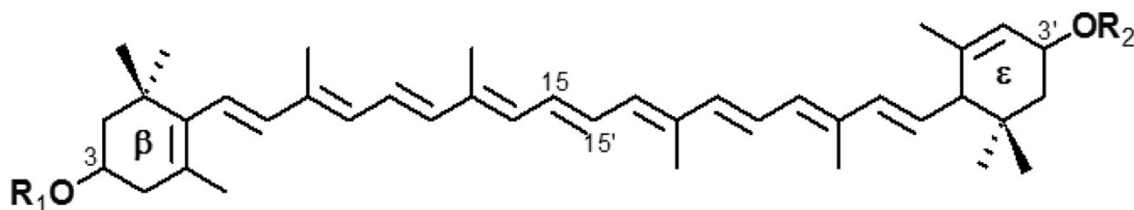
Fonte: ABDEL-AAL e RABALSKI (2015).

Em um experimento com extratos de *Tagetes*, Gau et al., (1983) relataram a presença de diésteres de xantofilas de ácidos mirístico, palmítico e esteárico. Os mesmos autores foram os primeiros a relatar a mistura de diésteres palmitato-estearato de miristato-palmitato de luteína. A possibilidade da presença destes regioisômeros não foi reconhecida na época porque a estrutura apresentada para luteína era incorretamente identificada como sendo o carotenoide zeaxantina, o qual não forma regioisômeros.

Segundo Subagio e Morita (2003), a esterificação do grupamento OH da molécula da luteína com ácidos graxos aumenta a estabilidade do carotenoide frente ao calor.

Figura 2. Dipalmitato de luteína.

Fonte: MERCADANTE et al. (2017).



3.3 Fontes de luteína

Os carotenoides da dieta humana são principalmente encontrados nos vegetais (Tabela 3), como as raízes, folhas, brotos, frutos, flores e, em menores extensões, podem ser encontrados em produtos avícolas e derivados de algas. Em frutas e hortaliças pode ocorrer variação de 4 a 20 carotenoides em um único produto (NWACHUKWU et al. 2016).

Tabela 3. Teor de luteína de alguns vegetais.

Alimento	Luteína ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)
Brócolis	772
Couve	8884
Salsa	4326
Espinafre cru	6603
Espinafre cozido	12640
Aspargo cozido	991
Alface	3824
Milho cozido	202

Fonte: PERRY et al. (2009).

Os teores de luteína nas frutas e hortaliças podem variar dependendo da parte da planta analisada, estágio de maturação, condições climáticas, manejo pós-colheita, variedade e espécie analisada (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

De acordo com Alves-Rodrigues e Shao (2004), a luteína pode ser empregada na indústria de alimentos funcionais, para enriquecimento de produtos de frutas, bebidas lácteas, cereais, biscoitos, molhos e sopas. Como corante natural, pode ser utilizada para colorir alimentos como óleos comestíveis, margarina, maionese, mostarda, molhos de salada, iogurte, bolos, sorvete e produtos lácteos (SOWBHAGYA et al., 2004).

A luteína pode ser empregada em alimentos na forma de microemulsões, as quais podem servir como um eficiente veículo de transporte, o que vem a reduzir problemas de solubilidade, e viabilizar o emprego deste carotenoide em bebidas com características translúcidas (AMAR et al., 2004).

Estudos toxicológicos têm confirmado que a luteína é segura, sendo considerada substância Geralmente Reconhecida como Segura (GRAS - Generally Recognized As Safe). O enriquecimento de alimentos pode ser realizado com êxito sem que ocorram mudanças nos demais ingredientes e sem nenhum impacto às propriedades sensoriais do produto final (ALVES-RODRIGUES e SHAO, 2004)

3.4 Pigmentos de *Tagetes*

Tagetes L. é uma planta ornamental pertencente à Família *Asteracea*. É cultivada em certas partes da Índia, bem como em outras partes do mundo possuindo diferentes variedades e suas flores estão disponíveis em vários tons de amarelo, vermelho, laranja e marrom alaranjado (SOWBHAGYA et al., 2004).

Figura 3. Flor de *Tagetes patula* L.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.



No México é utilizada na medicina tradicional, sendo uma planta de ramificação anual de cerca de 60 a 90 centímetros de altura. As flores de *Tagetes* preferem solos de pH 7,0 a 7,5, argilosos e arenosos férteis e com boa capacidade de retenção de água, bem como um clima ensolarado. A propagação é por sementes, corte ou caule fresco. As folhas são fortemente perfumadas (SOWBHAGYA et al., 2004).

Os primeiros estudos sobre *Tagetes* envolviam o conhecimento sobre seus constituintes, química e biologia em geral, porém devido à bioatividade de seus diversos compostos, o interesse recente tem sido investigar o efeito funcional de seus vários extratos e isolados. Por isto, cresceu o interesse na aplicação de *Tagetes* como corante em alimentos, utilizando várias partes da planta (raiz, flor e folha) (OLMEDILLA et al., 2003).

Os principais pigmentos presentes na *Tagetes* são os carotenoides e os flavonoides. O extrato de *Tagetes* contém aproximadamente 27% de carotenoides, com 0,4% de β -caroteno, 1,5% de éster de criptoxantina e 86,1% de éster de xantofila. Os carotenoides de *Tagetes* têm sido utilizados na produção de rações para alimentação de frangos com o objetivo de aumentar a cor amarela de gemas de ovo (VASUDEVAN et al., 1997; WANG, 2006).

Segundo Showbhagia et al., (2004) não menos que 17 componentes foram identificados em *T. erecta*. No entanto, a contribuição dos outros pigmentos além da luteína (72,3%), zeaxantina (16,4%), fitoeno (2,4%) e fitoflueno (2,6%) é insignificante.

Nos estudos de Hadden et al., (1999) e Rivas (1989) os ésteres de luteína representaram 88,0 e 95,5% do total de carotenoides presentes nas flores de *T. erecta* L., respectivamente.

Nachtigall (2007) encontrou um teor médio de 1230,2 mg.100 g⁻¹ de luteína nas flores marrons de *T. patula* L. Esta concentração está em níveis superiores aos encontrados por Gregory et al., (1986) que avaliaram o teor de luteína em flores frescas *T. erecta* L. de coloração laranja marrom (80mg.100 g⁻¹). Nas flores exploradas comercialmente, laranjas e laranjas escuras, os autores supracitados encontraram um teor variando de 40 a 67 mg.100 g⁻¹, respectivamente.

De acordo com Tsao et al., (2004) em flores de *T. erecta* L. encontra-se 0,6 a 2,5% de xantofilas em base seca, considerando um teor de luteína de 90% do teor de carotenoides, com uma variação no teor de luteína entre 540-2250 mg.100 g⁻¹.

Boonnoun et al. (2012) realizaram estudo para aumentar a pureza de luteína extraída de flores de *Tagetes* L. Os autores obtiveram rendimento de 66 % na extração e 97 % de pureza da luteína, utilizando métodos cromatográficos de separação em camada delgada e coluna de vidro (hexano:acetato de etila, 70:30).

Ésteres de ácidos graxos de luteína extraídos de pétalas de *Tagetes* são miscíveis com óleos vegetais, produzindo cores nos alimentos que vão do amarelo-ouro ao laranja, podendo-se atingir vermelhos com a adição de carotenoides sintéticos. O desenvolvimento de formas solúveis para serem usadas mais facilmente em água com aumento da estabilidade oxidativa tem estendido suas aplicações, usando este pigmento em sobremesas, refrigerantes e produtos de padaria (WANG et al., 2006).

3.5 Isolamento e purificação da luteína

A quantidade total e a concentração relativa de cada carotenoide podem ser influenciadas pela seleção de cultivares e variedades. Por essa razão, é necessário cautela no uso de dados de trabalhos e de tabelas de composição de alimentos. Essas informações

dependem de outros fatores como parte da planta consumida, estágio de maturação, condições climáticas e geográficas e manejo pós-colheita (KIMURA e RODRIGUEZ-AMAYA, 1993; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; SÁ e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

Muitos métodos têm sido propostos a fim de melhorar tanto a extração quanto a purificação de carotenoides (AUSICH E SANDERS 1997, PHILIP 1997; VECHPANICH, 2011). Porém, alguns deles apresentam o inconveniente de utilizarem temperaturas um pouco elevadas no desenvolvimento do método, o que pode resultar na degradação e formação de componentes indesejados (LEVI, 2001; MADHAVI e KAGAN, 2002).

Métodos alternativos de extração de carotenoides, sem a aplicação de solventes orgânicos tóxicos, têm apresentado vantagens significativas nas últimas décadas. Um exemplo é o emprego da técnica de extração com fluido supercrítico, utilizando o gás carbônico (CO₂) como solvente extrator, bem como o álcool etílico como co-solvente, em alguns casos, com objetivo de melhorar a eficiência da extração.

O tratamento enzimático também tem sido proposto como uma alternativa para melhorar a extração de xantofilas de *Tagetes* (NAVARRETE-BOLANOS 2004).

Além da extração, o processo de saponificação também tem sido extensamente estudado, sobretudo no que diz respeito à estabilidade do pigmento obtido. As xantofilas estão geralmente esterificadas e, neste caso, há necessidade de análises adicionais, além da separação e identificação. Uma das vantagens de saponificação é a eliminação da clorofila e de misturas complexas (DELGADO-VARGAS et al., 2000).

Segundo Mínguez-Mosquera et al., (2002) a saponificação é um procedimento rotineiro na análise de carotenoides, visando eliminar materiais lipídicos e clorofilas, que interferem nos ensaios espectrofotométricos, ou ainda, na hidrólise de ésteres de xantofilas.

É considerado o melhor meio para a remoção de clorofilas e produtos de degradação. Embora esta etapa possa ser efetuada diretamente na matriz homogeneizada, frequentemente é executada após a extração orgânica.

Normalmente é realizada com solução metanólica ou etanólica de hidróxido de sódio ou potássio (5-30%) que é somada ao extrato de pigmentos. Uma diminuição no conteúdo de carotenoides é observada durante a saponificação que pode variar de 5 até

100%, o que vai depender da concentração e da estrutura do carotenoide, bem como, dos procedimentos aplicados durante a saponificação (GRANADO et al., 2001).

Dependendo das condições empregadas (tempo, temperatura, concentração, solução de hidróxido, número e volume para partição e lavagem) os carotenoides podem produzir artefatos, sofrer isomerização, degradação, bem como, ocorrer perdas em consequência de uma recuperação incompleta durante a partição (PICCAGLIA et al., 1998).

Nachtigall et al., (2007) avaliaram o teor de luteína em algumas hortaliças comumente consumidas no estado de Minas Gerais e também observaram a eficiência da extração utilizando diferentes solventes. A extração do pigmento foi realizada com acetona, etanol, hexano e tetraidrofurano, por 24h. Após a extração realizou-se a saponificação com KOH etanólico 10% para eliminar impurezas, como clorofila e ácidos graxos. O teor de luteína nas hortaliças foi determinado por medidas espectrofotométricas e confirmado por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). Pelos resultados obtidos, a acetona foi o solvente mais efetivo para a extração do pigmento, com valores que variaram de 0,99 a 5,12 mg.100 g⁻¹, para jiló e rúcula, respectivamente.

Khachik (1995) publicou um método eficiente para isolamento, purificação e recristalização de luteína a partir de um extrato comercial de *Tagetes*. De acordo com este método, a luteína pura está livre de impurezas químicas que existem em plantas e outros vegetais. A luteína em estado puro, neste caso, pode ser utilizada como padrão analítico, em estudos de prevenção ao câncer e como um aditivo seguro na alimentação humana. O método de purificação envolve a saponificação do extrato ou óleo resina com KOH a 10% em álcool metílico, utilizando uma série de etapas que envolvem filtrações e lavagens com água e álcool etílico para obtenção dos cristais brutos. Os cristais, assim obtidos, são dissolvidos num solvente orgânico halogenado, no qual a luteína é bastante solúvel e, em seguida, em um segundo solvente orgânico, que neste caso, deve solubilizar parcialmente a luteína. Sob resfriamento, a luteína é recristalizada e a mistura obtida possui um elevado grau de pureza, verificado após secagem sob vácuo e análise cromatográfica.

3.6 Ação antioxidante

A atividade antioxidante da luteína consiste na inativação de espécies reativas, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos (POLYAKOV, et al., 2001). O número de duplas ligações conjugadas afeta a coloração e a capacidade antioxidante do carotenoide. Porém, a atividade antioxidante é afetada pela dupla conjugada do anel, ao contrário da coloração em que a ciclização reduz a intensidade da cor (MELLO, 2002; SILVA, 2001).

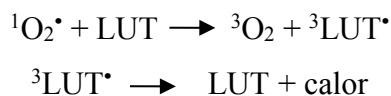
De acordo com Shami e Moreira (2004) a ação sequestrante de radicais é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas, presentes nas moléculas dos carotenoides. Segundo Mello (2002) para apresentar função como antioxidante e apresentar proteção máxima, os carotenoides devem possuir no mínimo nove ligações duplas conjugadas.

A luteína constitui potente antioxidante que pode prevenir danos causados pelas espécies reativas nos tecidos (ALVES-RODRIGUES e SHAO, 2004). Esse carotenoide absorve a luz azul prejudicial aos olhos e com isso reduz em 40% a incidência de luz danosa à mácula, região localizada no centro da retina, responsável pela visão nítida das imagens (DAGNELIE, ZORGE e McDONALD, 2000).

3.7 Luteína, sensibilizadores e oxigênio singlete

El-Agamey et al., (2004) afirmam que as propriedades antioxidantes dos carotenoides são atribuídas à sua estrutura, pela presença de elevado número de duplas ligações alternadas. Estas permitem a absorção da energia das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), canalizando-a através da longa cadeia de duplas ligações que se encontram em ressonância. A energia é finalmente liberada na forma de calor, regenerando a molécula de carotenoide ao seu estado inicial.

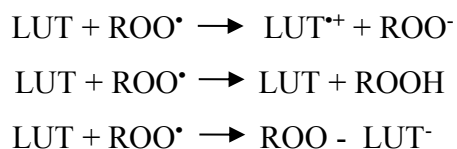
Desta forma, o princípio da proteção conferida pela luteína contra reações de fotossensibilização baseia-se num mecanismo de transferência de energia, que devolve o oxigênio singlete ao seu estado basal. O retorno da luteína triplete ao seu estado original, pela dissipação de energia na forma de calor, torna possível a reação com outro oxigênio singlete (Equação 1) (FONTANA, et al., 2004).



Equação 1 - Reação da luteína com oxigênio singlete.

Fonte: El-Agamey et al., (2004)

As reações em cadeia dos radicais peróxidos podem ser interrompidas pelos carotenoides através de três possíveis mecanismos: por transferência de elétrons, doação de hidrogênio ou por adição (Equação 2) (EL-AGAMEY et al., 2004). De acordo com Fontana et al., (2004) sob uma tensão adequada de oxigênio o curso das reações se completa.



Equação 2 - Reações da luteína com radicais peróxidos.

Fonte: El-Agamey et al., (2004)

A concentração de oxigênio gera um efeito significativo na atividade antioxidante dos carotenoides. Em baixas concentrações de oxigênio, os carotenoides apresentam comportamento antioxidante e caráter prooxidante em concentrações elevadas (EL-AGAMEY, et al., 2004).

A estrutura, a polaridade média e a reatividade dos carotenoides devem ser consideradas ao avaliar sua capacidade antioxidante (EL-AGAMEY, et al., 2004). Medidas via fotoemissão indicam que a capacidade de sequestro de oxigênio singlete por parte de

carotenos e xantofilas é máxima para o licopeno, alta para astaxantina ou cantaxantina, intermediária para β -caroteno ou bixina e menor para luteína e crocina (FONTANA, et al., 2004).

O local e orientação dos carotenoides nas membranas biológicas dependem da sua estrutura. Como consequência, sua habilidade em desativar espécies reativas é afetada. A característica apolar dos carotenos inviabiliza termodinamicamente a transferência de elétrons na membrana celular. No entanto, as xantoflias, como a luteína e a zeaxantina, pelo caráter mais polar, são capazes de atravessar a membrana e interceptar os radicais em regiões aquosas na superfície da membrana (SOWBHAGYA, 2004).

Os carotenoides quando expostos à luz, originam uma série de reações. Quando a incidência de energia da luz ultrapassa a região de absorção do carotenoide, reações de fotoisomerização competem com as de fotodegradação, enquanto que na presença de sensibilizador e luz (não necessariamente na mesma região de absorção dos carotenoides) ocorrem reações de isomerização e oxidação, geralmente, com a presença de um carotenoide em estado triplete como intermediário (MONTENEGRO et al., 2004).

A reação depende da intensidade de luz, comprimento de luz, temperatura, solvente e presença de catalisadores e sensibilizadores no meio (MERCADANTE, 2008). O oxigênio é triplete quando seus dois elétrons do orbital antiligante 2p têm a mesma direção de spin. Quando têm direções opostas, o oxigênio é chamado de singlete. Uma vez que os elétrons do oxigênio singlete ajustam-se à direção de spin do elétron na ligação dupla, podem reagir com ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos com uma velocidade 1500 vezes maior que o oxigênio triplete (MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

Uma das formas de geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) inicia com a recepção de energia na forma de fótons por um sensibilizador (S), se tornando mais excitado no estado triplete ($^3\text{S}^*$). Várias moléculas encontradas nos alimentos podem atuar como sensibilizadores (clorofilas, riboflavinas, porfirinas). O sensibilizador no seu estado excitado ($^3\text{S}^*$) pode transferir energia para uma molécula de oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), originando o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). O carotenoide (CAR) pode atuar de duas maneiras, para evitar as reações posteriores provocadas pela presença de oxigênio singlete. A primeira delas é estabilizando

o sensibilizador no seu estado triplete, recebendo energia e se tornando mais excitado. A segunda é estabilizando o oxigênio singlete (MONTENEGRO et al., 2004).

Estudos em sistema-modelo têm sido muito utilizados para demonstrar a capacidade de desativação de oxigênio singlete que os carotenoides têm. Dentre outras características, sabe-se que há uma tendência a maior capacidade de desativação pelos carotenoides com maior número de duplas ligações conjugadas, conforme exemplificado na Tabela 4 (EDGE; TRUSCOTT, 2010).

Tabela 4. Constantes de reação de desativação (k_q) de oxigênio singlete de alguns carotenoides em sistema-modelo utilizando benzeno.

Carotenoide	Duplas ligações conjugadas	K_q ($\times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Dodecano- β -caroteno	19	23,0
Decapreno- β -caroteno	15	20,0
Tetradehidrolícopeno	15	10,7
Rodoxantina	12(+2,C=O)	12,0
Astaxantina	12(+2,C=O)	14,0
Cantaxantina	12(+2,C=O)	12,0
Lícopeno	11	17,0
all- <i>trans</i> - β -caroteno	11	13,0
15- <i>cis</i> - β -caroteno	11	11,0
9- <i>cis</i> - β -caroteno	11	11,0
Zeaxantina	11	12,0
α -caroteno	10	12,0
β -apo-8'-carotenal	10	5,27
Luteína	10	6,64

Adaptado de: EDGE; TRUSCOTT, 2010.

Montenegro et al. (2002) estudaram o processo de desativação física e química de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por vários carotenóides em micelas inversas com sensibilizador rosa de bengala. A

degradação dos compostos, medida por espectrofotometria, seguiu uma cinética de primeira ordem. O valor de k_q aumentou com a extensão da cadeia de ligações duplas conjugadas, sendo que a presença de grupos substituintes na estrutura diminuiu o valor de k_q devido à maior diferença de energia entre os estados fundamentais e excitados dos carotenóides. Por outro lado, a k_r foi independente do tipo de carotenóide e 4 ordens de magnitude menor que a k_q . Foi observado também um decréscimo na k_q com o aumento do total de água presente no sistema (W = expresso como razão molar entre água e surfactante), provavelmente devido à menor acessibilidade do $O_2(^1\Delta_g)$ ao carotenóide, uma vez que com o aumento de W houve maior agregação micelar.

A luteína também pode sofrer alterações devido a fotoestabilidade. Shi e Chen (1997) avaliaram a estabilidade da luteína sob diferentes condições de armazenamento e quando as amostras foram expostas à luz fluorescente branca (4600 lux) a 25 °C por 75 dias, houve degradação do pigmento de 0,8% - 10,7% por dia nas amostras que continham ácido ascórbico, ácido ascórbico + KOH e H₂O (controle). Os autores verificaram que o ácido ascórbico pode retardar a degradação da luteína (0,04% - 2,5% por dia) em temperaturas variando desde -30 °C a 50 °C, sob condições alcalinas e no escuro. Altas temperaturas promoveram a degradação de luteína em todas as amostras.

A avaliação da estabilidade da luteína em três sistemas: nanopartículas sólidas lipídicas (NSL), transportadores lipídicos nanoestruturados (TLN) e nanoemulsões (NE) foi estudada no que diz respeito à fotoestabilidade. A irradiação das amostras foi realizada por meio de um simulador solar equipado com uma lâmpada de xenônio como fonte de UV-B. A intensidade da energia gerada pelo simulador solar era de 10 MED (Dose Eritematosa Mínima) correspondente a 300 mJ / cm². Os resultados apresentados demonstraram que todos os três sistemas produzidos demonstraram uma boa fotoestabilidade. Como controle, os autores utilizaram luteína pura (suspensa em óleo de milho) que apresentou degradação de 50% da sua concentração inicial, enquanto que NSL e TLN melhoraram a fotoestabilidade da luteína 10 vezes mais do que a luteína livre. A NE também exibiu um bom aumento na fotoestabilidade da luteína, mas ainda sim menor do que as nanopartículas lipídicas (MITRI et al., 2011).

Li et al., (2014) analisaram o teor de luteína e seus isômeros mantidos sob iluminação em um sistema modelo. No primeiro experimento os autores utilizaram um sistema catalisado por iodo em que as amostras foram iluminadas nos períodos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas a 25 °C e colocadas próximas da luz fluorescente (cerca de 10 cm). A intensidade de iluminação utilizada foi de 1800 lux. O outro experimento foi realizado sem a presença do catalisador de iodo e as amostras de luteína foram iluminadas com luz fluorescente nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas a 25 °C. A luz induziu a uma diminuição significativa no teor de luteína e tanto a isomerização quanto a degradação de luteína e seus isômeros ocorreram simultaneamente durante o experimento. Os autores também relataram que o catalisador de iodo forneceu elevada energia de ativação, visto que alguns isômeros formados tiveram predominância sobre os demais.

3.8 Estabilidade térmica

A luteína é um polímero isoprenoide que contém duplas ligações que pode ser isomerizado, oxidado e degradado conforme as condições de temperatura e luz.

É importante ressaltar que os alimentos são matrizes complexas que podem conter componentes que interferem na elucidação das reações envolvidas com a degradação de carotenoides.

Para evitar a interferência destes compostos, que podem ser, por exemplo, oxidantes ou antioxidantes, são realizados estudos de estabilidade de carotenoides, aplicando-se luz e calor. No entanto, não são encontrados muitos trabalhos sobre a estabilidade da luteína nestas condições experimentais.

Henry, Catignani e Schwartz (1998) estudaram a estabilidade térmica e oxidativa de *all-trans*- β -caroteno, *9-cis*- β -caroteno, licopeno e luteína em sistema modelo de óleo de cártamo. Os autores verificaram que os carotenoides estudados apresentaram degradação seguindo a uma cinética de primeira ordem quando aquecidos a 75 °C, 85 °C e 95 °C. Os valores das constantes de velocidade reação (k) para licopeno foram cerca de duas vezes maiores que os dos outros carotenoides. O valor de energia de ativação para licopeno foi menor que para os outros carotenoides, indicando maior susceptibilidade à degradação.

Scotter, Castle e Appleton (2001) avaliaram a estabilidade de bixina em sistema modelo de metanol, etanol e n-propanol nas temperaturas de 65 °C, 78 °C e 97 °C por até 24 horas. Durante aquecimento a 78 °C foi verificada a produção de di-*cis*-bixina, *trans*-bixina e o composto de degradação C17 (monometil éster do ácido 4, 8, dimetil tetradecahexaenedióico) com constantes de velocidade de reação (k) de $3,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $1,2 \times 10^{-7}$, $1,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. O isômero di-*cis*-bixina foi produzido rapidamente, com tempo de meia vida de 30 minutos.

Rios, Mercadante e Borsarelli (2005) estudaram a cinética de degradação de bixina juntamente com os produtos formados em sistema modelo de água:etanol (8:2) em temperaturas de 70 °C a 125 °C. Em todas as condições a perda de bixina seguiu uma cinética de primeira ordem. Os autores verificaram que o isômero all-*trans*-bixina foi produzido somente a 125 °C. Montenegro et al. (2004), também verificaram que o isômero all-*trans*-bixina é o principal produto formado durante a degradação de *cis*-bixina em sistema modelo de fotossentização em acetonitrila:metanol (1:1) a 5, 15 e 20 °C em condições de saturação de nitrogênio (99,9%) e ar.

Hadjal et al. (2013) realizaram estudo da cinética de degradação térmica de xantofilas (*cis*-violaxantina, luteína, β -criptoxantina, zeaxantina e *cis*-anteraxantina) a 45, 60, 75, e 90 °C em suco de laranja. Os resultados obtidos mostraram que a β -criptoxantina exibiu as taxas de degradação mais baixas, seguido da luteína que apresentou uma energia de ativação de 15,5 kcal/mol.

Em outra investigação, Giménez et al. (2015) avaliaram a degradação térmica de corantes solubilizados em etanol-água (3:2, v/v) sob diferentes temperaturas (30 °C, 50 °C, 70 °C e 90 °C) e observaram que a luteína livre em solução apresentou uma energia de ativação de apenas 0,76 kcal/mol.

3.9 Nanotecnologia

O termo nanotecnologia foi definido pelo físico Richard Feynman em 1960, como o estudo das técnicas e manipulação dos materiais na faixa de 1-100 nm (DI SIA, 2017; SATALKAR et al., 2016; SERVIN e WHITE, 2016). Desde então, os nanomateriais têm sido utilizados nas áreas de comunicação, defesa, alimentos, biotecnologia, elétrica,

química, esportes e horticultura. No setor agrícola, a inovação e as mudanças estão relacionadas a variedades híbridas de culturas, produtos químicos sintéticos e biotecnologia relacionados com os campos de processamento de alimentos, embalagens, segurança, nutrição, pesticidas e nutracêuticos (HANDFORD et al., 2015; ZIBAREVA, 2015).

No que diz respeito à utilização em fármacos e alimentos, a nanotecnologia apresenta a vantagem de aumentar significativamente a solubilidade e a biodisponibilidade de vários compostos funcionais, sobretudo os que possuem características lipídicas (JOYE e MCCLEMENTS, 2013; YERRAMILI e GHOSH, 2017).

A melhora da solubilidade e da biodisponibilidade desses compostos, é devido as suas partículas finas, que diminuem as limitações intrínsecas da dissolução incompleta e lenta dos lipídios funcionais, devido a sua maior área superficial (ANARJAN et al. 2010; RIBEIRO et. al. 2008).

As partículas são envolvidas por moléculas estabilizadoras que impedem sua coalescência, que também pode proteger seus componentes bioativos da oxidação induzida por íons metálicos ou espécies reativas (ANARJAN e TAN 2013).

3.9.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas coloidais transportadores que foram desenvolvidos para encapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos funcionais, tais como lipídios bioativos e drogas. A fase líquida lipídica e uma solução de surfactante aquoso são homogêneos em uma temperatura acima da temperatura de fusão dos lipídios, para produzir uma fina dispersão de uma emulsão de óleo em água, conforme exemplificado na Figura 4 (HELGASON et al., 2009). A partícula é estabilizada por surfactantes, que podem ser compostos de uma única camada, mas normalmente há uma mistura de surfactantes (WEISS et al., 2008). Nanopartículas lipídicas têm uma estrutura semelhante à nanoemulsões, com um tamanho que varia normalmente de 50 a 1000 nm. O núcleo lipídico em nanoemulsões é líquido, mas, em nanopartículas, o núcleo lipídico está no estado sólido (FARHANG, 2007).

As NLS podem ser produzidas por diferentes técnicas, entre as quais a homogeneização sob alta pressão a quente ou a frio, a diluição de microemulsão, o preparo

de emulsão múltipla, a emulsificação/evaporação de solvente ou a difusão de solvente (LIPPACHER et al., 2001; MEHNERT e MÄDER, 2001). A seguir serão discutidos alguns dos principais métodos utilizados na produção de nanopartículas.

3.9.2 Difusão de solvente

O método de preparação de nanopartículas por deslocamento do solvente, consiste na precipitação ou deposição interfacial de um polímero pré-formado, uma vez que ocorre na interface de uma emulsão O/A. Por esta razão, o método é igualmente encontrado na literatura sob a denominação de nanoprecipitação (MOHAMMADI et al. 2010).

Neste método, a fase interna é constituída por um polímero dissolvido num solvente orgânico polar, como, por exemplo, a acetona ou o acetonitrila, no qual se encontra dispersa ou dissolvida o princípio ativo. A utilização de um tensoativo incluído na fase orgânica como, por exemplo, um fosfolipídio, pode ser adequada para prevenir a coalescência das gotículas (LEGRAND et al. 2007).

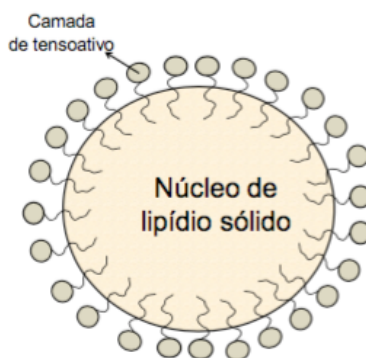
A fase externa é formada por uma solução aquosa, contendo um tensoativo do tipo O/A como, por exemplo, o PVA ou um poloxâmer. Procedese à dispersão da fase interna na fase externa, sob agitação magnética, ocorrendo uma emulsificação espontânea com a formação de um sistema opalescente devido à miscibilidade de ambas as fases. Segue-se a remoção do solvente orgânico a pressão reduzida, formando-se as nanopartículas, como resultado da difusão rápida do solvente do polímero, através da fase aquosa (BESHEER et al. 2009).

3.9.3 Nanoemulsões

Uma nanoemulsão pode ser considerada uma emulsão convencional que contém partículas muito pequenas, ou seja, raios médios entre cerca de 10 e 100 nm. O tamanho de partícula, comparado ao comprimento de onda da luz, significa que as nanoemulsões tendem a ser transparentes ou apenas ligeiramente turvas (semelhante a microemulsões). Este pequeno diâmetro também significa que elas apresentam uma maior estabilidade quando comparadas às emulsões convencionais (MCCLEMENTS e XIAO, 2012).

Figura 4. Modelo ilustrativo de uma partícula lipídica sólida

Fonte: Adaptado de VENTURINI et al. (2011).



3.10 Nanoencapsulamento de carotenoides

O encapsulamento de compostos bioativos para a formação de nanoestruturas é um exemplo emergente da aplicação da nanotecnologia na indústria de alimentos (SEKHON, 2010). Vários pesquisadores avaliaram a estabilidade de carotenoides encapsulados, conforme exemplificado na Tabela 5.

Tan e Nakajima (2005) estudaram a estabilidade de nanodispersões aquosas de β -caroteno pelo método emulsificação-evaporação, utilizando hexano como fase orgânica e Tween 20 como emulsificante. As nanodispersões apresentaram diâmetro de 40 a 260 nm e foi verificado que após 12 semanas de armazenamento a 4 °C, o teor de β -caroteno foi de 25 a 56% da quantidade inicial. Para aumentar a estabilidade das nanopartículas, os autores sugeriram que a utilização de outro emulsificante poderia ser capaz de estabilizar quimicamente o β -caroteno.

Em estudo de Hong et al. (2016), foram produzidas nanocápsulas de quitosana e ácido poli- γ -glutâmico, com a finalidade de melhorar a solubilidade da luteína. A faixa de

diâmetro obtida nas nanocápsulas sintetizadas foi de 115-260 nm, com uma distribuição de tamanho de partícula (PDI) menor do que 0,2. Tan et al. (2016) realizaram uma pesquisa comparando a formação de uma nanodispersão de luteína preparada pelo método de deslocamento do solvente com homogeneização sob alta pressão. Os autores verificaram que o menor tamanho de partícula e PDI (123,1 nm, 0,155) foram obtidos com a menor concentração de luteína de 0,1%. Os pesquisadores confirmaram que o método de deslocamento do solvente pode ser usado com sucesso para produzir partículas nanométricas com boa eficiência.

Lacatusu et al. (2013) avaliaram a estabilidade e as propriedades antioxidantes de nanocápsulas de núcleo lipídico utilizando óleo de peixe como fase lipídica. Os autores relataram que a nanocápsula apresentou boa estabilidade e capacidade de eliminação de 98% dos radicais livres nos testes realizados *in vitro*, através da quimioluminescência.

Em estudo de Mitri et al. (2011) nanocristais de luteína foram obtidos pelo método de formação de nanoemulsões, utilizando-se a homogeneização a alta pressão. Os autores pretendiam aumentar o poder de penetração de luteína na pele, bem como melhorar a absorção deste carotenoide quando ingerido via oral. O aumento da solubilidade e da área de superfície dos nanocristais foram alguns dos critérios utilizados para os pesquisadores confirmarem a eficiência do método aplicado.

Ribeiro et al. (2008) produziram nanopartículas de β -caroteno utilizando como polímeros, PLA (Poli ácido D,L-lático) e PLGA (Poli ácido D,L- co-glicólico), gelatina e Tween 20. As nanopartículas elaboradas com gelatina e Tween 20 apresentaram diâmetro médio de 74 e 77 nm, e estabilidade de pelo menos 5 meses armazenadas a 4 °C. Os autores atribuíram o tamanho das nanopartículas à alta difusão da acetona em água.

Yuan et al. (2008) ao caracterizarem nanoemulsões de β -caroteno do tipo óleo em água (O/W), variando-se a concentração, o tipo de emulsificante, temperatura, pressão de homogeneização e números de ciclos de homogeneização produziram nanoemulsões com diâmetros de 40 a 400 nm estáveis após 4 semanas de armazenamento a 4 e 25 °C. Entretanto, os autores verificaram perda do carotenoide, tendo como teor final variando de 75 a 86 % em relação a quantidade inicial.

Nanodispersões de luteína foram sintetizadas por Tan et al. (2016) as quais foram avaliadas em estabilidade conforme influência dos emulsificantes. Foi observado que as suspensões que continham polisorbato 80 e lauril sulfato de sódio apresentaram menor estabilidade, com perda de 50% do bioativo após 56 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Em outro estudo, nanopartículas de luteína, utilizando zeína como material de parede foram produzidas e a influência de estabilizantes foi avaliada após 30 dias de armazenamento a 25°C. Como resultados desta investigação eles verificaram que o conteúdo de luteína degradado foi de 26 e 54% na ausência e na presença de estabilizantes, respectivamente.

Lobato et al., (2013) caracterizaram e avaliaram a estabilidade de nanocápsulas de bixina produzidas pela técnica de deposição interfacial para formação de polímeros. Os cristais puros (98,7 % de pureza) obtidos foram extraídos de sementes de urucum empregando-se acetato de etila como solvente extrator e, posteriormente foram utilizados como padrão de bixina. A formulação ótima da nanocápsula apresentou uma concentração de bixina de $16,92 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ e foi considerada fisicamente estável durante o armazenamento por 119 dias com diâmetro médio de 195 nm. As nanocápsulas foram caracterizadas em termos de tamanho da partícula e distribuição no núcleo, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

Vishwanathan et al., (2009) formularam uma nanoemulsão hidrofílica de luteína que apresentou maior disponibilidade de absorção quando comparada a suplementos na forma de pílulas. A nanoemulsão óleo/água foi preparada com uma mistura de óleo de soja, Xangold® 15% (mistura de ésteres de luteína), vitamina E e Phospholipon® 85 G (mistura de fosfolipídios). A nanoemulsão produzida e estável foi adicionada ao suco de laranja e o experimento *in vivo* realizou-se com adultos saudáveis com 18 anos de idade ou mais.

Da Silva et al. (2016) e Dos Santos et al. (2015) utilizando a mesma técnica de nanoencapsulação do presente estudo, obtiveram eficiência de encapsulação de 99% em nanocápsulas produzidas com β -caroteno, α -caroteno e luteína (mistura) e 95% em nanocápsulas de licopeno, respectivamente. Esta elevada taxa de encapsulação obtida através dos estudos que utilizam o método de deposição interfacial do polímero pré-

formado é provavelmente devido à presença dos triglicerídeos de cadeia média no núcleo das nanocápsulas, o que facilita a solubilização dos carotenoides.

Dos Santos et al. (2016) avaliaram a estabilidade do licopeno nanoencapsulado com poli (ϵ -caprolactona) durante experimentos de fotossensibilização (5 °C e 25 °C) e aquecimento (60 °C e 80 °C). O estudo demonstrou que, durante a fotossensibilização e aquecimento em condições saturadas de ar, a nanoencapsulação forneceu um efeito protetor adicional, impedindo a rápida degradação do licopeno sob efeito da luz, oxigênio ou temperatura.

A estabilidade de carotenoides co-nanoencapsulados sob diferentes tratamentos industriais, tais como tratamento térmico e luz UV/vis foi avaliada por Da Silva et al. (2017). Os autores utilizaram a mistura de β -caroteno, α -caroteno e luteína, extraídos de cenoura da variedade *Baltimore*, para produzir nanocápsulas pelo método de deposição interfacial. Os resultados indicaram que, independentemente da temperatura, luz UV/vis e tempo de exposição das amostras, uma maior retenção de carotenoides foi observada nas nanocápsulas, quando comparada ao carotenoide livre, ou seja, o bioativo não encapsulado. Dessa forma, neste experimento, os autores concluíram que a nanoencapsulação ofereceu maior estabilidade ao β -caroteno, α -caroteno e luteína após a exposição a condições similares àquelas usadas no processamento de alimentos (calor) e armazenamento (luz UV-vis).

Tabela 5. Algumas formulações nanométricas de luteína encontradas na literatura.

Formulação	Via	Descrição da formulação	Resultado	Referência
Nanoemulsão	Oral	Nanoemulsão (óleo e água) de luteína	A nanoemulsão aumentou duas vezes mais os níveis de luteína no plasma em relação a luteína pura.	Murillo et al. (2016)
Nanocápsulas (PLGA-PEG)	Oral	Nanocápsulas de luteína produzidas com poli (ácido láctico- <i>co</i> -ácido glicólico), foram preparadas para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade da luteína.	Nanocápsulas de PLGA-PEG contendo luteína, aumentaram em mais de 700 vezes a solubilidade do bioativo em relação à luteína livre.	Arunkumar et al. (2015)
Nanocápsulas (Quitosana)	Oral	Nanocápsulas de luteína foram preparadas com quitosana, com objetivo de melhorar a biodisponibilidade do carotenoide.	Biodisponibilidade das nanocápsulas foi 27,7% maior do que o controle (luteína livre).	Ranganathan et al. (2013)
Nanopartículas lipídicas	Tópico (Ocular)	Nanopartículas lipídicas de luteína produzidas com β -Ciclodextrina por sonicação.	A formulação aumentou o acúmulo de luteína na córnea até $209,2 \pm 18$ (g/g), que foi 4,9 vezes maior que a luteína livre.	Liu et al. (2014)
Nanosuspensão	Tópico (Dérmico)	Nanosuspensão contendo luteína em pó e surfactante <i>Plantacare</i> ®, utilizando a técnica de homogeneização sob alta pressão.	A solubilidade de nanocristais de luteína foi aumentada em 264 vezes em água destilada e em 26,3 vezes em solução de surfactante, em comparação com a luteína em pó, o que resultou na melhora da bioacessibilidade e biodisponibilidade do carotenoide.	Mitri et al. (2011)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

CAPÍTULO 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

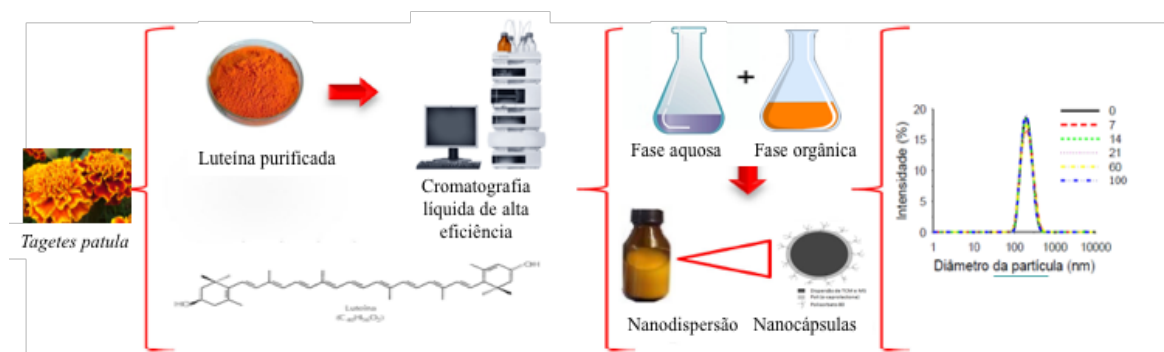
4.1 Materiais

As flores de *Tagetes patula* de cor marrom com borda amarela foram obtidas no Centro de Abastecimento do Rio Grande do Sul (Ceasa – RS) localizado em Porto Alegre, Brasil.

Foram utilizados o polímero PCL (poli- ϵ -caprolactona) ($M_w = 80.000 \text{ g/mol}$) e Span 60 (monoestearato de sorbitano) da Sigma (St. Louis, Missouri, EUA), triglicerídeos de cadeia média cáprico/caprílico (TCM) e polissorbato 80 da Delaware (Porto Alegre, Brasil). Todos os demais produtos químicos e solventes foram de grau analítico.

Segue abaixo um esquema resumido do obtenção e caracterização dos extratos e nanocápsulas de luteína, conforme Figura 5.

Figura 5. Fluxograma reduzido para produção e caracterização de nanocápsulas de luteína.



4.2 Extração e saponificação

As flores centrais e periféricas foram destacadas e secas em estufa de circulação de ar (Marca De Leo) à temperatura de 55 °C por 3h até umidade final de 10%. Posteriormente, foram homogeneizadas em triturador de alimentos e armazenadas em freezer doméstico (-18 ± 2 °C).

As extrações ocorreram de acordo com método de Nachtigall (2007) em que os pigmentos das amostras foram extraídos exaustivamente com tetrahidrofurano em equipamento Ultra Turrax (IKA T25 Digital – 1/minx1000). Para isso foi pesado 1,0 g da amostra previamente seca e adicionados 10 mL do solvente orgânico em tubo Falcon.

A saponificação foi realizada com uma solução etanólica de 10% KOH (p/v) na proporção de 1:1 em relação ao extrato. A extração e a saponificação ocorreram na ausência de luz e em temperatura ambiente por 24h. A seguir o extrato foi separado por filtração e transferido para éter de petróleo. A retirada completa do álcali e do solvente foi realizada por meio de sucessivas lavagens com água destilada. Os extratos saponificados foram concentrados a vácuo em evaporador rotatório (Marca Fisatom, modelo 802) à temperatura máxima de 35 °C e secos em corrente suave de nitrogênio comercial.

4.3 Cristalização

A cristalização da luteína seguiu a metodologia proposta por Vechpanich e Shotipruk (2011). Os cristais foram diluídos em 2 mL de álcool etílico em frasco âmbar e para completa dissolução a mistura foi colocada em equipamento de ultra-som por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de água destilada e a mistura ficou sob aquecimento em banho-maria em temperatura de 65 °C por 30 minutos. A mistura foi filtrada a vácuo em membrana filtrante LCR em PTFE modificado de 0,45 µm e 47 mm e os cristais foram secos em dessecador sob vácuo durante 1 hora. Os cristais obtidos foram retirados da membrana filtrante, pesados e armazenados em freezer a -18 °C em frasco âmbar até análise posterior.

4.4 Confirmação da identidade dos carotenoides e quantificação do teor de luteína

A identificação do carotenoide majoritário na amostra foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia utilizada por Mercadante e Rodriguez-Amaya (1998).

As análises foram realizadas utilizando um sistema de CLAE (Agilent Series 1100, Santa Clara, CA, EUA) equipado com um degaseificador em linha, uma bomba quaternária, um injetor automático acoplado a uma coluna polimérica de fase reversa C30, 250 mm x 4,6 mm, 3 μm (YMC, Japão), ajustada a 33 °C. A aquisição e processamento de dados foram realizados utilizando o software CHEMSTATION®.

A eluição ocorreu com uma taxa de fluxo de 1 mL/min utilizando como fase móvel, água/metanol/terc-metil-butiléter (MTBE) em um gradiente linear a partir de 5:90:5; 0:95:5 em 12 min e 0:50:50 em 60 min.

As condições cromatográficas para avaliação da degradação da luteína nos experimentos de termo e fotodegradação foram modificadas, utilizando-se: metanol/MTBE como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min e gradiente linear a partir de 95:5; 85:15 em 12 min, 83,33:16,67 em 14 min e 95:5 em 24 min, de acordo com Rodrigues et al., (2012). Os cromatogramas foram processados no máximo de absorção de luteína (445 nm).

Para a quantificação de luteína, uma curva padrão com um coeficiente de determinação (R^2) maior do que 0,99 foi utilizada. A curva de calibração foi obtida via CLAE, com limites de detecção e quantificação para luteína de: $6,9 \times 10^{-3}$ e $1,15 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente, sendo determinados de acordo com o método descrito por Valente-Soares (2001). As injeções foram realizadas em triplicata e todas as amostras foram filtradas antes de cada injeção (0,45 μm , Millex com membrana modificada – PTFE, para solventes aquosos e orgânicos, Millipore, Barueri, SP, Brasil).

4.5 Desenvolvimento das nanocápsulas contendo luteína

As nanocápsulas de luteína de núcleo lipídico foram preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado, de acordo com Venturini et al. (2011). O polímero (PCL) (100 mg), os triglicerídios de cadeia média (TCM), (160 mg) e o monoestearato de sorbitano (MS) (38 mg) foram dissolvidos numa mistura de acetona (24 mL) e etanol (3,0 mL), sob agitação magnética a 40 °C. Após a solubilização do PCL, MS e TCM nos solventes, a luteína foi adicionada e manteve sob agitação magnética durante 10 minutos (40 °C). Esta fase orgânica foi adicionada à fase aquosa (53 mL) contendo polissorbato 80 (78 mg) sob agitação durante 10 minutos. A dispersão foi concentrada sob pressão reduzida até atingir um volume final de 10 mL.

Os parâmetros de pH, diâmetro e a concentração de luteína na formulação foram avaliados a cada 4 dias durante 4 semanas; após este período, a avaliação foi realizada a cada 30 dias num total de 90 dias de experimento.

4.6 Determinação do teor de luteína e eficiência de encapsulação

O teor total de luteína foi determinado através da extração do pigmento a partir da nanocápsula obtida. Este método consistiu na extração a partir de uma alíquota de 250 µL da nanocápsula com acetonitrila (4,75 mL). O extrato foi dissolvido em ultra-som (30 minutos) e centrifugado (15 min a 2,820xg). O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo.

O teor de luteína na fase aquosa foi determinado através da injeção em cromatógrafo, do filtrado obtido. O filtrado foi obtido após a ultrafiltração/centrifugação de uma alíquota da suspensão (400 µL) utilizando um Ultrafree-MC® (10.000 MW, Millipore, Bedford, EUA) em uma centrífuga (15 minutos a 1,690xg). A eficiência de encapsulação foi determinada, de acordo com Venturini et al. (2011), dividindo-se a diferença entre a concentração total de luteína e a concentração de luteína na fase aquosa pela concentração total, multiplicada por 100.

4.7 Determinação de diâmetro médio e o potencial zeta

As análises para avaliação de diâmetro foram realizadas por difração de laser (DL) (2000® Mastersizer, Malvern Instruments, UK), utilizando a água como dispersante. Os dados foram analisados por software de 5,54 Mastersizer 2000. Os valores de calibração foram determinados pelo software e calculados dividindo a diferença entre D 0,1 D 0,9 e por D 0,5.

Na sequência, o diâmetro de partícula (média Z) e potencial zeta das suspensões foram medidos a 25 °C por Dynamic Laser Scattering (DLS) e mobilidade eletroforética, respectivamente (Zetasizer® nano-ZS ZEN mod. 3600, Nanoseries, Malvern, Reino Unido).

As amostras foram diluídas (aproximadamente 200 vezes) com uma solução aquosa pré-filtrada de NaCl a 10 mM ou com água MilliQ® para potencial zeta e determinação de z médio, respectivamente.

4.8 Viscosidade

A viscosidade da nanocápsula foi medida imediatamente após a preparação usando um viscosímetro rotacional Brookfield (modelo DV-II + Pro, LV2 fuso, Brookfield Engineering, EUA) a 25 °C. Os dados foram analisados usando o software Brookfield Rheocalc 32.

4.9 pH

O pH da formulação foi medido a 25 °C por meio de um potenciômetro de MS-22 (Digimed, São Paulo, Brasil) durante 90 dias de armazenamento.

4.10 Análise colorimétrica

As amostras da formulação de nanocápsulas obtidas (10 mL) foram analisadas utilizando um colorímetro portátil (modelo Konica Minolta CR 400 Singapore). Os parâmetros colorimétricos foram obtidos de acordo com o Commission Internationale de l'Eclairage (sistema CIELAB) que são: L * (luminosidade), a cor e as coordenadas a *

(componente vermelho-verde) e b * (componente amarelo-azul) usando o iluminante D65 e ângulo de visualização de 0 °.

4.11 Morfologia

As nanocápsulas de luteína foram analisadas morfológicamente por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Jeol, JEM 1200 Exll, Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS, Brasil). As nanocápsulas foram diluídas em água ultra pura (1:10 v/v) e dispersas em um “grid” (suporte de carbono/polivinil de mesh 400). Nesta análise, uma solução de acetato de uranila (2% p/v) foi usada como contraste e o equipamento foi operado a 80 kV.

4.12 Fotossensibilização e aquecimento das nanocápsulas de luteína

Foi preparada uma solução da nanocápsula com concentração de luteína de 20µg/mL. O sensibilizador rosa bengala foi adicionado (10 µM) à solução de nanocápsulas para os experimentos de fotossensibilização. Uma alíquota de 10 mL desta solução contendo a nanocápsula e o sensibilizador foi iluminada com uma lâmpada de incandescência de 150 W acoplada a um filtro de acrílico laranja (36.000 lux) que objetivou excitar o sensibilizador com comprimentos de onda superiores a 450 nm (máximo de absorbância). Este experimento foi realizado a 5 °C, 15 °C e 25 °C, em duas condições diferentes. A primeira foi realizada com injeção de N₂ (99,99% de pureza) para a célula de fotossensibilização (excluindo o oxigênio) e o segundo foi realizado injetando ar na célula de fotossensibilização.

A luz filtrada excitou apenas o rosa bengala e o oxigênio singlete foi formado pela transferência de energia a partir do oxigênio triplete (oxigênio atmosférico).

Para os experimentos de aquecimento, 600 µL da solução contendo a nanocápsula foram aquecidos em tubos *ependorf* de polipropileno (8.9 mm de diâmetro e espessura de parede de 1 mm) num banho de aquecimento a 70°C, 80°C e 90°C na ausência de luz.

O teor de luteína foi avaliado periodicamente por CLAE durante os experimentos de fotossensibilização nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 minutos; e durante os experimentos de aquecimento nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos. Os

dados de conteúdo luteína foram usados para determinar a cinética de constantes de velocidade e energia dos parâmetros de ativação do software *Origin Pro* 8.0.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando software SAS® 8.0 software e o programa gráfico utilizado foi o Sigma plot 12.0.

CAPÍTULO 5

ARTIGO 1: Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability evaluation

Publicado em Junho de 2017: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

Aelson Aloir Santana Brum^a, Priscilla Pereira dos Santos^a, Médelin Marques da Silva^a, Karina Paese^b, Silvia Stanisquaski Guterres^b, Tania Maria Haas Costa^c, Adriana Raffin Pohlmann^d, André Jablonski^c, Simone Hickmann Flôres^a, Alessandro de Oliveira Rios^{a,†}

^a Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, CEP, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

° Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 75, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

†Corresponding author: Tel.: +55 51 33089787; Fax: +55 51 33087048, E-mail: alessandro.rios@ufrgs.br (A. de O. Rios).

ABSTRACT

Lutein nanocapsules (Lutein-LNC) were developed by the technique of interfacial deposition of the preformed polymer poly- ϵ -caprolactone (PCL). The lutein crystals were obtained from Marigold flowers by exhaustive extraction using tetrahydrofuran to obtain lutein 92 % pure. The nanocapsules were prepared, characterized and their stability investigated. The results showed monomodal size distribution with polydispersity index of 0.11 ± 0.02 , z-average of 191.9 ± 3.24 nm, zeta potential of -5.14 ± 2.22 mV and encapsulation efficiency of 99.51%. The physicochemical properties of polymeric nanocapsules suspension were evaluated in function of storage time to determine the formulation stability. After 60 days of storage (4 °C) the Lutein-LNC were stable without significant changes in diameter and color ($p \geq 0.05$); and residual content of lutein was 36 % relative to initial value. However, Lutein-LNC stored at 25 °C presented changes in zeta potential, pH, color values and residual content over time when compared to nanocapsules stored at 4 °C. Lutein content in the nanocapsules after 90 days of storage at 4 °C and 25 °C presented superior values than free lutein after 30 days of storage in same conditions. Thus, the nanoencapsulation allowed the solubilization of lutein in aqueous medium and increased the stability of lutein in different temperatures.

Keywords: solubility; stability; nanocapsule; lutein.

1. Introduction

Recently, the preference for natural foods and ingredients containing functional properties has increased due to interest for health and life quality. Carotenoids are natural colorants associated with beneficial health effects due to antioxidant activity and, in this context; carotenoids have received special attention (El-Agamey et al. 2004).

Lutein is the second prevalent carotenoid in human blood plasma (β -carotene is the first one), and this carotenoid is abundantly present in vegetables such as kale and spinach (Kaulmann and Bohn 2014). Besides to vegetables, flowers can also be used as source of lutein to production of dietary supplementation (Vechpanich and Shotipruk 2011). However, commercial production of lutein is restricted to only the few species, and only the marigold flowers (*Tagetes*) are commercially cultivated as source of this carotenoid (Benítez-García et al. 2014; Khalil et al. 2012).

Lutein is a hydroxylated carotenoid and a potent antioxidant that actively protects tissues from damage caused by reactive species (Hartmann et al. 2004). In addition to preventing age-related macular degeneration, the use of lutein through diet has been strongly related to the decrease of diseases such as arteriosclerosis (Zou et al. 2011), cataracts (Olmedilla et al. 2003), diabetic retinopathy (Seddon 2013), cancer and other diseases (Alves-Rodrigues and Shao 2004; Jansen et al. 2013).

Although of these important biological activities, lutein is an unstable molecule with low bioavailability due to their insolubility in aqueous media (Lacatusu et al. 2013). The stability of lutein varies widely based on processing and storage, and factors such as

temperature, oxygen availability, light exposure, water activity, moisture, acidity, metals, peroxides and lipoxygenase (Shi and Chen 1997; Wang et al. 2012).

In this context, new technologies are constantly introduced in an attempt to increase the stability of carotenoids such as microencapsulation, which can prevent or reduce the oxidation of bioactive compounds present in foods, and additionally enabling the dispersion of powders in water (Nalawade and Gajjar 2016; Qv et al. 2011; Yi et al. 2016). Another possibility to stabilize the carotenoids is the application of delivery systems with diameters less than 1 micrometer such as nanoemulsions, nanoparticles and nanocapsules (Dos Santos et al. 2015; Hong et al. 2016; Qian et al. 2012).

Different techniques of nanoencapsulation have been recently applied in studies to increase the stability and improve the bioavailability and solubility of lutein. Chitosan and poly- γ -glutamic acid nanoparticles were developed to improve solubility of lutein and results showed that lutein nanoparticles were 58% more soluble than free lutein (Hong et al. 2016). In other study, poly (Lactic-co-Glycolic Acid)-polyethylene glycol nanocapsules containing lutein were produced by emulsion sonication-solvent evaporation technique to improve bioavailability of lutein (Arunkumar et al. 2015) and lutein nanocapsules presented 43% more biological activity than free lutein, suggesting that nanoencapsulation is an effective carrier to lipophilic molecules as carotenoids.

However, despite the previous researches regarding to nanoencapsulation of lutein using different nanometric vehicles, the lipid-core nanocapsules obtained by technique most used to prepare nanocapsules with bioactive compounds, interfacial deposition of preformed polymer technique, do not have been applied to increase the stability of lutein

nanocapsules during storage. Thus, this study aimed to produce and characterize lutein-loaded lipid-core nanocapsules and evaluate the stability during storage at 4°C and 25°C.

2. Material and methods

2.1. Material

The *Tagetes patula* flowers (French Marigold brown) were purchase from a local market in Porto Alegre, Brazil. The poly (ϵ -caprolactone) (PCL) and sorbitan monostearate were purchase from Sigma (St. Louis, MO, USA). Polysorbate 80 and medium chain triglycerides (MCT) were purchase from Delaware (Porto Alegre, Brazil). All solvents used were analytical grade.

2.2. Determination of lutein content in Marigold flowers

The lutein content was determined from Marigold petals by exhaustive extraction with tetrahydrofuran using Ultra-Turrax (T25, IKA, China). After extraction, the extract was concentrated under a reduced pressure in a rotaryevaporator (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil) at room temperature (25°C). Saponification step was carried with methanolic solution of 10% KOH (w/v) in the absence of light and at 25°C for 24 h. Then, the extract was transferred into petroleum ether and washed with water distilled to withdrawal of alkali. The extracts were concentrated under a reduced pressure in a rotaryevaporator at room temperature, maintained at -18°C until the analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the results are expressed in mg.100 g⁻¹ dry weight.

2.3. *Obtainment of lutein extract and crystallization process*

Lutein extract was prepared using an adaptation of the method of Nachtigall (2007), which described the lutein obtention from Marigold petals. The Marigold petals (1 g) were dried in a forced air convection oven (DeLeo model B5AFD, Porto Alegre, RS, Brazil) and maintained at 55 °C during 60 min. After grinding, the powder was packed in a plastic pot and stored in dark at $-18 \pm 2^\circ\text{C}$. The extraction and purification was carried with 1 g of dried petals with 10 mL tetrahydrofuran. The pigments were extracted by Ultra-Turrax (T25, IKA, China) during 5 min and concentrated under a reduced pressure in a rotaryevaporator (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil) at 25°C.

After this step, the saponification was carried with methanolic solution of 10% KOH (w/v) in a ratio 1:1 (v/v) in the absence of light and at room temperature (25°C) for 24 h. The extract was separated by filtration and transferred into petroleum ether. The complete withdrawal of alkali and of solvent was carried out by successive washings with distilled water. The saponified extracts were concentrated under a reduced pressure in a rotaryevaporator at 25°C.

Crystallization of lutein followed the methodology proposed by Vechpanich and Shotipruk (2011). The extract were diluted in ethyl alcohol (2 mL) and stirred in ultrasound for 1 min. Subsequently, distilled water was added (4 mL) and the mixture was heated in a water bath at 65 °C for 30 min. The crystals formed were dried under reduced pressure ($T < 30^\circ\text{C}$) and the purity evaluated by HPLC.

2.4. Preparation of lutein-loaded lipid-core nanocapsules

Lutein nanocapsules were produced by interfacial deposition of the preformed polymer according to method described by Venturini et al. (2011). The organic phase was prepared using a polymer (PCL, 250 mg), sorbitan monostearate (95 mg), medium chain triglycerides (400 μ L), and lutein (>92 %) in a mixture of acetone (60 mL) and ethanol (7.5 mL) under magnetic stirring for 40 min at 40 °C. Then, the organic phase was injected into an aqueous phase (132.5 mL) containing polysorbate 80 (195 mg), and stirring was maintained for approximately 10 min. The formulation was concentrated under reduced pressure until obtention of final volume of 25 mL. This formulation was denominated as Lutein-LNC and presented a lutein concentration of 14 μ g/mL and this concentration was defined considering the solubility of bioactive compound in organic phase and based in a preview study with bixin nanocapsules (Lobato et al. 2013).

The characterization of nanocapsules was performed in triplicate and parameters such as encapsulation efficiency, mean diameter (z-average), polydispersity index (PDI), zeta potential, morphology, viscosity, hydrogen potential (pH), and color were evaluated.

2.5. Determination of encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency of the Lutein-LNC was determined by the ultrafiltration/centrifugation technique (Ultrafree Microcon 10,000 MW, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The free lutein content in the aqueous phase of the nanocapsules was determined by injection of the ultrafiltrated obtained after the ultrafiltration/centrifugation (30 min at 3500 xg) of an aliquot of the nanocapsule formulation (500 μ L) using the high

performance liquid chromatography (HPLC). The value of encapsulation efficiency was calculated dividing the difference between the total concentration of lutein and the concentration of lutein in the aqueous phase by the total concentration and multiplying the result by 100.

2.6. Determination of diameter, span value, polydispersity index and zeta potential

The granulometric profiles were determined by laser diffraction (LD) (Mastersizer 2000[®] 5.54, Malvern Instruments, UK) and dynamic light scattering (DLS) (Zetasizer Nano ZS[®]; Malvern Instruments, Malvern, UK). The *z*-average, PDI and zeta potential were evaluated at 25 °C using a Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments, Malvern, UK). The *z*-average and PDI were obtained after dilution of the samples in ultrapure water by dynamic light scattering (DLS). The zeta potential (ζ) was analyzed by electrophoretic mobility after dilution of the suspensions in 10 mM NaCl aqueous solution. DLS was used to evaluate changes during storage due to ability of the Zetasizer Nano ZS[®] instrument to determine particle sizes ranging from 0.003 to 10 μm . Data analysis was performed using Dispersion Technology Software (version 7.4, 2013, Malvern Instruments Ltd.). The span values were determined by dividing the difference between $D_{0,1}$ and $D_{0,9}$ by $D_{0,5}$, as provided by Mastersizer 2000 5.54 software programme

2.7. Morphological analysis

The Lutein-LNC was analyzed morphologically by transmission electron microscopy (TEM) (Jeol, JEM 1200 Exll, Electron Microscopy Center, UFRGS, Brazil). The nanocapsules were diluted in pre-filtered ultrapure water (1:10 v/v) and dispersed on a

grid (Formvar-carbon support films mesh 400). In this analysis, uranyl acetate solution (2 % w/v) was used as a negatively stained standard and the equipment was operated at 80 kV.

2.8. *Viscosity*

Immediately after preparation, the viscosity of the Lutein-LNC was measured utilizing a Brookfield rotational viscometer (model DV-II+Pro, spindle LV2, Brookfield Engineering, USA) at 25 °C. The data were analyzed using Brookfield Rheocalc 32 software.

2.9. *pH*

The pH of Lutein-LNC was measured utilizing a DM-22 potentiometer (Digimed, Brazil) during 90 days of storage.

2.10. *Colorimetric analysis*

The colorimetric parameters of Lutein-LNC suspension (10 mL) was analyzed using a portable colorimeter (Konica Minolta model CR 400, Singapore) by according to the Commission Internationale de l'Eclairage (CIELAB system). The coordinates L (lightness) and the color coordinates a* (red–green component) and b* (yellow–blue component) were measured using the illuminant D₆₅ and a viewing angle of 0°. The parameters were measured over 90 days of storage.

2.11. Determination of Lutein-LNC stability

To evaluate the lutein-LNC stability stored at room temperature (25 °C) and under refrigeration (4 °C); z-average, PDI, pH, color and lutein content were evaluated during storage time (0, 4, 7, 11, 14, 21, 35, 60 and 90 days). To determine the total lutein content during 90 days of storage (4 and 25 °C) was performed the lutein extraction from a 500 µL aliquot of the Lutein-LNC with acetonitrile (10 mL). This extract was ultrasonicated (30 min) and centrifuged (30 min at 3500 x g). The supernatant was filtered before injection into the HPLC. Solution of free lutein in ethanol:water (2:8, mL:mL) was used as control to evaluate the protective capacity of nanocapsules in stability of lutein during storage at 4° and 25°C.

2.12. Chromatographic conditions

To determine the total lutein content in the marigold flowers, in the extracts, to calculate the encapsulation efficiency analysis and to determine stability of nanocapsules during the storage period (90 days at 4 and 25 °C), the analysis was carried by HPLC. The equipment utilized was a chromatograph Agilent (Series 1100, Santa Clara, CA, USA) equipped with an online degasser, quaternary pump and automatic injector coupled to a C30 polymeric column YCM with specification 250 x 4.6 mm, 3-µm particle size at 33 °C. The gradient elution at a flow rate of 1 mL/min consisted of water/methanol/methyl tertbutyl ether (v/v/v) starting at a ratio of 5/90/5 and reaching 0/95/5 at 12 min, 0/89/11 at 25 min, 0/75/25 at 40 min, and 0/50/50 at 60 min. The lutein was quantified at a detection wavelength of 445 nm. Data acquisition and processing was performed using the ChemStation® software program.

For the quantification of lutein, a calibration curve with determination coefficient (R^2) greater than 0.99 was utilized. The calibration curve was obtained by HPLC with limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) for lutein of 6.9×10^{-3} and 1.15×10^{-2} $\mu\text{g/g}$, respectively, according to the method described by Valente-Soares (2001). The injections were performed in triplicate and all samples were filtered before injection ($0.45 \mu\text{m}$, Millex with modified PTFE membrane for aqueous and organic solvents, Millipore, Barueri, SP, Brazil).

2.13. Statistical analysis

The results were evaluated by one-way analysis of variance, the mean values were analyzed by Tukey's test using SAS® 8.0 software and the graphic program utilized was Sigma plot 12.0.

3. Results and Discussion

3.1. Lutein content in marigold flowers and extract to prepare Lutein-LNC

In this study, a high content of lutein was verified in Marigold flowers ($1461 \text{ mg.}100 \text{ g}^{-1}$) and similar results were reported for others authors. Šivel et al. (2014) evaluated the lutein content of different Marigold flowers concentrates and observed a range in lutein content of 202 to $2400 \text{ mg.}100 \text{ g}^{-1}$. In other study, Nachtigall et al. (2010) evaluated the lutein content in tagetes flowers (*Tagetes patula* L.) and the results showed a lutein content of $1230 \text{ mg}/100 \text{ g}$, evidencing that Marigold flowers are an excellent source of this carotenoid. The total amount and the relative concentration of each carotenoid in

Marigold flowers may be influenced by selection of cultivars, varieties and other factors as part of the plant, climatic and geographical conditions; and soil (Piccaglia et al. 1998).

The purified lutein utilized in this study presented 92% of lutein and 8% of zeaxanthin, similar result were reported by Kumar et al. (2010) that obtained 89% of lutein after saponification. Khachik (1995) developed a method to isolate, purify and recrystallize lutein, preferably from saponification of marigold oleoresin and obtained purity of 95%.

3.2. *Preparation and characterization of Lutein-LNC*

The purified lutein was used to synthesize Lutein-LNC with concentration of 14 $\mu\text{g/mL}$. The formulation was analyzed by LD and DLS immediately after being produced. During a period of 90 days, the formulation was analyzed by DLS.

Solubility of carotenoids in lipid matrix is an important factor affecting loading capacity of the carrier system. The encapsulation efficiency (EE%) is one of the most important tests to verify if the nanocapsule has been formed. In this study the EE % was found 99.51 %, indicating that the lutein was present in lipid core of nanocapsules.

Da Silva et al. (2016) and Dos Santos et al. (2015) using the same nanoencapsulation technique of this study, obtained an encapsulation efficiency of 99% in nanocapsules of a blend with β -carotene, α -carotene and lutein and 95% in lycopene nanocapsules, respectively. This high encapsulation rate achieved by studies that use interfacial deposition of the preformed polymer method is probably due to the presence of the medium chain triglycerides in the core of the nanocapsules, which facilitates the solubilization of carotenoids (Lobato et al. 2013).

Solubilizers such as mono and diglycerides can be added in the lipid mixture to increase bioactive solubilization and consequently improve loading capacity. The chemical structure of the lipid is also critical; for example applying lipids which form highly crystalline particles with a perfect lattice (e.g. monoacid triglycerides) lead to expulsion of bioactive ingredient (Westesen et al. 1997).

Immediately after the synthesis, Lutein-LNC presented a monomodal distribution with a volume-weighted mean diameter ($D_{4,3}$) of 221 nm and a span value of 1.832. Similar results was found to bixin nanocapsules obtained by same technique that showed values of mean diameter ($D_{4,3}$) and span value of 195 nm and 1.4, respectively (Lobato et al. 2013).

The z -average obtained for Lutein-LNC was $191.9 \text{ nm} \pm 3.24$ with PDI of 0.11 ± 0.02 . The particle size distribution is based on a polydispersity index (PDI) of the samples and low PDI represents a narrow distribution (Wu et al. 2011). Similar values were reported by Liu and Wu (2010) that observed diameter of 139 nm and PDI of 0.17 in a study to optimize lutein nanocarriers with different surfactants and concentration of the bioactive compound. The use of surfactants provided a stable dispersion of lutein-loaded nanocapsules, and the optimal concentrations of surfactant were 0.2% and 2.4%. Arunkumar et al. (2015) obtained nanocapsules with lutein and poly (lactic-co-glycolic acid) – polyethylene glycol as wall material, with mean size of 200 nm and observed that nanocapsules improved solubility, bioavailability, and anticancer property of lutein.

In other study, nanocapsules containing water-soluble chitosan with poly- γ -glutamic acid were produced to improve the solubility of lutein and the size of nanocapsules synthesized were in the range of 115–260 nm with a narrow particle size distribution (PDI smaller than 0.2) (Hong et al. 2016). Tan et al. (2016) performed a research comparing the

formation of lutein nanodispersion prepared by solvent displacement method and high-pressure homogenization. The authors verified that the smallest particle size and PDI (123.1 nm; 0.155) were obtained at the lowest lutein concentration of 0.1 wt. % and the authors confirmed that the solvent displacement method can be used successfully to produce nanosized particles.

The particle size estimated by DLS technique was well correlated with found by microscopy analysis. The morphology and size of Lutein-LNC can be observed on TEM micrograph (Fig. 1). According to TEM image, lutein-LNC have spherical shape and homogeneous distribution.

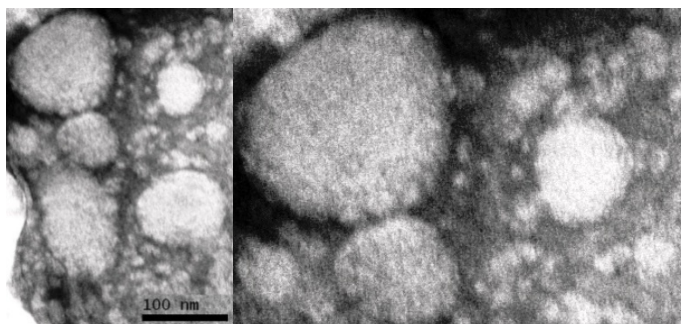


Fig 1 TEM image of Lutein-LNC [bar 100 nm (500,000)].

The particle charge is other important factor to determine the physical stability of emulsions and suspensions. Zeta potential is the electric potential near the surface of the nanoparticle where the velocity of the liquid is zero (surface of shear) (Tiede et al. 2008).

The Lutein-LNC suspension presented zeta potential of -5.14 ± 2.22 mV immediately after preparation. Other studies utilizing the same technique to obtention of nanocapsules with different bioactive compounds also showed negative results. Dos Santos et al. (2015) characterized lycopene-loaded lipid-core nanocapsules and obtained zeta

potential of -11.5 mV while that Coradini et al. (2014) produced lipid-core nanocapsules containing co-encapsulated resveratrol and curcumin and showed zeta potential of -7.8 ± 0.7 mV, similar to the value determined in Lutein-LNC of this study. The negative values reflect the presence of carboxylic groups at the polymer extremities, since PCL is polyester (Mora-Huertas et al. 2010).

The charge of nanoparticle depends of particle medium and composition of dispersion (Mohanraj and Chen 2006). Lutein nanosuspension was prepared by high pressure homogenization with 5.0% (w/w) lutein powder, 90% active ingredient and 1.0% (w/w) Plantacare® 2000 as stabilizer dispersed, and it was reported a zeta potential of nanocarriers range from 17 to -40 mV (Mitri et al. 2011).

The viscosity describes a fluid's resistance to flow and it is an important parameter for nanodispersion due to rheological properties that affect production steps such as mixing, pumping and final quality (Lobato et al. 2013). The Lutein-LNC presented a viscosity at 25°C of 1.08 ± 0.02 mPa.s. The viscosity of Lutein-LNC was similar to the water viscosity, characteristic that increase the industrial application of this nanocapsules in different food systems. Similar result was reported by Dos Santos et al. (2015) in lycopene nanocapsules and Contri et al. (2013) in different oil core nanocapsules that found viscosity values of 1.09 mPa.s and 1.13 mPa.s, respectively. The behavior of the Lutein-LNC suspension was typical for a Newtonian fluid, since the increase of the shear stress was proportional to the increase of the shear rate (Fig 2).

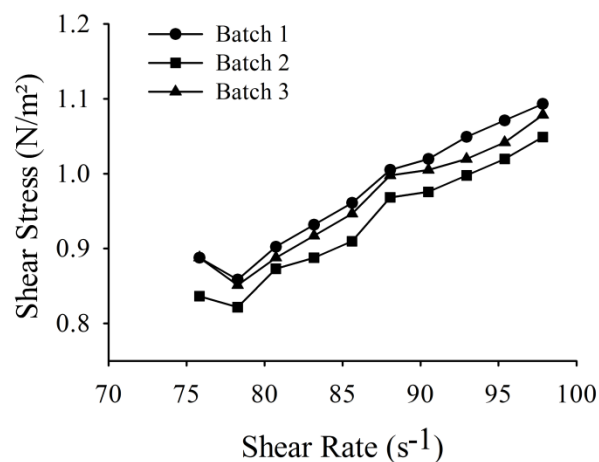


Fig 2 Rheological behavior of Lutein-LNC, in triplicate.

The formulations presented an initial pH of 5.44 ± 0.66 at 25°C . Coradini et al. (2014) reported similar values of pH (5.8 ± 0.1) to curcumin-loaded lipid-core nanocapsules. McClements and Rao (2011) studied the impact of nanoemulsion on various environmental stress and found that relatively stable nanoemulsion was formed at pH 6.0 and 7.0, however extensive particle growth/aggregation occurred at lower and higher pH values, which was attributed to either chemical (hydrolysis) or physical (electrical charge) effects.

Lutein-LNC suspension presented a yellow color and the colorimetric parameters were: $L = 75.44 \pm 0.05$, $a^* = -5.95 \pm 0.14$, $b^* = 49.67 \pm 1.35$. These nanocapsules exhibited a higher luminosity due to the polymer, which confers a turbidity to the suspension.

Da Silva et al. (2016) evaluated the stability of nanocapsules obtained from a blend of β -carotene, α -carotene, and lutein and observed initially a yellow color in the

suspensions produced with CIELAB coordinates of $L = 72.16 \pm 0.05$, $a^* = -5.83 \pm 0.05$, $b^* = 44.87 \pm 0.11$, similar to this present study.

3.3. *Stability evaluation of Lutein-LNC*

Lutein-LNC was synthesized and its physicochemical properties such as z-average, PDI, pH, color and lutein content were investigated during stored period (90 days). As lutein presents high instability and hydrophobicity is difficult to incorporate in aqueous food systems. For this reason the bioactive was encapsulated inside the oily core of nanocapsules. The z-average in different storage conditions (4 and 25 °C) remained stable during 90 days of experiment, without significant changes in particle size (range by 189 to 197 nm) (Table 1). The values found were in agreement with previous studies of the size of polymeric lipid core nanoparticles (Arunkumar et al. 2013; Grillo et al. 2012; Lobato et al. 2013).

Table 1 Stability of Lutein-LNC during 90 days of storage at 4 °C and 25 °C: z-average and Polydispersity Index (PDI).

Storage time (days)	Temperature (°C)	
	4	25
	z-average (nm)	z-average (nm)
0	194.60 ± 0.56 A a	191.90 ± 3.24 A a
4	195.97 ± 1.19 A a	195.30 ± 3.99 A a
7	194.80 ± 1.30 A a	191.67 ± 2.90 A a
11	193.67 ± 2.17 A a	189.05 ± 0.15 B a
14	193.93 ± 1.05 A a	191.85 ± 1.95 A a
18	197.07 ± 2.140 A a	191.47 ± 3.72 A a
21	194.40 ± 1.51 A a	194.57 ± 4.61 A a
35	196.67 ± 1.83 A a	193.43 ± 1.93 A a
60	194.57 ± 2.41 A a	193.03 ± 4.00 A a
90	195.50 ± 0.85 A a	193.27 ± 3.16 A a
	PDI	PDI
0	0.12 ± 0.02 A a	0.11 ± 0.02 A a
4	0.11 ± 0.03 A a	0.12 ± 0.02 A a
7	0.11 ± 0.01 A a	0.11 ± 0.02 A a
11	0.12 ± 0.02 A a	0.16 ± 0.08 A a
14	0.12 ± 0.01 A a	0.14 ± 0.05 A a
18	0.12 ± 0.02 A a	0.12 ± 0.02 A a
21	0.11 ± 0.01 A a	0.13 ± 0.02 A a
35	0.14 ± 0.01 A a	0.13 ± 0.04 A a
60	0.12 ± 0.02 A a	0.12 ± 0.04 A a
90	0.11 ± 0.02 A a	0.12 ± 0.03 A a

Mean ± standard deviation values followed by the same uppercase letter in line and by the same lowercase letter in column are not significantly different ($p \leq 0.05$).

The Lutein-LNC showed stable to droplet aggregation during the period of storage, without change in mean particle diameter or evidence of phase separation as creaming or sedimentation. The high stability of this system can be attributed to the ability of the non-ionic surfactant used (Tween 80) to generate a strong steric repulsion between the liquid lipid nanoparticles (steric stabilization) (Sessa et al. 2013; Venturini et al. 2011).

The granulometric profiles showed that no particle aggregation or agglomeration occurred during storage (Fig. 3). These results indicate that nanotechnological properties were maintained during storage to both temperatures.

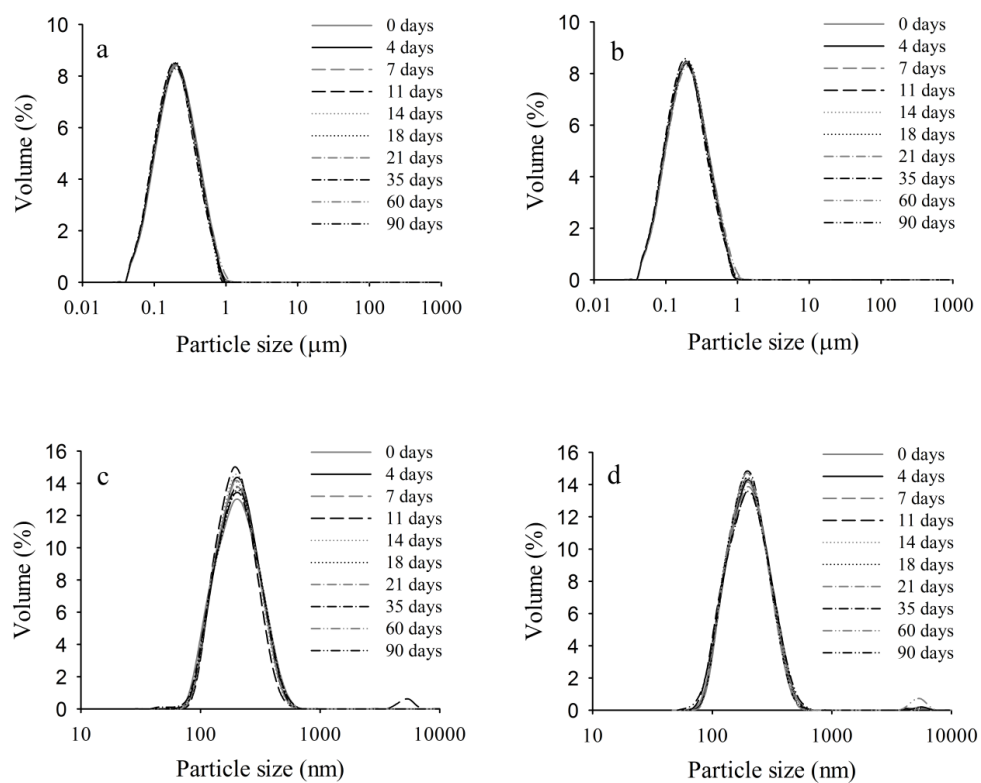


Fig 3 Size distribution (volume) obtained by LD (a and b) and by DLS (c and d) during 90 days of storage at 4°C (a and d) and 25°C (b and d).

The PDI corresponds to an indicator of the size distribution of the particles that can also be used to assess stability. Factors that influence polydispersity include the properties

of the solution, the thermodynamics of the system and the method of preparation (Schaffazick et al. 2003). PDI values smaller than 0.2 are considered ideal, since this is indicative of a narrow particle size. The PDI values obtained in the present study were all below 0.2 (range 0.11 to 0.14) during storage and no significant change was observed, indicating excellent particle homogeneity (Table 1).

The Lutein-LNC suspension showed the mean initial pH of 5.44 ± 0.47 and after 90 days of storage at 25°C a decrease was observed (3.51 ± 0.07) (Table 2), while that nanocapsules showed a smaller decrease at 4°C (4.2 ± 0.12) than at 25°C . During storage the decrease in the pH may occur due to the production of free hydroxycaproic acid as a result of PCL degradation (Calvo et al. 1996).

Table 2 Stability of Lutein-LNC during storage for 90 days at 4 °C and 25 °C on pH and color (L, a* and b*).

Storage time (days)	Temperature (°C)	
	4	25
	pH	pH
0	5.76 ± 0.19 A a	5.44 ± 0.66 A a
4	6.04 ± 0.34 A a	5.15 ± 0.98 A ab
7	5.81 ± 0.23 A a	4.71 ± 1.15 A abcd
11	5.76 ± 0.31 A a	4.27 ± 0.66 A abc
14	5.47 ± 0.39 A ab	4.26 ± 0.63 B abc
18	5.10 ± 0.32 A bc	4.19 ± 0.68 A abcd
21	4.81 ± 0.19 A c	4.15 ± 0.60 A bcd
35	4.69 ± 0.16 A c	4.06 ± 0.51 A bcd
60	4.40 ± 0.22 A cd	3.95 ± 0.01 B c
90	4.20 ± 0.12 A d	3.51 ± 0.07 B d
	L	L
0	75.80 ± 0.26 A e	75.44 ± 0.15 A d
4	75.56 ± 0.14 A ce	75.47 ± 0.13 A d
7	74.31 ± 0.32 A d	75.38 ± 0.62 A cd
11	75.64 ± 0.09 A c	75.72 ± 0.02 A c
14	75.21 ± 0.24 A b	75.37 ± 0.41 A cd
18	74.44 ± 1.12 A bcde	75.71 ± 0.25 A cd
21	75.61 ± 0.21 A bce	75.82 ± 0.08 A c
35	76.33 ± 0.45 A ae	77.32 ± 0.57 A b
60	76.46 ± 0.49 B ae	78.05 ± 0.55 A b
90	76.67 ± 0.22 B a	79.25 ± 0.59 A a
	a*	a*
0	-5.64 ± 0.11 A a	-5.95 ± 0.14 B a
4	-5.69 ± 0.08 A a	-6.31 ± 0.01 B b
7	-5.56 ± 0.06 A a	-6.46 ± 0.31 B bc
11	-5.69 ± 0.11 A a	-6.33 ± 0.05 B b
14	-5.78 ± 0.12 A a	-6.59 ± 0.08 B c
18	-5.94 ± 0.19 A ab	-6.76 ± 0.10 B cde
21	-6.00 ± 0.30 A ab	-6.89 ± 0.08 B de
35	-6.29 ± 0.23 A bc	-6.88 ± 0.08 B de
60	-6.54 ± 0.21 A cd	-6.90 ± 0.04 B de
90	-6.97 ± 0.04 A d	-7.02 ± 0.10 A e
	b*	b*
0	51.52 ± 0.34 A a	49.67 ± 1.35 A a
4	51.09 ± 0.22 A ac	48.32 ± 2.91 A abc
7	49.86 ± 0.71 A b	44.72 ± 6.87 A abcd
11	50.63 ± 0.58 A ab	48.56 ± 0.57 B ab
14	50.13 ± 0.93 A bc	47.64 ± 0.62 B b
18	49.60 ± 1.43 A bc	46.20 ± 0.16 B c
21	48.93 ± 1.80 A b	44.07 ± 0.14 B d
35	44.52 ± 0.38 A d	30.85 ± 0.17 B e
60	43.50 ± 0.28 A e	23.63 ± 0.56 B f
90	40.97 ± 0.67 A f	22.11 ± 0.73 B g

Mean ± standard deviation values followed by the same uppercase letter in line and by the same lowercase letter in column are not significantly different ($p \leq 0.05$).

Changes in the color of Lutein-LNC were measured and nanocapsules stored at 25°C showed a significant increase in L value after 35 days of storage, with L initial of 75.44 ± 0.05 and after 35 days of 77.32 ± 0.57 . At 4°C no significant difference was observed. Notably, the increase in brightness over time indicated a decrease of yellow color and appearance of white light. The difference between treatments showed that the degradation of lutein is strongly affected by temperature (Davidov-Pardo et al. 2016).

Regarding the component b^* , the significant decrease in values were observed in the lutein-LNC stored at 25 °C. Immediately after being produced, the suspension had value of 49.67 ± 1.35 , however after 35 days ($b^* = 30.85 \pm 0.17$) there was decrease of this coordinate. In storage under refrigeration, the decrease was less and gradual demonstrating that degradation of the carotenoid was lower at 4°C when compared to room temperature (25°C). As showed at Table 2, there are a strong evidence of color loss in the Lutein-LNC during storage, as verified by decrease in color intensity (particularly b^* -value) and increase in lightness (L^* -value).

After storage, the reduction of lutein content in nanocapsules was observed and after 90 days of storage, the lutein-LNC presented 21% of the bioactive content without refrigeration (25°C) while that after the same time at 4 °C, 33.71 % of lutein remained in the core of Lutein-LNC (Fig 4), proving that lutein at room temperature degrades faster than at refrigeration temperature (Cerón-García et al. 2010). The solution of free lutein utilized as control and storage at 4°C and 25°C presented half-life (50% of content) after 10 days and 40 days, respectively, while Lutein-LNC presented half-life after 50 days at 4°C and 21 days at 25°C, suggesting that the nanoencapsulation improved of lutein stability during storage. Chen et al. (2016) evaluated the stability of free lutein suspended in ethanol

to production of lutein from microalga and observed that 50% of lutein content stored at 4°C and 25°C was lost after 17 and 11 days, respectively, similar to results reported in this study to solution of free-lutein.

Lutein nanodispersion was synthesized by Tan et al. (2016) that evaluated the influence of emulsifiers in stability of nanodispersion and observed that suspensions containing polysorbate 80 and sodium dodecyl sulfate presented the lowest chemical stability with loss of 50% after 56 days of storage. In other study, lutein loaded in zein nanoparticles was produced to evaluate the influence of stabilizers in lutein stability and after 30 days of storage at 25°C, 26 % and 54% of lutein content degraded in presence and absence of stabilizers in nanoparticles, respectively (Chuacharoen and Sabliov 2016).

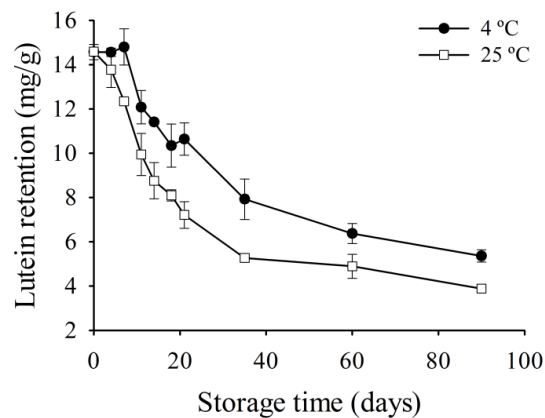


Fig 4 Lutein content in lutein-LNC and Free Lutein solution stored at 4°C and 25°C for 90 days.

The composition of nanocapsules and the technique of obtention are factors important to stability of carotenoids. Carotenoids such as lutein may degrade through various factors such as oxidation and isomerization, depending on storage conditions and

composition (Boon et al. 2010). Thus, the significant presence of lutein after 90 days of storage suggests that the lutein-loaded particles could improve the stability of lutein.

4. Conclusions

Lutein, a hydroxylated carotene, is a potent antioxidant that protects tissues from damage caused by reactive species; however the stability of lutein varies widely based on processing and storage, due to factors such as temperature, oxygen availability and light exposure. A way to improve the stability of lutein is the production of polymeric nanoparticles that have diameters of less than 1 micrometer. In this context, Lutein-LNC was prepared with satisfactory size diameter of 191 nm utilizing lutein crystals obtained by an efficient method of isolating, purifying, and crystallizing of pure lutein from dried petals of marigold. Microscopy analyses showed that the nanocapsules were spherical, with a uniform size distribution and no apparent aggregate formation and formulations remained stable for up to 90 days in relation of physical characteristics such as *z*-average and PDI. After 90 days of storage at 25 °C, the nanocapsules retained 21% lutein content, however, storage at 4 °C preserved more effectively the nanocapsules characteristics and showed a lower degradation of lutein due to the combined protection exercised by wall material presents in nanocapsules and refrigeration, verified by evaluation of free lutein as control. These results demonstrated that nanoencapsulation by interfacial deposition of preformed polymer of carotenoids for the development of nanostructures is an emerging example of the application of nanotechnology that may improve the possibility of application in the food industry. Besides that, trends regarding stability and behavior of these nanocapsules under different industrial conditions must be investigated.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) for the financial support provided for this research and Eletronic Microscope Center (CME) of Federal University of Rio Grande do Sul UFRGS for technical assistance.

References

- Alves-Rodrigues A, Shao A (2004) The science behind lutein. *Toxicol. Lett* 150: 57-83.
- Arunkumar R, Harish Prashanth KV, Baskaran V (2013) Promising interaction between nanoencapsulated lutein with low molecular weight chitosan: Characterization and bioavailability of lutein in vitro and in vivo. *Food Chem* 141: 327-337.
- Arunkumar R, Prashanth KV, Manabe Y, Hirata T, Sugawara T, Dharmesh SM, Baskaran V (2015) Biodegradable Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)-Polyethylene Glycol Nanocapsules: An Efficient Carrier for Improved Solubility, Bioavailability, and Anticancer Property of Lutein. *J. Pharm. Sci* 104: 2085-2093.
- Benítez-García I, Vanegas-Espinoza PE, Meléndez-Martínez AJ, Heredia FJ, Paredes-López O, Del Villar-Martínez AA (2014) Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Electron J Biotechnol* 17: 107-113.
- Boon CS, McClements DJ, Weiss J, Decker EA (2010) Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50: 515-532.
- Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ (1996) Comparative in vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. *J. Pharm. Sci* 85: 530-536.
- Cerón-García MDC, Campos-Pérez I, Macías-Sánchez MD, Bermejo-Román R, Fernández-Sevilla JM, Molina-Grima E (2010) Stability of carotenoids in *scenedesmus almeriensis* biomass and extracts under various storage conditions. *J. Agric. Food Chem* 58: 6944-6950.

- Chen C-Y, Jesisca HC, Lee D-J, Chang C-H, Chang J-S (2016) Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. *Bioresour. Technol* 200: 500-505.
- Chuacharoen T, Sabliov CM (2016) Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants. *Colloids Surf A* 503: 11-18.
- Contri RV, Ribeiro KLF, Fiel LA, Pohlmann AR, Guterres SS (2013) Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. *J. Exp. Nanosci* 8: 913-924.
- Coradini K, Lima FO, Oliveira CM, Chaves PS, Athayde ML, Carvalho LM, Beck RCR (2014) Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 88: 178-185.
- Da Silva MM, Nora L, Cantillano RFF, Paese K, Guterres SS, Pohlmann AR, Costa TMH, Rios AdO (2016) The Production, Characterization, and the Stability of Carotenoids Loaded in Lipid-Core Nanocapsules. *Food Bioprocess Technol* 9: 1148–1158.
- Davidov-Pardo G, Gumus CE, McClements DJ (2016) Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of pH and temperature on physical and chemical stability. *Food Chem* 196: 821-827.
- Dos Santos PP, Paese K, Guterres SS, Pohlmann AR, Costa TH, Jablonski A, Flores SH, Rios AdO (2015) Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. *J. Nanopart. Res* 17: 1-11.

- El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 430: 37-48.
- Grillo R, dos Santos NZP, Maruyama CR, Rosa AH, de Lima R, Fraceto LF (2012) Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *J Hazard Mater* 231: 1-9.
- Hartmann D, Thürmann PA, Spitzer V, Schalch W, Manner B, Cohn W (2004) Plasma kinetics of zeaxanthin and 3'-dehydro-lutein after multiple oral doses of synthetic zeaxanthin. *Am. J. Clin. Nutr* 79: 410-417.
- Hong DY, Lee J-S, Lee HG (2016) Chitosan/poly- γ -glutamic acid nanoparticles improve the solubility of lutein. *Int. J. Biol. Macromolec* 85: 9-15.
- Jansen RJ, Robinson DP, Stolzenberg-Solomon RZ, Bamlet WR, de Andrade M, Oberg AL, Rabe KG, Anderson KE, Olson JE, Sinha R, Petersen GM (2013) Nutrients from Fruit and Vegetable Consumption Reduce the Risk of Pancreatic Cancer. *J Gastrointest Cancer* 44: 152-161.
- Kaulmann A, Bohn T (2014) Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res* 34: 907-929.
- Khachik F (1995) Process for isolation, purification, and recrystallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof: Google Patents.
- Khalil M, Raila J, Ali M, Islam KMS, Schenk R, Krause J-P, Rawel H (2012) Stability and bioavailability of lutein ester supplements from *Tagetes* flower prepared under food processing conditions. *J Funct Foods* 4: 602-610.

- Kumar R, Yu W, Jiang C, Shi C, Zhao Y (2010) Improvement of the isolation and purification of lutein from marigold flower (*Tagetes erecta L.*) and its antioxidant activity. *J. Food Process. Eng* 33: 1065-1078.
- Lacatusu I, Mitrea E, Badea N, Stan R, Oprea O, Meghea A (2013) Lipid nanoparticles based on omega-3 fatty acids as effective carriers for lutein delivery: preparation and in vitro characterization studies. *J Funct Foods* 5: 1260-1269.
- Liu C-H, Wu C-T (2010) Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids Surf A* 353: 149-156.
- Lobato KBdS, Paese K, Forgearini JC, Guterres SS, Jablonski A, Rios AdO (2013) Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chem* 141: 3906-3912.
- McClements DJ, Rao J (2011) Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit. Rev. Food Sci* 51: 285-330.
- Mitri K, Shegokar R, Gohla S, Anselmi C, Müller RH (2011) Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *Int. J. Pharm* 414: 267-275.
- Mohanraj VJ, Chen Y (2006) Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharm Res* 5: 561-573.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A (2010) Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm* 385: 113-142.
- Nachtigall AM (2007) Extração, saponificação e atividade antioxidante de luteína obtida de flores de *Tagetes patula L.* e *Calendula officinalis L.* Tesis, Universidade Federal de Viçosa.

- Nachtigall AM, Stringheta ACO, Bertoldi MC, Stringheta PC (2010) Quantification and characterization of lutein from *Tagetes (Tagetes patula L.)* and *Calendula (Calendula officinalis L.)* flowers. Paper presented at the XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 939.
- Nalawade PB, Gajjar AK (2016) Microencapsulation of lutein extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta L.*) using full factorial design. *J Drug Deliv Sci Technol* 33: 75-87.
- Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Vaquero M (2003) Lutein, but not α -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition* 19: 21-24.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4: 89-96.
- Piccaglia R, Marotti M, Grandi S (1998) Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Ind Crops Prod* 8: 45-51.
- Qian C, Decker EA, Xiao H, McClements DJ (2012) Inhibition of β -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: Influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. *Food Chem* 135: 1036-1043.
- Qv X-Y, Zeng Z-P, Jiang J-G (2011) Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocoll* 25(6): 1596-1603.

- Schaffazick SR, Guterres SSU, Freitas LD, Pohlmann AR (2003) Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Quim Nova* 26: 726-737.
- Seddon, JM (2013). Genetic and Environmental Underpinnings to Age-Related Ocular Diseases. *Age-Related Ocular Diseases. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 54: ORSF28-ORSF30.
- Sessa M, Casazza A, Perego P, Tsao R, Ferrari G, Donsì F (2013) Exploitation of Polyphenolic Extracts from Grape Marc as Natural Antioxidants by Encapsulation in Lipid-Based Nanodelivery Systems. *Food Bioprocess Technol* 6: 2609-2620.
- Shi XM, Chen F (1997) Stability of lutein under various storage conditions. *Food Nahrung* 41: 38-41.
- Tan TB, Yussof NS, Abas F, Mirhosseini H, Nehdi IA, Tan CP (2016) Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: The effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. *Food Chem* 194: 416-423.
- Tiede K, Boxall AB, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M (2008) Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25: 795-821.
- Valente -Soares LM (2001). Como obter resultados confiáveis em cromatografia / How to obtain reliable results in chromatography. *Rev Inst Adolfo Lutz* 60(1):79–84.
- Vechpanich J, Shotipruk A (2011) Recovery of free lutein from tagetes erecta: Determination of suitable saponification and crystallization conditions. *Sep Sci Technol* 46: 265-271.

- Venturini CG, Jäger E, Oliveira CP, Bernardi A, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR (2011) Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids Surf A* 375: 200-208.
- Wang Y, Ye H, Zhou C, Lv F, Bie X, Lu Z (2012) Study on the spray-drying encapsulation of lutein in the porous starch and gelatin mixture. *Eur Food Res Technol* 234: 157-163.
- Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ (1997) Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Control. Release* 48: 223-236.
- Wu L, Zhang J, Watanabe W (2011) Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 456-469.
- Yi J, Fan Y, Yokoyama W, Zhang Y, Zhao L (2016) Characterization of milk proteins–lutein complexes and the impact on lutein chemical stability. *Food Chem* 200: 91-97.
- Zou Z, Xu X, Huang Y, Xiao X, Ma L, Sun T, Lin X (2011) High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: The Beijing atherosclerosis study. *Atherosclerosis* 219: 789-793.
- Šivel M, Kráčmar S, Klejdus MFB, Kuban V (2014) Lutein content in marigold flower (*Tagetes erecta L.*) concentrates used for production of food supplements. *Czech J. Food Sci* 32: 521-525.

CAPÍTULO 6

ARTIGO 2: Heating and photosensitization influence on stability of lutein-loaded lipid-core nanocapsules

Formatado para publicação em: *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*

Aelson Aloir Santana Brum¹, Médelin Marques da Silva¹, Priscilla Pereira dos Santos¹, Allana Von Sulzback Brasil¹, Karina Paese², Silvia Stanisçuaski Guterres², Adriana Raffin Pohlmann³, André Jablonski⁴, Simone Hickmann Flôres¹, Alessandro de Oliveira Rios^{1†}

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil

⁴ Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 75, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

†Corresponding authors: Tel.: +55 51 33089787; Fax: +55 51 33087048, E-mail: alessandro.rios@ufrgs.br (A. de O. Rios).

Abstract

Despite the lutein is unstable at light, temperature and oxygen, this carotenoid is a good quencher of singlet oxygen. In this study was evaluated the stability of lutein (92% of purity) in lipid-core nanocapsules (Lutein-LNC), prepared by interfacial deposition of preformed polymer, during photosensitization (5-25 °C) and heating (70-90 °C). The Lutein-LNC were characterized and presented polydispersity index of 0.11, average diameter of 191 nm, zeta potential of -9.14 mV and encapsulation efficiency of 100%. During photosensitization and heating, Lutein-LNC exhibited activation energy (E_a) of 24.67 kcal/mol and 9.96 Kcal/mol, respectively, and these values to Lutein-LNC were superior than free lutein values reported in other studies for both experiments. The results obtained in this study suggest that nanotechnology can improve the stability of lutein.

Keywords: lutein, stability, sensitizer, photodegradation, heating

Classification numbers: 4.02, 5.10, 5.11

1. Introduction

The intake of food or supplements containing carotenoids can provide a lower risk of age-related macular degeneration and cataract [1]. This occurs due to high antioxidant potential of carotenoids, such as lutein and zeaxanthin, and elevated concentration of these compounds in the macular region of the human retina [2,3].

The lutein structure consists in a long carbonic chain with alternate single and double carbon-carbon bonds, and along this chain are distributed two hydroxyl groups [4]. This structure is responsible by the lutein oxidation in the presence of reactive oxygen species and other reactive species, which prevents possible cell damage [5]. In foods, the reactive oxygen species can be generated by enzymatic, chemical and photochemical process or by irradiation [6]. The lutein may preserve eye macula from oxidation and two forms are suggested: (1) the lutein protects the photoreceptor cell layer from singlet oxygen, due to absorption of blue-light, or (2) quenches the photochemical products, such as singlet oxygen and possible reactive species in retina [7,8]. The system of conjugated double bonds also provides to carotenoids degradation when exposed to heat. Carotenoids structure is cleaved and molecular reactions that involve their double bonds occur under the application of high temperatures [9]. Studies demonstrate the instability of the lutein in free form against light and heat [10,11] and new techniques have been used to improve the stability of pigments, such as lutein, in the presence of external factors (light, heat and oxygen), increase the bioavailability of these compounds and allow their incorporation into water-soluble food systems such as nanoencapsulation.

Some studies have been performed to evaluate the stability during photosensitization and heating of carotenoids entrapped in nanocapsules obtained by

various techniques [12,13]. However, none of these studies verified the stability of lutein nanocapsules produced by interfacial deposition of the preformed polymer method. Thus, the aim of this study was to evaluate photosensitization and heating effects in the stability of lutein nanocapsules prepared by interfacial deposition of preformed polymer. The results obtained for this work may allow the application of lutein in food industry, where are used processes under thermal conditions and in the presence of oxygen and light.

2. Experimental

2.1. Material and methods

The *Tagetes patula* flowers were obtained from local market in Porto Alegre, Brazil. The polymer poly (ϵ -caprolactone) (PCL) ($M_w = 80,000$), sorbitan monostearate and Rose Bengal sodium salt (90% pure) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Capric/- caprylic triacylglycerols (CCTs) and polysorbate 80 were obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil).

2.2. Lutein extract

Lutein extract was prepared by modified method of [14] Nachtigall (2007). Lutein was extracted from *Tagetes* petals (1.0 g) utilizing tetrahydrofuran (10 mL) and the extraction was carried out in magnetic stirring for 5 min, filtered and concentrated under reduced pressure in rotaryevaporator (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil).

The step of lutein crystallization was performed according to methodology proposed by Vechpanich and Shotipruk [15]. The ethyl alcohol (2 mL) was added in concentrated extract and stirred in ultrasound for 1 minute. Subsequently, distilled water (4 mL) was

added and the mixture was submitted at heating (65°C) in water bath for 30 min. The crystals formed were dried and the purity evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC).

2.3. *Preparation of lutein nanocapsules*

Lutein nanocapsules were synthesized by interfacial deposition of the preformed polymer according to method described by Venturini *et al.* [16]. The organic phase was obtained by mixture of PCL (250 mg), CCT (400 µL), sorbitan monostearate (95 mg), and lutein crystals (purity of 92 %) in a solution of acetone (60 mL) and ethanol (7.5 mL) under magnetic stirring at 40 °C. In an aqueous phase (132.5 mL) containing polysorbate 80 (195 mg), the organic phase was injected, and the stirring was maintained for 10 min. The mixture was concentrated under reduced pressure until final volume of 25 mL and denominated Lutein-LNC.

2.4. *Characterization of Lutein-LNC*

The diameter and polydispersity index (PDI) of Lutein-LNC were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) using MilliQ® water to dilute the suspension. Zeta potential was determined by electrophoretic mobility (Zetasizer® nano-ZS ZEN mod. 3600, Nanoseries, Malvern, UK) and the suspension was diluted in aqueous solution (10 mM) of NaCl. The data was analyzed by Dispersion Technology Software (version 4.0, Malvern Instruments, UK). The pH of Lutein-LNC was determined at 25 °C by potentiometer (Model DM-22, Digimed, Brazil) and viscosity was evaluated at 25 °C using

a rotational viscometer (Model DV-II p Pro, spindle LV2, Brookfield Engineering, USA) and the data were compiled by Brookfield Rheocalc 32 software.

Encapsulation efficiency and total concentration of lutein in nanocapsules was determined by HPLC. To quantify the lutein total in nanocapsules, acetonitrile (2.5 mL) was added in 500 μ L of Lutein-LNC and sonicated in ultrasound (30 min) to extraction of lutein. This solution was dried in nitrogen, diluted in MTBE (1 mL) and injected in the HPLC.

The encapsulation efficiency was obtained after ultrafiltration of an aliquot of the Lutein-LNC suspension (500 μ L) and injection of aqueous phase containing free lutein in HPLC.

2.5. *Heating of the Lutein-LNC*

In heating experiments, Lutein-LNC was placed in Eppendorf tubes, heated in water bath at 70, 80 and 90 °C and cooled in ice bath. The experiment was performed in the dark. The lutein concentration was evaluated by HPLC after extraction at different times (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 180 min), to determine the kinetic parameters utilizing the Origin Pro 8.0 software (Origin lab Co., MA, USA).

2.6. *Photosensitization of Lutein-LNC*

In photosensitization experiments, the sensitizer rose bengal was added in Lutein-LNC (10 μ mol/L) and 10mL of this solution (Lutein-LNC and sensitizer) was illuminated by a 150 W filament lamp (36,000 lux) coupled to a yellow acrylic cutoff filter to exclusively excite the sensitizer at wavelengths above 470 nm (maximum absorbance). This

experiment was performed in different conditions: in presence of N₂ – saturated (99.99% purity) to the photosensitization cell (excluding the oxygen) at 25°C with rose bengal, in presence of air–saturated in the photosensitization cell at 5 °C, 15 °C and 25 °C with rose bengal and in presence of air - saturated in photosensitization cell at 25 °C without rose bengal.

The lutein content was evaluated by HPLC after lutein extraction from nanocapsules at different times (total of 300 min), and the data were used to determine the kinetic parameters using the Origin Pro 8.0 software (Origin lab Co., MA, USA).

In the photosensitization experiment, the filtered light excites only rose bengal and singlet oxygen is generated by energy transfer from sensitizer to atmospheric oxygen. In the presence N₂-saturated condition only the sensitizer is responsible in lutein loss, whereas in the presence both sensitizer and air, the lutein can be reduced due reaction with oxygen and sensitizer.

2.7. *High-performance liquid chromatography (HPLC)*

The total concentration of lutein during photosensitization and heating was determined by HPLC (Agilent series 1100, Santa Clara, CA, USA) utilizing an equipment with online degasser, quaternary pump, and automatic injector coupled to C30 polymeric column YCM (250 x 4.6 mm i.d.; 3- μ m particle size) at 33 °C. The samples were eluted isocratically at flow rate of 1 mL/min of water/methanol/methyl tertbutyl ether starting from 5:90:5 v/v and reaching 0:95:5 v/v at 12 min, 0:89:11 v/v at 25 min, 0:75:25 v/v at 40 min and 0:50:50 v/v at 60 min. The chromatograms were processed at the absorption wavelength of lutein (445 nm).

Before injection, the lutein from nanocapsules (500 μL) was extracted with acetonitrile (10 mL), homogenized by ultrasonication (30 min) and centrifuged (30 min at 3500 x g). All samples were filtered before injection (0.45 μm , Millex with modified PTFE membrane for aqueous and organic solvents, Millipore, Barueri, SP, Brazil) and were performed in triplicate. The limits of detection and quantification were 6.9×10^{-3} and 1.15×10^{-2} $\mu\text{g/g}$, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of Lutein-LNC

The Lutein-LNC exhibited a monomodal particle-size distribution and a mean diameter of 191 ± 3.24 nm, a PDI of 0.11 ± 0.02 and a zeta potential of -9.14 ± 2.22 mV. The Lutein-LNC suspension was produced with a lutein concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$ and showed pH of 5.4 ± 0.66 , encapsulation efficiency of 100% and viscosity of 1.08 ± 0.02 mPa.s.

Similar results were found by other authors that developed different nano vehicles of bioactive compounds [17-20]. Hong *et al.* [20] produced water-soluble chitosan with poly- γ -glutamic acid nanocapsules to improve the solubility of lutein and the nanoparticles presented size range of 115–260 nm with highly narrow particle size distribution (PDI smaller than 0.2). Coradini *et al.* [17] produced lipid-core nanocapsules containing co-encapsulated resveratrol and curcumin and showed zeta potential of -7.8 ± 0.7 mV and Contri *et al.* [21] reported viscosity of 1.3 ± 0.1 mPa s for nanocapsules containing capric/caprylic triglycerides, very similar to the value determined in Lutein-LNC. Using the

same encapsulation technique of this study, Da Silva *et al.* [18] obtained an encapsulation efficiency of 99.65 % in the nanocapsules of a blend with β -carotene, α -carotene and lutein.

3.2. Heating of Lutein-LNC

The temperature has remarkable effects on those heat-sensitive bioactive substances. In this experiment, the retention rate of lutein decreased with the increasing of temperature. After 180 min, the retention rates of lutein in nanocapsules was 77.47 % at 70 °C, 58.54 % at 80 °C and 19.07 % at 90 °C (Fig. 1).

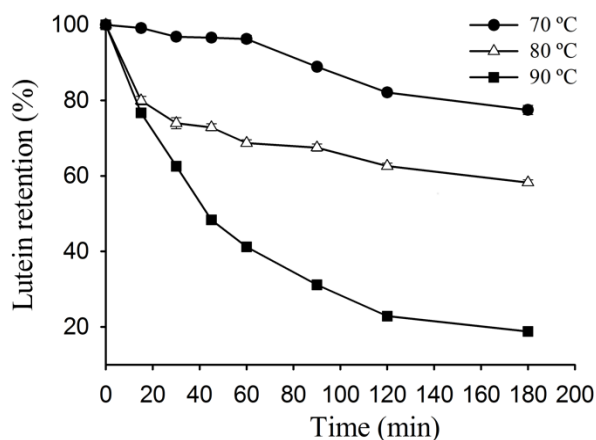


Fig. 1 Lutein concentration during heating of Lutein-LNC.

In all conditions, the rate of lutein loss was directly proportional with the increase of temperature and followed first order kinetics with a correlation coefficient $R^2 > 0.96$. During heating, the lutein loss was also verified by constant k_{obs} and the effect of temperature on the k value was evaluated by activation energy (E_a). Rate constant k_{obs} was obtained by exponential fitting of experimental data (Table 1).

The k_{obs} for the temperatures used during heating (70, 80 and 90 °C) were respectively, 3.45×10^{-4} , 5.63×10^{-4} and 25.59×10^{-4} . These values are in accordance with findings reported by Dos Santos *et al.* [22] in a similar study with lycopene nanocapsules obtained by same technique. The researchers found k_{obs} 2.95×10^{-4} (60 °C), 7.82×10^{-4} (70 °C) and 10.48×10^{-4} (80 °C) during heating procedure.

Table 1. Rate constant (k_{obs}) and activation energy for lutein loss during photosensitization and heating of Lutein-LNC.

Temperature (°C)	Experimental Conditions	Rate constants $k \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	Ea (kcal/mol)
5	Air + 10 µmol/L of Rose bengal	4.02	
15	Air + 10 µmol/L of Rose bengal	10.44	
25	Air + 10 µmol/L of Rose bengal	13.36	9.96
25	Air	0.18	
25	N ₂ + 10 µmol/L of Rose bengal	0.04	
70	Air	0.345	
80	Air	0.563	24.70
90	Air	2.56	

Chuachaoren and Sabliov [12] evaluated the stability of lutein particles with zein (wall material) stored under different temperatures (4°C, 25°C and 40°C) and found k_{obs} values of $4.17 \times 10^{-8} \text{ min}^{-1}$, $1.39 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$ and $1.46 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$. In general, all kinetic constants tripled for each 20 °C increase in temperature, demonstrating a marked effect of temperature in reaction rates [23]. The necessary activation energy (E_a) for the degradation of lutein in Lutein-LNC during heating (Table 1) was 24.70 kcal/mol. Dos Santos *et al.* [22] found similar activation energy (24.9 kcal/mol) to stability of lycopene nanocapsules obtained by same encapsulation method. Free lutein was evaluated by Giménez *et al.* [10]

that verified thermal degradation of colorants solubilized in ethanol-water (3:2, v/v) under different temperatures (30°C, 50°C, 70°C and 90°C) and observed that free lutein in solution presented an activation energy of only 0.76 kcal/mol. These results suggest that wall material present in nanocapsules may protect the lutein conferring thermal resistance when compared to free lutein or other techniques of encapsulation.

3.3. *Photosensitization of Lutein-LNC*

Due to its chemical structure, lutein can be oxidized and degraded in the presence of light and oxygen [24]. The results (Fig. 2) suggest that nanoencapsulation was appropriate method to protect lutein against photodegradation. The lutein retention rates in Lutein-LNC were 72.47 % (5 °C), 58.93% (15 °C) and 57.13 % (25 °C) in the presence of air – saturated after 300 min (Fig. 2a) and, indeed, the rate of lutein loss increased with the increase at temperatures.

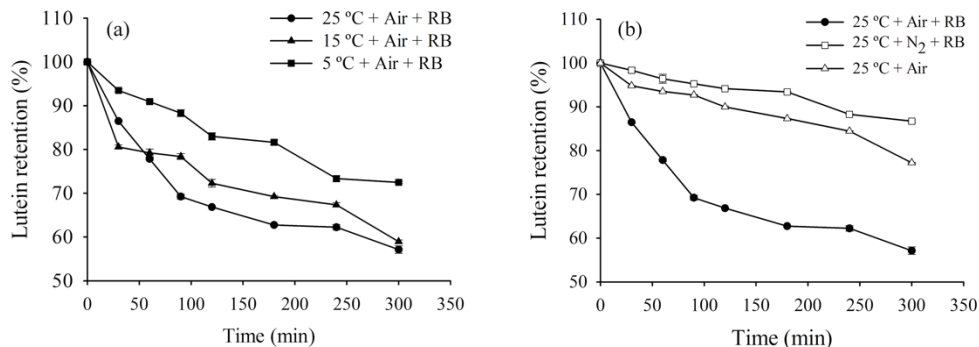


Fig. 2 Stability of Lutein-LNC during photosensitization in different temperatures in air-saturated (a) and in same temperature and in different conditions (b).

Comparing the same temperature in different conditions, it was possible observed that presence of oxygen caused more impact in the lutein degradation than sensitizer action in isolation (Fig. 2b). According to Winkler *et al.* [25], lutein and zeaxanthin primarily and preferentially quench photo-induced singlet oxygen, thus acting as antioxidants.

The lutein loss during the photosensitization followed a first-order kinetic reaction and rate constant k_{obs} (Table 1) by exponential fitting of the experimental data (coefficient of correlation $R^2 > 0.97$). This behavior is also observed by studies with encapsulated lutein utilizing different encapsulation technique [12] and other encapsulated carotenoids, such as lycopene [22] and bixin [26], proving the capacity to protect bioactive compounds.

Despite of lutein degradation in Lutein-LNC, free lutein may degrade faster than encapsulated. In study utilizing a lutein solution, Li *et al.* [27] evaluated stability of powder of freeze-dried sweet corn stored under illumination at 4, 20 and 37°C and verified that activation energy to free lutein was 4.5 kcal/mol, whereas Lutein-LNC presented activation energy of 9.96 kcal/mol (Table 1). Similar value was reported by Lobato *et al.* (2015) that analyzed photosynthetic stability of bixin nanocapsules obtained by same technique and under the same conditions and found activation energy of 12 kcal/mol, indicating that nanoencapsulation increases the stability of bixin during photosensitization.

4. Conclusion

This study demonstrated that stable nanocapsules can be produced by interfacial deposition of preformed poly (ϵ -caprolactone) technique and nanoencapsulation can improve thermal and photo stability of lutein. The higher values of activation energy to

Lutein-LNC compared to free lutein reported by literature showed that nanoencapsulation increased the stability of lutein and maintained the ability of this carotenoid to quench singlet oxygen. This investigation also evidenced that change in temperature alter the stability of the nanocapsules, indicating that the combined use of low temperature and nanotechnology may allow the application of lutein in food industry. Future trends in stability evaluation of Lutein-LNC should focus on studies regarding the stability of these nanocapsules in food matrices and their safety by *in vivo* studies.

References

- [1] Trumbo PR, Ellwood KC 2006 Lutein and zeaxanthin intakes and risk of age-related macular degeneration and cataracts: an evaluation using the Food and Drug Administration's evidence-based review system for health claims *Am. J. Clin. Nutr.* **84**:971-4
- [2] Nwachukwu ID, Udenigwe CC, Aluko RE 2016 Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status *Trends Food Sci. Tech.* **49**:74-84
- [3] Zimmer JP, Hammond BR 2007 Possible influences of lutein and zeaxanthin on the developing retina *Clin. Ophthalmol.* **1**:25-35
- [4] Kim SR, Nakanishi K, Itagaki Y, Sparrow JR 2006 Photooxidation of A2-PE, a photoreceptor outer segment fluorophore, and protection by lutein and zeaxanthin *Exp. Eye Res.* **82**:828-839
- [5] Santosa S, Jones PJH 2005 Oxidative stress in ocular disease: Does lutein play a protective role? *CMAJ: Can. Med. Assoc. J.* **173**:861-862

- [6] Choe E, Min DB 2005 Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods *J. Food Sci.* **70**:R142-R159
- [7] Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA 2003 Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye *Annu. Rev. Nutr.* **23**:171-201
- [8] Snodderly DM 1995 Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins *Am. J. Clin. Nutr.* **62**:1448s-1461s
- [9] Bonnie TP, May Y 1999 Oxidation and thermal degradation of carotenoids *J. Oil Palm Res.* **2**: 62-78
- [10] Giménez PJ, Fernández-López JA, Angosto JM, Obón JM 2015 Comparative Thermal Degradation Patterns of Natural Yellow Colorants Used in Foods *Plant Food Hum. Nutr.* **70**:380-387
- [11] Shi XM, Chen F 1997 Stability of lutein under various storage conditions *Food/Nahrung* **41**:38-41
- [12] Chuacharoen T, Sabliov CM 2016 Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **503**:11-18
- [13] Jin H, Xia F, Jiang C, Zhao Y, He L 2009 Nanoencapsulation of Lutein with Hydroxypropylmethyl Cellulose Phthalate by Supercritical Antisolvent *Chinese J. Chem. Eng.* **17**:672-677
- [14] Nachtigall AM 2007 Extração, saponificação e atividade antioxidante de luteína obtida de flores de *Tagetes patula* L. e *Calendula officinalis* L.: Universidade Federal de Viçosa

- [15] Vechpanich J, Shotipruk A 2011 Recovery of free lutein from *Tagetes erecta*: Determination of suitable saponification and crystallization conditions. *Sep. Sci. Technol.* **46**:265-271
- [16] Venturini CG, Jäger E, Oliveira CP, Bernardi A, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR 2011 Formulation of lipid core nanocapsules *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **375**:200-208
- [17] Coradini K, Lima FO, Oliveira CM, Chaves PS, Athayde ML, Carvalho LM, Beck RCR 2014 Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **88**:178-185
- [18] Da Silva MM, Nora L, Cantillano RFF, Paese K, Guterres SS, Pohlmann AR, Costa TMH, Rios AdO 2016 The Production, Characterization, and the Stability of Carotenoids Loaded in Lipid-Core Nanocapsules *Food Bioprocess Tech.* **9** (7), 1148–1158
- [19] Dos Santos PP, Paese K, Guterres SS, Pohlmann AR, Costa TH, Jablonski A, Flôres SH, Rios AdO 2015 Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study *J. Nanopart. Res.* **17**:1-11
- [20] Hong DY, Lee J-S, Lee HG 2016 Chitosan/poly- γ -glutamic acid nanoparticles improve the solubility of lutein *Int. J. Biol. Macromolec.* **85**:9-15
- [21] Contri RV, Ribeiro KLF, Fiel LA, Pohlmann AR, Guterres SS 2013 Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties *J. Exp. Nanosci.* **8**:913-924

- [22] Dos Santos PP, Paese K, Guterres SS, Pohlmann AR, Jablonski A, Flôres SH, Rios AdO 2016 Stability study of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules under temperature and photosensitization *LWT – J. Food Sci. Tech.* **71**:190-195
- [23] Aparicio-Ruiz R, Mínguez-Mosquera MI, Gandul-Rojas B 2011 Thermal degradation kinetics of lutein, β -carotene and β -cryptoxanthin in virgin olive oils *J. Food Compos. Anal.* **24**:811-820
- [24] Mitri K, Shegokar R, Gohla S, Anselmi C, Müller RH 2011 Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance *Int. J. Pharm.* **414**:267-275
- [25] Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P 1999 Oxidative damage and age-related macular degeneration *Mol. Vis.* **5**:32
- [26] Lobato KBdS, Paese K, Forgearini JC, Guterres SS, Jablonski A, Rios AdO 2015 Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating *LWT – J. Food Sci. Tech.* **60**:8-14
- [27] Li D-J, Song J-F, Liu C-Q 2014 Kinetic stability of lutein in freeze-dried sweet corn powder stored under different conditions *Food Sci. Technol. Res.* **20**:65-70

CAPÍTULO 7

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FLORES DE *Tagetes patula* UTILIZANDO FLUIDO SUPERCRÍTICO (CO₂) E CO-SOLVENTE ETANOL

1 Introdução

Com o aumento da expectativa de vida da população, e conseqüentemente, o maior número de idosos no mundo, a utilização da luteína como forma de combate e prevenção de doenças degenerativas é uma alternativa interessante e sua aplicação como ingrediente em bebidas e alimentos pode ser bastante conveniente e atrativa (MAUS, 2011).

A obtenção deste carotenoide é geralmente realizada utilizando-se solventes orgânicos altamente nocivos à população e ao meio ambiente.

Neste sentido, os investigadores enfrentam novos desafios no desenvolvimento de novos processos de extração para obter produtos bioativos e seguros. Novos desafios envolvem o desenvolvimento de técnicas rápidas, seletivas, eficientes, sustentáveis, verdes (sem o uso de solventes orgânicos tóxicos), com elevados rendimentos e com menores custos. As técnicas capazes de satisfazer estas exigências são, entre outras, as que se baseiam no uso de fluidos comprimidos (pressurizados), tais como a extração com fluido supercrítico (ScCO₂), extração de líquido pressurizado (ELP) e extração subcrítica com água (ESA), que estão entre os processos mais promissores.

1.1 Fluido supercrítico

Um componente puro é considerado um fluido supercrítico quando sua temperatura e pressão são maiores que seus valores críticos. A pressão crítica é definida como a pressão máxima na qual um líquido pode ser convertido a um gás pelo aumento da temperatura.

Analogamente, a temperatura crítica é considerada a temperatura máxima na qual um gás pode ser convertido a líquido pelo aumento da pressão. Desta forma, acima do ponto crítico, variações de pressão e temperatura não modificam a fase do fluido (ALBUQUERQUE, 2008). No diagrama de fases abaixo (Figura 1) é possível visualizar as regiões de gás, sólido, líquido e fluido supercrítico.

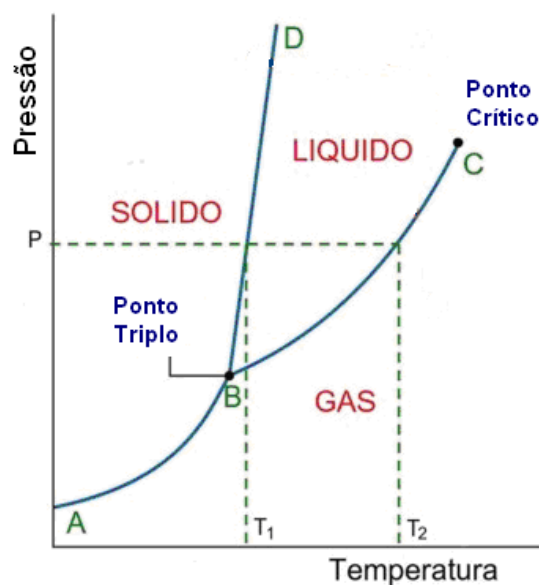


Figura 1. Diagrama de fases para uma substância pura.

Fonte: King et al. (1989).

No estado supercrítico, a substância assume propriedades tanto de gases como de líquidos e possui uma maior capacidade como solvente. Nesta região, pequenas mudanças na temperatura e/ou pressão resultam em uma grande mudança nas propriedades solventes. Estas propriedades oferecem características muito atrativas de extração devido a sua difusividade, viscosidade, tensão superficial e outras propriedades físicas favoráveis (MUKHOPADHYAY, 2000).

Desta forma, a densidade do fluido supercrítico pode ser modificada pela variação da pressão aplicada sobre o fluido. De acordo com Michielin, (2002), os fluidos

supercríticos apresentam uma viscosidade baixa como a de um gás, alta densidade como os líquidos e difusão intermediária entre gases e líquidos, variando de acordo com a densidade.

Essas características fazem com que os fluidos supercríticos apresentem maiores taxas de transferência de massa no processo de extração de soluto, quando comparado a operações convencionais que empregam solventes orgânicos (MICHIELIN, 2002).

O solvente utilizado na extração como fluido supercrítico deve apresentar os seguintes requisitos: possuir bom poder de solvatação, ser inerte ao produto, ser facilmente separado do produto, ser relativamente barato e deve apresentar pressão crítica baixa por razões econômicas (DIEHL, 2008).

O solvente mais utilizado na extração supercrítica de produtos alimentícios e farmacêuticos é o dióxido de carbono (CO_2) pois apresenta as seguintes vantagens:

- Temperatura Crítica: igual a $31,2^\circ\text{C}$, preservando as propriedades organolépticas e químicas dos extratos uma vez que as extrações podem ser conduzidas a temperaturas relativamente baixas;
- Pressão Crítica: igual a $73,4$ bar, diminuindo os custos de compressão, facilita a separação após a extração não deixando resíduos no extrato. Uma vez que é um gás nas condições ambientais e sua temperatura crítica é próxima a temperatura ambiente é ideal na extração de compostos termolábeis;
- Inerte: não oferece riscos de reações secundárias, como: reduções, oxidações, hidrólises e degradações químicas;
- Seguro: é um material não explosivo, não poluente e não tóxico;
- Polaridade: apresenta polaridade semelhante à dos solventes apolares comumente utilizados em extrações convencionais, como o hexano e o pentano;
- Versátil: os parâmetros de extração do CO_2 supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de pequenas quantidades de outros produtos, denominados de co-solventes, polares ou apolares, como a água e o etanol, e também pela seleção das condições de temperatura e pressão específicas. Essas opções adicionam flexibilidade e permitem a adequação de condições de extração para as necessidades específicas dos produtos a serem extraídos e ao produto final desejado.

O CO₂ é uma molécula apolar, logo a extração com dióxido de carbono supercrítico (ScCO₂) puro está relacionada à extração preferencial de substâncias apolares e/ou de baixa polaridade. Pode-se também empregar alguns solventes (o etanol, por exemplo) como co-solvente do ScCO₂ em diferentes proporções para se manipular a polaridade da mistura (ScCO₂/etanol) e extrair substâncias nas faixas de polaridades desejáveis (DINIZ, 2013).

1.2 Processo de extração supercrítica

O processo de extração supercrítica é uma operação unitária por contato que se fundamenta no equilíbrio e nas propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos: alto poder de solvatação, alto coeficiente de difusão, baixa tensão superficial e baixa viscosidade (ALBUQUERQUE, 2008).

A extração supercrítica de matrizes vegetais é realizada em batelada, onde o empacotamento da matéria-prima, de onde se obtém o substrato, é realizado em cilindro (extrator) de aço inoxidável a pressão atmosférica. O extrator é fechado, pressurizado e aquecido até a temperatura de operação (ALBUQUERQUE, 2008).

O processo ocorre em duas etapas, etapa de extração e a etapa de separação (RAVENTÓS; DUARTE; ALARCÓN, 2002):

1) Etapa de extração: nesta etapa o solvente no estado supercrítico é bombeado através do extrator, fluindo continuamente através da matéria-prima sólida, a qual absorve o fluido, dilata sua estrutura celular e diminui a resistência ao transporte de massa, acarretando na solubilização dos compostos que são transportados para superfície do sólido e, escoando para a saída do extrator.

2) Etapa de separação: a separação do extrato do solvente ocorre através da redução da pressão do fluido com a abertura da válvula de expansão localizada após o extrator; o que acarreta uma diminuição drástica do poder de solubilização do fluido devido à expansão ao estado gasoso. O soluto precipita em um separador onde a quantidade de extrato pode ser mensurada.

De acordo com Quispe-Condori, (2008), na etapa de extração a temperatura e a pressão são selecionadas de modo a maximizar os rendimentos nos compostos de interesse,

enquanto que na etapa de separação o nível de solubilidade é reduzido para assegurar a precipitação do extrato e possibilitar a reciclagem do CO₂.

1.3 Extração supercrítica de carotenoides

Os carotenoides são solúveis em lipídios ou em solventes apolares (PASSOS, 2007). No passado, carotenoides eram extraídos principalmente com solventes orgânicos. No entanto, com as crescentes restrições do governo sobre o uso de solventes orgânicos, a crescente demanda dos consumidores por produtos "naturais" e os mais recentes desenvolvimentos na tecnologia de fluido supercrítico, há um interesse crescente na recuperação de bioativos naturais usando ScCO₂ (SUN; TEMELLI, 2006).

O dióxido de carbono supercrítico é um solvente adequado para a extração de carotenoides devido à baixa polaridade destes compostos (MACÍAS-SANCHÉZ et al., 2007). Além disso, os carotenoides são extremamente sensíveis a exposição a luz, calor, oxigênio e ácidos, portanto, a extração de carotenoides via fluidos supercríticos é uma promessa para redução da sua isomerização e decomposição. O ScCO₂ é um solvente supercrítico ideal para extração destes compostos devido a sua natureza não tóxica, não inflamável. E, como mencionado anteriormente, apresenta uma temperatura crítica baixa o que é desejável para extração de muitos compostos naturais que necessitam de condições amenas (SHI et al., 2009).

Estudos realizados comprovam que a adição de um co-solvente para ScCO₂ melhora a eficiência da extração. Contudo, o co-solvente de escolha tem sido o etanol, que é um solvente polar, no entanto não é a escolha mais adequada para melhorar a solubilidade dos carotenoides não polares em ScCO₂, devido ao fato de que ao final do processo de extração o etanol tem que ser removido, o que requer o uso de calor. Outros co-solventes estudados são solventes orgânicos, que negam a grande vantagem da tecnologia com fluido supercrítico de ser capaz de produzir extratos "naturais" (SUN; TEMELLI, 2006).

Óleo vegetais estão sendo apontados como bons co-solventes do ScCO₂ para extração dos carotenoides, ao invés do etanol. A vantagem no uso dos óleos vegetais é que não é necessária a separação subsequente do óleo comestível do extrato obtido. Sun e

Temelli, (2006), avaliaram a extração supercrítica dos carotenoides da cenoura usando o óleo de canola como co-solvente do ScCO₂ e observaram que o óleo aumenta a solubilidade do carotenoide aumentando assim a sua extração.

França et al. (1999) aplicaram a extração com fluido supercrítico e a extração com hexano para determinar lipídeos e carotenoides da fruta buriti (*Mauritia flexuosa*). O óleo obtido com hexano apresentou cerca de 1 % de caroteno enquanto que a extração supercrítica foi capaz de remover cerca de 80 % do conteúdo inicial de carotenos.

Portanto, a tecnologia supercrítica é muito eficaz na extração de compostos bioativos (antioxidantes, óleos essenciais, carotenoides) a partir das mais variadas matérias biológicas (plantas, frutos, resíduos de atividade agroindustrial) (CORREA, 2010).

No presente trabalho, foi utilizado um método de extração menos tóxico e eficiente para obtenção de compostos bioativos a partir de flores de *Tagetes patula*, utilizando CO₂ em estado supercrítico com e sem emprego de etanol como co-solvente. Além da obtenção do extrato bruto, realizou-se a identificação cromatográfica dos principais compostos presentes nas pétalas de *Tagetes patula*.

Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Realizar a extração de ésteres de luteína de pétalas de *Tagetes patula* pelo método de Extração com Fluido Supercrítico.

2.1 Objetivos específicos

- Obter extratos de ésteres de luteína a partir das pétalas de *Tagetes patula*, utilizando etanol como co-solvente.
- Avaliar o rendimento dos extratos obtidos;
- Realizar a identificação dos compostos bioativos extraídos.

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Grupo de Pesquisa “Foodomics” do Instituto de Investigação em Ciências da Alimentação (CIAL) situado na Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Espanha.

As flores de *Tagetes patula*, de cor marrom com borda amarela, foram obtidas no comércio local da cidade de Madrid. As flores centrais e periféricas foram destacadas e secas em liofilizador Lyoquest-85 Telstar por um período de 24 horas e após o término desta etapa foram acondicionadas em embalagens plásticas, sob vácuo, e armazenadas à temperatura de -20 °C.

O dióxido de carbono, CO₂, (N-48) foi fornecido pela Praxair (Madrid, Espanha) e a água utilizada foi Água Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA). Todos os demais produtos químicos e solventes foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração com fluido supercrítico

Todas as extrações de alta pressão foram realizadas em um extrator de fluido supercrítico PrepMaster da Suprex (Pittsburgh, PA), conforme mostrado na Figura 2. Para cada extração, amostras de 1,0 g de pétalas secas foram inseridas em uma célula de extração de aço inoxidável de 20 mL na entrada e saída da célula de extração. A unidade PrepMaster pressuriza o CO₂ para o valor ajustado necessário e mantém a célula na temperatura desejada. Em experimentos com CO₂ modificado com etanol ou etanol expandido com CO₂, o etanol (Panreac Quimica SA, Barcelona, Espanha) foi alimentado por uma bomba de CLAE PU2080 da Jasco (Tóquio, Japão) ajustada na vazão volumétrica requerida. Em todos os experimentos, uma vazão mássica constante (0,04 g/min) de CO₂ (Carbuos Metálicos, Air Products Group, Madri, Espanha) foi ajustada na saída da célula de extração usando duas válvulas de parada em conjunto. Extratos (e etanol) foram

coletados em um *Falcon* que foi resfriado por imersão em gelo seco. O tempo de extração foi fixado em 120 minutos e após a conclusão de cada extração, o etanol e o excesso de umidade foram totalmente removidos do *Falcon* por sopro suave de N₂ (Carburos Metálicos, Grupo Air Products, Madri, Espanha). O rendimento de extrato (expresso em mg/g de extracto seco) foi determinado gravimetricamente pesando-se o *Falcon*. Para evitar a degradação do extrato seco, os *Falcons* foram protegidos da luz com folhas de alumínio e armazenados a -18°C antes das análises cromatográficas.

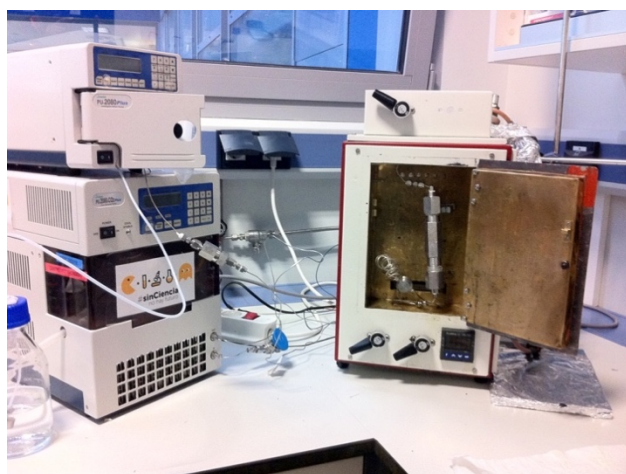


Figura 2. Extrator de fluido supercrítico PrepMaster da Suprex (Pittsburgh, PA)

3.2.2 Identificação de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE dos extractos foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido da série HP 1100 da Agilent (Santa Clara, CA, EUA) equipado com um detector de diodos e utilizando uma coluna de fase inversa YMC-C30 (250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno). Tamanho de partícula de 5 µm; YMC (Europe, Schermbeck, Alemanha). A fase móvel foi uma mistura de metanol-MTBE-água (90:7:3 v/v/v) (solvente A) e metanol-MTBE (10:90 v/v) (solvente B) eluída de acordo com o seguinte gradiente : 0 min, 0% de solvente B; 20 min, 30% de solvente B; 35 min, 50% de solvente B; 45 min, 80% de solvente B; 50 min, 100% de solvente B; 52 min, 0% de solvente B. O caudal foi de 0,8

mL/min, o volume de injeção foi de 10 μ L e a detecção foi a 450 e 660 nm (espectros registados de 240 a 770 nm por detecção de diodo-matriz, DAD). Para a curva de calibração, seis diferentes concentrações de luteína (variando de 1 a 0,025 mg/mL e de $0,04 \times 10^{-3}$ a $1,25 \times 10^{-3}$ mg/mL) foram injetados no instrumento (GILBERT-LÓPEZ et al. 2017).

3.2.3 Caracterização dos extratos obtidos através CLAE acoplada a Espectrômetro de Massa

O instrumento empregado para caracterizar quimicamente os extratos obtidos nas diferentes condições de extração testadas foi um cromatógrafo líquido Agilent (Santa Clara, CA, EUA) 1100 equipado com um detector de diodos e acoplado diretamente a um espectrômetro de massas (Agilent *ion trap* 6320) através de uma interface de ionização química à pressão atmosférica (APCI). As condições de CLAE empregadas para realizar a análise foram as mesmas descritas na seção anterior. A análise de massas foi realizada com APCI em modo de ionização positiva usando os seguintes parâmetros: voltagem capilar, -3,5 kV; temperatura de secagem, 350 °C; temperatura do vaporizador, 400 °C; vazão de gás de secagem, 5 L/min; corrente (que define a corrente de descarga para a fonte APCI), 4.000 nA; pressão do gás nebulizador, 60 psi (CASTRO-PUYANA et al. 2013)

3.3 Análise estatística

Os resultados serão avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias serão comparadas pelo teste de Tukey utilizando software Statistica® 10.

4 Resultados e Discussão

4.1 Avaliação do rendimento de extração para extratos de *Tagetes patula*

A Tabela 1 apresenta os rendimentos das extrações supercríticas (ScCO₂) realizadas a pressão (300 bar) e temperatura (60 °C) constantes, com variação na porcentagem de etanol utilizado como co-solvente (0 a 50%). A taxa de fluxo de CO₂ para os ensaios em condições supercríticas foi de 0,04 g de CO₂/min.

Tabela 1. Rendimento da extração das flores de *Tagetes patula* utilizando CO₂ e etanol em condição supercrítica

Pressão (bar)	Temp (°C)	Etanol (%)	Rendimento (%)	% RSD*	Éster luteína (área)
300	60	0	2,91	1,69	657,44832
300	60	10	10,78	10,23	3935,54721
300	60	50	38,21	6,29	880,64412

*RSD (Desvio padrão relativo)

Verificou-se um baixo rendimento de extrato de *Tagetes patula* com a extração utilizando somente o CO₂ (2,91%), ou seja, sem a presença do co-solvente. Este comportamento é justificado pela característica apolar do CO₂, representando a solubilização de componentes preferencialmente apolares.

Nas condições experimentais em que utilizou-se 10% de etanol como co-solvente, obteve-se um rendimento de 10,78%, evidenciando não somente a extração dos componentes apolares, mas também a obtenção de compostos polares presentes na planta.

Ao realizar-se a extração com 50% de etanol, ou seja, com um volume de co-solvente equivalente à metade do fluxo de CO₂, o rendimento obtido foi de 38,21%. No entanto, o elevado rendimento foi provavelmente causado pela extração de componentes indesejáveis como ceras, clorofila e outros.

Os resultados obtidos são compatíveis com a literatura, uma vez que compostos com maior peso molecular precisam de uma pressão elevada (300 bar) para se solubilizarem. Além disso, a escolha de um co-solvente com a polaridade adequada é um fator de extrema importância, pois poderá influenciar na composição do extrato final (DANIELSKY, et al. 2007).

Para realização das análises cromatográficas, optou-se por utilizar, em um primeiro momento, somente o extrato obtido com 10% de etanol. Cabe salientar, que o extrato de *Tagetes patula* não foi saponificado e/ou purificado. Justifica-se a não realização de tais etapas, com a prerrogativa de evitar, ao máximo, a utilização de solventes reconhecidamente tóxicos.

4.2 Caracterização dos extratos de *Tagetes patula* utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massa

O espectro de CLAE típico de ésteres de luteína extraídos de *Tagetes patula* é apresentado na Figura 3.

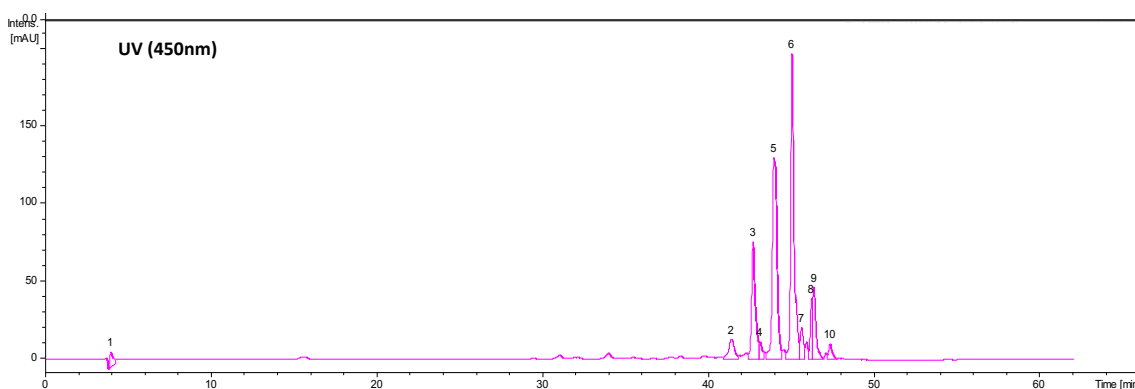


Figura 3. Cromatograma de CLAE do extrato bruto de *Tagetes patula* extraído com ScCO_2 e etanol 10%.

Conforme mostrado na Figura 3, os picos ao longo de 41 a 47 minutos são identificados como diésteres de luteína, como por exemplo, o miristato-palmitato de luteína (43,9 min), dipalmitato de luteína (45 min), palmitato-estearato de luteína (46,3 min) e distearato de luteína (47,3 min).

A identificação/confirmação dos picos cromatográficos obtidos via CLAE, foi realizada após a análise em espectrômetro de massas. Na Tabela 2, os ésteres de luteína são apresentados com seus respectivos fragmentos. Optou-se por trabalhar com as flores mais escuras (vermelho/laranja), pois as mesmas exibem níveis mais elevados de ésteres de luteína, sendo os ésteres de palmitato de luteína os principais compostos identificados.

De maneira geral, as flores de *Tagetes* contêm pequenas concentrações de luteína não esterificada, mas apresentam concentrações elevadas de diésteres de luteína, incluindo compostos diésteres mistos e homogêneos. Esta relação pode indicar que a luteína nas flores de *Tagetes* depositou-se principalmente na forma diéster. O dipalmitato de luteína, o 3'-O-miristato-3-O-palmitato de luteína e o 3'-O-palmitato-3-O-miristato de luteína foram os ésteres de luteína predominantes.

Esses resultados também indicam que o principal ácido graxo esterificado com luteína em *Tagetes* é o ácido palmítico. Outros ácidos também foram encontrados incluindo os ácidos mirístico e esteárico.

Estudos anteriores mostraram que os diésteres de luteína são os principais compostos de oleoresina de calêndula com pequenas quantidades de monoésteres de luteína e um traço de luteína não-esterificada (LI et al, 2007; PICCAGLIA et al, 1998; RIVAS, 1991)

Tabela 2. Ésteres detectados em flores de *Tagetes patula*, obtidos por ScCO₂ + 10% de etanol

Pico N°	Tempo Ret (min)	Éster de Luteína	λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺	MS/MS íons frag
2	41,4	3-O-laurato-3'-O-miristato de luteína	420, 445, 474	nd	761,8 [M+H-lau] ⁺ 733,8 [M+H-mir] ⁺ 533,6 [M+H-mir-lau] ⁺
3	42,7	Dimiristato de luteína	330, 420, 445, 473	nd	761,8 [M+H-mir] ⁺ 533,7 [M+H-2mir] ⁺
5	43,9	3-O-miristato-3'-O-palmitato de luteína	420, 445, 474	nd	789,8 [M+H-mir] ⁺ 761,8 [M+H-palm] ⁺ 533,7 [M+H-mir-palm] ⁺
6	45	Dipalmitato de luteína	422, 446, 474	nd	789,9 [M+H-palm] ⁺ 533,7 [M+H-2palm] ⁺
	45,2	3-O-palmitato-3'-O-miristato de luteína	422, 446, 474	nd	789,7 [M+H-mir] ⁺ 761,8 [M+H-palm] ⁺ 533,6 [M+H-mir-palm] ⁺
7	45,5	3-O-estearato-3'-O-miristato de luteína	422, 446, 473	nd	817,8 [M+H-mir] ⁺ 761,8 [M+H-estea] ⁺ 533,6 [M+H-mir-estea] ⁺
8	46,1	ni	422, 450, 480	nd	789,9 [M+H-palm] ⁺ 533,7 [M+H-2palm] ⁺
9	46,3	3-O-palmitato-3-O-estearato de luteína	330, 420, 445, 473	nd	817,8 [M+H-palm] ⁺ 789,8 [M+H-estea] ⁺ 533,6 [M+H-palm-estea] ⁺
10	47,3	Diestearato de luteína	422, 446, 474	nd	789,9 [M+H-estea] ⁺ 533,7 [M+H-2stea] ⁺

ni = não identificado; nd = não detectado

Considerando a natureza e as propriedades físicas da ScCO₂, extração com CO₂ tem sido usada principalmente para extrair compostos bioativos apolares, como ácidos graxos, esteróis ou carotenoides. Muitos fitoesteróis são amplamente investigados por serem

componentes naturais com uma importante atividade anti-colesterolêmica (UDDIN et al, 1998).

Estes compostos são bastante solúveis em ScCO₂. Diferentes fitoesteróis foram efetivamente extraídos a 60 °C e 350 bar, juntamente com os ácidos linoléico e linolênico, produzindo extratos de sementes de gergelim preto com atividade neuroprotetora (BOTELHO et al, 2014).

Condições mais brandas (40 °C e 150 bar) foram consideradas mais apropriadas para a recuperação do β -sitosterol do espinheiro marítimo (SAJFRTOVÁ et al, 2010). Na recuperação de fitoesteróis de sementes de melão Kalahari, ScCO₂ a 300 bar e 40 °C permitiram a obtenção de óleo enriquecido em fitoesterol que possuía concentração de fitoesteróis 94% maior do que a extração convencional com solvente orgânico (NYAM et al, 2011).

Esses dados destacam a importância de otimizar as condições de extração mais relevantes para cada amostra, já que a natureza particular da amostra pode influenciar diretamente a extração de componentes alvo, mesmo se os mesmos tipos de compostos forem procurados.

Na literatura, reporta-se que carotenoides foram extensivamente recuperados de diferentes matrizes de plantas usando ScCO₂ (DOMANDIA et al, 2013; ESPINOSA et al, 2014; PRADO et al, 2014). Como mencionado anteriormente, a umidade da amostra é um parâmetro importante na ScCO₂, pois pode afetar diretamente a composição dos extratos.

Um estudo recente comparou o desempenho deste procedimento na recuperação de carotenoides da abóbora após secagem em estufa e após liofilização (DURANTE et al, 2014). A liofilização é considerada um processo de secagem mais suave, mais adequado para compostos lábeis, como carotenoides, e permitiu um aumento de até oito vezes a concentração de carotenoides extraídos em comparação com a secagem em estufa.

Estes dados destacam a importância de se estudar de perto o estado físico da amostra (umidade e tamanho de partícula), a fim de maximizar a recuperação dos componentes-alvo, acima de tudo, para o subsequente aumento de escala do processo. De fato, considerando a complexidade relativa desse tipo de proceso, quando aplicado em

escala industrial, todos os parâmetros envolvidos devem ser cuidadosamente estudados para que o processo resultante seja economicamente viável (ZABOT et al, 2014).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a extração por alta pressão é uma tecnologia poderosa para obtenção de extrato de *Tagetes patula*, principalmente por ser um processo rápido, econômico e ambientalmente amigável, capaz de isolar os compostos de interesse.

Apesar de apresentar um rendimento inferior, quando comparado ao processo que utiliza somente solventes apolares, é importante observar a seletividade do processo através da composição da oleoresina. O perfil da composição do extrato varia ligeiramente com a densidade de CO₂, mas apresenta diferenças pronunciadas em relação aos extratos convencionais. Para estudar o potencial farmacológico do extrato, uma avaliação mais aprofundada do extrato supercrítico deve ser realizada, especialmente para investigar a seletividade do processo.

Solventes orgânicos convencionais também podem ser usados como co-solventes no ScCO₂, como por exemplo o etanol, devido ao seu efeito relacionado à polaridade, bem como à seletividade, nas características da mistura de solventes.

Desta forma, o Sc-CO₂ é um método adequado para a extração de luteína a partir de folhas de *Tagetes patula*, visto que estes extratos podem ser usados para desenvolver produtos alimentares nutricionais ou funcionais. Além disso, a extração supercrítica pode ser utilizada como substituinte dos métodos convencionais que fazem uso de solventes petroquímicos prejudiciais, tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente.

CAPÍTULO 8

DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, há um interesse crescente em compostos biologicamente ativos derivados de recursos naturais, especialmente os que podem atuar efetivamente em alvos moleculares envolvidos em várias doenças.

Os carotenoides constituem o mais amplo grupo de pigmentos na natureza e apresentam-se como moléculas lipofílicas presentes em todos os organismos fotossintéticos, sendo produzidos como metabólito secundário de vegetais, algas, fungos e algumas bactérias.

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos evidenciaram que dietas com altas doses de carotenoides estão correlacionadas com a diminuição de uma série de desordens degenerativas e esses efeitos biológicos têm sido atribuídos às propriedades antioxidantes desses compostos.

Um dos compostos de grande importância é a luteína, que apresenta uma propriedade antioxidante excepcional e seus efeitos benéficos para a saúde humana vêm sendo descritos por muitos autores, como por exemplo, a atuação contra os processos relacionados à degeneração macular. No entanto, a luteína é um composto instável frente ao calor e a luz e, dessa forma, diferentes métodos têm sido propostos para melhorar a estabilidade deste bioativo.

Dentre os métodos, pode-se destacar a produção de sistemas nanoparticulados poliméricos. Tais carreadores particulados, também chamados de nanocápsulas, têm se mostrado mais promissores por apresentarem uma série de vantagens. Além do seu tamanho nanométrico, que permite uma maior captura intracelular das substâncias encapsuladas, as nanocápsulas também são capazes de proteger a substância ativa frente à oxidação devido à presença do revestimento polimérico, de transportar substâncias insolúveis em água com altos níveis de eficiência de encapsulação e de controlar a liberação.

No presente estudo, flores de *Tagetes patula* foram utilizadas como fonte de luteína, visto que esta planta é uma das principais fontes deste carotenoide. Após realizada a

extração com solventes e posterior purificação, a luteína foi nanoencapsulada pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e o sistema foi avaliado quanto a sua estabilidade (4 e 25 °C) durante armazenamento por 90 dias.

A solubilidade de carotenoides na matriz lipídica da nanocápsula é um fator importante que afeta a capacidade de carga do sistema carreador. A eficiência de encapsulação é um dos testes mais importantes para verificar se a nanocápsula foi formada. Neste trabalho, a eficiência foi de 99,51%, indicando que a luteína estava presente no núcleo lipídico das nanocápsulas. A elevada taxa de encapsulação alcançada, é, provavelmente devido à presença de triglicerídeos de cadeia média no núcleo das nanocápsulas, o que facilita a solubilização de carotenoides.

A carga das partículas é outro fator importante para determinar a estabilidade física de emulsões e suspensões. O potencial *zeta* é o potencial elétrico próximo à superfície da nanopartícula onde a velocidade do líquido é zero (superfície de cisalhamento). Os valores negativos obtidos (-5.14 ± 2.22 mV) logo após o preparo das nanocápsulas, refletem a presença de grupos carboxílicos nas extremidades do polímero, uma vez que o polímero utilizado a poli (ϵ -caprolactona) é um poliéster.

No que diz respeito à viscosidade, a nanocápsula produzida apresentou uma viscosidade semelhante a da água, característica que aumenta a aplicação industrial das nanocápsulas em diferentes sistemas alimentares. A viscosidade descreve a resistência de um fluido ao escoamento e é um parâmetro importante para a nanodispersão devido a propriedades reológicas que afetam algumas etapas de produção.

Como a luteína apresenta elevada instabilidade e hidrofobicidade, torna-se difícil incorporá-la em sistemas alimentares aquosos. Por essa razão, o bioativo foi encapsulado dentro de um núcleo lipídico, utilizando-se triglicerídeos de cadeia média como meio lipofílico.

A nanocápsula mostrou-se estável quanto ao diâmetro médio durante o período de armazenamento, sem alteração nesta característica. Além disso, não foi observada a separação de fases ou sedimentação. A boa estabilidade desse sistema pode ser atribuída à capacidade do surfactante não iônico utilizado (Tween 80) de gerar uma forte repulsão estérica entre as nanopartículas lipídicas líquidas (estabilização estérica).

Durante o período de armazenamento, observou-se a redução do teor de luteína nas nanocápsulas e, após 90 dias, a nanocápsula apresentou 21,00 % do conteúdo bioativo (25 °C), enquanto que no mesmo período a 4 °C, uma retenção de 33,71%.

Comprovada a eficiência do método de e a consequente estabilidade do sistema polimérico e da luteína encapsulada, realizou-se um experimento de fotossensibilização e termodegradação. Devido a sua estrutura química, a luteína pode ser oxidada e degradada na presença de luz e oxigênio, portanto realizou-se uma avaliação acelerada em sistema modelo.

Verificou-se que as taxas de retenção de luteína na nanocápsula foram de 72,47% (5 °C), 58,93% (15 °C) e 57,13% (25 °C) na presença de ar saturado após 300 minutos, comprovando que a maior perda de luteína ocorreu com o aumento das temperaturas aplicadas.

Foi observado que a presença de oxigênio causou maior impacto na degradação da luteína do que a ação da radiação isoladamente, o que pode ser explicado pelo fato de que a luteína e a zeaxantina desativam preferencialmente o oxigênio singlete fotoinduzido, atuando assim como antioxidantes.

No experimento de termodegradação, a taxa de retenção de luteína diminuiu com o aumento da temperatura. Após 180 min, as taxas de retenção de luteína em nanocápsulas foram de 77,47% a 70 °C, 58,54% a 80 °C e 19,07 % a 90 °C. Em todas as condições experimentais, a taxa de degradação da luteína foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura.

Em relação a energia de ativação necessária para degradação da luteína encapsulada, o valor encontrado no sistema modelo foi de 24,70 kcal/mol, corroborando com valores reportados na literatura para condições similares às utilizadas no presente estudo. Conforme diversos autores, a energia de ativação necessária para degradar a luteína livre, em um sistema modelo, encontra-se entre 0,50 e 1,00 kcal/mol.

Assim sendo, os resultados obtidos sugerem que o material de parede, presente nas nanocápsulas produzidas, tem capacidade de proteger a luteína contra a degradação, mantendo suas propriedades antioxidantes.

Dois aspectos importantes que não podem ser desconsiderados são a bioacessibilidade e biodisponibilidade da luteína. Infelizmente estes aspectos não puderam ser avaliados no presente estudo, porém sabe-se que diversos fatores influenciam no aproveitamento, via dieta, deste bioativo. É, portanto, imperativo que futuros trabalhos do Laboratório de Compostos Bioativos realizem experimentos com este objetivo.

Conforme Chung et al., (2004) ovos de frangos, por exemplo, são fontes relativamente pobres de xantofilas, mesmo considerando que a biodisponibilidade da xantofila pode ser maior do que a das frutas e vegetais. A exceção é a gema de ovo, em que o teor total de xantofila é de 1,2 mg/100 g. Dado que a biodisponibilidade é 3 vezes maior do que a de uma fonte vegetal, uma gema de ovo poderia fornecer aproximadamente 14% da ingestão diária recomendada de 6 mg (SEDDON et al., 1994).

Um estudo realizado por Xavier et al. (2018), avaliou a bioacessibilidade da luteína através da fortificação *cupcakes* com ésteres deste bioativo. Os níveis de fortificação foram projetados para fornecer uma quantidade substancial de luteína em uma porção (1 *cupcake* de 65 g) para complementar a ingestão de luteína de outras fontes alimentares, e assim atingir a meta diária de 6 mg estabelecida como a quantidade adequada para redução do risco de DMRI (LANDRUM et al., 1997).

Desta forma, a faixa de fortificação de 1 a 4 mg de luteína por porção forneceria entre 17 e 67% da quantidade requerida de luteína e isso poderia ser considerado como a estratégia racional para a implementação da fortificação de luteína em produtos à base de trigo, por exemplo. Os pesquisadores também realizaram experimentos com maiores níveis de fortificação (6 mg e 12 mg por porção) para ampliar o conhecimento sobre o efeito da quantidade de carotenoides na matriz alimentar na eficiência da bioacessibilidade.

A tecnologia de extração por fluidos supercríticos surge como uma alternativa para substituir métodos convencionais. Devido ao caráter lipofílico dos carotenoides presentes na flores de Tagetes, estes são facilmente solubilizados em CO₂ supercrítico, permitindo sua extração a baixas temperaturas e evitando a perda de compostos termolábeis causados pela degradação térmica. Outra vantagem é que o CO₂, após a fase de despressurização e isolamento da oleoresina, pode ser coletado e reciclado, o que reduz a poluição ambiental e representa a redução dos custos operacionais dentro do processo. Da mesma forma,

eliminando os solventes orgânicos tóxicos dentro do processo de extração, há a vantagem de que a oleoresina apresentar-se sob condições apropriadas para o consumo humano direto.

CAPÍTULO 9

CONCLUSÃO GERAL

Nanocápsula de núcleo lipídico contendo luteína, foi produzida e avaliada com o objetivo de melhorar a solubilidade e estabilidade deste carotenoide. Os cristais do bioativo, utilizados nos experimentos, foram obtidos por métodos eficientes de isolamento, purificação e cristalização, a partir de pétalas secas de *Tagetes patula*.

Os resultados obtidos após 90 dias de armazenamento da nanocápsula contendo luteína, permitem concluir que as técnicas utilizadas foram eficazes, sobretudo no que diz respeito à estabilidade do carotenoide encapsulado.

Com um diâmetro de 191 nm, considerado adequado para este propósito, as nanocápsulas se apresentaram esféricas, com uma distribuição de tamanho uniforme e sem formação de agregados aparentes, conforme análise de microscopia.

Após 90 dias de armazenamento a 25 °C, as nanocápsulas retiveram 21% de teor de luteína, por outro lado, o armazenamento a 4 °C preservou com maior efetividade as características das nanocápsulas e apresentou menor grau de degradação da luteína devido à proteção combinada, exercida pelo material da parede e refrigeração.

Os maiores valores de energia de ativação para a nanocápsula contendo luteína, quando comparados ao carotenoide livre, mostraram que a nanoencapsulação aumentou a estabilidade da luteína e manteve a capacidade desse carotenoide em desativar o oxigênio singlete.

Estes resultados demonstraram que a nanoencapsulação, utilizando a técnica de deposição interfacial da poli (ϵ -caprolactona) para o desenvolvimento de nanoestruturas, é um exemplo emergente da aplicação da nanotecnologia, visto que combinada com a aplicação de baixas temperaturas, pode permitir a aplicação da luteína na indústria de alimentos.

Os resultados obtidos na extração de ésteres de luteína de flores de *Tagetes patula*, empregando-se a metodologia de fluido supercrítico, foram satisfatórios. A utilização de etanol a 10%, somado ao CO₂, mostrou-se eficiente, rápida, pouco tóxica e com baixo índice de degradação dos bioativos recuperados. No entanto, é imperativo a realização de um

trabalho mais detalhado na investigação de todos os componentes presentes nas flores estudadas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras podemos considerar:

- Estudo da liberação controlada de luteína em nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) *in vitro*;
- Adição da nanocápsula em bebidas e avaliação da estabilidade;
- Desenvolvimento de nanocápsulas de luteína utilizando a técnica de Extração com Fluido Supercrítico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, E-S. M. et al. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. **Nutrients**, 5, 1169–1185. 2013

ABIDOV, M. et al. The effects of Xanthigen™ in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. **Diabetes Obes. Metab.** 12, 72–81. 2010

ALBUQUERQUE, C.L.C. **Extração supercrítica de matrizes vegetais oleaginosas: rendimento global, cinética de extração, composição química e atividade antioxidante.** 2008. 98fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

ÁLVAREZ-HENAO, M.V. et al. Microencapsulation of Lutein by Spray-Drying: Characterization and Stability Analyses to Promote Its Use as a Functional Ingredient. **Food Chemistry** 256 (118): 181–87. 2018

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, n.150, p.57-83, 2004.

AMAR, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Microstructure transitions derived from solubilization of lutein and lutein esters in food microemulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 33, p.143-150, 2004.

ANARJAN, N. et al. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chem** 123:477–483 2010

ANARJAN, N.; TAN, C.P. Effects of selected polysorbate and sucrose ester emulsifiers on the physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Molecules** 18:768–777 2013

ARUNKUMAR, R. et al. Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanocapsules: an efficient carrier for improved solubility, bioavailability, and anticancer property of lutein, **Pharm. Sci.** 104, (6), 2085–2093. 2015

AUSICH, R.L, SANDERS, D.J. Process for the formation, isolation and purification of comestible xanthophyll crystals from plants. **US Patent** 5, 648, 564.1997.

BENÍTEZ-GARCÍA, I. et al. Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. **Electron J Biotechnol** 17: 107-113. 2014

BESHEER, A. et al. Characterization of PLGA Nanospheres Stabilized with Amphiphilic Polymers: Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Starch vs Pluronics. **Mol. Pharm.**, 6 (2), p. 407-415. 2009.

BHATTACHARYYA, S. et al. Lutein content and in vitro antioxidant activity of different cultivars of Indian marigold flower (*Tagetes patula L.*) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.8259–8264. 2010.

BONE, R.; LANDRUM, J. Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. **J. Nutr.** 133, 992–998. 2003

BOONNOUN, P. et al. Purification of Free Lutein from Marigold Flowers by Liquid Chromatography. **Engineering Journal**. v.16, n.5. 2012.

BOTELHO, J.R.S. Black sesame (*Sesamum indicum L.*) seeds extracts by CO₂ supercritical fluid extraction: isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects, **J. Supercrit. Fluids** 93 (2014) 49–55.

BROW, L. et al. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. **The American Journal of Clinical Nutrition**. n.70, p. 517-524. 1999.

CASTRO-PUYANA, M. et al. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**. n.405, p.4607–4616. 2013.

CORREA, H.A.M. Compostos bioativos de extratos naturais: uma combinação de processos de extração com dióxido de carbono supercrítico, etanol e água. 2010. 253fls. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP: 2010.

DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; McDONALD, T.M. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Alternative Medicine Review**., v.5, n.6, p.591. 2000.

DANIELSKY, L. et al. Marigold (*Calendula officinalis L.*) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. **Chemical Engineering and Processing**. 46 (2007) 99–106.

DA SILVA, M. M. et al.. Thermal and Ultraviolet–visible Light Stability Kinetics of Co-Nanoencapsulated Carotenoids. **Food and Bioproducts Processing** 105: 86–94. 2017

DA SILVA, M. M. et al. The Production, Characterization, and the Stability of Carotenoids Loaded in Lipid-Core Nanocapsules. **Food and Bioprocess Technology**, n.9, v.7, p.1148-1158. 2016.

DELGADO-VARGAS, F., PAREDES-LOPEZ, O, JIMENEZ, A.R. 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.

DEVASAGAYAM, T.P.A. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **J. Assoc. Physicians India** 52, 794–804. 2004

DIEHL, L.C.P. Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico. 2008. 228fls. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

DINIZ, T.T.G. Obtenção de extratos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e de alecrim- pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) por extração sequencial em leito fixo usando CO₂ supercrítico, etanol e água. 2013. 153fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP: 2013.

DI SIA, P. Nanotechnology among innovation, health and risks. **Procedia - Soc. Behav. Sci.** 237, 2017.

DOMANDIA, A.; VAGHELA, N.R. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomatos by using CO₂ as a solvent: a review, **J. Chem. Pharm. Res.** 5 (2013) 188–191.

DOS SANTOS, P. P. et al.. Stability Study of Lycopene-Loaded Lipid-Core Nanocapsules under Temperature and Photosensitization. **LWT - Food Science and Technology** 71: 190–95. 2016

DOS SANTOS, P. P. et al. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, n.17, v.2, p. 1-11. 2015.

DUFOSSÉ, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends Food Sci. Technol.** 16, 389–406. 2005

DURANTE, M. Effect of drying and co-matrix addition on the yield and quality of supercritical CO₂ extracted pumpkin (*Curcubita moschata* Duch) oil, **Food Chem.** 148 (2014) 314– 320.

EDGE, R.; TRUSCOTT, G. Chapter 14. Properties of Carotenoid Radicals and Excited States and Their Potential Role in Biological Systems. IN Carotenoids: **Physical, Chemical and Biological Functions and Properties**. LANDRUM, J. J. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 2010. (*on line*)

- EL-AGAMEY, A. et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 37-48, 2004.
- ESPINOSA-PARDO, A. Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactrix gasipaes*) using supercritical CO₂. **J. Supercrit. Fluids** 93 (2014) 2–6.
- FARHANG, B. Nanotechnology and lipids. **Lipid Technology**, v. 19, n. 6, p. 132-135, 2007.
- FONTANA, J.D. et al. Carotenoides cores atraentes e ação biológica. Disponível em: <http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112carotenoid.htm>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- FRANÇA, L. REBER, G. MEIRELES, M.A.A. MACHADO, N.T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **Journal of Supercritical Fluids**. v.14. p.247-256. 1999.
- FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265, 2004.
- GALASSO, C. et al.. Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. **Antioxidants** 6(4): 96. 2017
- GAU, W.; PLOSCHKE, H.-J.; WÜNSCHE, C. Mass spectrometric identification of xanthophyll fatty acid esters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high-performance liquid chromatography and Craig counter-current distribution. **Journal of Chromatography A**. v 262, p.277-284. 1983.
- GILBERT-LÓPEZ, B. Green compressed fluid technologies for downstream processing of *Scenedesmus obliquus* in a biorefinery approach. **Algal Res.**, v.24, p.111–121. 2017
- GIMÉNEZ, P.J. et al. Comparative Thermal Degradation Patterns of Natural Yellow Colorants Used in Foods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.70, p.380-387. 2015.
- GRANADO, F. et al. A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p.479-489, 2001.
- GREGORY, G. K., CHEN, T. S., PHILIP, T. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v.51, n.4, p.1093–1094.1986.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, n. 147, 2007.

HADDEN, W. L. et al. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4189-4194, 1999.

HADJAL, T. et al. Thermal degradation kinetics of xanthophylls from blood orange in model and real food systems. **Food Chemistry**, v.138, p.2442-2450. 2013

HANDFORD, C.E. et al. Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri- food sector. **Food Control** 57, 24–34, 2015

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**, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.

HENRY, L. K.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein and 9-cis and all-trans β -carotene. **Journal of the American Oil Chemists**. v.75, p. 823- 829. 1998.

HONG, D.Y. et al. Chitosan/poly- γ -glutamic acid nanoparticles improve the solubility of lutein. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.85, p.9-15. 2016

JOYE, I.J.; MCCLEMENTS, D.J. Production of nanoparticles by anti- solvent precipitation for use in food systems. **Trend Food Sci Technol** 34:109–123, 2013

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutr Res** 34: 907-929, 2014

KHACHIK, F. Process for isolation, purification, and recrystallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof. **US Patent** 5, 382, 714.1995.

KHALIL, M. et al. Stability and bioavailability of lutein ester supplements from *Tagetes* flower prepared under food processing conditions. **J Funct Foods** 4: 602-610. 2012

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**, n. 78, p. 389-398, 2002.

KING, J.W., JOHNSON, H.J., FRIEDRICH, J.P. Extraction of fat tissue from meat products with supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.37. p. 951–954. 1989.

KRINSKY, N.I. et al. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annu. Rev. Nutr.** 23:171-201, 2003

LACATUSU, I.; MITREAA, E.; BADEAA, N.; STANA, R.; OPREAA, O.; MEGHEA A. Lipid nanoparticles based on omega-3 fatty acids as effective carriers for lutein delivery. Preparation and *in vitro* characterization studies. **Journal of Functional Foods**, v.5, p. 1260-1269. 2013.

LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Lutein, zeaxanthin and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.385, n.1, p.28-40. 2001.

LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **Int. J. Pharm.**, v.344, n.1-2, p.33, 2007.

LEVI, LW. Trans-xanthophyll ester concentrates of enhanced purity and methods of making same. **US Patent** 6,191, 293. 2001.

LI, W.; GAO, Y.; ZHAO, J.; WANG, Q. Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of Chinese marigold. **J. Agric. Food Chem.** 2007, 55, 8478–8484.

LI, D. et al. Analysis of (all-E)-lutein and its (Z)-isomers during illumination in a model system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.100, p.33–39. 2014.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 214, n. 1-2, p.9-12. 2001.

LIU, J. et al.. *Chlorella Zofingiensis* as an Alternative Microalgal Producer of Astaxanthin: Biology and Industrial Potential. **Marine Drugs** 12(6): 3487–3515. 2014

LIU, C.H. et al. Novel lutein loaded lipid nanoparticles on procaine corneal distribution, **J. Ophthalmol.** 2014.

LOBATO, K.B.S. et al. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141 n.4 p.3906 -3912. 2013.

MACÍAS-SANCHÉZ, M.D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ-OSSA, E.; LUBIÁN, L.M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. **Journal of Supercritical Fluids**. v.39. p.323–329. 2007.

MADAAN, T. et al.. Lutein, a Versatile Phyto-Nutraceutical: An Insight on Pharmacology, Therapeutic Indications, Challenges and Recent Advances in Drug Delivery. **PharmaNutrition** 5(2): 64–75. 2017

MADHAVI, D.L, KAGAN D.I. Process for the isolation of mixed carotenoids from plants. **US Patent** 6, 380, 442, 2002.

MANAYI, A. et al. Lutein and cataract: from bench to bedside. **Crit. Rev. Biotechnol.** 8551, 1–11. 2015

MAUS, D. **Estabilidade oxidativa de queijo prato adicionado de luteína**. 2011. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MCCLEMENTS, D.J.; HANG X. Potential Biological Fate of Ingested Nanoemulsions: Influence of Particle Characteristics. **Food Funct.** 3(3): 202–20. 2012

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipídeos. IN: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4º Ed. Artmed, Porto Alegre, 2010.

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

MELLO, M.C. **Flores e microalgas como fontes alternativas de carotenoides**. 2002. 113f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MERCADANTE, A.Z. et al.. Carotenoid Esters in Foods - A Review and Practical Directions on Analysis and Occurrence. **Food Research International** 99: 830–50. 2017

MERCADANTE, A.Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 128–130. 1998.

MICHIELIN, E.M.Z.; Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*). 2002. 105 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina ‘Centro Tecnológico’, Florianópolis/SC: 2002.

MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R. H. Lutein nanocrystals as antioxidant formulation for oral and dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v.420, p.141– 146, 2011.

MOHAMMADI, G. et al. Development of azithromycin–PLGA nanoparticles: Physicochemical characterization and antibacterial effect against *Salmonella typhi*. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.80, n.1, p.34-39, 2010

MONTENEGRO, M. A. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.52(2), pp.367-73, 2004

MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Boca Raton: CRC Press, 2000.

MURILLO, A.G. et al. Compared with powdered lutein, a lutein nanoemulsion increases plasma and liver lutein, protects against hepatic steatosis, and affects lipoprotein metabolism in guinea pigs, **J. Nutr.** v.146, n.10, p.1961-1969, 2016

NACHTIGALL, A.M. **Extração, saponificação e atividade antioxidante de luteína obtida de flores de *Tagetes patula L.* e *Calendula officinalis L.*** 2007. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

NANBA, K.; TOYOOKA, S. The allelic distribution of a single nucleotide polymorphism in the PDCD5 gene locus of Japanese non-small cell lung cancer patients. **Mol. Med. Rep.** 1, 667–671. 2008

NAVARRETE-BOLANÕS, J. L. et al. Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. **Food Research International**, v.38, 159–165. 2005.

NAVARRETE-BOLANÕS, J. L. An optimization study of solid state fermentation: xanthophylls extraction from marigold flowers. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.65, p.383–390. 2004.

NWACHUKWU, I.D. et al.. Lutein and Zeaxanthin: Production Technology, Bioavailability, Mechanisms of Action, Visual Function, and Health Claim Status. **Trends in Food Science and Technology** 49: 74–84. 2016

NYAM, K.L. Optimization of supercritical CO₂ extraction of phytosterol-enriched oil from Kalahari melon seeds, **Food Bioprocess Tech.** 4 (2011) 1432–1441.

OLMEDILLA, B. et al. Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo controlled pilot study. **Nutrition**, v.19, p.21-24, 2003.

PASSOS, R. Extração e caracterização química de carotenoides provenientes de biomassas de interesse para a aquicultura. 2007. 88fls. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC: 2007.

PERRY, A. et al.. Xanthophyll (Lutein, Zeaxanthin) Content in Fruits, Vegetables and Corn and Egg Products. **Journal of Food Composition and Analysis** 22(1): 9–15. 2009

PHILIP, T. Purification of lutein-fatty acid esters from plant materials. US Patent 4, 048, 203. 1997.

PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M.; GRANDI, S. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. **Industrial Crops and Products**, v.8, p.45–51, 1998.

POLYAKOV, N.E. et al. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 3, p. 398-404, 2001.

PRADO, J.M. Extraction methods for obtaining carotenoids from vegetables – review, **Curr. Anal. Chem.** 10 (2014) 29–66.

PRIYADARSHANI, A.M.B.. A Review on Factors Influencing Bioaccessibility and Bioefficacy of Carotenoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 57(8): 1710–17. 2017

QUISPE-CONDORI, S. Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenaceae*, *Ocimum selloi*, *Foeniculum vulgare*. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP: 2008.

RANGANATHAN, A. et al. Promising interaction between nanoencapsulated lutein with low molecular weight chitosan: characterization and bioavailability of lutein in vitro and in vivo, **J. Food Chem.** 141, 327–337. 2013

RAVENTÓS, M. DUARTE, S. ALCARÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food industry: an overview. *Food Science and Technology International*. v.8. n.5. p.269-284. 2002.

RIBEIRO, H. S.; CHUA, B. S.; ICHIKAWAB, S.; NAKAJIMA, M. Preparation of nanodispersions containing b-carotene by solvent displacement method. **Food Hydrocolloids**. v.22, p. 12- 17. 2008.

RICE-EVANS, C.A.; SAMPSON, J.; BRAMLEY, P.M.; HOLLOWAY, D.E. Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? **Free Radical Research**. v.26, p.381-398.1997.

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, 2307- 2311. 2005.

RIVAS, J.D.L. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein acid esters from marigold flower petal powder. **Journal of Chromatography A**, v. 464, p.442-447, 1989.

RIVAS, J. D. L. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. **J. Chromatogr.** 1991, 464, 442– 447.

RODRIGUES, E. et al. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure activity relationship. **Food Chemistry**. v.135, p.2103-2111. 2012.

RODRIGUES-AMAYA, D. B. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos** / Délia B. Rodrigues-Amaya, Mieko Kimura e Jaime Amaya-Farfan [autores]; LidioCoradin e Vivian Beck Pombo, Organizadores. – Brasília: MMA/SBF, 2008. 100 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI, 2001. 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Nature and distribution of carotenoids in foods**. In: CHARALAMBOUS, F. Shelf life studies of foods and beverages-chemical, biological, physical and nutritional aspects. Amsterdam: Elsevier Science, 1993. p. 547-589.

SÁ, M.C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. **Food Chemistry**, v. 83, p. 595-600, 2003.

SAJFRTOVÁ, M. β -sitosterol: supercritical carbon dioxide extraction from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds, **Int. J. Mol. Sci.** 11 (2010) 1842–1850.

SATALKAR, P. et al. Defining nano, nanotechnology and nano- medicine: why should it matter? **Sci. Eng. Ethics**, 22 (5), 1255–1276, 2016

SCHWARTZ, S.J.; ELBE, J.H. von.; GIUSTI, M.M. **Corante**. In: FENNEMA, O. R., Química de Alimentos. 4 ed., Porto Alegre: Artmed. p 445 – 498, 900p. 2010.

SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; APPLETON, G. P. Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. **Food Chemistry**, v.74, p.365-375. 2001.

SEKHON, B. S. Food Technology - an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**. v 3, p.1-15. 2010.

SERVIN, A.D.; WHITE, J.C. Nanotechnology in agriculture: next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk. **NanoImpact** 1, 9–12, 2016.

SHAISH, A. et al. 9-cis- β -carotene-rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma HDL-cholesterol in fibrate-treated patients. **Atherosclerosis** 189, 215–221. 2006

- SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236. 2004.
- SHI, M.M.; CHEN, F. Stability of lutein under various storage conditions. **Nahrung**. v.41, n.1, p. 38-41. 1997.
- SHI, J.; KHATRI, M.; XUE, S.J.; MITTAL, G.S.; MA, Y.; LI, D. Solubility of lycopene in supercritical CO₂ fluid as effected by temperature and pressure. **Separation and Purification Technology**. v.66. p.322-328. 2009.
- SILVA, A.G da. **Extração e estabilidade dos carotenoides obtidos do tomate processado (*Lycopersicon esculentum Mill*)**. 2001. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- SNODDERLY, D. M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1448S-1461S, 1995.
- SOWBHAGYA, H.B.; SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY, N. Natural colorant from marigold-chemistry and technology. **Food Reviews International**, v. 20, n. 1, p. 33-50, 2004.
- SRINIVASAN, M. et al. Lycopene: an antioxidant and radioprotector against γ -radiation-induced cellular damages in cultured human lymphocytes. **Toxicology** 262, 43–49. 2009.
- SUBAGIO, A.; MORITA, N. Prooxidant activity of lutein and its dimyristate esters in corn triacylglyceride. **Food Chemistry**, v. 81, p. 97-102, 2003.
- SUN, M.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*. v.37. p.397-408. 2006.
- SURH, J. et al.. Utilisation of Spontaneous Emulsification to Fabricate Lutein-Loaded Nanoemulsion-Based Delivery Systems: Factors Influencing Particle Size and Colour. **International Journal of Food Science and Technology** 52(6): 1408–16. 2017
- TAN, C.P.; NAKAJIMA, M. β -carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**. v. 92, p. 661–671, 2005.
- TAN, T. B. et al. Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: The effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. **Food Chemistry**, v.194, p.416-423. 2016

- TSAO, R. et al. Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1045, p.65–70, 2004.
- UDDIN, M.S. et al. Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide: a review. **J. Sci. Food Agric** (2014). v.95.
- VASUDEVAN, P.; KASHYAP, S.; SHARMA, S. *Tagetes*: a multipurpose plant. **Bioresource Technology**, v.62, p.29-35, 1997.
- VECHPANICH, J.; SHOTIPRUK, A. Recovery of free lutein from *Tagetes erecta*: determination of suitable saponification and crystallization conditions. **Separation Science and Technology**. v.46, n. 2, p.265-271. 2011.
- VENTURINI, C.G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A - Physicochemical And Engineering Aspects**, v.375, n.1-3, p.200-208. 2011
- VIJAYAPADMA, V. et al. Protective effect of lutein against benzo(a)pyrene-induced oxidative stress in human erythrocytes. **Toxicol. Ind. Health** 30, 284–293, 2014.
- VIRTAMO, J. et al. Effects of α -tocopherol and β -carotene supplementation on cancer incidence and mortality: 18-year postintervention follow-up of the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. **Int. J. Cancer** 135, 178–185. 2014
- VISHWANATHAN, R., WILSON, T., NICOLOSI, R. Bioavailability of a nanoemulsion of lutein is greater than a lutein supplement. **Nano Biomedicine and Engineering**. v.1, n.1, 2009.
- VIUDA-MARTOS, M. et al. Tomato and tomato byproducts. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 54, 1032–1049. 2014
- WANG, M. et al. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. **Food Chemistry Toxicology**, v.44, p.1522-1559, 2006.
- WEISS, J.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, J.; KRISTBERGSSON, K.; HELGASON, T. AWAD, T. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 146-154, 2008.
- YERRAMILI, M.; GHOSH, S. Long-term stability of sodium caseinate-stabilized nanoemulsions. **J Food Sci Technol**. v.54, n.1, p.82-92, 2017

YEUM, K.; TAYLOR, A.; TANG, G.; RUSSELL, R. M. Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherol in human lenses. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 36, n. 13, p. 2756-2761, 1995.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**. v.41, p.61- 68, 2008.

ZABOT, G.L. Influence of bed geometry on the kinetics of rosemary compounds extraction with supercritical CO₂. **J. Supercrit. Fluids** 94 (2014) 234–244.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M.L. et al. Nanosystems in Edible Coatings: A Novel Strategy for Food Preservation. **International Journal of Molecular Sciences** 19(3). 2018

ZIBAREVA, I.V. A review of information resources on nanoscience, nanotechnology, and nanomaterials. **Sci. Tech. Inform. Process.** 42 (2), 93–111, 2015