



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS RICAS EM
 β -CAROTENO OBTIDAS PELA TÉCNICA DE
DESLOCAMENTO DE SOLVENTE

LARISSA SANTOS ASSUNÇÃO

SALVADOR

2016

LARISSA SANTOS ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS RICAS EM
 β -CAROTENO OBTIDAS PELA TÉCNICA DE
DESLOCAMENTO DE SOLVENTE**

Orientador (a): Profa. Dra. Itaciara Larroza Nunes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de mestre.

SALVADOR

2016

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Assunção, Larissa Santos.

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas ricas em B-caroteno obtidas pela técnica de deslocamento de solvente / Larissa Santos Assunção. - 2016.
.107.f.

Inclui apêndices e anexos.

Orientadora: Profª. Drª. Itaciara Larroza Nunes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2016.

1. Nanotecnologia. 2. Alga marinha. 3. Spirulina platensis. 4. Carotenóides. 5. Polímeros.
I. Nunes, Itaciara Larroza. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 620.5
CDU - 620.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

LARISSA SANTOS ASSUNÇÃO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS RICAS EM β -CAROTENO OBTIDAS PELA TÉCNICA DE DESLOCAMENTO DE SOLVENTE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Itaciara Larroza Nunes
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Renato Souza Cruz
Universidade Estadual de Feira de Santana

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a DEUS, por ter me dado forças, sabedoria e por nunca ter me abandonado nos momentos de angústia.

Aos meus pais, Marinei e Jairo, que são meus maiores incentivadores e a quem devo tudo o que sou e por eles sigo em frente em busca de novas conquistas. Agradeço por cada palavra de carinho e conforto.

À minha irmã Lívia, pelo carinho, atenção, preocupação e palavras de incentivo.

Às minhas tias Neide e Deia, por sempre estarem presentes e torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Leandro pela compreensão, companheirismo, carinho e amor a mim dedicado. Obrigado por sempre ter as palavras certas no momento certo.

À minha orientadora Itaciara, um exemplo de profissional e de ser humano. Agradeço imensamente pelos ensinamentos compartilhados, incentivo, compreensão nos momentos difíceis e pela grande parceria neste trabalho.

À Priscilla, Elaine Janaína, Camila, Tácila e Tainara, por serem tão parceiras e terem me ajudado muito nesta etapa.

Às alunas de iniciação científica Rafaela, Tayane e Luciana, agradeço imensamente a ajuda e paciência durante as “intermináveis extrações”.

Aos técnicos dos laboratórios da ENUFBA, em especial Luis e Ary, pela colaboração e apoio nesta etapa.

À minha estatística, professora Thereza, pela agilidade, paciência e por ser tão prestativa e sempre disposta a ajudar.

À Danilo e Ingrid pelos ensinamentos compartilhados e auxílio na interpretação e elaboração das análises de estabilidade térmica.

À Valdinei pela colaboração nas análises de tamanho de partícula e potencial zeta.

Ao SENAI, por ceder espaço para a realização de algumas análises.

À equipe da microscopia da FIOCRUZ, pela receptividade e apoio para a realização das análises.

Aos meus amigos de longa data Ana Carolina, Emanuel, Gabriela, Mailan, Bruno e Mariana e todos que de alguma forma sempre torcem pelo meu sucesso.

À Bruna pelos ensinamentos compartilhados e palavras de conforto e incentivo.

À CAPES e FAPESB pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro do projeto, respectivamente.

Enfim, a todos que de alguma forma estiveram presentes nesta fase, pelos “quero ir nesta defesa”, “esta defesa não chega não?”, e que mesmo de longe sempre me incentivaram, apoiaram e torceram para que esta etapa da minha vida fosse concluída com sucesso.

Muito obrigada!!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

SUMÁRIO

1. Introdução geral	14
Referências	16
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
CAPÍTULO I	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1. Carotenoides	21
2. <i>Spirulina platensis</i>	22
3. Nanotecnologia: Aspectos gerais.....	25
3.1. Nanopartículas	27
3.1.1. Nanoprecipitação	31
3.1.2. Estudos de obtenção de nanopartículas contendo carotenoides	35
Referências	42
CAPÍTULO II	52
USO DE DIFERENTES MATERIAIS POLIMÉRICOS PARA A OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES E DE NANOPARTÍCULAS LIOFILIZADAS RICAS EM β -CAROTENO.....	52
Resumo	53
Abstract	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1. Material.....	56
2.2. Métodos	56
2.2.1. Extrato rico em β -caroteno	56
2.2.2. Obtenção das nanoemulsões e das nanopartículas liofilizadas.....	57
2.2.3. Tamanho de partícula e potencial zeta	58
2.2.4. Viscosidade.....	58
2.2.5. pH	59
2.2.6. Análise colorimétrica.....	59

2.2.7. Caracterização dos espectros UV-Vis	59
2.2.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	59
2.2.9. Eficiência do encapsulamento	60
2.2.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	60
2.2.11. Análises térmicas	61
2.3. Análise estatística	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Caracterização das nanoemulsões	62
Tamanho de partícula e potencial zeta	62
Viscosidade, pH e cor.....	64
3.2. Caracterização das nanopartículas liofilizadas	66
Avaliação espectrofotométrica, cromatográfica e eficiência do encapsulamento	66
Morfologia das nanopartículas	70
Análises térmicas.....	71
AGRADECIMENTOS	74
REFERÊNCIAS	75
CONCLUSÃO GERAL	80
APÊNDICES	81
ANEXOS	105

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura de alguns carotenoides.....	21
Figura 2. <i>Spirulina platensis</i> (UTEX 1926).....	23
Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	28
Figura 4. Ilustração esquemática das fases do processo de formação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.....	31
Figura 5. Estrutura química do Poli (ácido láctico) (A) e do Poli (lactídeo-co-glicolídeo) (B).....	33
Figura 6. Representação da obtenção do PLGA.....	34
Figura 7. Estrutura química do poli- β -hidroxibutirato (PHB).....	35

CAPÍTULO II

Figura 1. Esquema do preparo e caracterização das nanoemulsões e das nanopartículas liofilizadas ricas em β -caroteno	58
Figura 2. Distribuição do tamanho das partículas das nanoemulsões: β -caroteno + PHB (A); β -caroteno + PLA/PLGA (B) e Extrato + PHB (C); Extrato + PLA/PLGA (D) em triplicata.....	63
Figura 3. Cromatograma obtido por CLAE do extrato de carotenoides da microalga <i>Spirulina platensis</i> e espectros de absorção UV-Vis do padrão comercial de β -caroteno e do extrato da microalga em éter de petróleo.....	67
Figura 4. Cromatogramas obtidos por CLAE das nanopartículas liofilizadas contendo o extrato de carotenoides da microalga <i>Spirulina platensis</i> (A) e o padrão comercial de β -caroteno (B), ambos com o polímero PHB e os espectros de absorção UV-Vis das amostras, dispersas em água.....	68
Figura 5. Nanopartículas liofilizadas dispersas em água: Extrato + PHB e Extrato + PLA/PLGA (A); β -caroteno + PHB e β -caroteno + PLA/PLGA (B)	70
Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas contendo β -caroteno, extrato rico em β -caroteno da microalga <i>Spirulina platensis</i> e seus respectivos brancos.....	70

Figura 7. Curvas TGA e DTG das nanopartículas Extrato + PHB (A); Extrato + PLA/PLGA (B); β -caroteno + PHB (C); β -caroteno + PLA/PLGA (D).....	72
Figura 8. Curva de DSC dos constituintes (A) e das diferentes formulações de nanopartículas (B).....	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Resultados das determinações de tamanho médio das partículas, índice de polidispersibilidade (Pdl) e potencial zeta das nanoemulsões.....	62
Tabela 2. Resultados das determinações de viscosidade, pH e cor das nanoemulsões.....	65
Tabela 3. Dados termogravimétricos obtidos a partir da TGA para as nanopartículas e seus constituintes.....	71

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1. Polímeros mais utilizados no preparo de nanopartículas.....	29
Quadro 2. Vantagens e desvantagens do uso da técnica de nanoprecipitação.....	30
Quadro 3. Principais estudos envolvendo a formação de nanopartículas contendo carotenoides.....	37

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Esta dissertação encontra-se dividida em: resumo; abstract; introdução geral; objetivos (geral e específicos); capítulo I (revisão bibliográfica); capítulo II (Artigo: *Nanopartículas poliméricas de β -caroteno obtidas por deslocamento de solvente: preparo e caracterização*); conclusão geral; anexos; resumo expandido apresentado na forma de pôster no 13º Congresso Brasileiro de Polímeros; trabalho completo apresentados na forma de pôster no *5th International Symposium on Technological Innovation* e seus respectivos certificados; prospecção tecnológica publicada na revista Geintec; resumo de duas patentes em fase de redação que serão submetidas ao NIT/UFBA (Núcleo de Inovação Tecnológica), intituladas “Método de extração de carotenoides da microalga *Spirulina platensis*” e “Nanopartícula de carotenoides extraídos da microalga *Spirulina platensis*”.

RESUMO

Os carotenoides são pigmentos com propriedades antioxidantes, atuam como precursores da vitamina A e proporcionam diversos efeitos benéficos à saúde. Dessa forma, há uma procura crescente por novas fontes desses compostos e as microalgas, em especial a *Spirulina platensis*, surgem como uma fonte promissora para a obtenção de β -caroteno. No entanto, a utilização industrial dos carotenoides torna-se difícil devido a algumas características intrínsecas que diminuem sua estabilidade. Assim, o uso do nanoencapsulamento destaca-se como uma alternativa para a preservação destes compostos e para ampliar suas possibilidades de aplicações. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas a partir de extrato rico em β -caroteno obtido da microalga *Spirulina platensis* e de β -caroteno comercial por nanoprecipitação, utilizando na formulação os polímeros PLA/PLGA e PHB. Primeiramente, foram produzidas 4 nanoemulsões ($\cong 160 \mu\text{g/mL}$) designadas como: β -caroteno + PHB; β -caroteno + PLA/PLGA; Extrato + PHB; Extrato + PLA/PLGA. As mesmas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula e potencial zeta, viscosidade, pH e cor (escala CIELab). Essas nanoemulsões foram secas por liofilização para a obtenção das nanopartículas, e caracterizadas quanto ao espectro UV-Vis, carotenoides majoritários por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), eficiência do encapsulamento, morfologia, através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), e comportamento térmico por análise termogravimétrica (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O diâmetro médio das partículas presentes nas nanoemulsões foi de $171,73 \pm 17,28 \text{ nm}$ e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre amostras para esse parâmetro. A maior uniformidade no diâmetro das partículas na emulsão Extrato + PLA/PLGA (99%) foi confirmada pelo menor índice de polidispersão ($\text{PdI} = 0,140 \pm 0,0015$). O potencial zeta variou de $-4,08 \pm 1,37$ (Extrato + PLA/PLGA) a $-11,34 \pm 2,65 \text{ mV}$ (β -caroteno + PHB). A viscosidade média das nanoemulsões foi de $2,92 \pm 0,44 \text{ cP}$, o pH variou de $4,31 \pm 0,02$ e $5,95 \pm 0,11$ e a cor tendeu ao laranja, com L^* médio de $27,72 \pm 1,50$, a^* variando de $-1,22 \pm 0,41$ a $0,42 \pm 0,01$ e b^* de $7,02 \pm 1,48$ a $13,20 \pm 0,96$. Os espectros UV-Vis das nanopartículas liofilizadas contendo o extrato da microalga foram menos afetados em comparação com as amostras contendo padrão de β -caroteno. Esta característica pode estar relacionada à maior eficiência de encapsulação das amostras contendo o extrato de carotenoides da *Spirulina platensis* (Extrato + PHB = 92,13%; Extrato + PLA/PLGA = 88,58%). O all-trans- β -caroteno foi o carotenoide majoritário do extrato de *Spirulina platensis*, seguido de zeaxantina, β -criptoxantina e luteína. Os pigmentos identificados nas nanopartículas com o extrato foram os mesmos, no entanto, a zeaxantina se destacou em relação ao β -caroteno. Todas as nanopartículas apresentaram formato esférico, circundadas pela parede polimérica, e de acordo com as análises térmicas podem ser consideradas estáveis em condições de processamento de alimentos. Os resultados indicam que foi possível obter nanopartículas poliméricas estáveis e dispersíveis em água a partir do extrato da microalga *Spirulina platensis* e de β -caroteno comercial por nanoprecipitação, utilizando os polímeros PLA/PLGA e PHB, como uma possível alternativa de aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: nanoemulsão, nanoprecipitação, *Spirulina platensis*, carotenoides, PHB, PLA, PLGA.

ABSTRACT

Carotenoids are pigments with antioxidant properties, act as vitamin A precursors and they provide many beneficial health effects. Thus, there is an increasing demand for new sources of these compounds and microalgae, in particular *Spirulina platensis*, appear as a promising source for obtaining β -carotene. However, the industrial use of carotenoids becomes difficult due to some intrinsic characteristics which decrease their stability. Thus, nanoencapsulation use stands out as an alternative to the preservation of these compounds and to expand their application possibilities. The aim of this study was to develop and characterize freeze-dried nanoparticles from extract rich in β -carotene obtained from *Spirulina platensis* and commercial β -carotene by nanoprecipitation using in formulating the PLA/PLGA and PHB polymers. First, four nanoemulsions were produced (≈ 160 ug / ml) designated as: β -carotene + PHB; β -carotene + PLA / PLGA; Extract + PHB; Extract + PLA / PLGA. The samples were characterized for particle size and zeta potential, viscosity, pH and color (CIELab scale). These nanoemulsions were dried by lyophilization to obtain the powder nanoparticles and were characterized by UV-Vis spectrum, majority carotenoids by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods, encapsulation efficiency, morphology by Transmission Electron Microscopy (MET) and thermal behavior by Thermogravimetric Analysis (TG) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and comparison test of means of Tukey at 5% probability. The mean diameter of the nanoparticles was 171.73 ± 17.28 nm and there was no significant difference between samples ($p > 0.05$). Higher uniformity in the sample extract + PLA / PLGA (99%) which had lowest polydispersity index (PDI = 0.140 ± 0.0015). Zeta potential ranged from -4.08 ± 1.37 (Extract + PLA / PLGA) at -11.34 ± 2.65 mV (β -carotene + PHB). The mean viscosity of the nanoemulsion was 2.92 ± 0.44 cP, pH ranged from 4.31 ± 0.02 to 5.95 ± 0.11 and tended to orange color with $L^* 27.72 \pm 1.50$ (mean), a^* ranging from -1.22 ± 0.41 to 0.42 ± 0.01 and $b^* 7.02 \pm 1.48$ to 13.20 ± 0.96 . UV-Vis spectrum of freeze-dried nanoparticles containing microalgae extract was less affected in comparison with commercial β -carotene samples. This feature may be related to highest encapsulation efficiency of the samples containing carotenoid extract from *Spirulina platensis* (Extract + PHB = 92.13%; Extract + PLA / PLGA = 88.58%). The all-trans β -carotene was the major carotenoid from *Spirulina platensis* extract, followed by zeaxanthin, β -cryptoxanthin and lutein. The pigment identified in the nanoparticles with extract were the same, however, zeaxanthin stood in relation to β -carotene. All nanoparticles showed spherical shape, surrounded by polymeric wall, according to the thermal analysis may be considered stable in food processing conditions. The results indicate that it was possible to obtain stable and water dispersible polymeric nanoparticles from extract rich in β -carotene obtained from *Spirulina platensis* and commercial β -carotene by nanoprecipitation, using PLA/PLGA e PHB polymers, as a possible alternative in the food industry.

Keywords: nanoemulsion, nanoprecipitation, *Spirulina platensis*, carotenoids, PHB, PLA, PLGA.

1. Introdução Geral

Os carotenoides são um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais, devido a sua ampla distribuição, diversidade estrutural e numerosas funções para as plantas e seres humanos. Embora as plantas sejam as fontes clássicas desses compostos, os mesmos também podem ser encontrados em animais, assim como em microrganismos (OLIVER e PALOU, 2000; MALDONADE et al., 2008).

Nos dias atuais, há uma procura crescente por novas fontes de carotenoides em função do seu poder corante e propriedades funcionais benéficas à saúde, tais como, atividade pró-vitáminica A e antioxidante, modulação da expressão de genes e resposta imunológica (CANELA et al., 2002; CERQUEIRA et al., 2007; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; VALDUGA et al., 2009; CONTADO et al., 2010). Neste contexto destaca-se o β -caroteno, que é o pigmento mais abundante nos alimentos, o mais interessante economicamente e um dos mais importantes carotenoides na nutrição humana (LÓPEZ-RUBIO e LAGARON, 2011).

O interesse na produção de carotenoides a partir de microalgas deve-se ao fato deste pigmento representar certa importância do ponto de vista científico e comercial. Estes microrganismos têm se destacado pelo grande potencial na produção destes pigmentos, sendo considerados recursos renováveis e com boa aplicabilidade nutricional (ARMSTRONG et al., 1997; MENDONÇA et al., 2012)

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria filamentosa de cor verde-azulada, que através da fotossíntese converte os nutrientes em matéria celular e libera oxigênio (COSTA et al., 2003; BERTOLIN et al., 2005; DERNER et al., 2006; AMBROSI et al., 2008). Esta microalga é composta por cerca de 60-70% de proteína e aminoácidos (essenciais e não essenciais) (ESTRADA et al., 2001; COLLA et al., 2004), constituída também por carboidratos, minerais, vitaminas (WANG et al., 2007; AMBROSI et al., 2008), compostos fenólicos (ESTRADA et al., 2001; COLLA et al., 2004), pigmentos fotossintéticos como clorofila a, luteína, β -caroteno, ficocianina, aloficocianina, dentre outros (ESTRADA et al., 2001; SILVA, 2008; MALA et al., 2010).

Devido à instabilidade dos compostos bioativos durante o processamento e armazenamento de produtos alimentícios como, por exemplo, do β -caroteno que é instável sob calor, luz e oxigênio, sua utilização industrial torna-se difícil, por ser um composto que degrada muito rápido em condições ambientais, apresentando menor

estabilidade quando comparado aos antioxidantes sintéticos (MATTEA et al., 2009; HOU et al., 2012).

A fim de preservar as características destes compostos, e ainda melhorar a solubilidade dos mesmos em água, a tecnologia de nanoencapsulação, anteriormente explorada apenas pela indústria farmacêutica, vem sendo aplicada à indústria de alimentos (LUO et al., 2011). As nanopartículas são definidas como sistemas coloidais submicrométricos, geralmente na faixa de 10 a 1000 nm (SOPPIMATH et al., 2001) e nesse grupo, as nanopartículas poliméricas são as que apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e no armazenamento, além de apresentar maior facilidade de produção em larga escala (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2008).

Dentre as técnicas de nanoencapsulamento, o método de nanoprecipitação ou de deslocamento de solvente é de fácil reprodutibilidade e tem sido bastante utilizado no preparo de nanopartículas (RIBEIRO et al., 2008; CAO-HOANG et al., 2011; GOU et al. 2011). A escolha dos componentes do sistema a ser encapsulado é extremamente importante e têm sido aplicados com sucesso vários materiais poliméricos, tais como, poli (ácido lático) (PLA); poli (lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA); poli (ϵ -caprolactona) (PCL), dentre outros polímeros (ANAND et al., 2010; CAO-HOANG et al. 2011).

O polihidroxibutirato (PHB) é um polímero biodegradável que vem ganhando destaque como uma alternativa biotecnológica e inovadora para a formulação de nanopartículas. Este biopolímero, com propriedades similares a de plásticos petroquímicos, pode ser produzido por diferentes tipos de bactérias e arqueobactérias, assim como por plantas geneticamente modificadas, incluindo também as microalgas (SHARMA e MALLICK, 2005; CAMPOS et al., 2014).

Considerando o interesse cada vez maior da indústria de alimentos no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, visando melhorar a estabilidade e a solubilidade em água de compostos bioativos, como forma de ampliar a sua aplicação, destaca-se a necessidade de realizar estudos envolvendo novos materiais para a produção de partículas contendo β -caroteno em escala nanométrica.

Referências

- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 29, p. 115-123, 2008.
- ANAND, P. et al. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 330-338, 2010.
- ARMSTRONG, G. A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis, a colourful tale. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 629-659, 1997.
- BERTOLIN, T. B. P.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 118-125, 2005.
- CAMPOS, M. I; FIGUEIREDO, T.V. B; SOUSA, L. S; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 338-346, 2014.
- CANELA, A. P. R. F.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of fatty acids and carotenoids from the microalgae *Spirulina maxima*. **Industrial & Engineering Chemistry Resesearch**, v. 41, p. 3012-3018, 2002.
- CAO-HOANG, L.; FOUGÉRE, R.; WACHÉ, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into poly lactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 124, p. 42-49, 2011.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.
- COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift Naturforsch**, v. 59, p. 55-59, 2004.
- CONTADO, E. W. N. F.; PATTO, L. S.; ROCHA, D. A.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D. Estudo dos métodos de extração de carotenoides em cenoura por fluído supercrítico (EFS) e convencional. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1617-1623, 2010.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P. *Spirulina platensis* Growth in Open Raceway Ponds Using Fresh Water Supplemented with Carbon, Nitrogen and Metal Ions. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschun**, v. 58, p. 76-80, 2003.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p.1959-1967, 2006.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

GOU, M. et al. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. **Nanoscale**, v. 3, p. 1558-1567, 2011.

HOU, Z.; ZHANG, M.; LIU, B.; YAN, Q.; YUAN, F.; XU, D.; GAO, Y. Effect of chitosan molecular weight on the stability and rheological properties of β -carotene emulsions stabilized by soybean soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 26, 205-211, 2012.

LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Improved incorporation and stabilisation of β -carotene in hydrocolloids using glycerol. **Food Chemistry**, v. 125, p. 997-1004, 2011.

LUO, Y.; ZHANG, B.; WHEAT, M.; YU, LIANGLI.; WANG, Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 145-152, 2011.

MALA, R.; KARTHIK, V.; SAKTHISELVAN, S.; SARAVANABABU, S. Milking of *Spirulina platensis* for the production of carotenoids by aqueous two phase bioreactor systems. International. **Journal of Chemical Sciences**, v. 8, p. 84-91, 2010.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v. 107, p. 145-150, 2008.

MATTEA, F.; MARTÍN, Á.; MATÍAS-GAGO, A. & COCERO, M. J. Supercritical anti-solvent precipitation from an emulsion: beta-carotene nanoparticle formation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 238-247, 2009.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, I. J.; NUNES, I. L. Prospecção tecnológica da utilização da *Spirulina platensis*. **Cadernos de Prospecção Tecnológica**, v. 5, p. 44-52, 2012.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography**, v. 881, p. 543-555, 2000.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, p. 99, 2008.

SHARMA, L.; MALLICK, N. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1304-1310, 2005.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. H.; KULKARNI, W. E.; RUDZINSKI, W. E. B. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Control Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TEIXEIRA, Z.; DURÁN, N.; GUTERRES, S.S. Annatto Polymeric Microparticles: Natural Product Encapsulation by the Emulsion-Solvent Evaporation Method. **Journal of Chemical Education**, v. 85, p. 946-947, 2008.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M.; FÚRIGO JÚNIOR, A. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 105, p. 36-41, 2007.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas a partir de extrato rico em β -caroteno obtido da microalga *Spirulina platensis* e de β -caroteno comercial por nanoprecipitação, utilizando na formulação os polímeros PLA/PLGA e PHB.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obter extrato rico em β -caroteno a partir da microalga *Spirulina platensis*;
- ✓ Produzir nanoemulsões e nanopartículas poliméricas do extrato da microalga e do β -caroteno comercial pelo método de nanoprecipitação;
- ✓ Caracterizar as nanoemulsões quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polispersibilidade (PdI), viscosidade, pH e cor, pH;
- ✓ Caracterizar o extrato da microalga e as nanopartículas liofilizadas dispersas em água quanto ao espectro UV-Vis;
- ✓ Avaliar a composição de carotenoides do extrato da microalga e das nanopartículas liofilizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ✓ Determinar a eficiência do encapsulamento;
- ✓ Caracterizar a morfologia das nanopartículas liofilizadas através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- ✓ Avaliar a estabilidade térmica das nanopartículas liofilizadas e de seus constituintes.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de muitos alimentos, tais como frutas, vegetais, gema de ovo, alguns peixes, como salmão e truta, e crustáceos, sendo encontrados também em microrganismos (VALDUGA et al., 2009). Na natureza estão principalmente na forma isomérica *trans* e divididos em duas classes: os carotenos, que são hidrocarbonetos terpênicos (β -caroteno, α -caroteno, licopeno, dentre outros) e as xantofilas, que são hidrocarbonetos terpênicos com oxigênio na cadeia, (luteína, zeaxantina, criptoxantina, dentre outros). São biossintetizados por plantas, algas, bactérias, fungos, leveduras e insetos (CERQUEIRA et al., 2007).

Os carotenoides têm a estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com ordem invertida no centro (BOBBIO e BOBBIO, 2001) (Figura 1). Os grupos metila centrais estão separados por seis carbonos, ao passo que os demais, por cinco. A característica de maior destaque nestas moléculas é um sistema extenso de ligações duplas conjugadas, responsáveis por suas propriedades e funções tão especiais. Este é o sistema cromóforo, que confere aos carotenoides suas cores atraentes (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

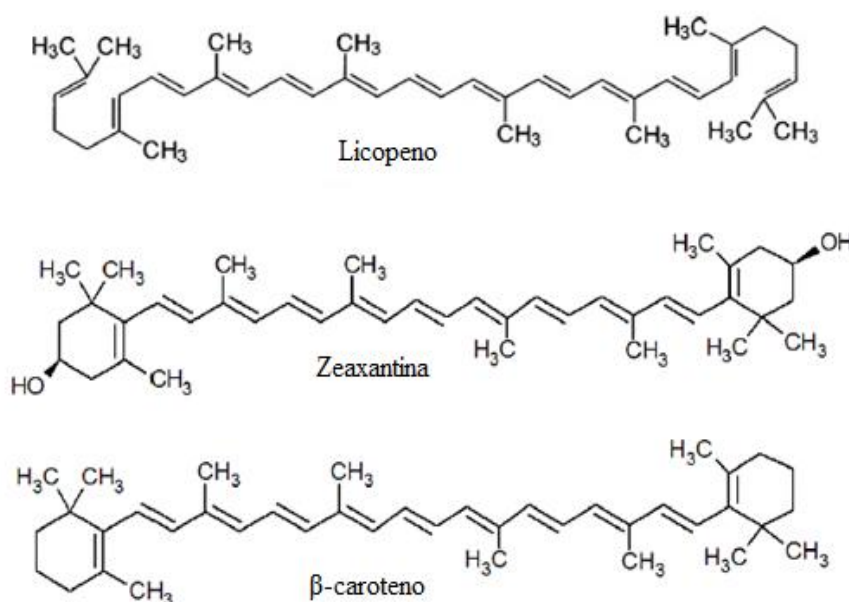


Figura 1. Estrutura de alguns carotenoides.
Fonte: Cadenas e Packer (2002), Adaptado.

O β -caroteno é um dos mais importantes carotenoides na nutrição humana. Sua estrutura exibe simetria molecular interna, em que uma metade da molécula é idêntica à outra metade. Esta propriedade faz com que a clivagem central do β -caroteno apresente potencial para produzir duas moléculas idênticas de retinol, o que atribui ao mesmo o mais alto potencial de atividade de pró-vitamina A em comparação com qualquer outro carotenoide (CADENAS e PACKER, 2002; GONNET et al., 2010).

Os carotenoides atuam como antioxidantes primários, na inativação de radicais livres, ou secundários, na desativação de oxigênio *singlete*. O calor, a luz, os ácidos e a co-oxidação com hidroperóxidos lipídicos promovem isomerização dos *trans* carotenoides, a sua configuração habitual, para as formas *cis*. Isso resulta em alguma perda de cor, porém muito insignificante e não visual, e atividade de pró-vitamina A. Esses pigmentos são considerados compostos apolares ou lipofílicos, por isso, são normalmente encontrados nas membranas dos vegetais, plantas e flores. Eles são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como, acetona, álcool, éter etílico, clorofórmio e acetato de etila (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Ao considerar todas as propriedades funcionais ou ativas dos carotenoides, existe uma busca crescente por novas fontes desses compostos, com destaque para as microalgas do gênero *Spirulina*, que tem sido foco de estudos e utilizadas para a produção de pigmentos por rota biotecnológica, principalmente com a finalidade de aperfeiçoar a bioprodução do β -caroteno (DERNER et al., 2006; SILVA, 2008; VALDUGA et al., 2009).

2. *Spirulina platensis*

O gênero bacteriano *Spirulina* é também denominado de *Arthrospira*, e as espécies mais importantes desse gênero são a *Spirulina platensis*, *Spirulina fusiformes* e *Spirulina máxima* (MARTÍNEZ, 2010; FERREIRA, 2011; WALTER, 2011). É caracterizado por cadeias de células, constituindo um filamento na forma de espiral, denominado tricoma (Figura 2). Seu diâmetro pode variar de 6 a 12 μm , e as estruturas helicoidais formadas por este filamento podem apresentar diâmetros que variam de 30 a 70 μm . As dimensões celulares, o grau de ondulação e o comprimento dos filamentos variam de espécie para espécie. Esta última característica também pode variar conforme as condições ambientais de crescimento (PELOSI et al., 1982; CIFERRI e TIBONI, 1985; TOMASELLI, 1997; HENRIKSON, 1989).



Figura 2. *Spirulina platensis* (UTEX 1926).
Fonte: Universidade do Texas (2006).

A *Spirulina* foi legalmente aceita pelo FDA (Food and Drug Administration, 2003) como GRAS (Generally Recognized As Safe), o que garante seu uso seguro e nutritivo na alimentação humana ou animal (MORAIS et al., 2006).

Segundo Dillon et al. (1995) a *Spirulina spp.* representa uma das mais ricas fontes protéicas de origem microbiana (55 a 70%), colocando-se acima de fontes clássicas, tais como as carnes (15 a 25%) e a soja (cerca de 40%) (MAEHLER et al., 2003). Esta microalga pode ser legalmente comercializada como alimento ou complemento alimentar desde que precisamente qualificada e livre de contaminantes e de adulteração com substâncias (FOX, 1996).

O consumo de *Spirulina spp.* traz benefícios à saúde humana devido a sua composição química, pela presença de compostos como aminoácidos essenciais (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e valina), vitaminas (especialmente B12), pigmentos naturais (como carotenoides, xantofilas, ficobilinas e clorofila) e ácidos graxos essenciais, particularmente ácido γ -linolênico, um precursor das prostaglandinas no organismo humano. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que as propriedades nutricionais da microalga *Spirulina platensis* têm sido relacionadas com possíveis propriedades terapêuticas que podem auxiliar no tratamento de problemas de saúde como diabetes, artrite, anemia, desnutrição, obesidade, doenças cardiovasculares, entre outros (ESTRADA et al., 2001; WANG et al., 2007; AMBROSI et al., 2008).

Desta forma, a microalga *Spirulina platensis* tem sido comercializada em vários países e seus componentes usados como nutrientes no consumo animal e humano, como corante natural em alimentos, cosméticos e em produtos farmacêuticos (CHEN et al.,

1996). Vários estudos mostram que os extratos de *Spirulina* podem prevenir ou inibir câncer nos humanos e animais e são poderosos tônicos para o sistema imunológico, o que fortalece o mecanismo celular de defesa (QURESHI et al., 1996; PANG et al., 1998; PIÑERO ESTRADA et al., 2001).

A maior atenção que vem sendo dada à *Spirulina spp.*, deve-se ao potencial de coloração dos seus pigmentos de interesse para as indústrias farmacêuticas, cosmética e de alimentos. Segundo Danesi et al. (2002), há uma tendência na substituição de corantes artificiais por produtos naturais, o que sugere a possibilidade de maior exploração de *Spirulina spp.*, pois essa microalga é uma das principais fontes de clorofila na natureza.

A biossíntese de carotenoides através de microalgas pode variar de acordo com as condições do meio de cultivo, fatores ambientais e luminosidade. Certas espécies de microalgas quando cultivadas em meios adequados podem duplicar a sua biomassa diariamente, com produtividades de 30 a 50 g/m²/dia em massa seca (PIRES et al., 2008; VALDUGA et al., 2009; DUARTE, 2010).

O carotenoide tipicamente presente em microalgas é o β-caroteno. Geralmente é encontrado numa fração inferior a 1% da massa seca, mas pode ser acumulado em até aproximadamente 10% em espécies halotolerantes, como por exemplo, as do gênero *Dunaliella* (DERNER et al., 2006; GUEDES et al., 2011; AZEREDO, 2012). De acordo com Christaki et al. (2013), as cepas da microalga *Spirulina spp.* também podem ser utilizadas para a produção comercial de carotenoides, com níveis desses pigmentos em torno de 1-2g Kg⁻¹ de matéria seca.

Segundo Gireesh et al. (2001) a *Spirulina platensis* pode alcançar uma quantidade de β-caroteno de aproximadamente 0,5 mg/g de massa seca, o que a torna viável como fonte deste pigmento. Dessa forma, além de apresentar elevado conteúdo proteico, ser uma das fontes mais ricas de pró-vitamina A (β-caroteno) e sua associação com propriedades terapêuticas (AMBROSI et al., 2008), esta microalga pode ser considerada mais uma fonte alternativa para a produção em escala comercial do pigmento β-caroteno (SILVA, 2008).

Através de dados obtidos em prospecção tecnológica de patentes, verifica-se que as algas (54%) são os principais microrganismos utilizados em processos tecnológicos relacionados a obtenção de carotenoides e que o β-caroteno (32%) foi o principal

pigmento de interesse nesses processos (MENDONÇA et al., 2012; MENDONÇA et al., 2013).

A biodisponibilidade de muitos carotenoides, especialmente quando em sua forma cristalina, é muito baixa, e a sua estabilidade oxidativa diminui durante o processamento devido à mistura de produtos químicos e exposição a fatores adversos como o calor (HENTSCHEL et al., 2008; HELGASON et al., 2009).

Desta forma, para minimizar os problemas de biodisponibilidade apresentados, melhorar a estabilidade destes compostos, além de tornar tais substâncias dispersíveis em água, de forma que possam ser incorporados mais facilmente em alimentos e apresentar melhor funcionalidade, a tecnologia de nanoencapsulamento surge como uma alternativa de proteção a substâncias bioativas (MATIOLI e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; CHIU et al., 2007; HENTSCHEL et al., 2008). Vários estudos avaliaram a estabilidade de carotenoides nanoencapsulados e de uma maneira geral foi verificado um aumento da estabilidade destes compostos quando incorporados em nanopartículas (TAN e NAKAJIMA, 2005; YUAN et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

3. Nanotecnologia: Aspectos gerais

Em 1959, Richard Feynman propôs o conceito de nanoestruturas e em 1974 Nario Taniguchi criou o termo nanotecnologia para se referir à manipulação de partículas em escala submicrométrica. O termo "nano" refere-se a uma magnitude de 10^{-9} m (QUINTANILLA-CARVAJAL et al., 2010). A *British Standards Institution*, empresa multinacional que atua na produção de normas e na prestação de serviços relativas à normalização, definiu a palavra nanotecnologia como o desenvolvimento, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas na forma e tamanho de escala “nano” (BAWA et al., 2005).

A nanotecnologia é percebida como uma das tecnologias-chave do século atual e tem um grande potencial para gerar novos produtos com inúmeros benefícios. Esta tecnologia está ligada à manipulação da matéria em escala nanométrica com o objetivo de criar novos materiais e desenvolver novos produtos e processos. Multidisciplinar por natureza tem o potencial de revolucionar amplamente vários campos tecnológicos e científicos. Assim, tem sido aplicada em diversas áreas tais como na liberação controlada de fármacos, na agricultura, e está cada vez mais sendo utilizada nas áreas de

produção de alimentos, de embalagens, dentre outras (FREITAS e MARCHETTI, 2005; KAWASAKI e PLAYER, 2005; SIEGRIST et al., 2007; EZHILARASI et al., 2013).

A aplicação desta tecnologia na indústria de alimentos pode permitir a modificação de muitas características nos alimentos, tais como a textura, sabor, outros atributos sensoriais, além da intensidade da coloração, processabilidade e a estabilidade durante a vida de prateleira, que conduz ao surgimento de novos produtos. A nanotecnologia também pode melhorar a solubilidade em água, a estabilidade térmica e a biodisponibilidade oral de compostos funcionais (MCCLEMENTS et al., 2009; HUANG et al., 2010).

Com o advento da nanotecnologia, houve o desenvolvimento de técnicas envolvendo processamento, fabricação e aplicação de estruturas com forma e tamanhos controlados. Entre estas inovações tecnológicas têm-se o nanoencapsulamento que é um processo pelo qual as partículas de ingredientes ativos são incorporadas a sistemas coloidais, dispersões ou vesículas, todos em escala nanométrica. O material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (AZEREDO, 2005; PETERS et al., 2011).

A tecnologia de encapsulamento já vem sendo utilizada pela indústria, principalmente a alimentícia, por mais de 60 anos. A escolha do melhor processo de encapsulamento em condições adequadas pode fornecer uma liberação controlada de compostos ativos durante o processamento ou armazenamento (SANTOS e MEIRELES, 2010). Entre as substâncias de interesse para o encapsulamento estão os lipídios, proteínas, vitaminas e principalmente os pigmentos naturais, dentre eles o β -caroteno, devido ao seu poder corante e por ser precursor da vitamina A, como também por ser de valor comercial e de aplicabilidade na indústria de alimentos (PETERS et al., 2011).

Através do nanoencapsulamento é possível que ocorra a proteção, isolamento, retardo de alterações que poderiam resultar na perda de aroma, cor e valor nutricional do produto. Além disso, através desta técnica há a possibilidade de separar reagentes reativos e incompatíveis e controlar a liberação de ingredientes encapsulados. Devido a tais características, a obtenção de compostos nanoencapsulados tem sido foco de pesquisas científicas e de investimentos financeiros pela indústria de alimentos, no entanto ainda são limitados os estudos e poucos artigos abordam esta tecnologia (MOREIRA, 2007; EZHILARASI et al., 2013).

Siegrist et al. (2007) avaliaram a percepção e aceitação, por parte dos consumidores, do uso da nanotecnologia em alimentos e embalagens para alimentos. Os resultados sugerem que a nanotecnologia aplicada em embalagens é aceita de uma forma mais positiva do que a mesma aplicada em alimentos para o consumo humano. Além disso, este mesmo estudo concluiu que a confiança estabelecida entre o consumidor e a indústria de alimentos é um fator importante com influência direta na aceitação de novos produtos.

3.1. Nanopartículas

As nanopartículas são definidas como sistemas sólidos à base de polímeros (sintéticos, semi-sintéticos ou naturais), ou de outros materiais, de natureza biodegradável ou não, com dimensão na ordem dos nanômetros, as quais carregam a substância ativa. Nos últimos anos, o uso de nanopartículas vem crescendo consideravelmente, devido a características como aumento da solubilidade de compostos ativos, maior estabilidade na suspensão e o aumento da absorção intracelular devido ao seu tamanho reduzido. Além disso, estas nanoestruturas apresentam ótima estabilidade cinética e morfologia rígida (SCHAFFAZICK et al., 2003; ANTON, 2008).

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais matriciais ou reservatórios, formados por diferentes materiais e podem apresentar uma variação de tamanho de 5 a 1000 nm (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). As nanopartículas poliméricas apresentam propriedades físico-químicas que as tornam importantes sistemas de liberação, como tamanho reduzido, grande área superficial e diversas características de carga superficial. (SCHAFFAZICK et al., 2003; MAINARDES et al., 2009).

O campo de aplicação das nanopartículas poliméricas está em rápida expansão e desempenha um papel importante em uma ampla gama de áreas que vão desde aplicação em eletrônicos, materiais condutores, sensores, medicina, biotecnologia, controle da poluição e tecnologia ambiental, indústria de alimentos, dentre outros (NAGAVARMA et al., 2012).

As nanopartículas poliméricas incluem as nanoesferas e as nanocápsulas, que diferem por suas organizações estruturais e composições. As nanocápsulas são formadas por uma camada polimérica disposta ao redor de um núcleo geralmente oleoso, enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais constituídos por polímero (PUISIEUX

et al., 1994; SCHAFFAZICK et al., 2003; SCHAFFAZICK, 2006). A Figura 3 representa as diferenças entre nanocápsulas e nanoesferas.

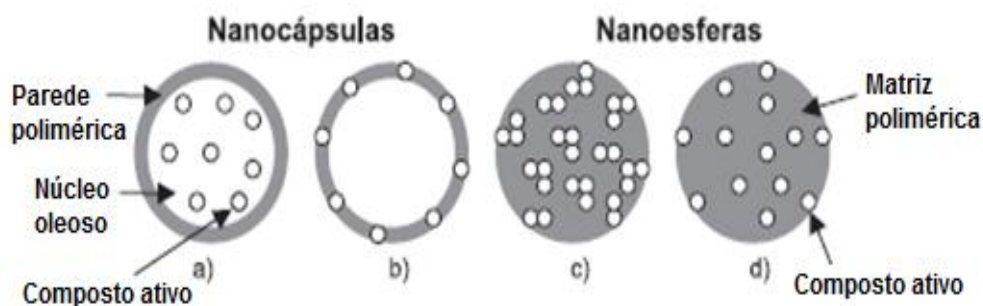


Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) composto ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) composto ativo adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) composto ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) composto ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: Schaffazick et al. (2003), Adaptado.

Sistemas nanoparticulados são em geral constituídos por matrizes poliméricas, no entanto, também podem ser obtidos com outros materiais, tais como as proteínas, ceras e lipídeos. Vários polímeros vêm sendo utilizados no preparo de nanopartículas, dentre os quais existem os polímeros naturais ou sintéticos e também podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos, biodegradáveis ou não biodegradáveis (Quadro 1) (ANDREO-FILHO e OLIVEIRA, 1999; LEGRAND et al, 2007; MOINARD-CHÉCOLT et al., 2008).

Quadro 1. Polímeros mais utilizados no preparo de nanopartículas.

Naturais	Sintéticos
Albumina	Poli (cianoacrilato de alquila) (PACA)
Colágeno	Poliésteres: Poli (ácido láctico) (PLA) Poli (ácido glicólico) (PLG) Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)
Gelatina	Poli (ε-caprolactona) (PCL)
Polissacarídeos: Celulose Quitosana Alginatos	-

Fonte: Andreo-Filho e Oliveira (1999); Legrand et al. (2007); Moinard-Chécolt et al. (2008).

O mecanismo de obtenção das nanopartículas representa um fator crucial que influencia diretamente nas suas características físico-químicas como tamanho e morfologia, o que em compensação determina o comportamento destas partículas em relação à eficiência de encapsulação, perfil de liberação do material ativo e propriedades cinéticas (ROSCA et al., 2004).

Se um composto é insolúvel em um líquido utilizado na formulação de um produto e a sua atividade é significativamente limitada, sua aplicação será reduzida; assim o uso de nanopartículas com o intuito de formar dispersões de compostos que seriam insolúveis pode ser aplicado para que estes se comportem como moléculas dispersas em meio aquoso, o que pode ampliar o leque de aplicações para gerar produtos de grande potencial, competitivos e inovadores (PETERS et al., 2011).

As matérias-primas utilizadas na produção das nanopartículas podem interferir nas características das mesmas, como diâmetro de partícula, morfologia, potencial zeta, eficiência de encapsulação e/ou associação e liberação da substância ativa. Logo, a escolha do polímero e do método de preparação das nanopartículas deve ser criteriosa, já que nanopartículas compostas de polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e com diâmetro e distribuição granulométrica controlada são mais interessantes para o direcionamento de substâncias ativas (LEGRAND et al., 2007; SANTOS, 2010; SUNDAR et al., 2010; DASHA et al., 2011).

Há diversos métodos de obtenção de nanopartículas poliméricas que são basicamente classificados em duas categorias, a polimerização *in situ* de monômeros dispersos e a precipitação de polímeros pré-formados (COUVREUR et al., 1995). Entre

os métodos de polímeros pré-formados descritos na literatura, os principais são: emulsificação /evaporação de solvente, emulsificação/difusão de solvente, nanoprecipitação, *salting-out* (SOUTO et al., 2012).

Comumente, nas técnicas de polímeros pré-formados, durante a preparação uma solução orgânica constitui a fase interna das nanopartículas e a fase aquosa externa apresenta agentes estabilizadores da dispersão. Outra similaridade entre eles é a baixa taxa de encapsulação de substâncias hidrossolúveis, sendo estes sistemas preferencialmente empregados para substâncias lipofílicas (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; SOPPIMATH et al., 2001).

Para garantir o sucesso do método é de extrema importância à escolha do sistema polímero/solvente/não-solvente, já que este governa a formação das nanopartículas e conseqüentemente a eficiência de encapsulamento. O solvente e o não-solvente do polímero devem ser mutuamente miscíveis (FESSI et al., 1989).

De uma maneira geral, a escolha de um método de preparação é determinada pelas características de solubilidade do princípio ativo. Em comparação com os métodos de produção de nanopartículas poliméricas a partir de polimerização de monômeros, a preparação utilizando polímeros pré-formados é mais facilmente controlável e de maior rendimento (SOUTO et al., 2012). Dentre as técnicas deste grupo a que merece destaque é a de nanoprecipitação, conforme vantagens e desvantagens expostas no Quadro 2.

Quadro 2. Vantagens e desvantagens do uso da técnica de nanoprecipitação.

Vantagens	Desvantagens
Simple e rápida execução	Mais efetivo para compostos lipofílicos
Aplicável a muitos polímeros	Solventes devem ser hidrossolúveis
Facilmente reprodutível	Necessária uma quantidade significativa de solvente
Baixo consumo de energia	Fase solvente e o não-solvente deverão ser miscíveis
Alta eficiência de encapsulação	-
-	-

Fonte: Fessi et al. (1989); Legrand et al. (1999); Ribeiro et al. (2008).

3.1.1. Nanoprecipitação

O método baseado na precipitação de polímeros pré-formados que mais se destaca é o de nanoprecipitação proposto por Fessi et al. (1988), que é considerado um método simples e tem a vantagem de não formar monômeros evitando a presença de resíduos na formulação.

Esta técnica, também chamada de deposição interfacial do polímero pré-formado ou método de deslocamento de solvente, consiste na presença tanto de uma fase composta por solvente como outra sem a presença do mesmo. A fase de solvente consiste, em sua maioria, de uma mistura de solventes e pode ser chamada de fase orgânica. A esta mistura associa-se uma substância formadora de filme, tais como um polímero (sintético, semi-sintético ou de ocorrência natural), além de uma substância ativa, óleo, entre outras substâncias. Por outro lado, a fase não solvente em geral é constituída de água e então chamada de fase não orgânica. Desta forma, no método da nanoprecipitação, nanopartículas são obtidas como uma suspensão coloidal, formada quando a fase orgânica é adicionada lentamente e com agitação moderada para a fase aquosa (Figura 4) (MORA-HUERTAS et al., 2010; FESSI et al., 1989).

Segundo Galindo-Rodriguez et al. (2004) o mecanismo de formação das nanopartículas por nanoprecipitação, pode ser descrito através das interações entre água-solvente, água-polímero e solvente-polímero. Assim, as interações água/solvente e o movimento de difusão do solvente exercem uma importante função para explicar a variação de tamanho de partícula durante a preparação.

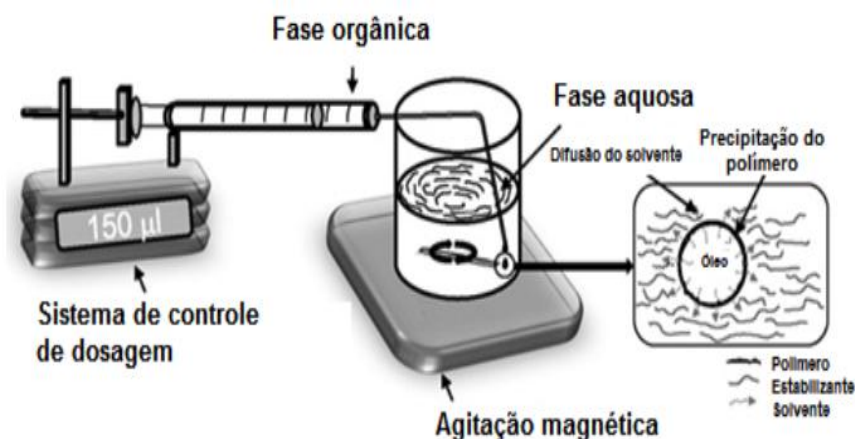


Figura 4. Ilustração esquemática das fases do processo de formação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. Fonte: Mora-Huertas et al. (2010), Adaptado.

Embora ainda exista certa discordância em relação ao mecanismo de formação das nanopartículas com esta técnica, a investigação sobre a precipitação do polímero (LINCE et al., 2008) e a difusão de solvente (QUINTANAR et al., 1998) provaram ser úteis a este respeito.

Com base na teoria de *Sugimoto* sobre a precipitação do polímero (SUGIMOTO, 1987), Lince et al. (2008) indicaram que o processo de formação de partículas pelo método de nanoprecipitação compreende três fases: nucleação, crescimento e agregação. A proporção de cada passo determina o tamanho de partícula e a força motriz destes fenômenos é a supersaturação, a qual é definida como a proporção de concentração de polímero sobre a solubilidade do polímero na mistura de solventes. A separação entre a nucleação e as fases de crescimento é o fator chave para a formação de partículas uniformes (MORA-HUERTAS et al., 2010).

Outra característica imprescindível para o desenvolvimento do método de deslocamento de solvente é que o solvente orgânico precisa ser miscível em água e facilmente removido por evaporação, assim os solventes etanol, acetona ou cloreto de metileno, podem ser utilizados como solventes do polímero. Dentre estes solventes, a acetona é o mais empregado, devido à facilidade de remoção deste solvente da solução (RAO e GECKELER, 2011). A utilização de um tensoativo incluído na fase orgânica como, por exemplo, um fosfolípido, pode ser adequado para prevenir a coalescência das gotículas (SOUTO et al., 2012). Além disso, este método permite obter nanoesferas ou nanocápsulas. (MARTINS et al., 2010), conforme ilustrado na Figura 3.

Considerava-se complexa a determinação das características físico-químicas das suspensões de nanopartículas, devido ao tamanho reduzido das mesmas e à diversidade de matérias-primas que as compõem, porém já existem métodos fáceis de executar e com respostas imediatas. Com o intuito de aplicação das nanopartículas poliméricas, torna-se importante a análise de algumas características como tamanho e distribuição de partículas, potencial zeta, cinética de liberação do composto ativo, eficiência de encapsulação, além da avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Os polímeros comumente empregados no método de nanoprecipitação e que vem apresentando resultados satisfatórios são os poliésteres como o poli (ácido láctico) (PLA), poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), poli (lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) e poli (ϵ -caprolactona) (PCL), os quais apresentam boa biodegradabilidade e ausência de toxicidade (QUINTAR-GUERRERO, 1998; SAHOO et al., 2003;

LETFORD e BURT, 2007; ANTON, 2008). Poucos estudos referem o uso do Polihidroxibutirato (PHB) como polímero no preparo de nanopartículas, porém vem crescendo o interesse por este composto biodegradável (DEEPAK et al., 2009; PANDIAN et al., 2009; SHAKERI et al., 2014).

Para o preparo das nanopartículas é importante que os materiais poliméricos sejam biocompatíveis e biodegradáveis. Estes podem ser de origem natural, tais como albumina, gelatina, colágeno e quitosana, assim como sintéticos como os polilactídeos, poliglicolídeos e seus copolímeros, os poliácridatos e a policaprolactona. Os polímeros naturais possuem algumas desvantagens, tais como o grau variável de pureza, alto custo de obtenção (JAIN, 2000) e risco potencial de infecções e imunogenicidade (LEE et al., 2007). Desta forma, uma grande variedade de polímeros sintéticos tem sido desenvolvidos e amplamente utilizados, tais como os poliésteres (JAIN et al., 1998; MUNDARGI et al., 2008).

Dentre os poliésteres, destacam-se os de cadeia aberta, formados por uma sucessão de unidades monoméricas de poli (ácido láctico) (PLA) ou de dímeros de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (Figura 5). Estes polímeros são aprovados pelo FDA para uso humano (JAIN, 2000; THOMAS e BURG, 2004), e após sua administração sofrem hidrólise formando ácido láctico e ácido glicólico, que são removidos do organismo pelo ciclo do ácido cítrico, processo que ocorre lentamente e que não afeta as funções fisiológicas das células saudáveis (ATHANASIOU et al., 1996).

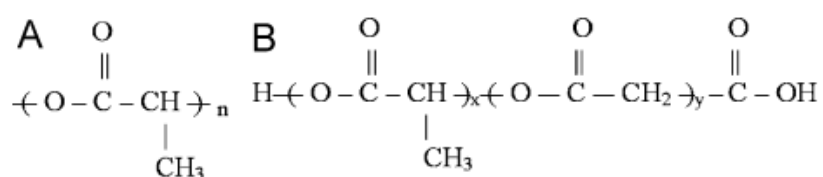


Figura 5. Estrutura química do Poli (ácido láctico) (A) e do poli (lactídeo-co-glicolídeo) (B).
Fonte: Ribeiro et al. (2008)

Dentre os poliésteres o PLA ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) merece destaque já que é um dos polímeros mais estudados para o uso em matrizes para sistemas de liberação controlada. Este composto é um éster alifático, termoplástico e relativamente hidrofóbico devido ao seu grupo metil e é amplamente aplicado em nanopartículas, principalmente, por possuírem cadeias carbônicas hidrolisáveis (MOTTA e DUEK, 2006; SEVERINO et al., 2011). Tem como nome genérico e químico (CAS), PLA, poli (ácido láctico) e ácido propiônico, 2-hidroxi homopolímero, respectivamente.

O PLGA é um copolímero sintético, biodegradável, biocompatível, formado por dois monômeros, o ácido láctico (PLA) e do ácido glicólico (PGA) em diferentes proporções (Figura 6). Os dímeros cíclicos destes ácidos são ligados aleatoriamente por meio de ligações do tipo éster, o que resulta em um poliéster de cadeia alifática (BRANNON-PEPPAS, 1997; REIS et al., 2006). Durante a síntese deste polímero, pode-se definir a sua cinética de degradação do sistema e de liberação do composto ativo através da massa molecular, do grau de cristalinidade e da relação entre a quantidade de PLA e PGA utilizada para a síntese do PLGA (BRANNON-PEPPAS, 1997; PILLAI e PANCHGNULA, 2001).

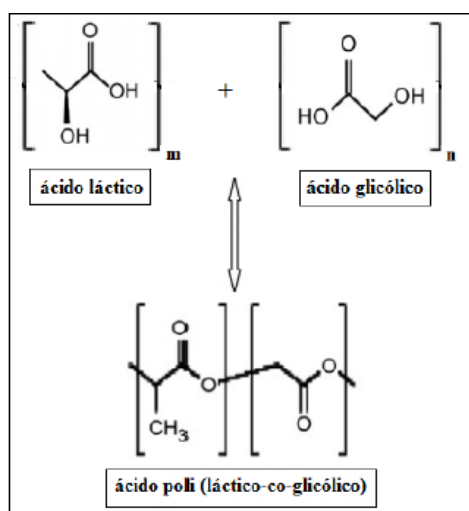


Figura 6. Representação da obtenção do PLGA. m = número de unidades de ácido láctico e n = número de unidades de ácido glicólico. Fonte: Kumari et al. (2010), Adaptado.

Na década de 90 iniciou-se no Brasil o desenvolvimento de tecnologias para produção de plásticos biodegradáveis com o emprego de matéria prima obtida a partir de derivados da cana de açúcar. Essa tecnologia propiciou o início da produção de polímeros da família dos Polihidroxicanoatos (PHAs), que podem ser produzidos por bactérias em biorreatores a partir de açúcares (NONATO, 2001). Os polímeros biodegradáveis são materiais que degradam em presença de microrganismos, tais como fungos, bactérias e algas de ocorrência natural, gerando CO₂ e CH₄, componentes celulares e outros produtos (ROSA et al., 2002).

Sendo assim, os Polihidroxicanoatos (PHAs) são um grupo de biopolímeros produzidos por um número de bactérias que acumulam naturalmente grânulos intracelulares, em resposta ao *stress* ambiental e desequilíbrio de nutrientes. Entre os PHAs, o poli-β-hidroxibutirato (PHB) é um polímero de cadeia curta, sintetizado por

bactérias, e é o mais estudado dentre os polímeros desta classe (VERLINDEN et al., 2007).

Segundo Silva e Gomes (2007), o PHB é um homopolímero composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono (Figura 7). Um aspecto relevante na sua produção é o fato de que suas propriedades e aplicações dependem diretamente da massa molar e distribuição monomérica. De acordo com outros estudos, alguns fatores, como o meio de produção, podem influenciar a formação dessa massa molar.

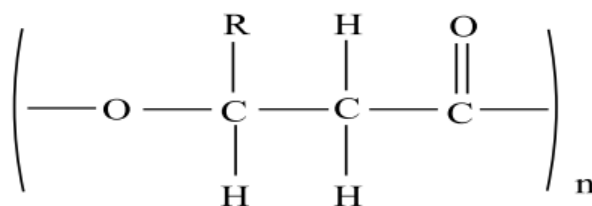


Figura 7. Estrutura química do poli-β-hidroxi-butirato (PHB)
Fonte: Rodrigues et al. (2005).

Atualmente, o PHB é produzido por diversas bactérias, entre elas a mais utilizada é a *Ralstonia eutropha* (H16) que foi clonada e caracterizada com melhorias para a produção do PHB. Alguns estudos descrevem outras bactérias com a mesma função de armazenar o PHB, como *Caulobacter crescentus* (COUTINHO et al., 2004) e *Cupriavidus necator* (CAMPOS et al., 2014). Segundo Telles et al. (2011), a seleção do microrganismo depende principalmente da capacidade que tem para acumular polihidroxi-alcanoatos, além da disponibilidade do mercado e das condições de produção da bactéria em grande escala.

3.1.2. Estudos de obtenção de nanopartículas contendo carotenoides

Alguns trabalhos sobre o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas podem ser encontrados na literatura científica. São estudos que em sua maioria trazem o efeito da natureza do polímero empregado, assim como os resultados referentes às características físico-químicas das nanopartículas, no que diz respeito ao tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, dentre outros.

De acordo com o Quadro 3, foi possível observar que o composto ativo que se destacou como material a ser encapsulado foi o β-caroteno (TAN e NAKAJIMA et al.,

2005; CHU et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; YUAN et al., 2008; HELGASON et al., 2009; CAO-HOANG et al., 2011; SILVA et al., 2011; KIM et al., 2013; YI et al., 2014), seguido da curcumina (ANAND et al., 2010; BHAWANA et al., 2011; GOU et al., 2011). Há também estudos que reportaram o nanoencapsulamento de bixina (LOBATO et al., 2013; LOBATO et al., 2015), vitamina E (KHAYATA et al., 2012), licopeno (SANTOS et al., 2015) e astaxantina (TACHAPRUTINUN et al., 2009).

Os polímeros e/ou materiais encapsulantes variaram de acordo com a técnica empregada, sendo que os poliésteres PLA, PLGA e o PCL se destacaram como sendo os mais utilizados no preparo de nanopartículas. As técnicas mais utilizadas para a obtenção das nanoemulsões e/ou nanopartículas foram a nanoprecipitação, homogeneização sobre alta pressão – emulsão óleo em água (sem a utilização de polímeros ou material encapsulante) e emulsificação/evaporação de solvente. As principais análises realizadas nestes estudos envolviam a análise do tamanho de partícula, potencial zeta, eficiência do encapsulamento e avaliação do formato das nanopartículas através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Uma importante característica a ser analisada nos estudos que envolvem partículas em escala nano, visando a sua aplicabilidade, é o diâmetro médio das mesmas. Foram observados tamanhos bastante variados de partículas, porém de uma maneira geral o tamanho médio das partículas nos estudos envolvendo o nanoencapsulamento de carotenoides (Quadro 3) variou de 17 a 800 nm.

Quadro 3. Principais estudos envolvendo a formação de nanopartículas contendo carotenoides.

Material encapsulado	Polímero/encapsulante	Técnica empregada	Principais análises realizadas	Principais resultados	Referência
β -caroteno (natural e sintético)	PLA	Encapsulamento em micelas contendo Tween 80 e PLA, ambos por Nanoprecipitação	Análise e caracterização da estrutura fina dos espectros UV-Vis; Tamanho de partícula e potencial zeta; Percentual de recuperação do β -caroteno; Estudo de degradação.	Tamanho de partícula: sintético + PLA < sintético + Tween 80 e Natural + PLA (\approx 150 nm). Natural + Tween 80 gerou partículas com diâmetro muito maiores (800 nm). β -caroteno sintético foi melhor incorporado em micelas contendo Tween 80, comparado ao sintético + PLA. Potencial zeta entre -31 e -23 para sintético e +4,8 e +9,1 para natural.	CAO-HOANG et al. (2011)
Bixina	PCL	Deposição interfacial de polímero pré-formado	Viscosidade, cor e pH da nanoemulsão; Eficiência do encapsulamento; Tamanho de partícula e potencial zeta.	Tamanho de partícula: 195 nm (média). Não houve diferença estatística no tamanho das partículas após 119 dias de armazenamento. Alta eficiência de encapsulamento (100%).	LOBATO et al. (2013)
β -caroteno	Dextrina	Formação de um complexo entre β -caroteno e dextrina	Tamanho de partícula (efeito da ultrasonicação); MET; DSC; XRD; Estabilidade das nanopartículas à oxidação (FeCl ₃); Liberação enzimática do β -caroteno.	Tamanho de partícula: Variou a depender da sonicação: 1) Característica bimodal (micro: 7,4 μ m; nano: 140 – 190 nm); 2) Ultrasonicação suave por 2 min (reduziu micro de 57,7 para 8,6%, nano: 100 nm); 3) Ultrasonicação por 3 min (característica unimodal: 15,6 – 36,1 nm). Dispersão aquosa contendo β -caroteno permaneceu homogênea durante a estocagem em temperatura ambiente por	KIM et al. (2013)

Material encapsulado	Polímero/encapsulante	Técnica empregada	Principais análises realizadas	Principais resultados	Referência
				mais de 3 meses. Melhora da estabilidade contra a oxidação	
β -caroteno	-	Homogeneização sobre alta pressão - Emulsão óleo em água	Tamanho de partícula; Avaliação da estabilidade da emulsão; MET; Determinação da concentração de β -caroteno.	Tamanho de partícula: 40 – 400 nm. O tamanho da partícula e a distribuição na emulsão foram influenciados pelo tipo e pela quantidade do emulsificante.	YUAN et al. (2008)
β -caroteno	CS, WPI, SPI	Emulsificação /evaporação de solvente	Tamanho de partícula e potencial zeta; Medida da tensão superficial; Cor; MET; Estudo da estabilidade oxidativa e da citotoxicidade celular; Extração e quantificação do β -caroteno nas nanopartículas.	Tamanho de partícula: SC (75 – 162,4 nm); WPI (88,5 – 190,9 nm); SPI (371,8 – 493,4 nm). A eficiência do encapsulamento foi de 99,1%, 98,8%, and 98,7%, respectivamente, para SC, WPI e SPI. A estabilidade oxidativa das nanopartículas diminuiu na seguinte ordem: SC > WPI > SPI	YI et al. (2014)
Vitamina E	PCL	Nanoprecipitação (escala laboratorial e piloto)	Tamanho de partícula, potencial zeta e PDI; Eficiência do encapsulamento; MET.	Tamanho de partícula: 165 – 172 nm (houve um aumento conforme ocorria o aumento do conteúdo de Vitamina E). Eficiência de encapsulamento de 98% para escala laboratorial e 97% para escala piloto. Potencial zeta diminuiu com o aumento do material ativo.	KHAYATA et al. (2012)
β -caroteno	-	Homogeneização sobre alta pressão - Emulsão óleo em água	Tamanho de partícula; DSC.	Tamanho de partícula: 150,7 – 173,4 nm (sólida); 95,9 – 140,7 nm (líquida).	HELGASON et al. (2009)

Material encapsulado	Polímero/encapsulante	Técnica empregada	Principais análises realizadas	Principais resultados	Referência
β -caroteno	-	Emulsificação /evaporação de solvente – Emulsão óleo em água	Tamanho de partícula; Concentração de β -caroteno; Mudança da cor durante a estocagem; MET; Estabilidade do β -caroteno durante a estocagem.	Tamanho de partícula: 9 – 280 nm. Boa estabilidade após 21 dias de estocagem. A retenção do β -caroteno dentro das micelas e a cor foram afetadas pela estocagem.	SILVA et al. (2011)
Curcumina	-	Moagem úmida	Tamanho de partícula; MET; Estudo da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima.	Tamanho de partícula: 2 – 40 nm. Aumento da solubilidade da curcumina em água, boa estabilidade química e física, maior atividade antimicrobiana, maior eficácia terapêutica.	BHAWANA et al. (2011)
β -caroteno	-	Emulsificação /evaporação de solvente – Emulsão óleo em água	Tamanho de partícula; MET; Determinação do conteúdo de β -caroteno nas nanopartículas.	Tamanho de partícula: 60 – 140 nm Aumento da estabilidade física durante o armazenamento e o tamanho de partícula influencia na degradação do β -caroteno.	TAN E NAKAJIMA et al. (2005)
β -caroteno	PLA e PLGA	Nanoprecipitação	Tamanho de partícula; Determinação da concentração de β -caroteno; MET; Estudo da estabilidade.	Tamanho de partícula: 74 – 77 nm Formação de nanopartículas de β -caroteno com boa dispersão em água, estabilidade de pelo menos 5 meses armazenadas a 4 °C. O diâmetro pequeno das nanopartículas foi atribuído à alta difusão da acetona em água.	RIBEIRO et al. (2008)
β -caroteno	CS, WPC, WPI, WPH.	Nanoprecipitação	Efeito do processamento térmico, pH e sais (Na	Tamanho de partícula: 17 – 127 nm (dependendo da proteína utilizada como encapsulante).	CHU et al. (2008)

Material encapsulado	Polímero/encapsulante	Técnica empregada	Principais análises realizadas	Principais resultados	Referência
			e Ca) nas nanodispersões; Tamanho de partícula e potencial Zeta.	Nanopartículas com CS apresentaram menor diâmetro. O potencial zeta das partículas preparadas com CS teve maior carga de superfície (-31mV) em comparação com as preparadas com proteínas de soro de leite (-17 a -15 mV), sugerindo que a nanodispersão com CS era mais estável contra agregação durante armazenamento.	
Curcumina	PLGA	Nanoprecipitação	Eficiência do encapsulamento; MET e MEV; Tamanho de partícula; Efeito da absorção celular de curcumina.	Tamanho de partícula: 81 nm Eficiência de encapsulamento de 97,5%. Absorção celular muito mais rápida e eficiente quando incorporada em nanopartículas. Aumento da biodisponibilidade in vitro e in vivo da curcumina.	ANAND et al. (2010)
Licopeno	PCL	Deposição interfacial de polímero pré-formado	Tamanho de partícula e potencial zeta; MET; cor, pH e viscosidade das nanoemulsões; Determinação do conteúdo de licopeno nas nanopartículas; Eficiência do encapsulamento.	Tamanho de partícula: 193 nm (média). Eficiência de encapsulamento de 95,12%; potencial zeta médio de -11,5. A formação das nanopartículas melhorou a estabilidade e solubilidade do licopeno.	SANTOS et al. (2015)
Curcumina	MPEG-PCL	Nanoprecipitação	Tamanho de partícula e PDI; MET; XRD; DSC; Teste de estabilidade; Eficiência do encapsulamento;	Tamanho de partícula: 27,3 nm (média). Eficiência do encapsulamento de 99,16%.	GOU et al. (2011)

Material encapsulado	Polímero/encapsulante	Técnica empregada	Principais análises realizadas	Principais resultados	Referência
			Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , citotoxicidade.		
Astaxantina	EC, PPLC e PB4	Nanoprecipitação	MET e MEV; Eficiência do encapsulamento; Tamanho de partícula e potencial zeta; Estudo da estabilidade, liberação controlada.	Tamanho de partícula: 300 – 320 nm Houve formação de nanopartículas de Astaxantina + EC, porém com baixa eficiência de encapsulação, assim como com o polímero PB4. Houve uma boa eficiência (98%) com o PCPLC. Nanopartículas liofilizadas com boa dispersão em água e alta estabilidade térmica.	TACHAPRUTINUN et al. (2009)
Bixina	PCL	Deposição interfacial de polímero pré-formado - Nanopartícula lipídica sólida	Tamanho de partícula, viscosidade e ph das nanoemulsões; Eficiência do encapsulamento; Avaliação da estabilidade durante fotossensibilização e aquecimento.	Tamanho de partícula: 195 nm (média). Eficiência de encapsulamento: cerca de 100%. Encapsulamento aumentou a estabilidade da bixina, tanto com a fotossensibilização como com o aquecimento.	LOBATO et al. (2015)

PLA= poli (ácido láctico); PLGA= poli (ácido láctico-co-ácido glicólico); PCL= poli (ϵ -caprolactona); MET=Microscopia Eletrônica de Transmissão; MEV=Microscopia Eletrônica de Varredura; DSC= Calorimetria Exploratória Diferencial; XRD=Difração de raios X; CS=Caseinato de sódio; PdI=Índice de polispersibilidade; WPI=proteína do soro do leite isolado; SPI=proteína de soja isolada; WPC=proteína do soro do leite concentrado; WPH=hidrolisado de proteína do soro do leite isolado; EC=Etilcelulose; PPLC= poli (óxido de etileno)-4-metoxi cinamoilftaloil- quitosano; PB4= poli (álcool vinílico-co-vinil-4-metoxicinamato).

Referências

- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 115-123, 2008.
- ANAND, P.; NAIR, H. B.; SUNG, B.; KUNNUMAKKARA, A. B.; YADAVA, V. R.; TEKMAL, R. R.; AGGARWAL, B. B. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 330-338, 2010.
- ANDREO-FILHO N.; OLIVEIRA A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, Brasília, v.9, p. 18-21, 1999.
- ANTON, N. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.
- AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**, 2012. 171 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético), Programa de Pós-Graduação em Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, p. 89-97, 2005.
- ATHANASIOU, K.A., NIEDERAUER, G.G., AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 17, p. 93-102, 1996.
- BAWA, R.; BAWA, T. S. R.; MAEBIUS, S. B.; FLYNN, T.W. C. Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 1, p. 150-158, 2005.
- BHAWANA; BASNIWAL, R. K.; BUTTAR, H. S.; JAIN, V. K.; JAIN, N. Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2056-2061, 2011.
- BRANNON-PEPPAS, L. Polymers in Controlled Drug Delivery. **Medical Plastic and Biomaterials**, v. 4, p. 34-45, 1997.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed., São Paulo: Varela, p. 103-118, 2001.
- CADENAS E. & PACKER L. **Handbook of Antioxidants**, 2nd edition. Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
- CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by

Cupriavidus necator using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial Crops and products**, v. 52, p. 338-346, 2014.

CAO-HOANG, L.; FOUGÉRE, R.; WACHÉ, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into poly lactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 124, p. 42-49, 2011.

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

CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 603-8, 1996.

CHIU, Y.T.; CHIU, C.P.; CHIEN, J. T.; HO, G. H.; YANG, J.; CHEN, B. H. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly(γ -glutamic acid) as carrier. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5123-5130, 2007.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENASA, I.; FLOROU-PANERIA, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 5-11, 2013.

CHU, B. S.; ICHIKAWA, S.; KANAFUSA, S.; NAKAJIMA, M. Stability of protein-stabilised β -carotene nanodispersions against heating, salts and pH. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1764-1769, 2008.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 503-526, 1985.

COUTINHO, B. C, MIRANDA, G. B, SAMPAIO, G. R. S, SANTANA, L. B. S, COUTINHO, H. D. M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). **Holos**, 2004.

COUVREUR, P., DUBERNET, C. e PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, p. 2-13, 1995.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carriers System**, v. 19, p. 99-134, 2002.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 261-269, 2002.

DASHA, M.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 981-1014, 2011.

DEEPAK, V.; PANDIAN, S. R. K.; KALISHWARALAL, K.; GURUNATHAN, S. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6644-6646, 2009.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p.1959-1967, 2006.

DILLON, J.C.; PHUC, A.P.; DUBACQ, J.P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.77, p. 32-46, 1995.

DUARTE, D. R. S. **Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ômega 3**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Animal), Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; FRESNO, A. M. V. del. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **IL Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628-647, 2013.

FERREIRA, L. S. **Utilização do dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando simultaneamente nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio**. 2011. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Fermentações, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FESSI, H.; PUISIEUX, J. P.; DEVISSAGUET, N.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1-4, 1989.

FREITAS M.N.; MARCHETTI J. M. Nimesulid PLA microspheres as a potencial sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 295, p.201-211, 2005.

FOX, R. D. **Spirulina production e potential**. Paris: Edisud, p. 232, 1996.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1428-1439, 2004.

GIREESH, T.; JAYADEEP, A.; RAJASEKHARAN, K. N.; MENON, V. P.; VAIRAMANY, M.; TANG, G.; NAIR, P. P.; SUDHAKARAN, P. R. Production of deuterated β -carotene by metabolic labeling of *Spirulina platensis*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 447-449, 2001.

- GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 276-290, 2010.
- GOU, M.; MEN, K.; SHI, H.; XIANG, M.; ZHANG, J.; SONG, J.; LONG, J.; WAN, Y.; LUO, F.; ZHAO, X.; QIAN, Z. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. **Nanoscale**, v. 3, p. 1558-1567, 2011.
- GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, p. 625-644, 2011.
- HELGASON, T.; AWAD, T.S.; KRISTBERGSSON, K.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J.; WEISS, J.; Impact of Surfactant Properties on Oxidative Stability of β - Carotene Encapsulated within Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8033-8040, 2009.
- HENRIKSON, R. **Earth food *Spirulina***. California: Ronore Enterprises. p. 180, 1989.
- HENTSCHEL, A.; GRAMDORF, S.; MULLER, R.H.; KURZ, T.; β -Carotene-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 1-6, 2008.
- HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 50-57, 2010.
- JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.
- JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W. RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester)devices: different preparative approaches. **Drug development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 703-727, 1998.
- KAWASAKI E. S.; PLAYER A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, New York, v. 1, p. 101– 109, 2005.
- KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M. F.; CHAECOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 419-427, 2012.
- KIM, J.; SEO, T.; LIM, S. Preparation of aqueous dispersion of β -carotene nanocomposites through complex formation with starch dextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 256-263, 2013.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surface B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.
- LEE, S.H.; ZHANG, Z.; FENG, S.S. Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery. **Biomaterials**, v. 28, p. 2041-2050, 2007.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. S.T.P. **Results in Pharma sciences**, v. 9, p. 411-418, 1999.

LEGRAND P.; LESIEUR S.; BOCHOT A.; GREF R.; RAATJES W.; BARRATT G.; VAUTHIER C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 344, p. 33-43, 2007.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259-269, 2007.

LINCE, F.; MARCHISIO, D.L.; BARRESI, A.A. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, p. 505-515, 2008.

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

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

MAEHLER, A. R.; COSTA, J. A.; PIRES, J. L. F.; RAMBO, L. Grain quality in two soybean cultivars in relation to the water availability and plant arrangement. **Ciência Rural**, v. 33, p.213-218. 2003.

MAINARDES, R.M., GREMIÃO, M.P.D., BRUNETTI, I.L., DA FONSECA, L.M., KHALIL, N.M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 257-267, 2009.

MARTINS, D.; FRUNGILLO, L.; ANAZZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURÁN, N. Antitumoral activity of L-ascorbic acid-polyD,L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 77-85, 2010.

MARTÍNEZ, L. C. C. **Cultivo descontínuo alimentado de *Arthrospira (Spirulina)* em fotobiorreator tubular utilizando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Fermentações, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 577-606, 2009.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L. Prospecção tecnológica da utilização da *Spirulina platensis*. **Cadernos de Prospecção Tecnológica**, v. 5, p. 44-52, 2012.

MENDONÇA, T. A.; CAZUMBÁ, Í; LIMA, A. B.; NUNES, I. L. Prospecção tecnológica da utilização de microalgas em processo de extração de carotenoides voltados para insumos na nutrição humana e animal. **Revista GEINTEC**, v. 3, p. 193-204, 2013.

MOINARD-CHÉCOT D.; CHEVALIER Y.; BRIANÇON S.; BENEY L.; FESSI H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 317, p.458-468, 2008.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods Critical comparison. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, p. 90-122, 2010.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: Características físico- químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, p. 326-328, 2006.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli (l-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, p. 26-32, 2006.

MUNDARGI, R.C.; BABU, V.R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T.M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of controlled release**, v. 125, p. 193-209, 2008.

NAGAVARMA, B. V. N.; YADAV, H. K. S.; AYAZ, A.; VASUDHA, L. S.; SHIVAKUMAR, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles - A review. **Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research**, v. 5, p. 16-23, 2012.

NONATO, R. V.; MANTELATTO, P. E.; ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 1-2, 2001.

PANDIAN, R. K. S.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; MUNIYANDI, J.; RAMESHKUMAR, N.; GURUNATHAN, S. Synthesis of PHB nanoparticles from optimized medium utilizing dairy industrial waste using *Brevibacterium casei* SRKP2: A green chemistry approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, p. 266-273, 2009.

PANG, Q. S.; GUO, B. J.; RUAN, J. H. Enhancement of Endonuclease Activity and Repair DNA Synthesis by Polysaccharide of *Spirulina platensis*. **Acta Genetica**, v. 15, p. 374-381, 1988.

PELOSI, E.; MARGHERI, M. C.; TOMASELLI, L. *Spirulina* morphology. **Caryologia**. v 35, p.157-158, 1982.

PETERS, R.; DAM, G. T.; BOUWMEESTER, H.; HELSPER, H.; ALLMAIER, G.; KAMMER, F.; RAMSCH, R.; SOLANS, C.; TOMANIOVA, M.; HAJLSLOVA, J.; WEIGEL, S. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 100-112, 2011.

PILLAI, O.; PANCHGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 447-451, 2001.

PIÑERO ESTRADA, J. E.; BERMEJO BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **IL Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B. de; SOUSA, M. B. de; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. Teores de α -caroteno e β -caroteno em macroalgas marinhas desidratadas. **Revista de Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, p. 257-262, 2008.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J-P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. **Polymeric Micro and Nanoparticles as Drug Carriers**. In: Dumitriu, S. (Ed.). *Polymeric biomaterials*, New York: Marcel Dekker, 1994.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1056-1062, 1998.

QUINTANILLA-CARVAJAL, M. X. et al. Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing. **Food Engineering Review**, v. 2, p. 39-50, 2010.

QURESHI, M.A., ALI, R.A. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 18, p. 457-463, 1996.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, p.64, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**.

Brasília: Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, p. 99, 2008.

ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. S.; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. V. **Utilização da casca de coco como substrato agrícola**. Fortaleza, EMBRAPA, p.24, 2002.

ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 271-280, 2004.

SAHOO, SK; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, p.1112-1120, 2003.

SANTOS, J. S. **Nanopartículas: Aplicações cosméticas e farmacêuticas**. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

SANTOS, D. T.; MEIRELES, A. A. Carotenoid Pigments Encapsulation: Fundamentals, Techniques and Recent Trends. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 42-50, 2010.

SANTOS, P. P.; PAESE, K.; STANISC, S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; COSTA, T. H.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. O. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1-11, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina**. 2006 (Dissertação de Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricas nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SEVERINO, P. et al. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, p. 361-368, 2011.

SHAKERI, F.; SHAKERI, S.; HOJJATOLESLAMI, M. Preparation and Characterization of Carvacrol Loaded Polyhydroxybutyrate Nanoparticles by Nanoprecipitation and Dialysis Methods. **Journal of Food Science**, v. 79, p. 697-715, 2014 .

SIEGRIST, M.; COUSIN, M.; KASTENHOLZ, H.; WIEK, A. Public acceptance of nanotechnology foods and food packaging: The influence of affect and trust. **Appetite**, v. 49, p. 459-466, 2007.

SILVA L. F.; GOMEZ, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. São Paulo: Universidade de São Paulo. **Química Nova**, v. 30, p. 1732-1743, 2007.

SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; RIBEIRO, C.; AVIDES, M. C.; QUINTAS, M. A. C.; COIMBRA, J. S. R.; CUNHA, M. G. C.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions of b-carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 130-135, 2011.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZISKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal Control. Release**. v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I. **Polímeros**, v. 22, p. 96-100, 2012.

SUGIMOTO, T. Preparation of monodispersed colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 28, p. 65-108, 1987.

SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, p. 1-13, 2010.

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

TAN, C. P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 661-671, 2005.

TELLES, M. R., SARAN, L. M, UNÊDA-TREVISOLLI, S. H. Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, p. 52-63, 2011.

THOMAS, C.B.; BURG, K.J.L. Tissue Engineering Systems. In: **Absorbable and Biodegradable Polymers** (eds. WS Shalaby, KJL Burg). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 2004.

TOMASELLI, L. **Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis***. In: VONSHAK, A., ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997, p.1-14.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TRICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.; JÚNIOR, A. F. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

VERLINDEN, R.A.J.; HILL, D.J.; KENWARD, M.A.; WILLIAMS, C.D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1437-1449, 2007.

WALTER, A. **Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo**. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 105, p. 36-41, 2007.

YI, J. et al. Cellular Uptake of β -Carotene from Protein Stabilized Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Homogenization–Evaporation Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 1096-1104, 2014.

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.

CAPÍTULO II

USO DE DIFERENTES MATERIAIS POLIMÉRICOS PARA A OBTENÇÃO DE
NANOEMULSÕES E DE NANOPARTÍCULAS LIOFILIZADAS RICAS EM
 β -CAROTENO

Resumo

O objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões e nanopartículas liofilizadas a partir de extrato rico em β -caroteno obtido de *Spirulina platensis* e de β -caroteno comercial pela técnica de nanoprecipitação, utilizando poli (ácido láctico) (PLA) / poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (75:25) e poli- β -hidroxibutirato (PHB). As nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, viscosidade, pH e cor. As nanopartículas liofilizadas foram caracterizadas com relação ao espectro UV-Vis, carotenoides majoritários, eficiência do encapsulamento, morfologia e comportamento térmico. O diâmetro médio das partículas nas nanoemulsões foi de $171,73 \pm 17,28$ nm, com maior uniformidade para a amostra Extrato + PLA/PLGA (99%) que teve o menor índice de polidispersão (PdI = $0,140 \pm 0,0015$). O potencial zeta variou entre $-4,08 \pm 1,73$ a $-11,34 \pm 2,65$ mV. Os espectros UV-Vis das nanopartículas liofilizadas contendo o extrato da microalga foram menos afetados em comparação com as amostras contendo padrão de β -caroteno, possivelmente pela maior eficiência de encapsulação das mesmas (Extrato + PHB = 92,13%; Extrato + PLA/PLGA = 88,58%). O all-*trans*- β -caroteno foi o carotenoide majoritário do extrato de *Spirulina platensis*, seguido de zeaxantina, β -criptoxantina e luteína. Os pigmentos identificados nas nanopartículas contendo o extrato foram os mesmos, mas a zeaxantina se destacou em relação ao β -caroteno. As nanopartículas apresentaram formato esférico e circundadas pela parede polimérica. As análises térmicas indicaram que todas as nanopartículas obtidas podem ser consideradas estáveis em condições de processamento de alimentos. O PHB demonstrou potencial para produção de nanoemulsões e de nanopartículas liofilizadas bioativas.

Palavras-chave: carotenoides, *Spirulina platensis*, nanoprecipitação, PHB, PLA, PLGA.

Abstract

The aim of this study was to develop and characterize nanoemulsions and freeze-dried nanoparticles from extract rich in β -carotene obtained from *Spirulina platensis* and commercial β -carotene by nanoprecipitation technique using poly (lactic acid) (PLA) / poly (lactic acid -co-glycolic acid) (PLGA) (75:25), and poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Nanoemulsions were characterized for particle size, zeta potential, viscosity, pH and color. Freeze-dried nanoparticles were characterized by UV-Vis spectrum, majority carotenoids, encapsulation efficiency, morphology and thermal analysis. The mean diameter of the particles in the nanoemulsion was 171.73 ± 17.28 nm with higher uniformity in the sample extract + PLA / PLGA (99%) which had lowest polydispersity index (PDI = 0.140 ± 0.0015). Zeta potential was in the range of -4.08 ± 1.73 a -11.34 ± 2.65 mV. UV-Vis spectrum of freeze-dried nanoparticles containing microalgae extract were less affected in comparison with commercial β -carotene samples, possibly the highest encapsulation efficiency of them (Extract + PHB = 92.13%; Extract + PLA / PLGA = 88.58%). The all-*trans* β -carotene was the major carotenoid from *Spirulina platensis* extract, followed by zeaxanthin, β -cryptoxanthin and lutein. The pigments identified in the nanoparticles containing the extract were the same, but zeaxanthin stood in relation to β -carotene. Nanoparticles showed spherical shape, surrounded by polymeric wall. Thermal analysis showed that all the nanoparticles can be considered stable in food processing conditions. PHB shows potential for the production of bioactive nanoemulsions and freeze-dried nanoparticles.

Key Words: carotenoids, *Spirulina platensis*, nanoprecipitation, PHB, PLA, PLGA.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos sintetizados por plantas superiores, microrganismos e alguns animais. Apresentam propriedades importantes como poder corante, atividade de pró-vitamina A e potencial antioxidante, características especialmente relacionadas ao β -caroteno (Yuan et al., 2008; Liang et al., 2013).

A preocupação dos consumidores com a saúde e com o uso de aditivos químicos pela indústria alimentícia tem impulsionado a realização de estudos com fontes naturais para a obtenção de carotenoides e sua utilização como corantes e/ou antioxidantes (Islam e Mohammad, 2015; Liu et al., 2015). Sob tal aspecto as microalgas são microrganismos que crescem geralmente em meio líquido, se multiplicam rapidamente, são capazes de realizar fotossíntese e produzir biomassa rica em compostos biologicamente ativos (Mortensen et al., 2006; Valduga et al., 2009).

A *Spirulina platensis*, uma microalga azul-verde, apresenta-se como fonte para a obtenção de carotenoides em escala industrial, sendo o principal deste o β -caroteno. Pode ser produzido de 0,5 mg a 1-2 g β -caroteno/kg de matéria seca de acordo com as condições de cultivo (Gireesh et al., 2001; Christaki et al., 2013). Dentre os outros carotenoides presentes em menor quantidade, destaca-se a β -criptoxantina e a zeaxantina (Careri et al., 2001).

A biodisponibilidade dos carotenos encontrados na *Spirulina* é muito semelhante àquela de carotenos obtidos de outras fontes, o que sugere que esta microalga apresenta grande potencial como fonte de pró-vitamina A (Wang et al., 2008). A forte atividade antioxidante apresentada por esses compostos têm sido associada à proteção das células do organismo contra os efeitos nocivos dos radicais livres, com consequente influência na redução de algumas doenças crônicas como câncer, doenças cardiovasculares, além de atuar no combate ao envelhecimento (Xavier et al., 2012; Liang et al., 2013).

Por outro lado, os carotenoides são insolúveis em água, ligeiramente solúveis em óleo à temperatura ambiente, apresentam sensibilidade ao oxigênio, ao calor e a luz; o que limita a sua aplicação em alguns produtos alimentícios. Dessa forma, a produção de nanopartículas contendo carotenoides representa uma alternativa para aplicação desses compostos em alimentos, uma vez que tal técnica pode propiciar uma melhor estabilidade e biodisponibilidade das substâncias encapsuladas, principalmente as susceptíveis a oxidação (Chu et al., 2007). As partículas produzidas em escala

nanométrica são fisicamente mais estáveis do que as de tamanho micrométrico (Chu et al., 2007) e possuem maior capacidade de dispersão em água (De paz et al., 2012).

O preparo de nanopartículas contendo β -caroteno tem sido realizado por diversas técnicas, tais como emulsificação-evaporação do solvente (Tan e Nakajima, 2005; Chu et al., 2007), emulsificação-difusão do solvente (Zambrano-Zaragoza et al., 2011), homogeneização a alta pressão (Yuan et al., 2008) ou por deslocamento de solvente (nanoprecipitação) (Ribeiro et al., 2008). A técnica de nanoprecipitação é caracterizada pela simplicidade do processo, alta eficiência de encapsulação e reprodutibilidade, baixo teor de contaminação e baixo custo, além de utilizar polímeros como materiais de partida ao invés de monômeros e solventes tóxicos (Mora-Huertas et al., 2011).

Na nanoprecipitação a fase interna é constituída por um polímero pré-formado (Poli (ácido láctico) (PLA) ou Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)) dissolvido em solvente orgânico (ex. acetona) contendo o material de interesse disperso ou dissolvido (ex. β -caroteno). Tal fase é dispersa, sob agitação magnética, na fase externa, formada por uma solução aquosa com surfactante (ex. Tween) para formação de emulsão. Posteriormente o solvente orgânico é removido à pressão reduzida, para formar as nanopartículas, resultantes da difusão rápida do solvente utilizado para dissolver o polímero, através da fase aquosa (Ribeiro et al., 2008; Souto et al., 2012).

Entre os polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, o PLGA é um dos mais estudados, em parte devido a sua aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration). O PLA é um poliéster hidrofóbico e semicristalino, com ótimas propriedades físicas e com uma viabilidade comercial bastante atrativa, como substituto de polímeros não biodegradáveis e utilização específica nas áreas médicas e agrícolas (Ren et al., 2009).

O tipo e a concentração do polímero usado influenciam não somente na liberação do composto encapsulado como também na polidispersibilidade da nanopartícula (Chu et al., 2007). O uso de PLA/PLGA (75:25) (Ribeiro et al., 2008) e dextrina (Kim et al., 2013) em formulação de nanodispersão contendo β -caroteno e também de PLGA usado para o preparo de nanopartículas de curcumina (Anand et al., 2010) possibilitou a dispersão dos compostos bioativos em água.

O poli- β -hidroxibutirato (PHB) é um polímero da classe dos polihidroxicanoatos (PHAs) com características de biodegradabilidade, termoplasticidade e biocompatibilidade com células e tecidos humanos. Pode ser aplicado também na indústria de alimentos, inclusive em filmes biodegradáveis (Sharma

e Mallick et al., 2005). Tal composto apresenta-se como uma alternativa biotecnológica e inovadora para a formulação de nanopartículas de β -caroteno.

Ao considerar os benefícios atribuídos à produção de nanopartículas e sua aplicabilidade na indústria de alimentos, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanoemulsões e nanopartículas liofilizadas a partir de extrato rico em β -caroteno obtido a partir da microalga *Spirulina platensis* e de β -caroteno comercial pela técnica de deslocamento de solvente, utilizando na formulação os polímeros PLA/PLGA e PHB.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Material*

Os padrões de β -caroteno ($\geq 97\%$ de pureza), zeaxantina ($> 95\%$), criptoxantina ($> 95\%$), α -caroteno ($> 95\%$), α -tocoferol ($\geq 96\%$ HPLC) e os polímeros biodegradáveis Poli (ácido láctico) (PLA; $M_w = 75,000 - 120,000$) e o Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA; $M_w = 66,00 - 107,000$), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O polímero PHB (Polihidroxibutirato $M_w 780$ kDa) foi fornecido pelo Laboratório de Análises Aplicadas e Biomateriais (LAPBIM) (Universidade Federal da Bahia, Brasil).

2.2. *Métodos*

2.2.1. *Extrato rico em β -caroteno*

O extrato rico em β -caroteno foi obtido a partir da microalga *Spirulina platensis* (LEB 18) cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A cepa foi isolada da Lagoa Mangueira ($33^\circ 30' 13''$ S; $53^\circ 08' 59''$ O) em Santa Vitória do Palmar (RS) e o cultivo realizado na água da lagoa suplementada com meio Zarrouk (20%, v/v) em tanques abertos do tipo *raceway*, protegidos dos raios UV por túnel de filme transparente e expostos às condições ambientais naturais no período de inverno (junho a setembro de 2013).

As amostras foram liofilizadas (0,5 g) e posteriormente submetidas a 5 extrações em shaker (CT 712, Cientec, São Carlos, São Paulo) por 30 min a temperatura de 35°C ,

com etanol como solvente e saponificação simultânea com KOH etanólico 10%. O extrato foi transferido para éter de petróleo, lavado com água destilada para remoção do álcali para posterior leitura em espectrofotômetro a 450 nm (UV/vis espectrofotômetro, Lambda 25, Perkin-Elmer, Ayer Rajah Crescent, Singapore) (Mendonça et al., 2014). Os extratos foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno usando o coeficiente de absortividade ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) de 2592 (Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004).

2.2.2. Obtenção das nanoemulsões e das nanopartículas liofilizadas

As nanoemulsões contendo extrato rico em β -caroteno obtido a partir da microalga *Spirulina platensis*, assim como o β -caroteno comercial, utilizando os polímeros sintéticos PLA/PLGA (75:25) e PHB, foram preparadas pelo método de deslocamento de solvente, de acordo com Ribeiro et al. (2008), com modificações. As diferentes formulações foram designadas como: β -caroteno + PHB; β -caroteno + PLA/PLGA; Extrato + PHB; Extrato + PLA/PLGA. Os pigmentos foram dissolvidos em 25 mL de acetona, sendo adicionados de 70 mg/L de α -tocoferol e de 100 mg do polímero (PHB ou PLA/PLGA (75:25)). Esta mistura foi adicionada lentamente em 25 mL de solução aquosa contendo 1% de Tween 20, com agitação magnética moderada (380 rpm) (Tecnal TE – 085, São Paulo, Brasil). A seguir, foram adicionados 70 mL de água destilada e após obter uma mistura homogênea, a acetona foi evaporada em evaporador rotatório (35 °C) (Tecnal TE – 211, São Paulo, Brasil). As emulsões resultantes ($\cong 160 \mu\text{g/mL}$) foram submetidas à caracterização (Figura 1).

As amostras obtidas na etapa descrita acima foram congeladas a -80 °C por 24 h e secas por liofilização (Terroni LS 3000, São Carlos, Brasil), por aproximadamente 72 h, para a obtenção das nanopartículas liofilizadas, que foram caracterizadas a seguir, como descrito na Figura 1.

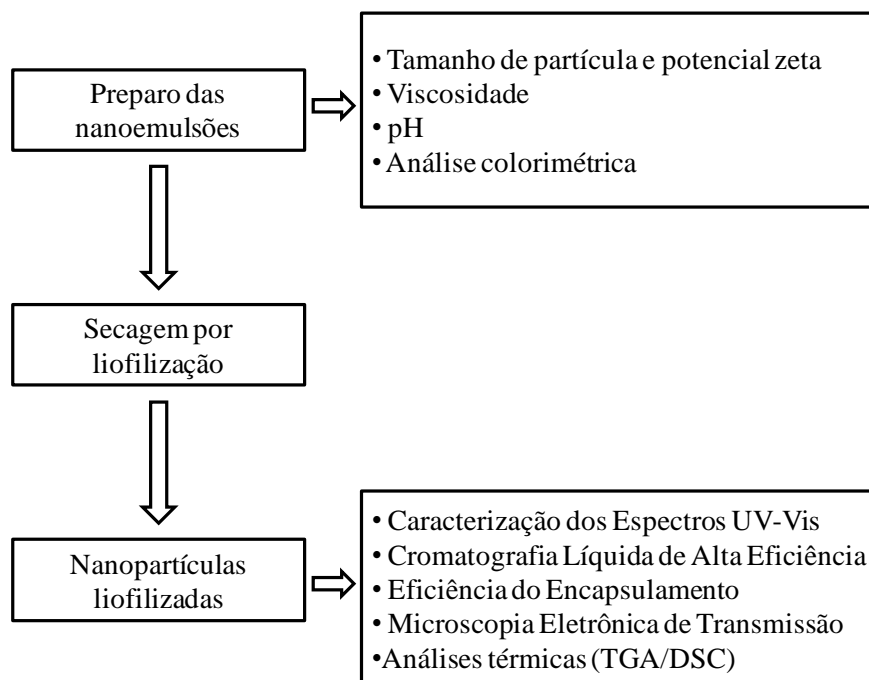


Figura 1. Esquema do preparo e caracterização das nanoemulsões e das nanopartículas liofilizadas ricas em β -caroteno.

2.2.3. *Tamanho de partícula e potencial zeta*

Para dimensionar o tamanho médio das nanopartículas, o índice de polidispersabilidade (PdI) e o potencial zeta, foi utilizada a técnica de espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering – DSL), pela análise no equipamento Zetasizer, Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). O tamanho de partícula foi descrito pelo diâmetro médio acumulado e a distribuição de tamanhos demonstrada por gráficos e pela PdI, todos medidos a 25 °C. Os valores de potencial zeta foram medidos com base na mobilidade eletroforética.

2.2.4. *Viscosidade*

A viscosidade das nanoemulsões foi determinada em viscosímetro digital (Brookfield LVDV-I Prime, Boston, USA), empregando-se o “spindle” n° 62, a 20 rpm por 1 minuto, com a temperatura da amostra igual a 21 °C. Os resultados foram expressos em cP.

2.2.5. pH

O pH das nanoemulsões foi mensurado a 25 °C usando o medidor de pH Tecnopron mpA-210 (São Paulo, Brasil).

2.2.6. Análise colorimétrica

A determinação da cor das nanoemulsões foi realizada em colorímetro Minolta CR-400 com iluminante D₆₅, ângulo de observação de 2° e utilizando-se a escala CIELab, sendo L* a luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco); a* intensidade de vermelho, variando de verde a vermelho (-a/+a); b* intensidade de amarelo, variando de azul a amarelo (-b/+b).

2.2.7. Caracterização dos espectros UV-Vis

Os espectros de absorção do padrão de β -caroteno e do extrato da microalga *Spirulina platensis*, em éter de petróleo, assim como das nanopartículas liofilizadas solubilizadas em água, foram obtidos através de leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 25, Perkin-Elmer, Ayer Rajah Crescent, Singapore) na faixa de 300-550 nm. A estrutura fina dos espectros foi caracterizada através do valor de % III/II (razão entre altura do pico de maior comprimento de onda, designado III e o pico de absorção do meio, designado II) e pelo λ_{\max} em relação à linha base. Também foi calculada a intensidade do pico *cis* (% AB/AII), razão entre a altura do pico *cis*, designada AB e o pico máximo de absorção, designado AII (Rodriguez-amaya, 2001).

2.2.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A composição de carotenoides do extrato de carotenoides da microalga, do padrão de β -caroteno e das nanopartículas liofilizadas foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Agilent série 1100, Santa Clara, USA) em equipamento com degaseificador, bomba de solvente quaternária e detector UV/vis (Agilent série 1100, Alemanha). Foi utilizada uma coluna C₃₀ de fase reversa polimérica (250 mm x 4,6 mm d.i., 3 μ m; YMC, Japão). A fase móvel foi composta de água/metanol/tert-metil butil éter (MTBE), começando com proporções de 5:90:5, atingindo 0:95:5 em 10 min, 0:89:11 em 20 min, 0:75:25 em 30 min e, por fim, 0:50:50

depois de 40 min, com um fluxo de 1 mL/min a 33 °C (Nunes e Mercadante, 2007; Zanatta e Mercadante, 2007).

Antes da injeção, as nanopartículas liofilizadas (5 mg) foram submetidas à 3 extrações sucessivas com 3 mL da mistura de metanol/n-hexano (1:2, v/v) em centrífuga por 10 min à 2.000 rpm (Tecnal 206 - Baby I, São Paulo, Brasil) de acordo com a metodologia de Yi et al. (2014), como modificações. Os sobrenadantes foram combinados, secos em atmosfera de N₂, dissolvidos em MTBE e filtrados em membrana Millex de PTFE (0,45 µm, Millipore, Barueri, SP, Brasil).

2.2.9. Eficiência de encapsulamento

A concentração total de β-caroteno na suspensão foi determinada após completa dissolução de 1 mL da mesma em acetona e a quantificação realizada em espectrofotômetro UV/Vis (Lambda 25, Perkin-Elmer, Ayer Rajah Crescent, Singapore) através da leitura da absorbância em comprimento de onda máximo de absorção do β-caroteno em acetona (454 nm) e a concentração calculada considerando a absorvidade ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) de 2500 (Hiyama et al., 1969).

A eficiência do encapsulamento (EE) foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação descrito por Khayata et al. (2012), com modificações. Aproximadamente 500 µL da solução contendo as nanopartículas em acetona foi submetida à ultrafiltração/centrifugação (Amicon Ultra 0,5/30 kDa. Millipore, Irlanda) a 4500 rpm por 30 minutos. O conteúdo de β-caroteno livre na suspensão foi determinado através da leitura do ultrafiltrado em espectrofotômetro UV/Vis, nas mesmas condições descritas acima. A EE foi estimada de acordo com a Equação 2.

(Equação 2)

$$EE (\%) = \frac{[(\text{conc. de } \beta - \text{ caroteno total} - \text{conc. de } \beta - \text{ caroteno livre})]}{\text{conc. de } \beta - \text{ caroteno total}} \times 100$$

2.2.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das nanopartículas liofilizadas e dos respectivos brancos foi examinada através de MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1230, Tóquio, Japão) pelo o método de contraste negativo. Para tanto a amostra foi dissolvida

em 20 μL de água destilada, transferida para uma grade de níquel (200 *mesh*) e mantida por 10 minutos ao ar livre até a completa secagem. Após esta etapa, adicionou-se 5 μL de solução de ácido fosfotúngstico 1% e a amostra foi submetida à análise por MET.

2.2.11. Análises térmicas

A Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG) das nanopartículas liofilizadas e de seus constituintes (padrão comercial de β -caroteno, PHB, PLA, PLGA) foram realizadas em equipamento XSTAR 6000 TG/DTA Series, Seiko (Tokyo, Japão). As condições de análise foram: massa da amostra de aproximadamente 6,0 mg; fluxo de nitrogênio de 100 mL min⁻¹; razão de aquecimento a 10 °C/min e a faixa de temperatura de 25 °C a 1000 °C.

As curvas de DSC foram obtidas em um Calorímetro Exploratório Diferencial (Seiko, DSC 6220, Japão). Cada amostra foi pesada em uma balança analítica (Shimadzu, AY 220, São Paulo, Brasil) em panelinhas de alumínio. Um cadinho vazio foi utilizado como referência. Nesta análise, o peso da amostra foi de cerca de 6,0 mg, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, à razão de aquecimento de 10 °C/min em uma faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C.

2.3. Análise Estatística

Os resultados referentes ao tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade (PDI), potencial zeta, viscosidade, pH e cor foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O experimento consistiu em 4 tratamentos com análises individuais para cada repetição (total de 3 repetições), conduzida no mínimo em triplicata (valores de média para cada repetição). Para a análise dos dados foi utilizado o Software SPSS[®] 13.0 e o programa ORIGIN[®] 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das nanoemulsões

Tamanho de partícula e potencial zeta

Os valores referentes ao diâmetro médio das partículas presentes nas nanoemulsões estudadas a partir da análise de dispersão de luz dinâmica (DSL) foram de $171,73 \pm 17,28$ nm e não houve diferença significativa entre as amostras (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados das determinações de tamanho médio das partículas, índice de polidispersibilidade (PdI) e potencial zeta das nanoemulsões.

Amostras	Diâmetro médio (nm±DP)	PdI (DP)	Potencial zeta (mV±DP)
Emulsões			
Extrato+PHB	$172,65 \pm 6,25^a$	$0,149 \pm 0,0010^a$	$-9,61 \pm 3,80^{ab}$
Extrato+PLA/PLGA	$148,90 \pm 0,40^a$	$0,140 \pm 0,0015^a$	$-4,08 \pm 1,37^b$
β -caroteno+PHB	$174,50 \pm 22,40^a$	$0,398 \pm 0,0235^c$	$-11,34 \pm 2,65^a$
β -caroteno+PLA/PLGA	$190,87 \pm 33,15^a$	$0,243 \pm 0,0360^b$	$-5,05 \pm 1,19^{ab}$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

O tamanho da partícula influencia nas propriedades físico-químicas, cinética de liberação do composto e na biodistribuição. Desta forma, quando há um controle maior no tamanho das estruturas, em especial partículas em escala nano e de menores dimensões, estas são capazes de interagir mais facilmente com o composto de interesse durante determinada aplicação (Fontanive et al., 2014).

Em estudo de González-Reza et al. (2014) foram obtidas nanocápsulas de β -caroteno preparadas com o polímero PCL (Policaprolactona) com um diâmetro médio de 191 nm, valor este similar ao obtido neste estudo para as nanopartículas BEPL. Já Ribeiro et al. (2008) e Tan e Nakajima et al. (2005) produziram nanopartículas com β -caroteno na faixa de 74 a 77 nm e 60 a 135 nm de diâmetro, utilizando na formulação os polímeros PLA/PLGA por nanoprecipitação e técnica de emulsão-evaporação, respectivamente.

A nanoprecipitação é uma técnica em que se utiliza três ingredientes básicos (polímero, solvente e não-solvente), além de um emulsificante. A escolha do sistema que envolvem todas estas vertentes é crucial para o sucesso do método e influencia diretamente no tamanho da partícula obtida (Legrand et al., 2007). Assim, neste estudo

foram utilizados os poliésteres PLA e PLGA, que segundo Kibbe et al. (2000) são os polímeros sintéticos mais empregados na preparação de nanocápsulas, além de serem solúveis na maioria dos solventes orgânicos, e também o PHB que vem sendo considerado como uma alternativa de material polimérico produzido por fontes renováveis e resíduos biológicos (Campos et al., 2014).

Na Figura 2 pode ser observada a distribuição média do tamanho das partículas, sendo que os valores apresentados confirmam que é possível preparar emulsões contendo o padrão de β -caroteno e o extrato rico em β -caroteno proveniente da microalga empregando os polímeros PHB e PLA/PLGA pela metodologia de deslocamento de solvente, obtendo estruturas em escala nano.

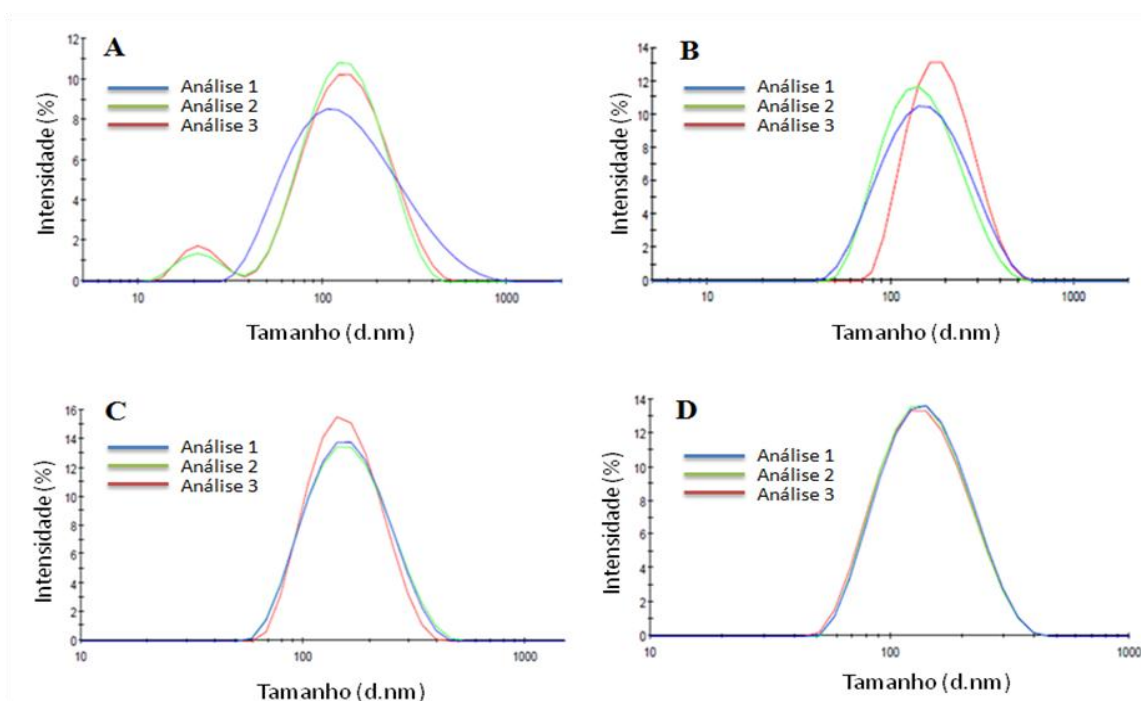


Figura 2. Distribuição do tamanho das partículas das nanoemulsões β -caroteno + PHB (A); β -caroteno + PLA/PLGA (B) e Extrato + PHB (C); Extrato + PLA/PLGA (D), em triplicata.

A maior uniformidade no diâmetro das nanopartículas presentes na emulsão Extrato + PLA/PLGA (99%) é confirmada pelo menor índice de polidispersão da mesma ($PdI = 0,140 \pm 0,0015$), no entanto, β -caroteno + PLA/PLGA e Extrato + PHB, também apresentaram PdI abaixo de 0,3, que segundo Zhang e Kosaraju (2007) indica alta homogeneidade no tamanho das partículas presentes no meio. Apenas a amostra β -

caroteno + PHB apresentou diferença significativa para esse parâmetro quando comparada às demais amostras.

O potencial zeta variou de $-4,08 \pm 1,37$ (Extrato + PLA/PLGA) a $-11,34 \pm 2,65$ mV (β -caroteno + PHB) (Tabela 1). Em estudo de Santos et al. (2015), em que foram obtidas nanocápsulas de licopeno com o polímero PCL o potencial zeta médio foi de $-11,5 \pm 0,40$ mV, muito similar ao encontrado no presente estudo para as nanopartículas com o polímero PHB. Cao-Hoang et al. (2011) observaram uma variação no potencial zeta de -31 a -23 mV para nanopartículas contendo β -caroteno sintético e de $+4,8$ a $+9,1$ mV com o natural, ambas utilizando o poliéster PLA.

Grande parte da estabilidade das partículas ocorre devido a efeitos estéricos (efeito osmótico) e camada de hidratação (aumento da distância entre as partículas) conferida pelos estabilizantes, como o Tween, que foi utilizado em todas as formulações do presente estudo. Os polímeros constituintes das nanopartículas também podem influenciar nesta estabilidade e são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta, em especial os poliésteres, tais como PLA e PLGA, Estes polímeros fornecem um potencial negativo à interface, devido aos grupamentos carboxílicos resultantes das hidrólises da cadeia (Mosqueira et al., 2000; Schaffazick et al., 2003), o que conseqüentemente acarretou em um potencial zeta negativo nas amostras estudadas.

Viscosidade, pH e cor

A viscosidade média das nanoemulsões foi de $2,92 \pm 0,44$ cP, não sendo verificada diferença significativa entre as mesmas (Tabela 2). Esses valores foram bem inferiores ao reportado por Lobato et al. (2015), de $11,4 \pm 0,24$ cP para nanocápsulas de bixina e PCL (Policaprolactona) obtidas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado utilizando span 60 como emulsificante. Já no trabalho de Santos et al. (2015), utilizando a mesma técnica do estudo anterior, a suspensão contendo nanocápsulas de licopeno e o polímero PCL, preparada com o emulsificante momoestearato de sorbitana apresentou viscosidade de $1,09 \pm 0,03$ cP, valor mais próximo ao encontrado no presente estudo. A viscosidade pode ser afetada por diversos fatores, tais como o diâmetro das partículas, que acabam influenciando nas interações interpartículas, além do tipo de surfactante utilizado (Silva et al. 2006), que neste estudo foi o tween 20.

Tabela 2. Resultados das determinações de viscosidade, pH e cor das nanoemulsões.

Amostras	Viscosidade (cP)	pH	Parâmetros de cor		
			L*	a*	b*
Emulsões					
Extrato + PHB	3,50 ± 0,50 ^a	5,95 ± 0,11 ^c	26,69 ± 0,58 ^a	-0,58 ± 0,33 ^a	13,20 ± 0,96 ^b
Extrato + PLA/PLGA	3,00 ± 2,60 ^a	5,02 ± 0,45 ^b	26,86 ± 1,56 ^a	-1,22 ± 0,41 ^a	13,16 ± 1,81 ^b
β-caroteno + PHB	2,50 ± 1,73 ^a	5,54 ± 0,21 ^{bc}	29,93 ± 0,11 ^a	0,42 ± 0,01 ^b	7,02 ± 1,48 ^a
β-caroteno + PLA/PLGA	2,67 ± 1,04 ^a	4,31 ± 0,02 ^a	27,40 ± 0,58 ^a	0,19 ± 0,06 ^b	8,42 ± 1,88 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

As nanoemulsões apresentaram pH entre $4,31 \pm 0,02$ e $5,95 \pm 0,11$, sendo que β-caroteno + PHB foi similar tanto à amostra Extrato + PHB, também preparada com o polímero PHB, quanto à Extrato + PLA/PLGA, demonstrando diferença significativa em relação à β-caroteno + PLA/PLGA ($p < 0,05$), que foi a amostra com menor valor para esse parâmetro. Santos et al. (2015) produziram nanoemulsões de licopeno e PCL por deposição interfacial de polímero pré-formado, com pH inicial de $6,01 \pm 0,04$, sendo que este valor foi se alterando ao longo de 28 dias, chegando a $5,60 \pm 0,02$, valor próximo aos apresentados neste estudo. Lobato et al. (2013) encontraram valores similares, utilizando a mesma técnica, com pH médio de $5,89 \pm 0,70$.

A importância da análise deste parâmetro gira em torno da futura aplicação da nanoemulsão. O valor do pH e a ocorrência de possíveis alterações do mesmo, pode indicar a presença de reações químicas ou crescimento bacteriano, que podem comprometer a qualidade do produto final, influenciando em certas características como a cor, o sabor, dentre outras. Além disso, o pH também pode influenciar na estabilidade do composto bioativo que será encapsulado, visto que um pH muito ácido interfere diretamente na diminuição da estabilidade do carotenoide (Lobato et al., 2013; Lobato et al., 2015).

Considerando os parâmetros de cor, as nanoemulsões apresentaram um valor médio para o L* de $27,72 \pm 1,50$, a* variando de $-1,22 \pm 0,41$ a $0,42 \pm 0,01$ e b* de $7,02 \pm 1,48$ a $13,20 \pm 0,96$. De forma geral a cor das amostras apresentou tendência ao laranja, e a luminosidade das nanoemulsões não foi modificada mesmo com a mudança do polímero ou composto encapsulado. As amostras contendo extrato (Extrato + PHB e Extrato + PLA/PLGA) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para valores de a* e b* em relação às amostras contendo padrão de β-caroteno (β-caroteno + PHB e β-caroteno + PLA/PLGA), sendo que as primeiras apresentaram valores negativos para a* (tendência ao verde) e maiores valores de b* (tendência ao amarelo), enquanto β-

caroteno + PHB e β -caroteno + PLA/PLGA tiveram valores de a^* positivos (tendência ao vermelho).

Liu et al. (2010), estudaram a variação na cor em dispersões aquosas contendo diferentes concentrações de β -caroteno e encontraram valores médios superiores aos do presente estudo ($L^* = 39,73 \pm 0,66$; $a^* = 48,80 \pm 1,66$; $b^* = 51,83 \pm 0,85$), predominando também a cor laranja. Esta diferença pode estar relacionada à quantidade de β -caroteno utilizada (0,05g) no estudo, já que a intensidade da cor é proporcional à concentração.

3.2. *Caracterização das nanopartículas liofilizadas*

Avaliação espectrofotométrica, cromatográfica e eficiência do encapsulamento

O extrato obtido da *Spirulina platensis* e o padrão comercial de β -caroteno foram avaliados por espectrofotometria e por CLAE (Figura 3). Apesar de apresentarem composições diferentes, os espectros obtidos foram semelhantes quanto ao comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), com um valor de 449 nm para o padrão e de 447 nm para o extrato.

A análise espectrofotométrica mostrou que em relação à estrutura fina (%III/II) e intensidade do pico *cis* %AB/AII os resultados foram de 27 e 21 para o padrão e de 23 e 22 para o extrato, ambos dissolvidos em éter de petróleo (Figura 3), sendo tais parâmetros semelhantes aos descritos por Rodriguez-Amaya (2001) para β -caroteno ($\lambda_{\text{máx}} = 450$, %III/II = 25) no mesmo solvente. Cao-Hoang et al. (2011) identificaram para β -caroteno em acetonitrila um $\lambda_{\text{máx}} = 452$ e %III/II = 35, valor considerado típico para o β -caroteno monomolecular, de acordo com Mercadante et al. (1998).

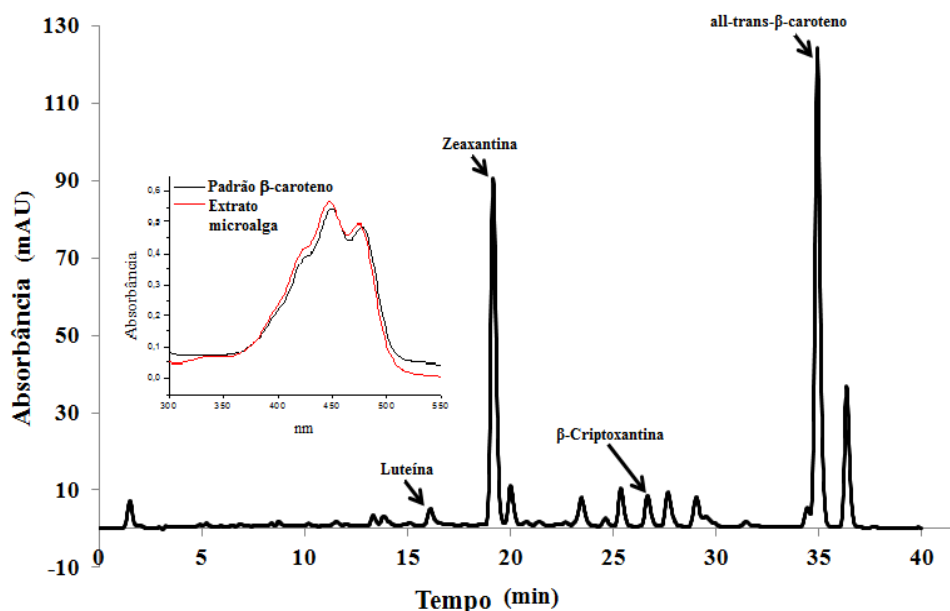


Figura 3. Cromatograma obtido por CLAE do extrato de carotenoides da microalga *Spirulina platensis* e espectros de absorção UV-Vis do padrão comercial de β -caroteno e do extrato da microalga em éter de petróleo.

Foi possível verificar que o *all-trans*- β -caroteno foi o carotenoide majoritário do extrato de *Spirulina platensis*, seguido de zeaxantina, β -criptoxantina e luteína, entre outros compostos minoritários não identificados. Esses pigmentos também foram citados por Mendonça et al. (2014), que obteve carotenoides da *Spirulina platensis* por meio de um planejamento fatorial completo e etanol (solvente GRAS) como solvente de extração.

Ao comparar os carotenoides presentes no extrato da *Spirulina platensis* (Figura 1) com os da nanopartícula preparada com o extrato e PHB (Figura 4A) foi possível observar que os pigmentos identificados foram os mesmos, porém nas nanopartículas a zeaxantina se destacou em relação ao β -caroteno, possivelmente pela melhor interação desse composto com o polímero em função da presença da hidroxila na estrutura. Na Figura 4B observa-se que a elevada pureza do padrão comercial de β -caroteno ($\geq 97\%$) utilizado foi mantida na nanopartícula. Ressalta-se que os cromatogramas das nanopartículas preparadas com PLA/PLGA foram bastante similares aos apresentados nas Figuras 4A e 4B.

Em relação aos espectros de absorção, as amostras contendo o extrato da microalga foram menos afetadas (Figura 4A) em comparação às com o padrão de β -caroteno (Figura 4B). Estes resultados mostram-se similares aos espectros do estudo de Cao-Hoang et al. (2011), em que dispersões contendo β -caroteno a partir de fonte sintética e natural preparadas com Tween 80 e PLA exibiram três picos típicos de β -

caroteno, com $\lambda_{\text{máx}}$ a 460 nm, semelhante ao verificado para as amostras com o extrato nesse estudo. Além disso, a estrutura fina, segundo os autores, também foi bastante afetada exibindo espectro com seis picos distintos, assim como o observado na Figura 4B.

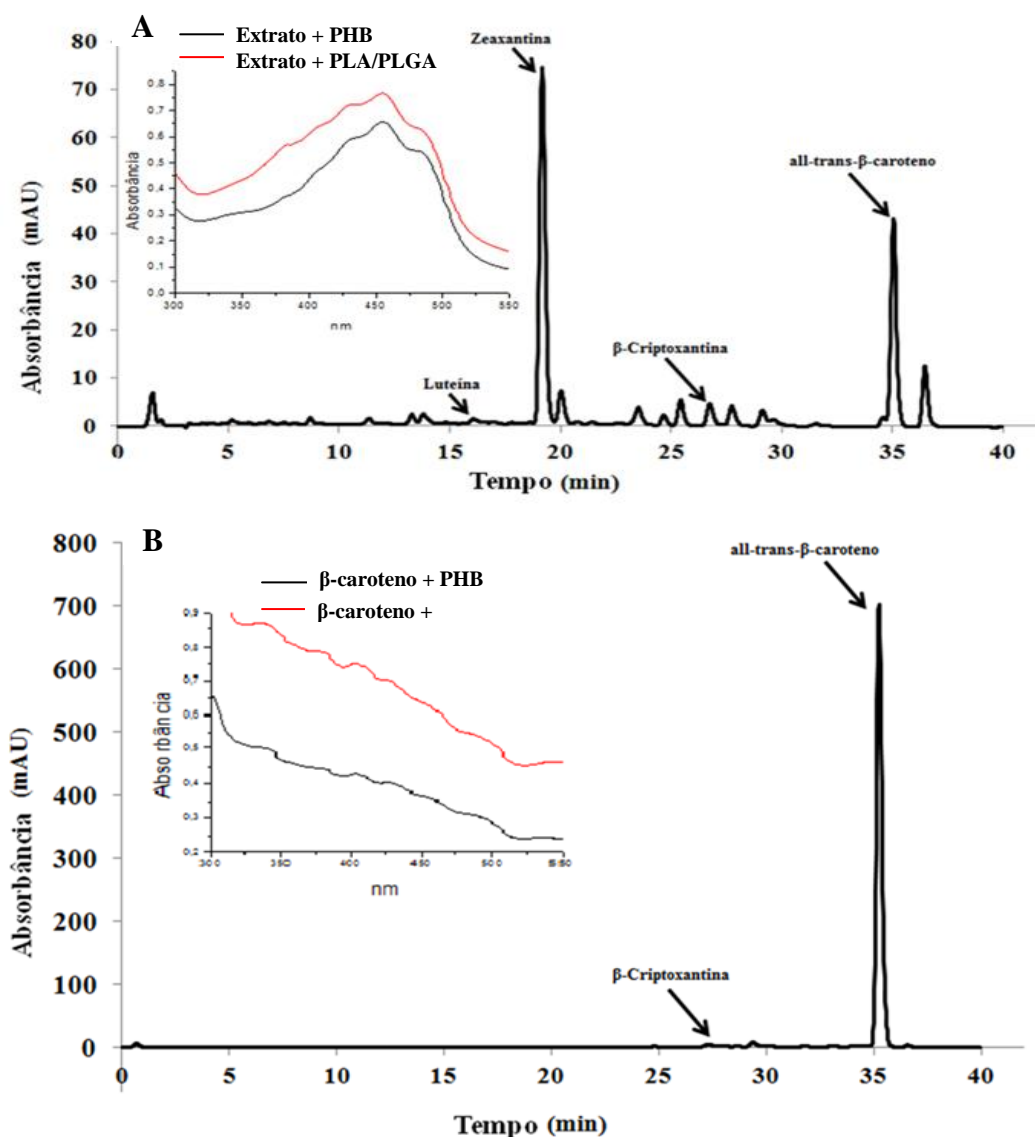


Figura 4. Cromatogramas obtidos por CLAE das nanopartículas liofilizadas contendo o extrato de carotenoides da microalga *Spirulina platensis* (A) e o padrão comercial de β -caroteno (B), ambos com o polímero PHB e os espectros de absorção UV-Vis das amostras dispersas em água.

Segundo Auweter et al. (1999) existem dois parâmetros que podem afetar os espectros UV-Vis, o tamanho das partículas e o tipo de agregação supramolecular das moléculas de β -caroteno. Possivelmente esses dois parâmetros tenham influenciado nas modificações ocorridas no espectro das nanopartículas contendo padrão comercial de β -

caroteno devido a maior quantidade de β -caroteno não encapsulado agregado e também pela presença de partículas com diâmetro médio superior em comparação àquelas contendo o extrato da microalga.

As nanopartículas contendo β -caroteno comercial (β -caroteno + PHB e β -caroteno + PLA/PLGA) apresentaram menores eficiências (β -caroteno + PHB = 83,00%; β -caroteno + PLA/PLGA = 83,62%) em comparação com as do extrato de carotenoides da *Spirulina platensis* (Extrato + PHB = 92,13%; Extrato + PLA/PLGA = 88,58%). As amostras contendo β -caroteno comercial perderam a estrutura típica do espectro de carotenoides (Figura 3), possivelmente devido à menor eficiência do encapsulamento. Uma maior eficiência de encapsulamento indica que a maior parte dos compostos está presente na estrutura das nanopartículas.

Eficiência de encapsulamento de 97,5% para nanopartículas de curcumina com PLGA e de 95,12% para nanocápsulas de licopeno e PCL foram reportadas por Anand et al. (2010) e Santos et al. (2015), respectivamente. Os polímeros utilizados podem afetar a eficácia da encapsulação (Rocha et al., 2012), além disso, o método usado (espectrofotometria) para estimar a eficiência no presente estudo também pode ter influenciado nas menores eficiências em comparação com os descritos na literatura, que empregaram CLAE.

O β -caroteno é altamente hidrofóbico, de difícil dispersão, sendo encontrado principalmente sob a forma agregada, mesmo em ambientes relativamente lipofílicos, em que apenas uma pequena proporção das moléculas está na forma monomolecular (Wisniewska et al., 2006; Köhn et al., 2008; Cao-Hoang e Wache, 2009).

Quando as nanopartículas liofilizadas foram dispersas em água foi possível verificar dispersões transparentes para as amostras Extrato + PHB e Extrato + PLA/PLGA (Figura 5A), já as dispersões contendo as nanopartículas β -caroteno + PHB e β -caroteno + PLA/PLGA apresentaram certa turbidez (Figura 5B). Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que o padrão de β -caroteno utilizado apresentava elevada pureza ($\geq 97\%$), e quanto mais puro é o carotenoide maior a dificuldade de solubilização do mesmo em solventes polares devido à tendência da formação de cristais (Ribeiro e Cruz, 2005). Além disso, esse resultado pode ter relação com a menor eficiência de encapsulamento verificada para as nanopartículas contendo o padrão, ocorrendo, conseqüentemente uma maior concentração de β -caroteno livre nessas dispersões.

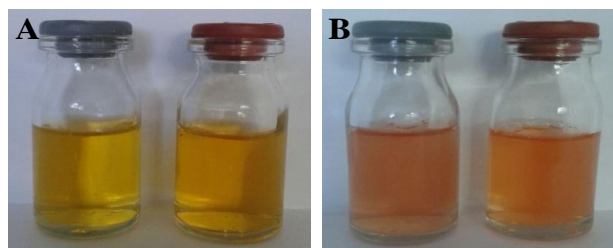


Figura 5. Nanopartículas liofilizadas dispersas em água: Extrato + PHB e Extrato + PLA/PLGA (A); β -caroteno + PHB e β -caroteno + PLA/PLGA (B).

Morfologia das nanopartículas

Segundo Carastan et al. (2007), para que haja a caracterização estrutural completa dos materiais analisados é necessário recorrer a MET, que permite observar diretamente as partículas dispersas no interior do polímero. Assim, a técnica de espalhamento de luz (DSL) juntamente com a MET possibilitam avaliações mais completas das partículas, visto que a primeira é a mais utilizada para determinar o tamanho, e com a microscopia é possível determinar não somente o tamanho, mas também a morfologia das nanopartículas.

Foi possível evidenciar na Figura 6 a presença de nanopartículas de formato esférico, circundadas pela parede polimérica, com tamanhos variados, provavelmente em função do tipo de polímero utilizado no preparo.

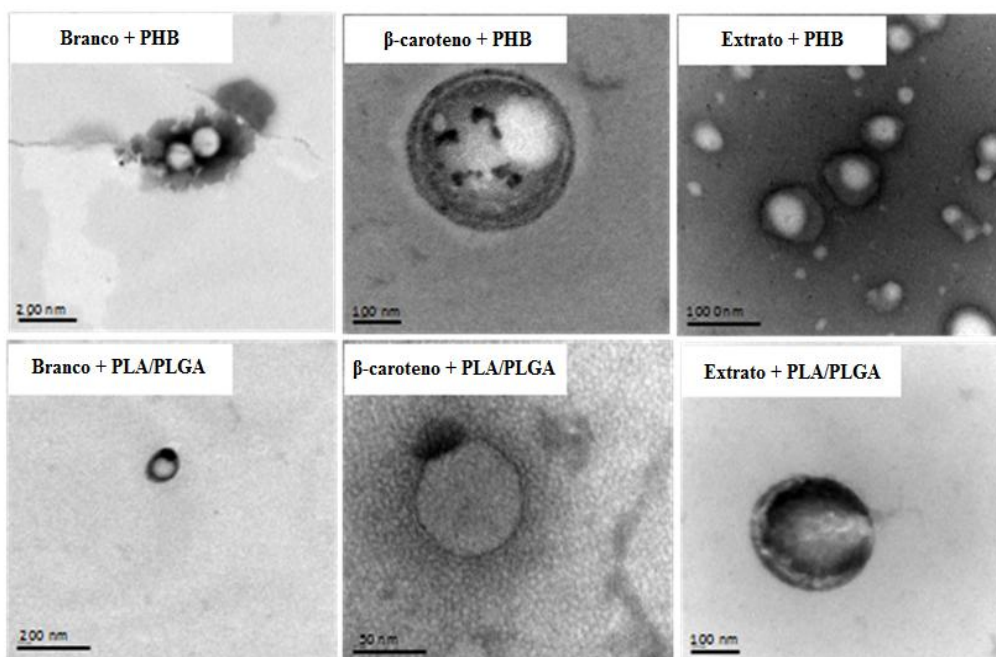


Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas contendo β -caroteno, extrato rico em β -caroteno da microalga *Spirulina platensis* e seus respectivos brancos.

As amostras com PHB (β -caroteno + PHB; Extrato + PHB) apresentaram maior heterogeneidade em relação ao tamanho. Esta característica pode ser confirmada pelos gráficos obtidos pela análise de tamanho de partícula através da técnica de DSL, em que foi observada uma característica bimodal dos picos de uma das amostras (Figura 2A), no qual conclui-se que existem partículas com tamanhos variados.

Nanopartículas de β -caroteno e PLA/PLGA (75:25) produzidas por Ribeiro et al. (2008) e avaliadas por MET apresentaram formato esférico bem definido, sendo semelhante às nanopartículas com esses mesmos constituintes obtidas nesse trabalho (Figura 6), que em sua maioria também apresentaram este formato.

Análises térmicas

A análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada neste estudo com a finalidade de verificar a estabilidade térmica das nanopartículas, a fim de avaliar a possibilidade de submeter às mesmas a condições de processamento térmico, comumente empregado na indústria de alimentos e/ou no preparo de filmes bioativos. Na Tabela 3 são apresentados os valores para a temperatura inicial de degradação (T_{onset}), temperatura final (T_{endset}) e o percentual de resíduo após a análise térmica para cada formulação.

Os dados termogravimétricos mostram que para o padrão de β -caroteno, ocorreu apenas um estágio de perda de massa iniciando-se em 260 °C (T_{onset}) e massa residual de 2,15%, indicando que não ocorreu perda total do material ao final da análise térmica. Uma característica observada foi a similaridade das curvas TGA dos poliésteres PLA e PLGA, com temperaturas finais e iniciais de degradação muito próximas (Tabela 3).

Tabela 3. Dados termogravimétricos obtidos a partir da TGA para as nanopartículas e seus constituintes.

Amostras	Temperatura (°C)				Massa residual (%)
	Estágio 1		Estágio 2		
	T_{onset}	T_{endset}	T_{onset}	T_{endset}	
β -caroteno	260	388	-	-	2,15
PLA	209	365	-	-	-
PLGA	209	364	-	-	-
PHB	276	298	-	-	4,38
Extrato + PHB	191	251	334	417	-
Extrato + PLA/PLGA	207	308	336	422	0,88
β -caroteno + PHB	214	251	312	413	-
β -caroteno + PLA/PLGA	189	285	330	410	-

Dentre os polímeros utilizados para o preparo das nanopartículas, o PHB apresentou maior T_{onset} (276 °C), o que indica maior estabilidade térmica quando comparado aos demais polímeros utilizados nas formulações (PLA e PLGA). Uma temperatura de decomposição mais elevada proporciona uma separação mais ampla entre a temperatura necessária para a aplicação das nanopartículas e a degradação térmica dos polímeros (Campos et al. 2014).

Considerando a T_{onset} dos constituintes (β -caroteno = 260 °C e PHB = 276 °C) e os dois eventos térmicos na amostra β -caroteno + PHB (T_{onset} de 214 °C e 312 °C), é possível observar que houve interação entre os compostos, pois no primeiro evento há uma diminuição na estabilidade térmica do β -caroteno e no segundo evento há um aumento na estabilidade em relação ao PHB, provavelmente devido à formação de um produto de interação, que é mais estável (Figura 7C). Para as demais amostras foi verificado o mesmo comportamento térmico, sendo que as nanopartículas tiveram uma menor estabilidade em relação aos seus constituintes, e dentre todas β -caroteno + PHB foi a que apresentou a maior T_{onset} , podendo ser considerada a de maior estabilidade.

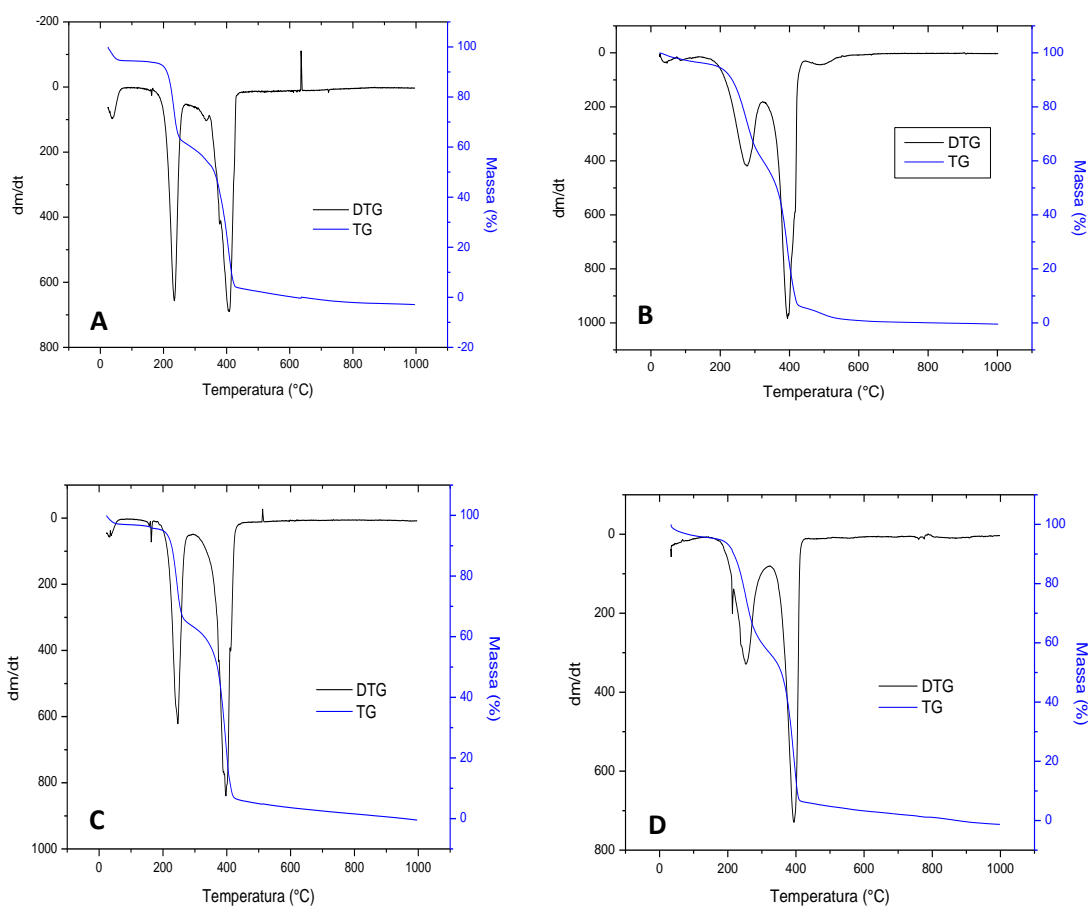


Figura 7. Curvas TGA e DTG das nanopartículas Extrato + PHB (A); Extrato + PLA/PLGA (B); β -caroteno + PHB (C); β -caroteno + PLA/PLGA (D).

Desta forma, o polímero PHB permitiu a formação de nanopartículas mais estáveis do que o PLA/PLGA. Entretanto, no que se refere à aplicação na indústria de alimentos, ambos os polímeros permitiram a formação de nanopartículas estáveis, porque as temperaturas utilizadas no processamento de alimentos são, geralmente, menores do que 185 °C, inferiores a T_{onset} (primeiro evento) de todas as amostras analisadas.

Com o objetivo de caracterizar as energias envolvidas no processo de pirólise das nanopartículas e de seus constituintes, foi empregada a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Conforme observado na Figura 8A, o β -caroteno apresenta um evento endotérmico em 186 °C, correspondendo à fusão deste material, um pouco acima do reportado por De Paz et al. (2012) para esse composto (180-182 °C), devido as diferentes condições empregadas no estudo.

Para o PHB, a temperatura em que ocorre o primeiro evento térmico foi de 174,10 °C, atribuída à fusão do mesmo, já que ao ser analisada a curva TGA deste polímero não houve perda de massa nesta faixa de temperatura. Os valores obtidos para o PHB coincidem com os resultados relatados na literatura (174-183 °C) para este polímero (Anderson e Dawes, 1990; Gomez e Bueno Neto, 1997). Há um evento endotérmico em torno de 300 °C nas curvas referentes ao PLA e ao PLGA (Figura 8A). Nessa faixa de temperatura ocorre perda de massa, indicando que este evento é decorrente da decomposição térmica.

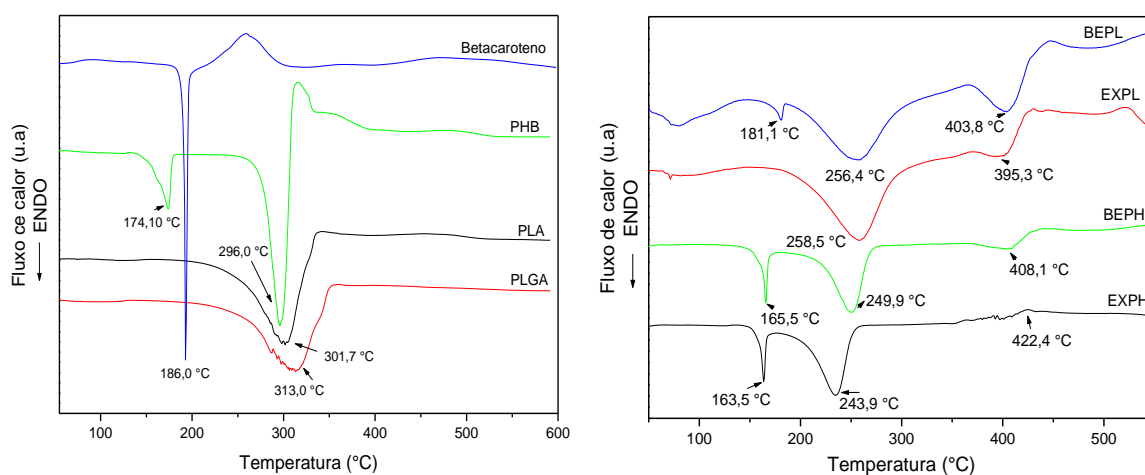


Figura 8. Curva de DSC dos constituintes (A) e das diferentes formulações de nanopartículas (B).

Conforme observado na Figura 8B, às curvas correspondentes as amostras β -caroteno + PLA/PLGA; Extrato + PLA/PLGA e β -caroteno + PHB; Extrato + PHB apresentam eventos endotérmicos muito similares para as nanopartículas formuladas com os mesmos polímeros.

Nas amostras β -caroteno + PHB e Extrato + PHB existem dois eventos que não são equivalentes aos dos seus constituintes, provavelmente devido à interação entre o pigmento e o polímero empregado, característica esta também presente nas demais nanopartículas (β -caroteno + PLA/PLGA e Extrato + PLA/PLGA).

Uma característica observada na amostra β -caroteno + PLA/PLGA é a presença de um evento endotérmico em 181,1 °C, que equivale à temperatura de fusão do β -caroteno, já que na análise referente a este constituinte puro podemos visualizar que a fusão do mesmo ocorre em torno dessa temperatura (Figura 8A). Nas nanopartículas contendo o extrato da microalga não foram observados eventos adicionais que caracterizassem a presença deste constituinte, quando comparadas com as amostras contendo o padrão de β -caroteno. Esta característica pode ser justificada devido à composição muito similar destes constituintes, em termo de estruturas químicas. Sendo assim, na análise de DSC não foi possível captar estas diferenças.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo projeto Rede Nanofotobiotec (AUX-PE-NANOBIOTEC 769/2009) e bolsa de mestrado da primeira autora, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo auxílio financeiro do Projeto (RED0017/2013), à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo apoio na realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), ao Laboratório de Nanotecnologia Supercrítica pela colaboração nas análises de tamanho de partícula e potencial zeta e ao Grupo de Energia e Ciência de Materiais do Instituto de Química da UFBA pela colaboração nas análises térmicas.

Referências

- ANAND, P. et al. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 330-338, 2010.
- ANDERSON, A.J., DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- AUWETER, H. et al. Supramolecular structure of precipitated nanosize β -carotene particles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 2188-2191, 1999.
- CAMPOS, M. I; FIGUEIREDO, T.V. B; SOUSA, L. S; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 338-346, 2014.
- CARASTAN, D. J. **Obtenção e caracterização reológica de nanocompósitos de polímeros estirênicos**. 2007. 262 p. Tese (Doutorado em Engenharia), Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- CAO-HOANG, L.; FOUGÉRE, R.; WACHÉ, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into poly lactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 124, p. 42-49, 2011.
- CAO-HOANG, L.; WACHÉ, Y. **Carotene dispersion in liquid media**. In L. Haugen & T. Bjornson (Eds.), *Betacarotene: Dietary sources, cancer and cognition*, p. 283-298. New York: Nova Publisher, 2009.
- CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A.; VON HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: a chemometric approach. **Journal of Chromatography**, v. 912, p. 61-71, 2001.
- CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENASA, I.; FLOROU-PANERIA, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 5-11, 2013.
- CHU, B. et al. Preparation and Characterization of β -Carotene Nanodispersions Prepared by Solvent Displacement Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6754-6760, 2007.
- DE PAZ, E. et al. Formulation of β -carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-on- water emulsions for application as natural colorant. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 17-27, 2012.
- FONTANIVE, V. C. P. et al. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, p. 549-558, 2014.

- GIREESH, T. et al. Production of deuterated β -carotene by metabolic labeling of *Spirulina platensis*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 447-449, 2001.
- GOMEZ, J.G.C., BUENO-NETTO, C.L. Biodegradable plastics production by bacteria. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, p. 24-29, 1997.
- GONZÁLEZ-REZA, R. M. et al. Nanocapsules of β -carotene: thermal degradation kinetics in a scraped surface heat Exchange (SSHE). **Food Science and Technology**, v. 60, p. 124-130, 2014.
- HIYAMA, T.; NISHIMURA, M.; JOHNSON, B. C. Energy and Electron Transfer Systems of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Photosynthetic and Respiratory Cytochrome Systems of the Pale Green Mutant. **Plant Physiology**, v. 44, p. 527-534, 1969.
- ISLAM, S.; Mohammad, F. Natural Colorants in the Presence of Anchors So-Called Mordants as Promising Coloring and Antimicrobial Agents for Textile Materials. **ACS Sustainable Chemistry Engineering**, v. 3, p. 2361-2375, 2015.
- KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M. F.; CHAECOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 419-427, 2012.
- KIBBE, A.U. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. London: Pharmaceutical Press, 2000.
- KIM, J.; SEO, T.; LIM, S. Preparation of aqueous dispersion of β -carotene nanocomposites through complex formation with starch dextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 256-263, 2013.
- KÖHN, S. et al. **Aggregation and Interface Behaviour of Carotenoids**. In: Basel, B., Carotenoids, vol. 4: Natural Functions, p. 53-98. New York: Springer, 2008.
- LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 33-43, 2007.
- LIU, Y.; YIN, H.; YUAN, S.; CHEN, Z. Influence of particle characteristics and E/Z-isomer ratio on the colour of concentrated β -carotene dispersions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1450-1456, 2010.
- LIU, X. et al. Increasing Carotenoid Bioaccessibility from Yellow Peppers Using Excipient Emulsions: Impact of Lipid Type and Thermal Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8534-8543, 2015.
- LIANG, R. et al. Stability and Bioaccessibility of β -Carotene in Nanoemulsions Stabilized by Modified Starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1249-1257, 2013.

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

LOBATO, K. B. S. et al. Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. **Food Science and Technology**, v. 60, p. 8-14, 2015.

MENDONÇA, T. A. **Carotenoides da microalga *Spirulina platensis*: obtenção e avaliação da atividade antioxidante**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2014.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Carotenoids from Guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and Structure Elucidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 145-151, 1998.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods Critical comparison. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, p. 90-122, 2011.

MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, p. 1477-1491, 2006.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Poly (D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal and Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 614-625, 2000.

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

REN, J. et al. Preparation, characterization and properties of binary and ternary blends with thermoplastic starch, poly(lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate). **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 576-582, 2009.

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

RIBEIRO, H. S.; CRUZ, R. C. D. Biliquid foams containing carotenoids. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, p. 84–88, 2005.

ROCHA, G. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Process**, v. 90, p. 37-42, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, p. 64, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Harvest plus handbook for carotenoid analysis**. Washington, DC e Cali: International Food Policy Research Institute e International Center for Tropical Agriculture, p.58, 2004.

SANTOS, P. P. D. et al. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 107, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas polimérica nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SILVA C.; MARTINI E.; TAVARES G.; SILVEIRA T.; DE OLIVEIRA M. C.; TEIXEIRA H. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, p.17-21, 2006.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I. **Polímeros**, v. 22, p. 96-100, 2012.

SHARMA, L., MALLICK, N. Accumulation of poly-b-hydroxybutyrate in *Nostocmuscorum*: regulation by pH, light– dark cycles, N and P status and carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1304-1310, 2005.

TAN, C. P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 661-671, 2005.

VALDUGA, E; TATSH, P.O; TIGGEMANN, L; TREICHEL, H; TONIAZZO, G; ZENI, J; LUCCIO, M. Produção de carotenoides: Microrganismo como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

WANG, J. et al. Vitamin A equivalence of *Spirulina* β -carotene in Chinese adults as assessed by using a stable-isotope reference method. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.1730-1737, 2008.

WISNIEWSKA, A.; WIDOMSKA, J.; SUBCZYNSKI, W. K. Carotenoid-membrane interactions in liposomes: effect of dipolar, monopolar, and nonpolar carotenoids. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 475-484, 2006.

XAVIER, A. O. et al. Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. **Química nova**, v. 35, p. 2057-2062, 2012.

YI, J. et al. Cellular Uptake of β -Carotene from Protein Stabilized Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Homogenization–Evaporation Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 1096-1104, 2014.

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.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L. et al. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsione-diffusion method for food applications. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1362-1368, 2011.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, p. 1526-1532, 2007.

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, v. 7, p. 2956-2966, 2007.

CONCLUSÃO GERAL

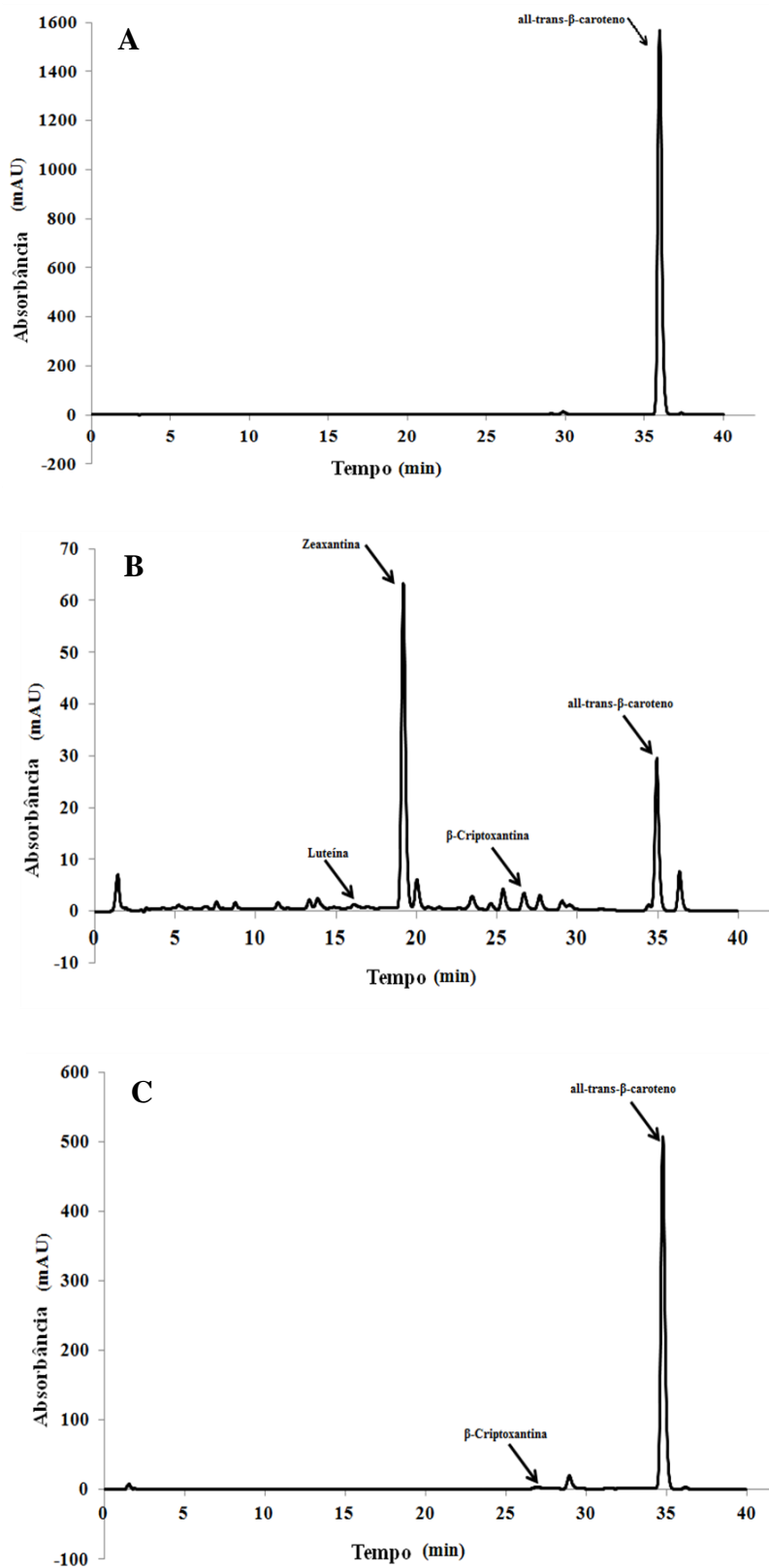
Os resultados apresentados ao longo deste estudo demonstram que foi possível obter nanopartículas contendo o extrato rico em β -caroteno obtido a partir da microalga *Spirulina platensis* e de β -caroteno comercial, por meio da técnica de deslocamento de solvente e os polímeros PLA/PLGA, assim como o PHB.

O diâmetro médio das nanopartículas presentes nas nanoemulsões foi de $171,73 \pm 17,28$ nm, não ocorrendo diferença significativa entre as amostras, sendo que o potencial zeta variou de $-4,08 \pm 1,37$ (Extrato + PLA/PLGA) a $-11,34 \pm 2,65$ mV (β -caroteno + PHB). As nanoemulsões apresentaram cor tendendo ao laranja, não diferiram com relação à viscosidade, sendo que o pH da amostra β -caroteno + PHB foi similar tanto à Extrato + PHB, preparadas com o mesmo polímero, quanto à Extrato + PLA/PLGA, o que demonstrou diferença em relação à β -caroteno + PLA/PLGA.

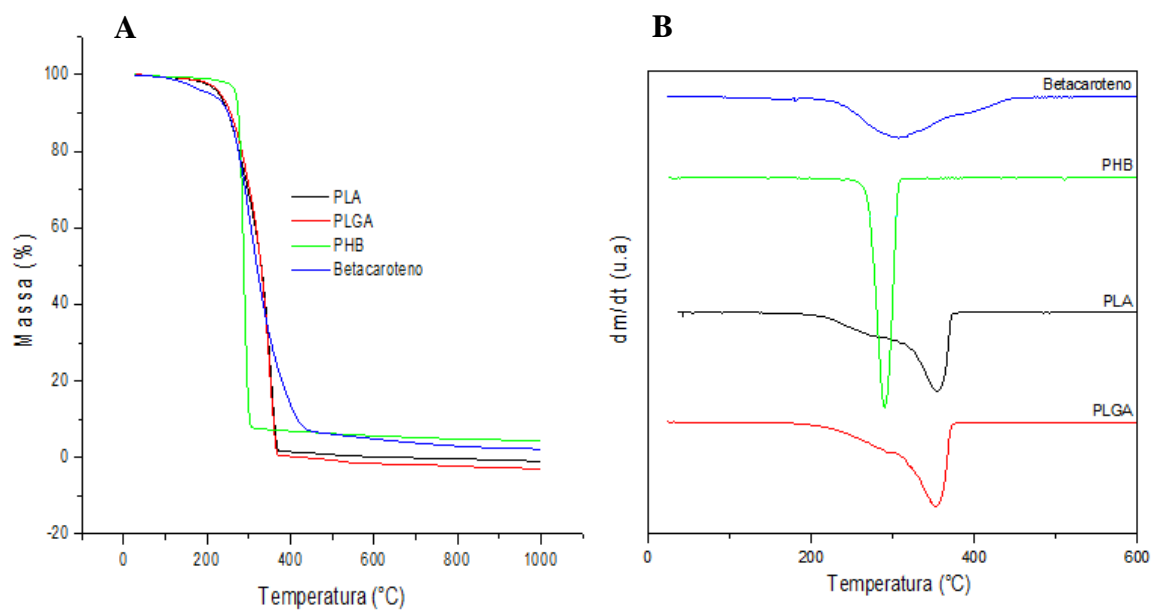
Os espectros UV-Vis das nanopartículas liofilizadas contendo o extrato da microalga foram menos afetados em comparação às com o padrão de β -caroteno, apresentando também melhor dispersibilidade em água e eficiência. O all-*trans*- β -caroteno foi o carotenoide majoritário do extrato de *Spirulina platensis* e nas nanopartículas preparadas com esta microalga a zeaxantina se destacou em relação ao β -caroteno, independente do polímero empregado.

Foram obtidas nanopartículas com formato esférico, circundadas pela parede polimérica. Considerando a estabilidade térmica, o polímero PHB permitiu a formação de nanopartículas mais estáveis do que o PLA/PLGA. Entretanto, no que se refere à aplicação na indústria de alimentos, ambos os polímeros permitiram a formação de nanopartículas estáveis, porque as temperaturas utilizadas no processamento de alimentos são, geralmente, menores do que 185°C .

APÊNDICE A. Cromatogramas: β -caroteno padrão (A); nanopartículas liofilizadas contendo o extrato de carotenoides da microalga *Spirulina platensis* com os polímeros PLA/PLGA (B); nanopartículas liofilizadas contendo o padrão comercial de β -caroteno com os polímeros PLA/PLGA (C).



APÊNDICE B. Curvas TGA (A) e DTG (B) para os constituintes das nanopartículas.



APÊNDICE C. Resumo expandido apresentado na forma de pôster no 13º Congresso Brasileiro de Polímeros.



PREPARO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO CAROTENOIDES DA MICROALGA *Spirulina platensis*

Larissa S. Assunção¹ (M)*, TÁCILA A. MENDONÇA¹, Elaine J. L. da Conceição² (M), Priscila Q. M. Bezerra¹ (M), Luciana R. dos Santos² (IC), Tayane de J. Freitas² (IC), Itaciara L. Nunes^{1,2} (D)

1. Universidade Federal da Bahia – UFBA, Faculdade de Farmácia, Salvador – BA, larissa.sanut@yahoo.com.br
2. Universidade Federal da Bahia – UFBA, Escola de Nutrição, Salvador – BA

Resumo:

Os pigmentos naturais vêm sendo utilizados em larga escala como corantes em alimentos e umas das possíveis fontes dos mesmos são as microalgas, tais como a *Spirulina platensis* como uma alternativa para a produção de carotenoides. Contudo, além de serem lipossolúveis, estes compostos são instáveis quando submetidos a diversos fatores. O preparo de nanopartículas contendo pigmentos naturais pode aumentar a estabilidade dos mesmos. O presente estudo teve como objetivo obter nanopartículas de carotenoides obtidos a partir da microalga *Spirulina platensis*, contendo o polímero PHB (Polihidroxibutirato) através do método de deslocamento de solvente. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada para caracterização morfológica das nanopartículas, que apresentaram de modo geral formato esférico e tamanhos diversos (780-840 nm). Os resultados demonstram a viabilidade do uso do polímero PHB associado à metodologia de deslocamento de solvente no preparo de nanopartículas.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*, nanopartículas, PHB

Preparation of nanoparticles containing carotenoids of Spirulina platensis

Abstract:

Natural pigments have been used on a large scale as food dyes. One of the possible sources of these pigments are microalgae such as *Spirulina platensis*, an alternative source for the production of pigments alike the carotenoids. However, besides its hydrophobic characteristics, this compound also presents instability when submitted to several physical and environmental factors. The preparation of natural pigment nanoparticles can raise the stability of such pigments due to its ability to protect, isolate and control the release of bioactive ingredients. The aim of this research is to produce carotenoid nanoparticles obtained from *Spirulina platensis*, containing the polymer PHB (polyhydroxybutyrate) by solvent displacement method. Transmission Electron Microscopy (TEM) was used for morphological characterization of nanoparticles, resulting in particles with different sizes (780-840 nm). The results demonstrate the feasibility of using the PHB polymer associated with the solvent displacement method for the preparation of nanoparticles that contains the extract.

Keywords: *Spirulina platensis*, nanoparticles, PHB

Introdução

O encapsulamento de pigmentos naturais pode aumentar a estabilidade destes compostos e a manutenção da cor ao ser aplicado em alimentos, fármacos e embalagens. Além disso, esta técnica pode preservar características benéficas destes biocompostos como ação antioxidante. As principais substâncias de interesse para o encapsulamento são lipídios, proteínas, vitaminas e pigmentos naturais [1]. Desta forma, estes compostos ativos podem ser encapsulados a dimensões micro e principalmente nano, em cápsulas de barreira de polímeros [2].

As nanopartículas são definidas como partículas sólidas coloidais incluindo as nanoesferas como também as nanocápsulas. Uma de suas principais características é o seu tamanho que fica geralmente em torno de 5-10 nm com um limite superior de tamanho de aproximadamente 1000 nm, embora a média de tamanho seja de 100-500nm. É notória a importância das nanopartículas no que diz respeito ao processo de encapsulamento, já que as barreiras poliméricas são utilizadas para proteção contra ação de pH e luz, por exemplo [3].

Os pigmentos extraídos de fontes naturais vêm sendo utilizados em larga escala como corantes em alimentos, devido à preocupação cada vez maior por parte dos consumidores do uso de aditivos químicos pela indústria alimentícia. Dentre as fontes de pigmentos naturais se encontram às microalgas [4] [5].

A *Spirulina* faz parte do reino Bactéria, divisão Cianobactéria, da classe Cianofíceas e da família Oscillatoriaceae e neste gênero a espécie mais importante é a *Spirulina platensis*, que pode ser classificada como uma microalga azul-verde que possui pigmentos fotossintéticos incluindo clorofila a, luteína, β -caroteno, ficocianina e aloficocianina [6]. Pode apresentar β -caroteno em sua biomassa em níveis de 0,5 mg/kg/1-2 g/kg de matéria seca [7] [8].

No caso de substâncias sensíveis como o β -caroteno, carotenoide insolúvel em sistemas aquosos e de forte potencial como pigmento, por exemplo, suas características podem ser preservadas pelo processo de nanoencapsulamento o qual, inclusive, pode aumentar sua biodisponibilidade. Uma das metodologias utilizadas para obtenção destas nanopartículas é a metodologia de deslocamento de solvente [9].

O método de deslocamento do solvente (ou nanoprecipitação) permite a formação de nanopartículas. É um método que consiste na precipitação ou deposição

interfacial de um polímero pré-formado, uma vez que ocorre na interface de uma emulsão óleo/água. Neste processo, ocorre a dispersão da fase interna na fase externa, sob agitação magnética, caracterizando uma emulsificação espontânea com a formação de um sistema opalescente devido à miscibilidade de ambas as fases. Posteriormente há a remoção do solvente orgânico à pressão reduzida, formando-se as nanopartículas, como resultado da difusão rápida do solvente do polímero, através da fase aquosa. Este método possui vantagens como baixa aplicação de energia, elevada eficiência de processo, e elevada reprodutibilidade [10].

O polihidroxibutirato (PHB) é o polímero mais comum da família dos PHAs (polihidroxicanoatos), sendo o primeiro a ter sido descoberto. Historicamente é o que tem sido mais estudado e é obtido a partir da bactéria *Cupriavidus necator* por fermentação da glicose em meio limitante de fonte de nitrogênio ou fósforo. O PHB é um material por excelência biocompatível e seus atributos o fazem objeto de interesse das indústrias química e farmacêutica para o desenvolvimento de produtos que vão desde hormônios até os mais variados produtos [11].

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo obter nanopartículas de β -caroteno contendo o polímero PHB (Polihidroxibutirato) através do método de deslocamento de solvente, com intuito de preservar suas características funcionais e viabilizar sua possível aplicação em embalagens.

Experimental

A extração de carotenoides da microalga *Spirulina platensis* foi realizada de acordo com o método descrito por Mendonça et. al (2014). Aproximadamente 0,5 g de amostra foram pesadas e então foram adicionados 15 mL do saponificante (KOH etanólico a 10%) e 15 mL do solvente de extração (etanol). Esta mistura foi então submetida à homogeneização por 30 minutos em uma mesa agitadora tipo Shaker (modelo CT 712, Cientec, São Paulo, Brasil) na velocidade de rotação de 50% e em uma temperatura de 35°C. Este procedimento foi repetido 5 vezes, com o objetivo de cumprir o objetivo do planejamento (5 extrações de 30 minutos cada). O extrato obtido após esta etapa foi transferido para um funil de separação contendo éter de petróleo: éter etílico (1:1 – 10 mL de cada solvente) e submetido a lavagens com água para retirada do etanol e do KOH etanólico a 10% [12].

O preparo das nanopartículas contendo o extrato obtido a partir da microalga foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Ribeiro et. al (2008), com modificações. O extrato seco foi dissolvido em 25 mL de acetona. A esta mistura foram adicionados 70 mg/L de α -tocoferol e então dissolvidos 100 mg do polímero PHB (Polihidroxibutirato). Esta mistura foi adicionada gota a gota em 25 mL de solução aquosa contendo 1% de Tween 20, com agitação magnética. A seguir, foram adicionados 70 mL de água destilada. Após obter uma mistura homogênea, a acetona presente foi então evaporada em Rotaevaporador (TECNAL[®] - Modelo TE-211). Ao final, esta solução foi congelada a -80°C por cerca de 24h e submetida à liofilização em um Liofilizador LS 3000 (TERRONI[®]), por aproximadamente 72h [9].

A morfologia das nanopartículas foi examinada através de Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1230) utilizando o método de contraste negativo. Para o preparo da solução a ser analisada, a amostra foi dissolvida em 20 μ l de água destilada em um *ependorf*. Esta solução foi então transferida para uma placa e mantida por 10 minutos ao ar livre até a completa secagem. Após esta etapa, adicionou-se 5 μ l de solução de ácido fosfotúngstico 1% e a amostra foi submetida à análise por MET, sendo observada em 600 kV.

Resultados e Discussão

A metodologia de nanoprecipitação, também conhecida como método de deslocamento de solvente, vem ganhando destaque em estudos científicos. Ela envolve a precipitação de um polímero pré-formado a partir de uma solução orgânica e a difusão do solvente orgânico no meio aquoso, na presença ou ausência de um surfactante [13]. Baseando-se na metodologia proposta por Ribeiro et. al (2008), com adaptações, foram obtidas nanopartículas contendo o extrato de carotenoides (Fig. 1A).

Pode-se observar na Fig. 2B as nanopartículas dissolvidas em água destilada. Os carotenoides apresentam elevada hidrofobicidade que os tornam insolúveis em sistemas aquosos. Assim, esta capacidade dos carotenoides de se apresentarem solúveis e dispersos em água através da incorporação em nanopartículas possibilita uma forma diferenciada de aplicação em certas matrizes, tais como em embalagens antioxidantes [9].

De acordo com o observado através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Fig. 2), as partículas apresentaram tamanhos diversos (780-840 nm) e formato esférico bem definido. As nanopartículas poliméricas são preparadas a partir de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, em tamanho que gira em torno de 10-1000 nm em, onde o composto ativo é dissolvido, aprisionado, encapsulado ou ligado a uma matriz de nanopartículas [13].

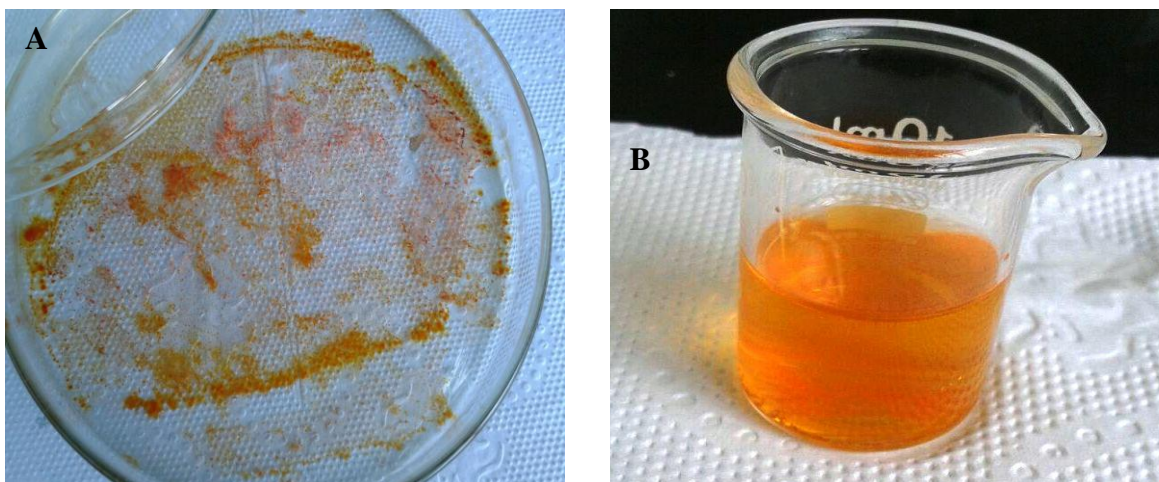


FIGURA 1. Nanopartículas contendo carotenoides da microalga *Spirulina platensis* obtidas através da metodologia de deslocamento de solvente (A) nanopartículas dissolvidas em água (B).

Ribeiro et al. (2008), avaliaram a formação de nanodispersões contendo β -caroteno pelo método de deslocamento de solvente, utilizando os polímeros Poli (ácido-lático) (PLA) e Poli (ácido lático e ácido glicólico) (PLGA) para o preparo de uma solução orgânica que foi então adicionada a uma solução aquosa contendo um surfactante, com o objetivo de formar as nanodispersões de β -caroteno. Foram produzidas nanopartículas enriquecidas com β -caroteno/PLA e PLGA com diâmetro inferior a 80 nm e de formato esférico bem definido. Esta característica mostra semelhança com as nanopartículas de β -caroteno obtidas nesse trabalho (Fig. 2), que em sua maioria também apresentaram formato esférico bem definido, entretanto, com diâmetro variando de 780-840 nm, superiores ao citado pelo autor [9].

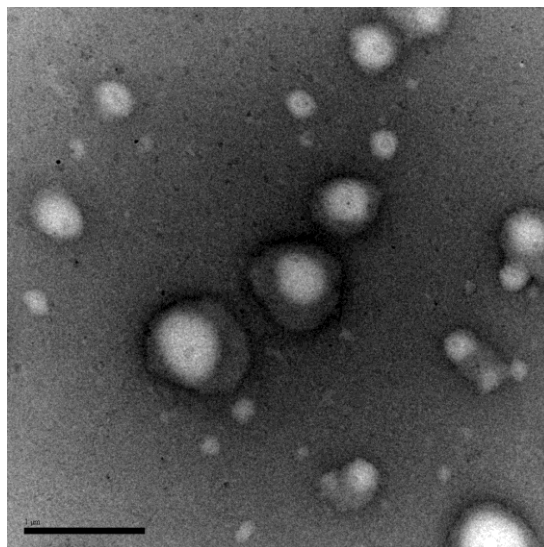


FIGURA 2. Nanopartículas observadas através da MET por contraste negativo, observadas a 600 kV.

Um estudo avaliou o efeito da metodologia de deslocamento de solvente para o preparo de nanopartículas carregadas com a curcumina, usando PLGA e um estabilizador de polietilenoglicol (PEG), com o diâmetro da partícula de cerca de 80 nm, levando um aumento na absorção celular e também em uma melhor biodisponibilidade *in vivo* da curcumina livre [14]. Este dado se distancia um pouco das nanopartículas obtidas (Figura 2), muito provavelmente devido aos tipos de polímeros usados, que diferenciam no que diz respeito à estrutura química dos mesmos.

O PLGA é um polímero sintético biodegradável derivado do ácido lático e o PHB é um polihidroxibutirato obtido a partir da bactéria *Cupriavidus necator* por fermentação da glicose. Em seu metabolismo as bactérias produzem acetil-coenzima-A (acetil-CoA), que é convertido em PHB por três enzimas biossintéticas [15].

A estrutura do PHA é composta por ácidos graxos 3-hidroxi. O PHB forma uma classe de PHAs normalmente referido como PHAs de cadeia curta de comprimento. Alguns autores sugerem que o PHB "homopolímero", sintetizado por bactérias, sempre contém menos do que 1% molar de monómeros de 3-hidroxivalerato [15].

Em um estudo realizado por Wu et al. (2008), nanopartículas de quercetina foram desenvolvidas utilizando a mesma técnica de deslocamento de solvente, porém utilizando o polímero PVA (álcool polivinílico), o que gerou um tamanho de partículas <85 nm. [16]. Desta forma, pode-se concluir que o tamanho e formato das

nanopartículas podem ser influenciados pela natureza do polímero empregado, além das condições empregadas no processo.

Conclusões

O uso do polímero PHB associado à técnica de deslocamento de solvente mostrou-se viável na formação de nanopartículas contendo carotenoides da microalga *Spirulina platensis*. O diâmetro das partículas apresentou-se condizente com o observado na literatura científica. Desta forma, a produção dessas nanopartículas pode ser uma alternativa viável, para possível aplicação em embalagens antioxidantes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pela parceria para a realização das análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado e financiamento do Projeto Rede Nanofotobiotec (AUX-PE-NANOBIOTEC 769/2009).

Referências Bibliográficas

1. M. Siegrist; M.E. Cousin; H. Kstenholz; A. Wiek. *Appetite*, 2007, 49.
2. S. S. Jyothi; A. Seethadevi; K.S Prabha; P. Muthuprasanna; P. Pavitra. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2012, 3.
3. C.E. Mora-Huertas; H. Fessi; P.A. Elaissari. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 38.
4. A. Mortensen. *Pure Appl. Chem.*, v. 78, n. 8, p. 1477–1491, 2006.
5. E. Valduga; P. O. Tatsh; L. Tiggemann; H. Treichel; G. Toniazzo; J. zeni; M. Luccio. *Rev. Quim. Nova*. Vol. 32, No. 9, 2429-2436, 2009.
6. C. Chen; W. Liuan; G. Tsai. *Journal of Food Protection*. v. 61, p. 1124 -1128, 1998.
7. T. Gireesh; A. Jayadeep; K. N. Rajasekharan; V. P. Menon; M. Vairamany; G. Tang; P. P. Nair; P. R. Sudhakaran. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 447–449, 2001.
8. E. Christaki; E. Bonos; I. Giannenasas; P. Florou-Paneria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n. 1, p. 5-11, jan., 2013.
9. H.S. Ribeiro; B. Chu; S. Ichikawa; M. Nakajima. *Food Hydrocolloids*. 2008, 22.
10. E.B. Souto; P. Severino; M.H.A. Santana. *Polímeros*. 2012, 22.

11. L.A.S. Costa; C. S. Miranda; M.I. Campos; D. J. Assis; J. I. Druzian. Patent 2237-0722, 2013; *GEINTEC*, 2013, vol.3/n.2/p.055-069.
12. T.A. Mendonça. Tese de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.
13. B. V. N. Nagavarma; K. S. Y. Hemant; A. Ayaz; L. S. Vasudha; H. G. Shivakumar. *Academic Sciences*. 2012, 5.
14. Z. Fang; B. Bhandaria. *Trends in Food Science & Technology*. 2010, 21.
15. R.A.J. Verlinden; D.J. Hill; M.A. Kenward; C.D. Williams; I. Radecka. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102.
16. T. H. Wu; F. L. Yen; L. T. Lin; T. R. Tsai; C. C. Lin; T. M. Cham. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 346.

APÊNDICE D. Prospecção tecnológica apresentada como trabalho completo no *5th International Symposium on Technological Innovation* e posteriormente selecionada pela comissão organizadora do evento para publicação na revista Geintec.



ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Larissa Santos Assunção – larissa.sanut@yahoo.com.br

*Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal da Bahia – UFBA*

Camila Duarte Ferreira – camiladuartef@hotmail.com

*Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal da Bahia – UFBA*

Elaine Janaína Linhares da Conceição – elainejlc@hotmail.com

*Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição,
Universidade Federal da Bahia – UFBA*

Itaciara Larroza Nunes – itaciara@ufba.br

*Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição;
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal da Bahia - UFBA*

Resumo

Com o advento da nanotecnologia, houve o desenvolvimento de técnicas envolvendo processamento, fabricação e aplicação de estruturas, com forma e tamanho controlados, sendo que na indústria de alimentos, estas formulações, tanto na faixa micrométrica como nanométrica, vêm sendo utilizadas com o objetivo de favorecer o produto final. Tendo em vista a importância tecnológica dessa técnica e do grande interesse nacional e internacional, principalmente no ramo da indústria alimentícia, sobre os benefícios do encapsulamento, o presente estudo prospectivo teve como objetivo avaliar o panorama mundial relativo ao tema em questão, correlacionando-o com os documentos de patentes depositados. Para tanto, realizou-se uma pesquisa das patentes na base de dados europeia Espacenet®, utilizando os descritores do tema em estudo associados aos códigos de classificação. As informações encontradas foram compiladas em gráficos e discutidas. Pôde-se observar que

o maior número de patentes referiu-se ao código A23L1/00 - alimentos ou produtos alimentícios: a sua preparação ou tratamento e houve um crescimento exponencial em relação ao depósito de patentes nos últimos 10 anos, sendo os Estados Unidos o país líder em número de patentes depositadas (60%). A Firmenich e CIE lidera o *ranking* com mais patentes depositadas. Em relação à área de atuação, predomina a indústria alimentícia (69%). No que diz respeito ao Brasil, o país aparece com apenas 1 patente detentora desta tecnologia, sendo um número bastante reduzido o que mostra a falta de incentivo neste setor. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que, apesar de ser uma tecnologia recente, observa-se uma tendência ao crescimento de depósito de patentes.

Palavras-chave: encapsulamento, compostos bioativos, aditivos alimentares.

Abstract

With the advent of nanotechnology, there was the development of techniques involving processing, manufacture and application of structures, with controlled shape and size, and in the food industry, these formulations (in micrometer and nanometer range), have been used with the objective of promote the final product. Considering the technological importance of this technique and the great national and international interest, especially in the food industry about the benefits of encapsulation, the present prospective study aimed to assess the outlook for the global theme, correlating it documents filed with the patents. So, a survey of the patent in the European database Espacenet ® was carried out, using the descriptors of the topic under study associated with classification codes. The information found in charts were compiled and discussed. After analyzing the graphs, it was observed that the largest number of patents referred to the code A23L1/00 and there was a slight upward trend of patent applications from the last 10 years, and the United States is the leading country in number of patents deposited. Firmenich and CIE leads the ranking with more patents filed. Regarding the performance area, dominates the food industry (69%). With respect to Brazil, the country appears only 1 of this technology patent holds, with a very small number, which shows the lack of incentive in this sector. Based on these results, it was concluded that, despite being a new technology, there is the growth of patent applications, currently the United States leading in number of patents.

Keywords: encapsulation, bioactive compounds, food additives.

1. INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos, formulações na faixa micrométrica e/ou nanométrica vêm sendo utilizadas para aumentar a vida de prateleira de alimentos perecíveis bem como incorporar vitaminas e compostos nutracêuticos a fim de oferecer um produto diferenciado no mercado e que possibilite ações benéficas à saúde humana, como anti-hipertensiva, antimicrobiana, antioxidante ou antiinflamatória (Herrero *et al.*, 2006).

A fim de propor novas formas de utilização de substâncias bioativas em diversos setores industriais, a técnica de nanoencapsulamento pode surgir como ferramenta útil e de grande interesse em estudos científicos, todavia os mesmos ainda são escassos. Esta técnica

tem como objetivo proteger, isolar, controlar a liberação de ingredientes, dentre outros (MOREIRA, 2007; EZHILARASI et al., 2013). Alguns dos objetivos da encapsulação de componentes de alimentos são: reduzir as interações do núcleo com fatores ambientais, retardando alterações que podem resultar em perda de aroma, alteração de cor ou perda do valor nutricional (AZEREDO, 2005).

As principais substâncias de interesse para o encapsulamento são lipídios, proteínas, vitaminas e pigmentos naturais. O encapsulamento de colorantes naturais pode aumentar a estabilidade destes compostos e a manutenção da cor ao ser aplicado em alimentos, fármacos e embalagens. Além disso, esta técnica pode preservar características benéficas destes biocompostos como ação antioxidante e antimicrobiana (SIEGRIST et al., 2007).

No cenário da tecnologia relativa ao encapsulamento de produtos alimentícios, para manutenção de empresas numa situação economicamente viável em um ambiente de competitividade, faz-se necessário o fator inovação. Nesse contexto, o domínio sobre o fluxo de informações e o conhecimento das tendências tecnológicas futuras, bem como a antevisão de possíveis rupturas no padrão de competição de uma dada indústria, se converte em uma poderosa ferramenta de competitividade e de racionalização dos esforços de capacitação das empresas. Para sistematizar as informações referentes às inovações tecnológicas que podem identificar as oportunidades e necessidades relevantes para a pesquisa no futuro, são realizados os trabalhos de prospecção (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Com base no exposto e diante do grande interesse nacional e internacional, principalmente no ramo da indústria alimentícia, sobre os benefícios do encapsulamento nesta área, o presente estudo prospectivo teve como objetivo avaliar o panorama mundial relativo ao tema em questão, correlacionando-o com os documentos de patentes depositados.

2. DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA

2.1 Aspectos gerais sobre o encapsulamento

O encapsulamento é um processo de empacotamento de partículas (ex: compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas, conservantes) em cápsulas comestíveis. O material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (AZEREDO, 2005). De acordo com o seu tamanho, as cápsulas são classificadas como nanopartículas ou micropartículas, variando de 0,01 a 0,2 μm e de 1 a 100 μm , respectivamente. Acima de 100 μm elas são denominadas de macropartículas (SUAVE *et al.*, 2006). Com o advento da nanotecnologia, houve o desenvolvimento de técnicas envolvendo processamento, fabricação e aplicação de estruturas, com forma e tamanho controlados (PETERS et al., 2011; DICKINSON; 2012; ASSIS et al., 2012; EZHILARASI et al., 2013). O objetivo da nanotecnologia, seguindo a proposta de FEYNMAN (1992), é o de criar novos materiais e desenvolver novos produtos e processos baseados na crescente capacidade da tecnologia moderna de detectar e manipular átomos e moléculas.

2.2 Métodos de encapsulamento

Os diversos setores industriais buscam incessantemente melhorar a qualidade dos seus produtos, o que necessariamente passa pelo conhecimento, domínio e aprimoramento das técnicas de produção. Do ponto de vista tecnológico, são conhecidas e propostas algumas técnicas tradicionais para a precipitação de partículas na ordem nanométrica e/ou micrométrica, tais como o *spray drying*, recristalização por solvente orgânico e liofilização (PRIANO *et al.*, 2011).

A escolha do método mais adequado depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (SUAVE *et al.*, 2006).

Os métodos físicos englobam as técnicas de: *spray-dryer*, *spray-cooling*, pulverização em banho térmico, leito fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização, os métodos químicos incluem: inclusão molecular e polimerização interfacial e, entre os métodos físico-químicos estão os processos de coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (RABELLO, 2009; SUAVE *et al.*, 2006).

2.3 Materiais encapsulantes

O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas (SUAVE *et al.*, 2006).

O tipo de material de parede utilizado irá influenciar tanto na estabilidade da emulsão antes da secagem, quanto na capacidade de proteção do produto em pó. O material de parede ideal deve ter propriedades emulsificantes; ser um bom formador de filme na interface; ter baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos; exibir baixa higroscopicidade; liberar o material encapsulado quando desejável no produto final; ter baixo custo; apresentar alta disponibilidade e, por fim, oferecer boa proteção ao encapsulado. Como quase nenhum material de parede possui todas essas propriedades listadas, na prática eles são utilizados em combinação (CARNEIRO, 2011).

3. METODOLOGIA

3.1 Busca de patentes

As patentes foram pesquisadas na base européia Espacenet®, visto que na mesma é possível encontrar patentes publicadas por mais de 80 países.

Para o levantamento de dados nessa base de dados foram utilizados os códigos da Classificação Internacional de Patentes (IPC), conforme demonstrado no Quadro 1, os quais foram cruzados entre si com o intuito de se obter diferentes variações e combinações dentre o tema proposto. Esses códigos possuem as seguintes descrições: A23L1/00 -

alimentos ou produtos alimentícios: a sua preparação ou tratamento; A23L1/0029 - partículas encapsuladas, por exemplo, aditivos alimentares; A23L1/22016 - Encapsulamento; B82Y20/00 – nano-tecnologia para materiais ou ciência de superfície, por exemplo, nanocompósitos; A23L1/0032 - Encapsulado com óleos, lipídios ou mono ou diglicerídeos; A23V2002/00 - Composições de alimentos, a função dos ingredientes alimentares ou processos para alimentos ou produtos alimentares.

As patentes que apresentaram os descritores mais próximos ao tema proposto, Encapsulamento de compostos bioativos em destaque no Quadro 1, foram selecionadas para o tratamento de dados. Apesar dos descritores escolhidos apresentarem 426 patentes publicadas, apenas 80 destas tinha o acesso disponível. Ao ser realizada a análise do número de prioridades destas patentes, observou-se que existem diferentes números para a mesma patente. Desta forma, podemos concluir que, em média, existem patentes sendo protocoladas em vários países diferentes. Esta é uma característica importante que pode estar atrelada ao uso desta tecnologia (encapsulamento), considerada inovadora e que muito ainda precisa ser estudada, principalmente no que diz respeito à nanotecnologia.

Quadro 1. - Busca de patentes por códigos da IPC na base de dados europeia (Espacenet® – EP).

A23L1/00	A23L1/0029	A23L1/22016	A23V2002/00	B82Y20/00	Nº total de patentes
	X	X			1083
X				X	25
	X	X	X		423
			X	X	15
	X		X		2157
		X	X		833

3.2 Tratamentos de dados

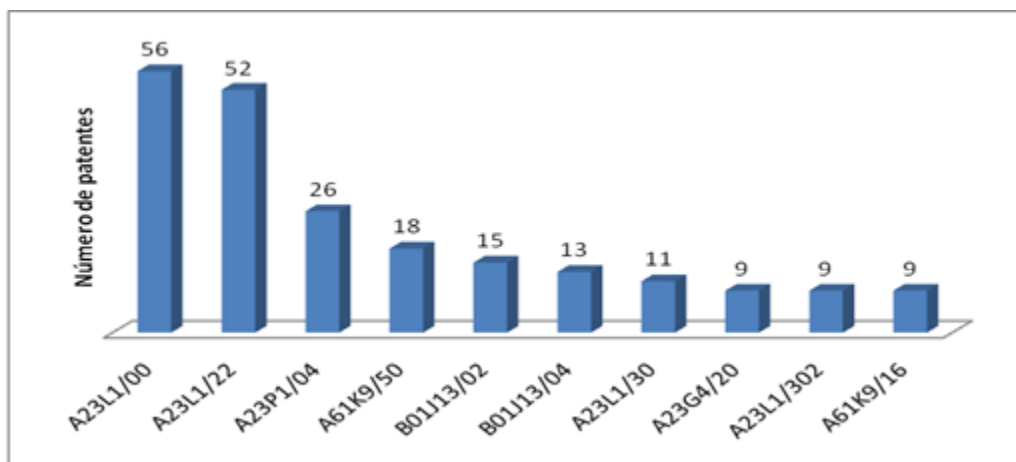
As 80 patentes disponíveis foram exportadas para o programa CSVed 2.2.3 e desse último, para o *Microsoftexcel*. A partir daí, foram criadas planilhas e gráficos referentes ao código de classificação internacional, distribuição de depósitos por país detentor da tecnologia, evolução anual das patentes, depósitos de patentes por empresas e inventores. Cada planilha gerou um gráfico com representação dos 10 itens com maior incidência, com exceção do gráfico referente ao ano de publicação. Neste último, foram demonstrados todos os anos de publicação das patentes, gerando um gráfico acumulado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a distribuição dos 10 códigos de classificação internacional que mais apareceram entre as 80 patentes analisadas do *Espacenet*®. Observou-se que a maioria das patentes depositadas (56 registros) se refere ao código A23L1/00 que trata de alimentos ou produtos alimentícios: a sua preparação ou tratamento. Além disso, pode-se perceber que um grande número de patentes se refere ao código A23L1/22 que trata das partículas encapsuladas, com 52 registros.

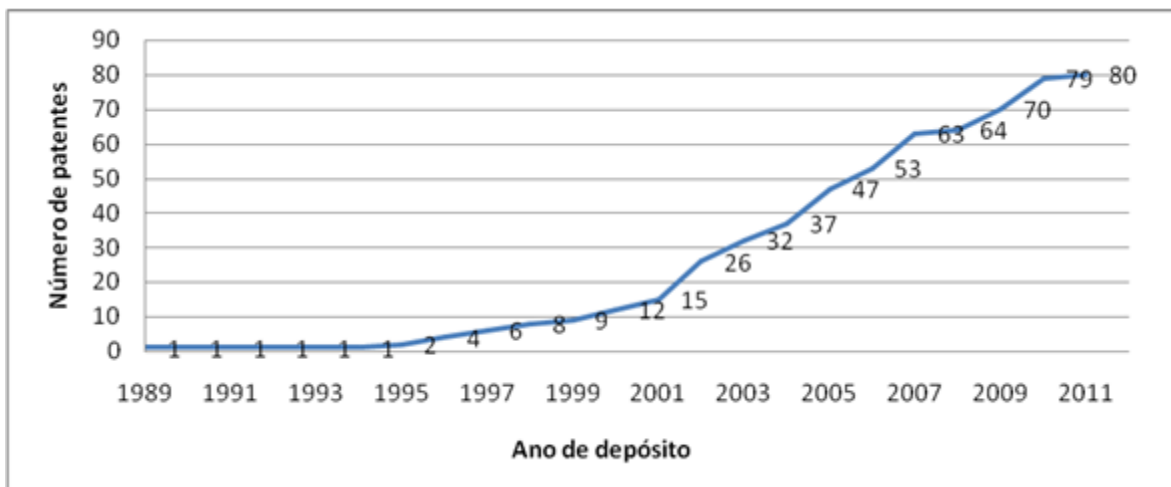
Dentre os outros códigos encontrados, todos possuem relação com o tipo de técnica de encapsulamento empregada (B01J13/04) e/ou a matéria-prima utilizada para a aplicação da técnica (A23L1/30; A23L1/302), além do tamanho das partículas obtidas após o encapsulamento da matéria-prima (A61K9/50; A61K9/16). De maneira geral, entre os 10 códigos de classificação internacional que mais apareceram entre as 80 patentes analisadas, a maioria está inserida na categoria da indústria de alimentos.

Figura 1. Distribuição dos códigos da classificação internacional - Espacenet®



A Figura 2 apresenta a evolução anual de patentes depositadas, referente ao encapsulamento de compostos bioativos. O primeiro registro ocorreu em 1989 até o ano de 2011, perfazendo um total de 22 anos de estudo e apenas 80 documentos depositados, que tinham o acesso disponível. Porém, como foi destacado na seção 3.1 do presente documento, em média, existem patentes sendo protocoladas em vários países diferentes, o que poderia justificar este número baixo de documentos depositados com acesso disponível. Trata-se de uma tecnologia que apresenta um crescimento ao longo do tempo e evolução de depósitos nos últimos anos, sendo observado na Figura 2 (gráfico acumulado) um crescimento exponencial, principalmente nos últimos 10 anos. É, portanto, uma tecnologia ainda pouco explorada e bastante promissora no que diz respeito ao depósito de patentes.

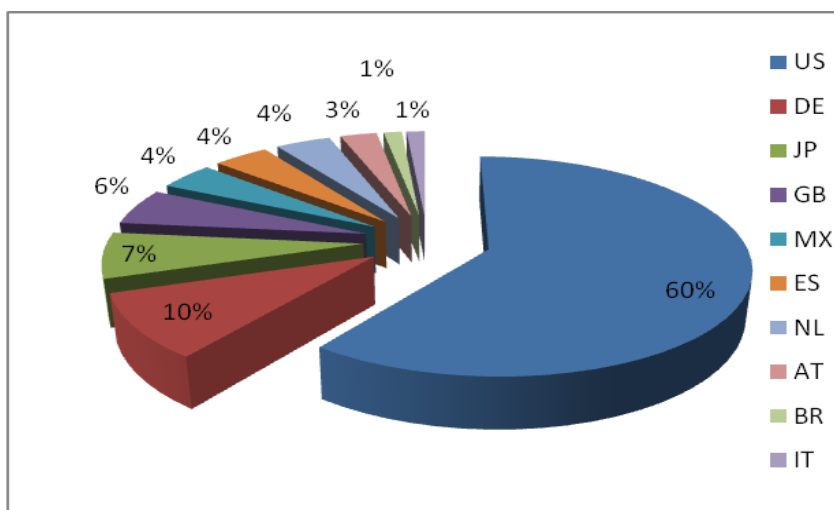
Figura 2. Evolução anual do depósito de patentes no Espacenet® de 1989 a 2011.



A Figura 3 mostra a distribuição dos depósitos de documentos de patentes por países em que se origina a tecnologia patenteada, disponíveis na base de dados do Espacenet®. As patentes sobre essa tecnologia concentram-se em sua grande maioria nos Estados Unidos com 60% dos documentos e em segundo lugar está a Alemanha (DE) com 10%, seguida pelo Japão com 6%.

Esse cenário deixa claro que os países desenvolvidos possuem o domínio da tecnologia pesquisada, pois sabe-se que a técnica de encapsulamento é uma tecnologia considerada cara e que são necessários investimentos no setor.

Figura 3. Distribuição de depósitos de patentes por país de origem - Detentores da Tecnologia – Espacenet®.



Vale ressaltar que o Brasil aparece entre os detentores da tecnologia, com apenas 1 patente das 80 analisadas nesta base de dados. No Brasil, de acordo com informações divulgadas pelo CNPq (2006), os principais setores que utilizam a tecnologia de sistemas

de liberação controlada, como exemplo as técnicas de encapsulamento, se concentram nas áreas farmacêutica, de alimentos e de agrotóxicos. Em todas, o principal objetivo é intensificar o efeito desejado, minimizar a toxicidade e a degradação do agente ativo.

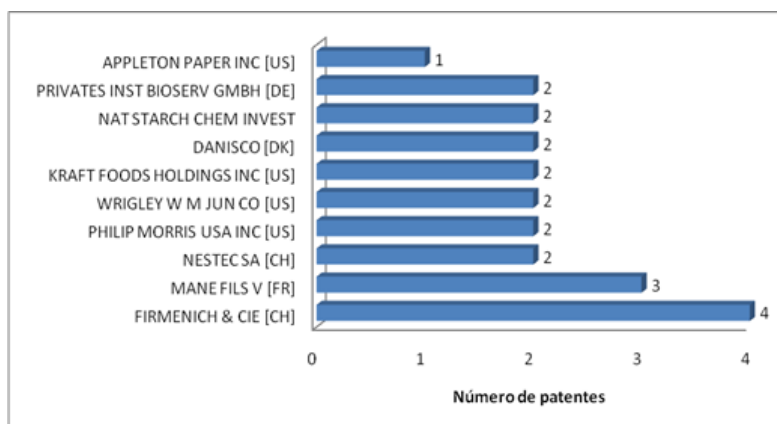
De acordo com Suave, *et al* (2006), há no Brasil, 109 grupos de pesquisa em diferentes áreas do conhecimento que empregam técnicas de microencapsulamento. Entre eles, destacam-se grupos na Universidade de São Paulo (USP), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Universidade Federal do rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidade Federal do rio Grande do Norte (UFRN), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Universidade Federal de Goiás (UFG) e Universidade Federal do Paraná (UFPR), além do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). E também informações onde retrata que em Santa Catarina há grupos na Universidade Federal de santa catarina (UFSC), na Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), na Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) e dois grupos jovens na Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), um voltado aos fármacos e outro aos agrotóxicos.

Os resultados observados na Figura 4 referem-se aos detentores de tecnologia, sendo verificado que a empresa chinesa Firmenich e CIE é a líder do *ranking* dos detentores da tecnologia de produção, seguida da empresa francesa Mane Fils V, que é um grupo francês e um dos líderes mundiais da indústria de fragrância e sabor.

O domínio de patentes tanto por detentores como inventores asiáticos pode estar associado ao investimento maciço destes países tanto na educação básica como na superior. A China, por exemplo, passou a desenvolver pesquisas dentro de suas próprias universidades e depois a comercializar os resultados. Na Coréia do Sul e em Taiwan a importância dada à inovação é tão grande que os países passaram a produzir milhares de patentes por ano (MAHMOOD e SINGH J, 2003).

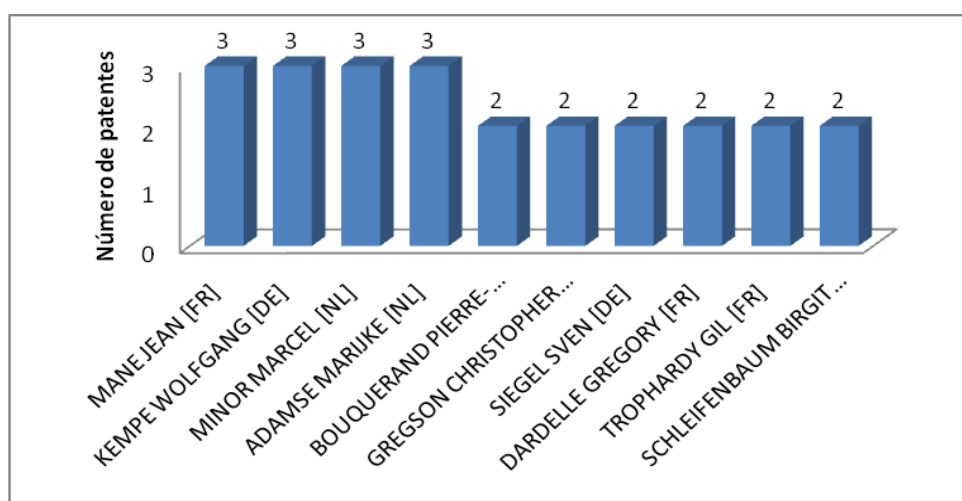
Vale ressaltar que o atual crescimento econômico dos países asiáticos também pode atuar como fator de contribuição para o desenvolvimento de novas tecnologias e posteriores patentes. De acordo com a ONU - Organizações das Nações Unidas, as economias da Ásia e do Pacífico vão ter um crescimento moderado em 2013, após forte desaceleração em 2012, causado por fatores externos (ONUBR, 2013).

Figura 4. Depósito de patentes relacionadas ao Encapsulamento de compostos bioativos, por dentores - Espacenet®.



A Figura 5 relaciona o número de patentes por inventores, disponíveis no Espacenet®. Percebe-se que os documentos de patente depositados foram provenientes, principalmente, das indústrias. Isso comprova o financiamento das mesmas pelo setor industrial visando rentabilidade pela inovação e/ou desenvolvimento de uma nova tecnologia que potencialize os lucros e a comercialização de seus produtos. Além disso, aquela patente pode ser depositada em diversos países garantindo assim o direito de exclusividade aos depositantes e inventores nos mercados considerados mais relevantes, garantindo assim o direito territorial da patente (MENDONÇA *et. al*, 2012).

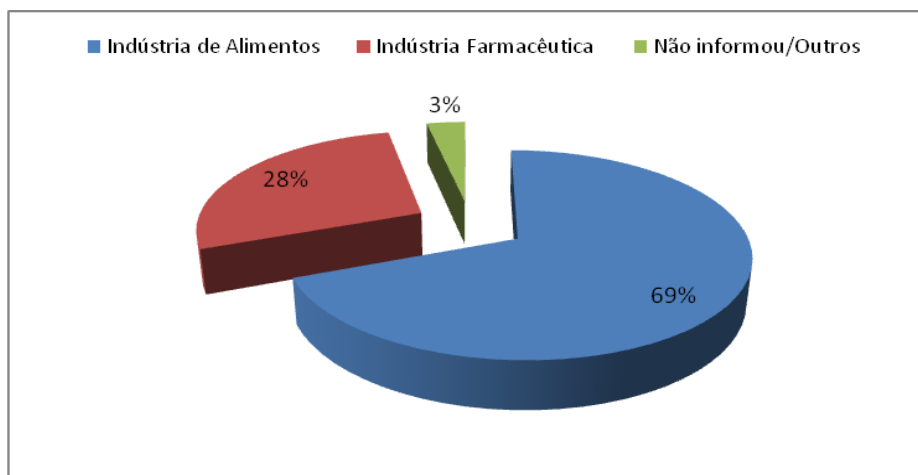
Figura 5. Inventores da tecnologia em relação ao Encapsulamento de compostos bioativos – Espacenet®.



De acordo com uma pesquisa realizada nos 80 documentos de patentes disponíveis no Espacenet®, foram observados diversos tipos de partículas submetidas ao processo de encapsulamento, sendo que a maioria das patentes analisadas aplicaram a tecnologia de encapsulamento em sabores, aromas e perfumes (com o intuito de preservar/reter estas características no produto). Além disso, foram encontradas patentes referentes a aplicação da tecnologia em corantes naturais, medicamentos, vitaminas, suplementos alimentares e extratos naturais, dentre outros.

A Figura 6 apresenta a distribuição das principais áreas tecnológicas de aplicação do encapsulamento. Das 80 patentes analisadas, 68,75% relacionam-se a Indústrias de Alimentos; 27,50% à Indústria Farmacêutica (fármacos, fitoterápicos e cosméticos) e 3,75% não informaram ou estavam enquadradas em outra área de aplicação.

Figura 6. Áreas de aplicação das patentes relacionadas ao Encapsulamento de compostos bioativos.



Dentre as técnicas mais empregadas para o encapsulamento de produtos na indústria alimentícia está o *spray-drying* (PRIANO *et. al*, 2011). De acordo com a análise das 80 patentes, foram encontrados diversos métodos de aplicação da tecnologia, tais como coacervação, freeze-drying, extrusão, adsorção, esferificação, pulverização, inclusão em lipossomas e atomização. Informações referentes ao tamanho das partículas (micro ou nano) não estavam disponíveis em muitas patentes, porém nas patentes que continham esta informação, um destaque maior foi dado à análise da técnica do microencapsulamento em detrimento ao nanoencapsulamento (tecnologia mais recente).

A seleção de combinações de materiais de parede interfere nas propriedades da emulsão e nas características das partículas após a secagem e também durante o armazenamento do produto. Além disso, as características da estabilidade da emulsão (viscosidade, tamanho das partículas, bem como propriedades do pó, óleo de superfície, tamanho de partículas, densidade, morfologia e estabilidade oxidativa) são influenciadas pelo tipo de agente encapsulante utilizado (CARNEIRO, 2011). Em relação aos materiais de parede verificados na análise das 80 patentes disponibilizadas, pode-se observar que foram utilizados diferentes tipos de encapsulantes, desde células de microrganismos vazios, até os mais usuais para indústria de alimentos, como amido modificado, goma arábica, maltodextrina, proteína do soro do leite, entre outros.

5. CONCLUSÃO

A partir da análise das patentes depositadas no Espacenet®, pode-se concluir que existe uma tendência ao crescimento de depósitos ao longo dos anos, indicando que muitas inovações têm sido realizadas, destacando-se a importância do encapsulamento de compostos bioativos.

No que diz respeito aos países nos quais se origina a tecnologia patenteada, esta se encontra bastante concentrada nos países desenvolvidos, sendo dominada pelos Estados Unidos. Cabe destacar que o Brasil aparece como detentor de apenas 1 patente desta tecnologia, sendo que no país a referida técnica é mais utilizada nas áreas farmacêutica, de

alimentos e de agrotóxicos. Consequentemente, evidencia-se a necessidade de maior investimento do setor público e privado brasileiros na tecnologia em questão.

Possivelmente, devido ao crescimento econômico e no setor de pesquisa e desenvolvimento, os países Asiáticos, como exemplo a China, são líderes entre as empresas detentoras com maior número de patentes, seguida da França, que se destacou dentre os inventores nesta tecnologia.

As áreas de aplicação desta tecnologia que merecem destaque são a Alimentícia e Farmacêutica, sendo empregados diferentes tipos de técnicas e materias de parede.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado.

REFERÊNCIAS

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Características de nanopartículas e potenciais de aplicações em alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, jan./mar., 2012.

AZEREDO, H.M.C . Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Ver. Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.

CARNEIRO, H. C. F. Microencapsulação de óleo de linhaça por spray drying: influência da utilização de diferentes combinações de materiais de parede. (Dissertação de Mestrado). Campinas – SP. Faculdade de Engenharia de Alimentos. **Universidade Estadual de Campinas**, 2011.

DICKINSON, E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, p.4-12, 2012.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628-647, 2013.

FEYNMAN, R. P., Theres Plenty of Room at the Bottom. Disponível em:
<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A. e IBANEZ, E. Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. **Food Chemistry**, 98, 136-148, 2006.

MAHMOOD, P. I.; SINGH J. Technological Dynamism in Asia. **Research Policy**, vol. 32, n. 6, pp. 1031-1054, 2003.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L. Prospecção Tecnológica da Utilização da *Spirulina platensis*. **Congresso Brasileiro de Prospecção Tecnológica: ProspeCT&I**. Cadernos de Prospecção - vol.5, n.1, p.44-52, 2012.

MOREIRA, G. E. G. Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, 2007.

OLIVEIRA, G. R. *et al.* Prospecção tecnológica: processo de liofilização na indústria de alimentos. **Revista Geintec**. São Cristóvão/SE, vol. 3, n. 1, p.92-102, 2012.

ONUBR – Organização das Nações Unidas no Brasil. 2013. Disponível em:<<http://www.onu.org.br/crescimento-sustentavel-de-longo-prazo-para-asia-e-pacifico-requer-investimentos-em-politicas-de-protecao-social/>>. Acesso em: 01 de setembro de 2013.

PETERS, R.; DAM, G. T.; BOUWMEESTER, H.; HELSPER, H.; ALLMAIER, G.; KAMMER, F.; RAMSCH, R.; SOLANS, C.; TOMANIOVA, M.; HAJLSLOVA, J.; WEIGEL, S. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 100-112, 2011.

PRIANO, L. W. **Encapsulamento de β -caroteno em PHBV com dióxido de carbono e avaliação da liberação *in vitro***. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC – Brasil.

RABELLO, F. F. P. *et al.* Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, 2009.

SIEGRIST, M.; COUSIN, M-E.; KASTENHOLZ, H.; WIEK, A. Public acceptance of nanotechnology foods and food packaging: The influence of affect and trust. **Appetite**, v. 49, p. 459-466, 2007.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, 2006.

Submetido em 15/06/2014

Aprovado em 10/08/2014

APÊNDICE E. Resumos das patentes elaboradas.

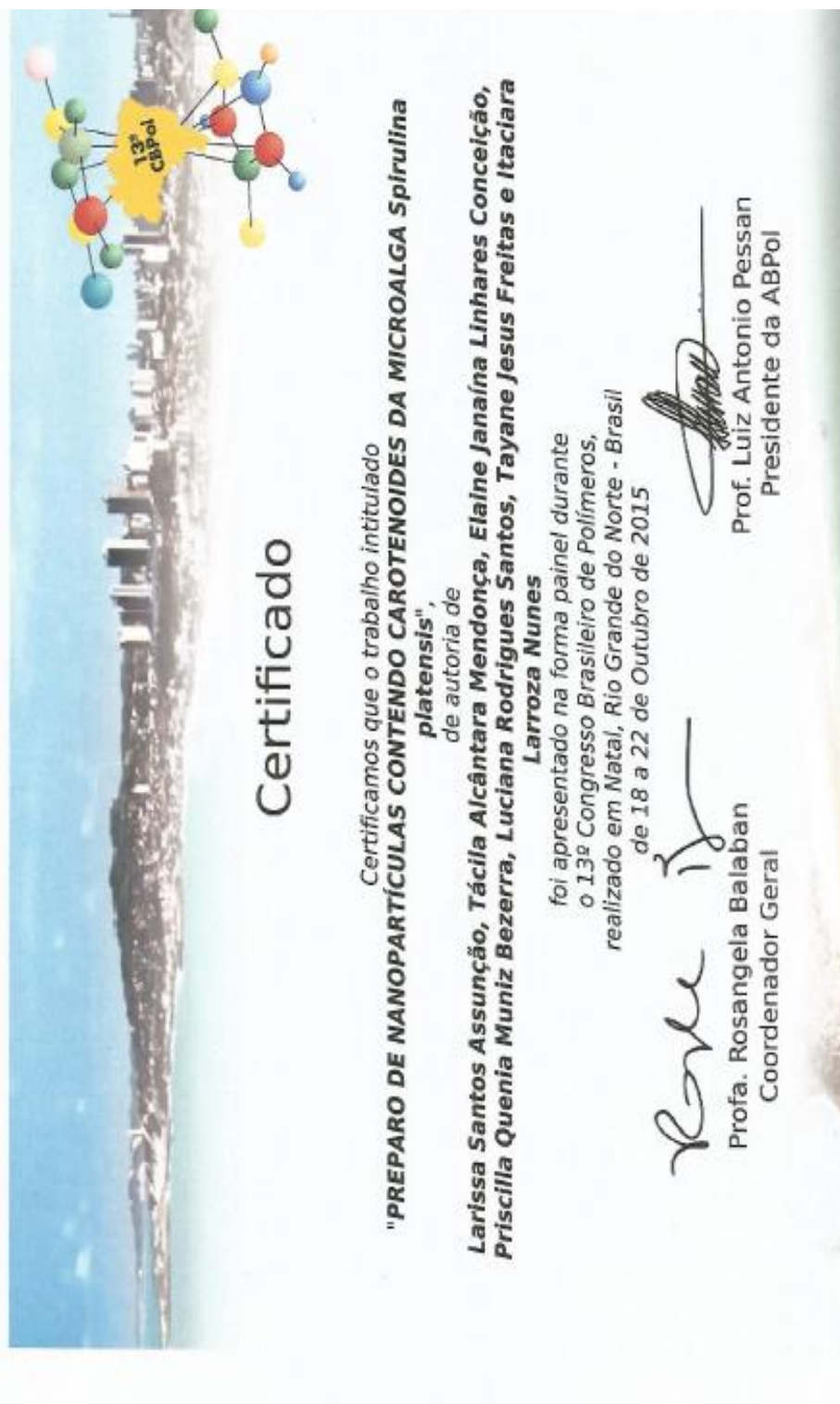
MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES DA MICROALGA *Spirulina platensis*

A presente Patente de Invenção (PI) diz respeito ao desenvolvimento de um método de extração de carotenoides da microalga *Spirulina platensis*, através da técnica de extração convencional com solventes. Sua aplicação dar-se-á preferencialmente na indústria alimentícia, facilitando e ampliando o uso dessa matéria-prima. Ressalta-se que a principal característica que difere esse método dos demais é de que não há extração de carotenoides da microalga *Spirulina platensis* utilizando-se o método proposto e os solventes empregados também estão em proporções diferenciadas. Sendo assim, essa pode ser uma invenção promissora do ponto de vista tecnológico, econômico e social.

NANOPARTÍCULA DE CAROTENOIDES EXTRAÍDO DA MICROALGA *Spirulina platensis*

A presente Patente de Invenção (PI) diz respeito ao desenvolvimento de nanopartícula de extrato de carotenoides da microalga *Spirulina platensis*, através da técnica de deslocamento de solvente. Sua aplicação dar-se-á na indústria alimentícia, facilitando e ampliando o uso dessa matéria-prima. Ressalta-se que a principal característica que difere essa nanopartícula das demais é de que não há nanopartículas elaboradas com essa microalga, utilizando-se a referida técnica e os polímeros envolvidos. Sendo assim, essa pode ser uma invenção promissora do ponto de vista tecnológico, econômico e social.

ANEXO A. Certificado de apresentação do pôster no 13º Congresso Brasileiro de Polímeros.



ANEXO B. Certificados de participação no evento e de apresentação na forma de pôster dos trabalhos completos no *5th International Symposium on Technological Innovation*.



INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TECHNOLOGICAL INNOVATION



SEPTEMBER 24 TO 26, 2014
ARACAJU, SE, BRAZIL

CERTIFICATE

The paper **ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS** by Larissa Santos Assunção, Camila Duarte Ferreira, Elaine Janaína Linhares da Conceição, Itaciara Larroza Nunes Was presented in the Poster Sessions of the V ISTI - V International Symposium on Technological Innovation held in Aracaju/SE, Brazil, on September 24th to 26th, 2014.


Renata Silva Mann

Sergipe State Association of Intellectual Property
Federal University of Sergipe


Suzana/Leitão Russo

Graduate Program in Intellectual Property Sciences
Federal University of Sergipe

REALIZATION



PARTNERS & SPONSORS

