



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**



**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS  
CONSTITUÍDAS POR ÁCIDOS GRAXOS, GORDURA VEGETAL  
HIDROGENADA E LECITINA NA ENCAPSULAÇÃO DE UM COMPOSTO  
HIDROFÍLICO DE BAIXA MASSA MOLAR**

**Alda Jusceline Leonel  
Nutricionista**

**Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Orientador**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

**Campinas – SP**

**Abril – 2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L553p Leonel, Alda Jusceline  
Produção e caracterização de partículas lipídicas constituídas por ácidos graxos, gordura vegetal hidrogenada e lecitina na encapsulação de um composto hidrofílico de baixa massa molar / Alda Jusceline Leonel. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Micropartículas lipídicas. 2. Spray cooling. 3. Raios X – Difração. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Production and characterization of lipid particles composed by fatty acids, hydrogenated vegetable fat and lecithin in the encapsulation of a hydrophilic compost of low molar mass

Palavras-chave em inglês (Keywords): Lipid microparticles, Spray cooling, X-rays - Diffraction

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Daniel Barrera-Arellano

Maria Helena Andrade Santana

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP**  
**(orientador)**

---

**Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP**  
**(membro)**

---

**Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana**  
**Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP**  
**(membro)**

---

**Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues**  
**Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas –**  
**UNICAMP**  
**(membro)**

*“Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor”.*

*“You may say I’m a dreamer  
But I’m not the only one  
I hope someday you’ll join us  
And the world will be as one”*

John Lennon

*“Oh, Minas Gerais  
Oh, Minas Gerais  
Quem te conhece não esquece jamais  
Oh, Minas Gerais”*

## Dedicatória

A meus pais, **Edson** e **Alda**, meus grandes incentivadores, pela presença sempre constante e por serem meu exemplo de vida, amor, dedicação e fé.

A meu namorado, **Arnaldo**, meu parceiro sempre, por seu amor, dedicação, apoio e compreensão. Tão longe e tão perto!

## **Agradecimentos**

A Deus, pela dádiva da vida e pelas enormes e diárias bênçãos, por estar sempre comigo e me mostrar o meu caminho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A UNICAMP, pela possibilidade de crescimento e desenvolvimento intelectuais.

Ao Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, pela orientação e compreensão, e pelo tempo dispensado a este trabalho. Obrigada pelos ensinamentos!

Aos membros da banca, Daniel Barrera-Arellano, Maria Helena Andrade Santana e Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, pelas sugestões e importantes contribuições, pelo tempo e pela atenção dispensados a este trabalho.

A professora Heloíse Pastore, do Instituto de Química – UNICAMP, pela atenção e importante ajuda experimental.

A Raquel, do Laboratório de Difração de Raios-X, do Instituto de Química – UNICAMP, pela análise das amostras, pelo tempo e atenção dispensados a mim e a este trabalho.

Ao Renato, do Laboratório de Óleos e Gorduras, do Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA – UNICAMP, pela análise das amostras, pelo tempo e atenção dispensados a mim e a este trabalho. Obrigada pelas explicações!

A todos do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Biologia – UNICAMP, em especial a Antônia, pela atenção.

Aos funcionários do DEPAN: Cidinha, Fátima, Chico, Eliana, Beth, Iara e Nice, pela colaboração e atenção.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Marcos, pela atenção, educação e paciência.

Aos meus irmãos Jacke, Denis e Denner e às minhas cunhadas Edilaine e Tânia, pelo carinho, preocupação e atenção. Agradeço em especial a Tânia, por ser mais que uma irmã pra mim.

Aos meus sobrinhos Rafael, Gustavo e Vinícius, por sempre me mostrarem a beleza da vida.

Ao meu sogro, Arnaldo, e meus cunhados, Aguielson e Alison, pelas risadas e boas conversas.

A meus avós João, Antônia e José pela proteção, mesmo que do lado de lá, e a minha avó Maria, pela proteção e fortes orações.

Às pessoas que encontrei no ambiente de trabalho, hoje meus queridos amigos, Noemi, Andréa, Carol, Camila, Bárbara, Gláucia, Renata, Cris, Caro, Fernando, Diego e Aline, por tornarem as coisas mais leves. Em especial a Noemi, por sempre me escutar e pela essencial ajuda experimental, e a Carol (e Leléu), por me dar um pedacinho de sua casa.

Aos meus amigos de Viçosa, Belo Horizonte e Capitólio, que mesmo longe me foram tão essenciais. Obrigada pela amizade que temos!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

## Índice Geral

<b>ÍNDICE GERAL.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1. LIPÍDIOS .....	4
3.1.1. <i>Definição</i> .....	4
3.1.2. <i>Características Físicas e Alterações</i> .....	5
3.2. MICROENCAPSULAÇÃO .....	9
3.2.1. <i>Definição</i> .....	9
3.2.2. <i>Cronologia e Aplicação</i> .....	10
3.2.3. <i>Principais Métodos para Produção de Micropartículas</i> .....	11
3.2.4. <i>Materiais de Parede</i> .....	12
3.2.5. <i>Tensoativos</i> .....	13
3.2.6. <i>Materiais de Recheio</i> .....	15
3.2.7. <i>Liberção do Recheio</i> .....	15
3.2.8. <i>Spray Cooling</i> .....	18
3.2.9. <i>Nanopartículas Lipídicas</i> .....	19

3.2.10. <i>Técnicas Utilizadas para o Estudo da Estabilidade de Partículas Lipídicas</i> .....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1. MATERIAL.....	34
4.2. MÉTODOS.....	34
4.2.1. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	34
4.2.1.1. <i>Ponto de amolecimento – “Melting Point”</i> .....	34
4.2.1.2. <i>Determinação de glicose</i> .....	35
4.2.1.3. <i>Determinação da distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas</i> .....	35
4.2.1.4. <i>Morfologia das micropartículas</i> .....	35
4.2.1.5. <i>Determinação da eficiência de encapsulação</i> .....	36
4.2.1.5.1. <i>Determinação da eficiência de encapsulação total (EET)</i> .....	36
4.2.1.5.2. <i>Determinação de glicose superficial (GS)</i> .....	36
4.2.1.5.3. <i>Determinação da eficiência de encapsulação efetiva (EEE)</i> .....	36
4.2.1.6. <i>Avaliação da liberação do recheio</i> .....	37
4.2.1.7. <i>Avaliação Calorimétrica</i> .....	37
4.2.1.8. <i>Difração de Raios-X</i> .....	38
4.2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	39
4.2.2.1. <i>Formulação das misturas lipídicas</i> .....	39
4.2.2.2. <i>Determinação das condições de preparação da emulsão</i> .....	39
4.2.2.3. <i>Produção das micropartículas lipídicas (MpL)</i> .....	40
4.2.2.4. <i>Determinação da estabilidade das micropartículas lipídicas</i> .....	42
4.2.2.5. <i>Análise estatística</i> .....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
5.1. PONTO DE AMOLECIMENTO – “MELTING POINT” .....	44
5.2. ESTABILIDADE DAS EMULSÕES .....	45
5.3. ETAPA 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS.....	49
5.3.1. <i>Produção das micropartículas</i> .....	49

5.3.2. Caracterização das micropartículas .....	50
5.3.2.1. Distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas .....	50
5.3.2.2. Morfologia das micropartículas.....	53
5.3.3. Determinação de glicose superficial e eficiência de encapsulação efetiva.....	57
5.3.4. Avaliação da liberação do recheio em meio aquoso .....	59
5.4. ETAPA 2 – ESTUDO DA ESTABILIDADE.....	63
5.4.1. Produção das micropartículas lipídicas .....	63
5.4.2. Avaliação calorimétrica .....	64
5.4.3. Análises do estudo da estabilidade.....	68
5.4.3.1. Determinação de glicose superficial e eficiência de encapsulação efetiva.....	68
4.3.2. Difração de Raios-X .....	73
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS .....</b>	<b>84</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>93</b>
9.1. ANEXO 1 – TERMOGRAMAS OBTIDOS POR DSC DAS AMOSTRAS ANALISADAS NO ESTUDO DA ESTABILIDADE .....	94

## Índice de Figuras

FIGURA 1 – DIAGRAMA DE PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS .....	42
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO: (A) F1 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 40%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25), (B) F2 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 40%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10), (C) F3 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 60%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25), (D) F4 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 60%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10), (E) F5 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 80%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25), (F) F6 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 80%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10) .....	52
FIGURA 3 – IMAGENS CAPTADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS SEGUINTE FORMULAÇÕES: (A) F1 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 40%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25) (300x), (B) F1 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 40%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25) (2500x), (C) F2 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 40%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10) (300x), (D) F2 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 40%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10) (2500x).....	54
FIGURA 4 – IMAGENS CAPTADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS SEGUINTE FORMULAÇÕES: (A) F3 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 60%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25) (300x), (B) F3 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 60%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25) (2500x), (C) F4 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 60%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10) (300x), (D) F4 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 60%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10) (2500x).....	55
FIGURA 5 – IMAGENS CAPTADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS SEGUINTE FORMULAÇÕES: (A) F5 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 80%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25) (300x), (B) F5 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 80%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25) (2500x), (C) F6 (SOLUÇÃO DE	

GLICOSE 80%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10) (300x), (D) F6 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 80%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10) (2500x).....	56
FIGURA 6 – LIBERAÇÃO DO RECHEIO (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) EM SOLUÇÃO AQUOSA, EM 120 MINUTOS, ANALISADA PÓS-PRODUÇÃO (—◆— F1; —■— F2; —▲— F3; —■— F4; —✱— F5; —●— F6).....	61
FIGURA 7 – CURVA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DA FORMULAÇÃO 1 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 40%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25) NOS TEMPOS 0, 7, 14, 21 E 28 DIAS .....	78
FIGURA 8 – CURVA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DA FORMULAÇÃO 4 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 60%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 90/10) NOS TEMPOS 0, 7, 14, 21 E 28 DIAS .....	79
FIGURA 9 – CURVA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DA FORMULAÇÃO 5 (SOLUÇÃO DE GLICOSE 80%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25) NOS TEMPOS 0, 7, 14, 21 E 28 DIAS .....	80
FIGURA 10 – CURVA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DA FORMULAÇÃO DE REFERÊNCIA (MPLR – SOLUÇÃO DE GLICOSE 40%, PROPORÇÃO LIPÍDIO/SOLUÇÃO DE GLICOSE 75/25, SEM LECITINA) NOS TEMPOS 0, 7, 14, 21 E 28 DIAS .....	81
FIGURA 11 – TERMOGRAMA OBTIDO POR DSC DA FORMULAÇÃO 1 – CRISTALIZAÇÃO (A) E FUSÃO (B).....	94
FIGURA 12 – TERMOGRAMA OBTIDO POR DSC DA FORMULAÇÃO 4 – CRISTALIZAÇÃO (A) E FUSÃO (B).....	95
FIGURA 13 – TERMOGRAMA OBTIDO POR DSC DA FORMULAÇÃO 5 – CRISTALIZAÇÃO (A) E FUSÃO (B).....	96
FIGURA 14 – TERMOGRAMA OBTIDO POR DSC DA FORMULAÇÃO DE REFERÊNCIA (MPLR) – CRISTALIZAÇÃO (A) E FUSÃO (B) .....	97

## Índice de Tabelas

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS .....	5
TABELA 2 – MISTURAS CUJOS PONTOS DE AMOLECIMENTO FORAM ANALISADOS.....	39
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES ANALISADAS.....	41
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES AVALIADAS NO ESTUDO DA ESTABILIDADE	43
TABELA 5 – TEMPERATURA DE AMOLECIMENTO DAS MISTURAS ANALISADAS E DA GORDURA VEGETAL HIDROGENADA UTILIZADA NA PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	45
TABELA 6 – ESTABILIDADE DAS EMULSÕES COMPOSTAS POR ÁCIDO ESTEÁRICO, ÁCIDO OLÉICO E GORDURA VEGETAL HIDROGENADA (ESTABILIDADE $\pm$ DESVIO PADRÃO) EXPRESSA EM PORCENTAGEM COM DIFERENTES TEMPOS DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE TENSOATIVO (VELOCIDADE DE AGITAÇÃO $\rightarrow$ 10000 RPM) .....	47
TABELA 7 – ESTABILIDADE DA EMULSÃO COM 5% DE LECITINA E 5 MINUTOS DE EMULSIFICAÇÃO (ESTABILIDADE $\pm$ DESVIO PADRÃO) COM DIFERENTES VELOCIDADES DE EMULSIFICAÇÃO .....	49
TABELA 8 – DIÂMETRO MÉDIO DAS MICROPARTÍCULAS (MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO).....	51
TABELA 9 – QUANTIDADE DE GLICOSE SUPERFICIAL (%) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO EFETIVA (%) DETERMINADAS UM DIA APÓS A PRODUÇÃO .....	58
TABELA 10 – PARÂMETROS CALORIMÉTRICOS (TEMPERATURA DE PICO, °C, E ENTALPIA, J/G) OBTIDOS NAS CURVAS DE CRISTALIZAÇÃO E DE FUSÃO PARA AS FORMULAÇÕES ANALISADAS NO ESTUDO DA ESTABILIDADE NO TEMPO ZERO .....	67
TABELA 11 – QUANTIDADE DE GLICOSE SUPERFICIAL ( $\% \pm$ DESVIO PADRÃO) DAS QUATRO FORMULAÇÕES ANALISADAS DURANTE VINTE E OITO DIAS .....	70
TABELA 12 – VALORES DE EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO EFETIVA ( $\% \pm$ DESVIO PADRÃO) DAS QUATRO FORMULAÇÕES ANALISADAS DURANTE VINTE E OITO DIAS.....	71
TABELA 13 – GRAUS DE CRISTALINIDADE (%) DAS QUATRO FORMULAÇÕES ANALISADAS DURANTE VINTE E OITO DIAS.....	74

## Resumo

Apesar de micropartículas lipídicas possuírem vantagens, como baixa toxicidade e não utilizarem solventes orgânicos em sua produção, elas apresentam alguns inconvenientes como a baixa capacidade de encapsulação do recheio e a possibilidade de expulsão do material de recheio encapsulado durante o armazenamento. Este trabalho teve como objetivo estudar a formação e a estabilidade de micropartículas de lipídios preparadas por *spray cooling* compostas por ácidos graxos (esteárico e oléico) e gordura vegetal hidrogenada como matriz, lecitina de soja como tensoativo e solução de glicose como material de recheio. Foram avaliados morfologia de superfície, tamanho de partícula, quantidade de recheio encapsulada e não encapsulada (superficial) e comportamento de liberação do recheio em solução aquosa. Para o estudo da estabilidade, medidas da retenção do recheio ao longo do tempo em temperatura controlada, medidas de difração de raios-X (0, 7, 14, 21 e 28 dias) e medidas calorimétricas (tempo zero) foram efetuadas. Valores de eficiência de encapsulação foram superiores a 70%, e as maiores quantidades de glicose não encapsulada foram encontradas nas formulações nas quais foram adicionadas maiores quantidades de recheio. A liberação do recheio também apresentou correlação com a quantidade de recheio utilizado, onde menores quantidades de recheio foram mais bem retidas. Os diâmetros médios das micropartículas situaram-se entre 25 e 32  $\mu\text{m}$ , e as partículas apresentaram paredes rugosas porém contínuas. No estudo da estabilidade, as formulações com maiores quantidades de recheio (solução de glicose 80%) ou sem a adição de tensoativo (solução de glicose 40%, sem lecitina) apresentaram, na quantidade de glicose superficial, 18 e 56% de recheio não encapsulado no último dia de análise, respectivamente, sendo significativamente diferente das outras duas formulações, uma com solução de glicose 60% e outra com solução de glicose 40%, que apresentaram resultados de 5% e 2% no último dia de análise. Os resultados de

difração de raios-X não apresentaram alterações ao longo dos 28 dias de estudo e os resultados de DSC foram semelhantes no tempo zero entre as diferentes formulações estudadas. A utilização da mesma matriz lipídica nas formulações parece responsável pelos resultados da difração de raios-X e calorimétricos obtidos.

**Palavras-chave:** Micropartículas lipídicas; *Spray cooling*; Liberação de recheio hidrofílico; Difração de raios-X.

## Abstract

Although lipid microparticles have advantages, just as low toxicity and no use of organic solvents in their production, they present some inconvenients, as low capacity of encapsulation of core material and the expulsion of encapsulated core during its storage. The aim of this work was to study the formation and the stability of lipid microparticles prepared by spray cooling, composed by fatty acids (stearic and oleic) and hydrogenated vegetable fat as matrix, soya lecithin as surfactant and glucose solution as core material. For this propose, surface morphology, particle size, no encapsulated (surficial) core measure, total encapsulated core material and core release behavior in aqueous solution were evaluated. The stability study was evaluated with measures of core retention along of the time in controlled temperature, X-ray diffraction measurements (0, 7, 14, 21 and 28 days) and calorimetric measurements (zero time). The efficiency of encapsulation was above 70% and the biggest amounts of glucose no encapsulated were found in the formulations in which were added the biggest amount of core material. Results of release of core material also showed correlation with the amount of core material utilized, where low amount of core material showed better retention. The mean diameters of microparticles remained between 25 and 32  $\mu\text{m}$  and they exhibited rough walls, but continuous. In the stability study, formulations with high amounts of core material (solution of glucose 80%) or without the addition of surfactant (solution of glucose 40%, without lecithin) showed 18 and 56% of no encapsulated core material in the last day of analysis, respectively. This result were significantly different compared with the other two formulations, one with solution of glucose 60% and the other with solution of glucose 40%, that showed results of 5% and 2% of superficial glucose in the last day of analysis. The X-ray diffraction results didn't show alterations after 28 days. The DSC results showed similar profile for the formulations studied at zero time. The use of the same lipid materials to produce

the microparticles during the stability study may be responsible for X-ray and calorimetric results obtained.

**Keywords:** Lipid microparticles; Spray cooling; Hydrophilic core release; X-ray diffraction.

## 1. Introdução

Microencapsulação é uma técnica usada para o recobrimento de substâncias, que podem estar em diferentes estados físicos, então chamadas de recheio. Tem como objetivos proteger este material das condições adversas do meio como luz e umidade, mascarar propriedades indesejáveis e promover uma liberação modulada deste recheio, entre outros (JACKSON & LEE, 1991; SHAHIDI & HAN, 1993; NORI, 1996). Esta técnica forma pequenas partículas, chamadas de micropartículas, que podem ter a matriz multinucleada ou mononucleada.

A microencapsulação é estudada desde os anos 30, e o primeiro produto com material encapsulado surgiu nos anos 50, um papel de cópia sem carbono. Depois disto muitos produtos, como vacinas, protetores solares, defensivos agrícolas, tintas especiais, aditivos alimentícios, entre outros foram lançados no mercado por diversos segmentos industriais, entre eles farmacêutico, cosmético, químico, agrícola e alimentício (MÜLLER et al, 2002).

Os lipídios são uma atraente alternativa como material de revestimento pela habilidade que têm de formarem uma variedade de estados morfológicos como emulsões, lipossomas e micropartículas sólidas, e já são usados há bastante tempo, principalmente na indústria farmacêutica. Partículas lipídicas possuem várias vantagens, pois usam lipídios fisiológicos que não causam toxicidade aguda nem crônica em humanos, não utilizam solventes orgânicos, podem ser produzidas em larga escala, têm possibilidade de aplicação farmacológica por várias vias, entre outras. No início dos anos 90 foi lançada uma nova forma de matriz lipídica, produzida por homogeneização a alta pressão ou por precipitação de microemulsão, e foi chamada de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN – solid lipid nanoparticles), uma vez que são usados apenas lipídios sólidos a temperatura ambiente. A SLN combinou vantagens de outros sistemas carreadores, como estabilidade física, proteção a recheios sensíveis contra

degradação, modulação da liberação e excelente tolerabilidade enquanto ao mesmo tempo minimizava alguns problemas. Contudo, foram observados alguns inconvenientes, como a expulsão do recheio durante a estocagem e a pequena quantidade de recheio que efetivamente era encapsulado. Para superar estes problemas estas nanopartículas sofreram algumas modificações e foram produzidos os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC – nanostructured lipid carriers), partículas nas quais são incluídos um lipídio sólido e outro líquido a temperatura ambiente; este lipídio líquido provoca pequenas imperfeições na matriz lipídica, aumentando a eficiência de encapsulação e evitando a expulsão do recheio ao longo do tempo. Posteriormente surgiram as nanopartículas lipídicas conjugadas com recheio (LCD – lipid drug conjugate), que, usando lipídios especiais e ligações especiais entre recheio e matriz, permitem a incorporação de grandes quantidades de recheio na matriz lipídica (WISSING et al, 2004a).

São adicionadas, para produção das partículas, substâncias chamadas de tensoativos, que auxiliam na efetiva ligação entre recheio e matriz. Lecitina comercial, um tensoativo bastante usado em micropartículas lipídicas, é uma mistura de diglicerídeos de, predominantemente, ácidos esteárico, palmítico e oléico, que são ligados com éster colina no ácido fosfórico. Estudos analisaram a incorporação de lecitina na matriz lipídica para melhorar e aumentar a incorporação do recheio e confirmaram que a incorporação do recheio aumentou linearmente com o aumento da concentração de lecitina presente até uma determinada porcentagem, e este efeito foi atribuído à formação de micelas no meio da matriz lipídica, o que permitiu adicional incorporação do recheio (SCHUBERT et al, 2006).

Partículas lipídicas são um interessante meio de armazenamento e posterior uso para várias substâncias, tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas. Assim, micropartículas lipídicas, preparadas por *spray cooling*, compostas por ácido esteárico, ácido oléico e gordura vegetal hidrogenada comercial como matriz, lecitina de soja como tensoativo e solução de glicose como material de

recheio foram produzidas, caracterizadas e analisadas quanto a sua estabilidade ao longo do tempo.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar a formação e a estabilidade de micropartículas lipídicas, preparadas por *spray cooling*, compostas por ácido esteárico, ácido oléico e gordura vegetal hidrogenada comercial como matriz, lecitina de soja como tensoativo e solução de glicose como material de recheio.

### **2.2. Objetivos Específicos**

2.2.1. Avaliar a estabilidade das emulsões, em função da concentração de tensoativo, do tempo e da velocidade de agitação da emulsão.

2.2.2. Determinar a porcentagem de glicose superficial, eficiência de encapsulação total e efetiva e a liberação percentual do recheio, liberado em duas horas.

2.2.3. Determinar as características morfológicas e de distribuição de tamanho de partícula.

2.2.4. Realizar um estudo de estabilidade, avaliando porcentagem de glicose superficial, eficiência de encapsulação total e efetiva e difração de raios-X durante vinte e oito dias e medidas calorimétricas efetuadas no tempo zero.

### **3. Revisão Bibliográfica**

#### **3.1. Lipídios**

##### **3.1.1. Definição**

Lipídios consistem de um amplo grupo de compostos solúveis em solventes orgânicos e pouco solúveis ou insolúveis em água. Ésteres de glicerol com ácidos graxos, que perfazem 99% dos lipídios de plantas e animais, têm tradicionalmente sido chamados de óleos e gorduras, distinção que é baseada apenas no fato do material ser líquido ou sólido a temperatura ambiente. O estado físico do lipídio pode variar de líquido a fluido viscoso e de um sólido plástico a sólido flexível, e a organização da cadeia carbônica influencia fortemente o ponto de fusão, a estabilidade, a estrutura e a permeabilidade lipídica (DUNCAN, 1984; TIMMS, 1984). Existem várias classes de lipídios, conforme mostrado na Tabela 1.

Os ácidos graxos, principais componentes dos acilgliceróis (mono-, di- e triacilgliceróis), podem ter a cadeia carbônica saturada ou insaturada, sendo esta uma característica importante na definição de suas propriedades físicas e químicas (NAWAR, 1996).

Os fosfolipídios, lipídios que contém o ácido fosfórico na composição, possuem uma cabeça polar e duas cadeias hidrocarbônicas. Estes compostos diferem um do outro em tamanho, forma e polaridade da parte polar. As duas cadeias carbônicas variam, mas geralmente uma é saturada e a outra insaturada, esta última localizada preferencialmente na posição 2 do glicerol (DUNCAN, 1984; NAWAR, 1996).

**Tabela 1 – Classificação dos Lipídios**

Classe	Subclasse	Descrição
Lipídios simples	Acilgliceróis	Glicerol + ácidos graxos
	Ceras	Cadeia longa de álcool + cadeia longa de ácido graxo
Lipídios compostos	Glicerofosfolipídios	Glicerol + ácido graxo + fosfato + outro grupo geralmente contendo nitrogênio
	Esfingomielinas	Esfingosina + ácido graxo + fosfato + colina
	Cerebrosídeos	Esfingosina + ácido graxo + açúcar simples
	Gangliosídeos	Esfingosina + ácido graxo + carboidrato complexo
Lipídios derivados	Compostos que não se enquadram nas classificações de simples nem compostos	Carotenóides, esteróides, vitaminas lipossolúveis

Adaptado de NAWAR (1996)

Lipídios em alimentos exibem propriedades físicas e químicas únicas. Sua composição, estrutura cristalina, propriedades de fusão e habilidade de associação com água e outras moléculas não lipídicas são muito importantes para suas propriedades funcionais em alimentos. Durante processamento, estocagem e manuseio dos alimentos os lipídios passam por complexas mudanças químicas e reações com outros compostos, produzindo substâncias indesejáveis e prejudiciais à qualidade do alimento (NAWAR, 1996).

### **3.1.2. Características Físicas e Alterações**

Muitas teorias são propostas para padrões de distribuição dos ácidos graxos na molécula de glicerol. Há um consenso de que a distribuição seja

aleatória, mas não totalmente, uma vez que análises mostraram que, em lipídios naturais, o ácido graxo que se liga na posição 2 do glicerol é sempre diferente dos que se combinam nas posições 1 e 3, e que, no caso de ácido insaturado, este vai preferencialmente na posição 2 (NAWAR, 1996).

### *Cristalização*

A formação de um sólido a partir de uma emulsão ou de um lipídio fundido é um processo complicado no qual moléculas devem primeiro entrar em contato, se orientarem e então interagirem para formar estruturas altamente ordenadas, conhecidas como núcleos; este processo pode ser estimulado por algumas situações, como agitação da substância. A nucleação pode ser homogênea (ou espontânea), que geralmente não acontece em condições usuais, ou pode ser heterogênea, que é induzida na superfície, dando orientação e ordem ao sistema (LARSSON, 1993; NAWAR, 1996). Como nas reações químicas, existe uma barreira de energia para iniciar o processo, e quanto mais complexa e estável é a forma polimórfica da molécula, mais difícil será a nucleação; na forma  $\alpha$  a nucleação se dará em maior quantidade e com núcleos de pequeno tamanho, enquanto na forma  $\beta$  este processo será em pequeno número com grandes núcleos (NAWAR, 1996; MARANGONI, 2002).

No estado cristalino, átomos e moléculas assumem posições rígidas formando repetições das unidades celulares, altamente organizadas, em padrão tridimensional. O resultado desta organização tridimensional no espaço é conhecido como "*space lattice*" (blocos estruturais). Esta rede de pontos se entrelaça nas propriedades simétricas do cristal; com os pontos unidos, uma série de unidades celulares é produzida, formando um cristal completo, que diz respeito a unidades celulares unidas lado a lado no espaço. Existem sete diferentes formas destas unidades, os sistemas de cristais: formas triclínica, monoclínica, ortorômbica, tetragonal, trigonal, hexagonal e cúbica (LARSSON, 1993; SUN, 2004).

Formas polifórmicas são fases cristalinas de uma mesma composição química que diferem entre elas mesmas na estrutura pela inclinação da ligação química ou pela variação de organização da cadeia carbônica, mas apresentam fases líquidas idênticas sob fusão. Cada forma polifórmica é caracterizada por propriedades específicas, como espaço de raios-X, volume específico e ponto de fusão. Muitos fatores determinam a forma polifórmica assumida, como pureza, temperatura, razão de resfriamento, presença de núcleos de cristalização e tipo de solvente (LARSSON, 1993; NAWAR, 1996).

Dependendo da estabilidade da molécula, a transformação de uma forma polimórfica em outra pode acontecer no estado sólido, sem fusão. Duas formas cristalinas são ditas “monotrópicas” se a transformação da forma menos estável para a mais estável ocorre indiferente da temperatura, ou são ditas “enantiotrópicas” quando a direção da modificação depende da temperatura. Lipídios naturais geralmente ocorrem na forma monotrópica. Em compostos com longas cadeias, o polimorfismo é associado com diferentes formas de organização das cadeias carbônicas ou com diferentes ângulos de inclinação (NAWAR, 1996; MARANGONI, 2002).

Ácidos graxos ocorrem em um de três tipos polimórficos básicos, designados  $\alpha$  (forma hexagonal),  $\beta'$  (forma ortorômbica) e  $\beta$  (forma triclínica). A forma  $\alpha$  é a menos estável e com menor ponto de fusão, e a forma  $\beta$  é a mais estável e apresenta o maior ponto de fusão. Transformações de  $\alpha$  para  $\beta'$  para  $\beta$  acontecem nesta ordem e são irreversíveis. O ponto de fusão da forma  $\beta$  é mais ou menos 10°C acima do valor apresentado pela forma  $\alpha$ , e a estabilidade desta última aumenta com o tamanho da cadeia carbônica apresentada pelo ácido graxo. Na literatura ainda são referidas as formas sub- $\alpha$  e sub- $\beta$ , sendo que a primeira apresenta menor ponto de fusão e menor estabilidade do que a forma  $\alpha$ . Em alguns casos a transformação de sub- $\alpha$  para  $\alpha$  é reversível, mas na maioria não. Toda a organização das cadeias dos ácidos graxos pode ser determinada por medidas de difração de raios-X (TIMMS, 1984; LARSSON, 1993; JORES et al, 2003).

Um lipídio pode cristalizar em diferentes formas polifórmicas quando são aplicados, nele já fundido, diferentes razões de resfriamento. Por exemplo, em razões de resfriamento rápidas o lipídio fica preferencialmente na forma instável  $\alpha$ , e quando o resfriamento é lento a tendência é o aparecimento da forma  $\beta$  (ELDEM et al, 1991a).

A designação de triacilgliceróis leva em conta o polimorfismo de cada ácido graxo, por exemplo, se os três ácidos graxos ligados em um glicerol estão na conformação  $\beta$ , o triacilglicerol será designado  $\beta$ -3 (TIMMS, 1984). A forma estável  $\beta$ -2 é encontrada em óleos líquidos, de soja, linhaça, amendoim, gergelim, milho e girassol, quando hidrogenados; isso ocorre por causa da alta quantidade de ácidos graxos de 18 carbonos que, por causa da hidrogenação, se convertem em ácido esteárico, predominando o triacilglicerol triestearina (TIMMS, 1984). Normalmente triacilgliceróis possuem uma estrutura de cristais de forma  $\beta$ , contudo, quando se trata de dialcigliceróis geralmente se encontra a forma  $\beta'$ , por causa da presença de maiores imperfeições na cadeia carbônica (ZUR MÜHLEN et al, 1996).

Uma composição mais complexa de lipídios aumenta o número de defeitos na estrutura, levando a uma organização menos estável e menor empacotamento das cadeias carbônicas. Isto leva ao fato de não haver, provavelmente, modificação polimórfica para a forma  $\beta$ . É uma alternativa para o controle das alterações que ocorrem na organização lipídica (OLLIVON, 2005).

A inclusão de alguns tipos de tensoativos, como lecitina e monoacilgliceróis, pode ser usada para controlar a viscosidade do meio, e assim prevenir ou retardar a transição polimórfica de lipídios para formas mais estáveis. Alguns tensoativos têm a habilidade de se incorporarem no interior dos cristais; eles se comportam como parte desta estrutura e conservam a forma  $\alpha$ . Podem ainda interferir nos processos de solidificação e fusão sem que nenhuma alteração seja detectada na organização dos cristais (ELDEM et al, 1991b).

Quando uma complexa mistura de triacilgliceróis no estado líquido é resfriada, moléculas com maior ponto de fusão terão a tendência de se unirem

para formarem cristais. O processo é complexo e difícil de prever, mas normalmente os cristais vão estar em equilíbrio com o óleo ao redor, e quando a proporção da parte cristalina se exceder em mais ou menos 10% um material semi-sólido é obtido; a parte líquida, então, é imobilizada pela matriz cristalina (LARSSON, 1993).

Quando os lipídios estão no estado líquido, as forças intermoleculares estão enfraquecidas e as moléculas adquirem liberdade de movimento e assumem um estado de desordem. Adicionalmente, fases com propriedades intermediárias entre estados cristalinos e líquidos ocorrem, e estas fases são chamadas de cristais líquidos. Tipicamente, isto ocorre com compostos anfifílicos, uma vez que, sob aquecimento, um triacilglicerol, por exemplo, tem suas ligações entre as cadeias carbônicas (apolares) desfeitas mais rapidamente do que as ligações entre as cabeças polares. Cristais assim formados são ditos termotrópicos. Na presença de água, por outro lado, a temperaturas acima do ponto de fusão, a cadeia carbônica do triacilglicerol passa a um estado de desordem e a água penetra entre os grupos polares; cristais formados desta maneira são chamados liotrópicos. Para que um ou outro cristal seja formado fatores como concentração e estrutura química do composto, conteúdo de água, temperatura e presença de outros componentes na mistura precisam ser levados em conta (NAWAR, 1996).

## **3.2. Microencapsulação**

### **3.2.1. Definição**

Microencapsulação é definida como uma tecnologia de recobrimento de substâncias sólidas, líquidas ou gasosas, em partículas pequenas, que podem liberar seu conteúdo de forma modulada em condições específicas (TODD, 1970; SPARKS, 1981; THIES, 1987; RÉ, 2000). As micropartículas podem ter tamanhos de poucos nanômetros a muitos milímetros, variando o nome de nanopartícula a micropartícula, dependendo do tamanho apresentado, e também diferentes

formas, entre esféricas, retangulares ou irregulares, monolíticas ou podem formar um conglomerado (DZIEZAK, 1988; JACKSON & LEE, 1991; NORI, 1996). Na micropartícula, a parte interna, ativa, é chamada recheio, e a parte externa, que faz o recobrimento, é denominada parede, agente encapsulante ou matriz (DZIEZAK, 1988). Em geral elas podem ser mononucleadas (terminologicamente chamada de micropartícula), nas quais o recheio é todo envolvido por uma única camada de parede, ou podem ser multinucleadas (terminologicamente chamada de microesfera), nas quais o recheio se divide por toda a extensão da matriz (SCHROOYEN et al, 2001).

O conceito de micropartícula surgiu da idéia do modelo celular, em que a membrana que envolve e protege o citoplasma exerce também outras funções, isolando uma determinada substância ou evitando os efeitos de sua exposição inadequada (JACKSON & LEE, 1991; RÉ, 2000).

A encapsulação pode ser usada com vários propósitos e razões: estabilizar o recheio, modular a liberação deste material ativo em um meio específico a uma taxa conhecida, reduzir a toxicidade do material, separar compostos da formulação que são incompatíveis ou reativos, proteger compostos sensíveis de condições ambientais (luz, umidade), evitar perdas nutricionais, mascarar ou preservar aromas e gostos, transformar líquidos em ingredientes sólidos de fácil manuseio, entre outros (BALASSA & FANGER, 1971; DZIEZAK, 1988; JACKSON & LEE, 1991; SHAHIDI & HAN, 1993; RÉ, 2000).

### **3.2.2. Cronologia e Aplicação**

Esta tecnologia vem sendo estudada desde os anos 30, mas o primeiro produto que foi comercializado com material encapsulado surgiu nos anos 50, com a indústria de fotocópias, na qual se produzia um papel de cópia sem carbono: o papel recebia uma fina camada de micropartículas que se rompia com a pressão da ponta do lápis e liberava uma tinta incolor que, em contato com um reagente,

tornava-se colorida e idêntica ao original (DZIEZAK, 1988; RÉ, 2000). Depois vieram outros produtos, como óleo de laranja encapsulado para aplicações de flavours, combustível para foguetes e, na área farmacêutica, o uso da tecnologia na produção de pílulas e comprimidos (DZIEZAK, 1988).

Na área de alimentos os estudos foram iniciados nos anos 60, pelo Instituto de Pesquisas Southwest (EUA), com a microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a oxidação e a perda de substâncias voláteis e controlar a liberação do aroma. Além dos aromas, a aplicação desta tecnologia estendeu-se à incorporação de aditivos naturais e ingredientes (corantes, temperos, acidulantes, vitaminas e minerais) que alteram a textura, melhoram a qualidade nutricional, aumentam a vida de prateleira ou controlam as propriedades dos alimentos processados (RÉ, 2000).

Um campo em que a microencapsulação vem trazendo grandes benefícios é o nutricional (JACKSON & LEE, 1991). Levando-se em consideração as deficiências de vitaminas e minerais, governos e instituições têm procurado preveni-las através da fortificação de alimentos ou suplementação com medicamentos. A microencapsulação é necessária uma vez que estes nutrientes, estando livres, reagem muito facilmente, alteram cor e gosto e se degradam. O produto encapsulado, além de mascarar o sabor dos minerais, reduz a reatividade e modula sua liberação nas áreas do trato gastrointestinal que permitam melhor absorção (RÉ, 2000).

### **3.2.3. Principais Métodos para Produção de Micropartículas**

Inúmeros métodos permitem microencapsular um material ativo, dependendo do tipo do material, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para sua ação. A diferença básica entre os métodos está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante,

sendo que a combinação entre eles pode ser de natureza física, química ou físico-química (RÉ, 2000).

Estes métodos se dividem em físicos, químicos e físico-químicos. O processo físico envolve a combinação de recheio e material de parede por meios mecânicos em um ambiente em que o recobrimento do recheio pelo material de parede está favorecido (JACKSON & LEE, 1991), ao contrário do que acontece nos métodos químicos, nos quais existem forças químicas envolvidas.

Dentro dos métodos físicos, alguns exemplos são *spray drying*, *spray cooling*, *spray chilling*, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização. Entre os métodos químicos estão inclusão molecular e polimerização interfacial, e os métodos físico-químicos mais estudados são coacervação e incorporação em lipossomas (JACKSON & LEE, 1991; RÉ, 2000).

#### **3.2.4. Materiais de Parede**

A escolha do material de parede usado depende das propriedades físicas e químicas do material de recheio, do processo usado para formar as micropartículas e das propriedades esperadas (JACKSON & LEE, 1991; NORI, 1996). A efetividade do funcionamento da cápsula depende das propriedades do material da membrana, que tem papel essencial na liberação do conteúdo apenas no momento adequado.

Um material de parede ideal precisa ser insolúvel e não reativo com o recheio, deve ter boas propriedades emulsificantes, ser um bom formador de filmes, ter baixa viscosidade mesmo em soluções com alto teor de sólidos, apresentar baixa higroscopicidade, baixo custo, não possuir sabor desagradável, ser estável e oferecer boa proteção ao ingrediente encapsulado (JACKSON & LEE, 1991; SHAHIDI & HAN, 1993).

Estes materiais são uma variedade de filmes naturais ou sintéticos de grau alimentício. Polímeros lipossolúveis são usados para microencapsular um conteúdo hidrossolúvel e vice-versa. Os materiais mais utilizados incluem: *gomas* (goma arábica, alginato de sódio, carragena), *carboidratos* (amido, dextrina, açúcar, xarope de milho), *celuloses* (carboximetilcelulose, etilcelulose, metilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose), *lipídios* (cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídios e diglicerídios, óleos, gorduras e óleos hidrogenados) e *proteínas* (glúten, caseína, gelatina e albumina) (SHAHIDI & HAN, 1993).

### **3.2.5. Tensoativos**

Na produção das partículas, além dos polímeros usados como constituintes da matriz, são adicionadas também substâncias chamadas de tensoativos ou surfactantes, que são caracterizadas por possuírem um grupo com pouca atração e outro com forte atração pelo recheio, as porções hidrofóbicas e hidrofílicas (ROSEN, 1998). Os tensoativos apresentam duas propriedades fundamentais: capacidade de absorção nas interfaces e a tendência de associação para formarem estruturas organizadas (PORTER, 1991).

A estabilidade que a molécula de tensoativo fornece a uma interface é função da sua estrutura molecular. As maiores forças que o tensoativo apresenta para ter estruturas bem definidas são interações hidrofóbicas e hidrofílicas, que competem para dar duas forças de oposição agindo na região interfacial: uma tenta diminuir e outra aumentar a área interfacial da molécula. As forças de atração são principalmente atrações hidrofílicas e forças de tensão interfacial; as forças de repulsão são mais complexas e difíceis de explicar, elas incluem repulsão eletrostática entre os grupos polares, repulsão hidrostática e interações entre grupos polares e apolares (VILLAMAGNA et al, 1995).

A medida da afinidade de um tensoativo para óleo ou água pode ser identificada através do HLB (Balanço Hidrofílico/Hidrofóbico), valor este que pode ser calculado ou determinado experimentalmente. Tensoativos com HLB de 3 a 6 são considerados tensoativos hidrofóbicos e são melhores em emulsões água em óleo; já tensoativos com HLB de 8 a 18 são hidrofílicos e são mais usados em emulsões óleo em água. Dependendo da aplicação do produto final, diferentes tensoativos ou misturas de tensoativos podem ser usados, como sais biliares, polisorbatos (triestearato de sorbitana, trioleato de sorbitana), lecitina e fosfolipídios em geral (MAGEE JR. & OLSON, 1981a; SIEKMANN & WESTESEN, 1992; SCHUWARZ et al, 1994; MEHNERT & MÄDER, 2001; FRIEDRICH & MÜLLER-GOYMANN, 2003; HEURTAULT et al., 2003).

Na estabilização da emulsão, na produção de partículas lipídicas, por exemplo, os aspectos estruturais do tensoativo dependem da agregação, forma e tamanho, capacidade de absorção e tensões superficiais e interfaciais (VILLAMAGNA et al, 1995). A formação e estabilização da emulsão ocorrem em três estágios: no primeiro há a aproximação das moléculas de tensoativo na interface óleo/água; no segundo há uma mistura das moléculas na interface e no terceiro acontece a estabilização interfacial, com formação de filme (VILLAMAGNA et al, 1995). O primeiro estágio depende da natureza das moléculas, suas concentrações e viscosidade. O segundo depende das tensões interfaciais, viscosidade interfacial e da natureza do tensoativo. E a formação do filme, no terceiro estágio, é dependente das interações entre os grupos polares das moléculas de tensoativo e as cadeias apolares dos lipídios, e também com os grupos apolares das próprias moléculas de tensoativo (VILLAMAGNA et al, 1995).

Tensoativos são de grande importância na estabilidade das micropartículas lipídicas, além da escolha apropriada do material lipídico. Sua composição afeta o tamanho da partícula, a estabilidade física durante a estocagem e também o perfil de liberação ou razão de degradação enzimática. A escolha do tensoativo depende dos compostos usados na produção das partículas e também da aplicação do produto final. Não existe um tensoativo ideal, mas é possível

escolher uma molécula que forneça mais qualidades que propriedades indesejáveis ao produto final (FREITAS & MÜLLER, 1998; MEHNERT & MÄDER, 2001; KIM et al, 2005).

Lecitina comercial é uma mistura de diglicerídios de, predominantemente, ácidos esteárico, palmítico e oléico, que são ligados com éster colina no ácido fosfórico (VILLAMAGNA et al, 1995). Em relação a outros tensoativos, à lecitina têm sido atribuídos menores efeitos de ligação, de ação como tensoativo, por causa da sua baixa mobilidade, advinda de seu alto peso molecular e da sua estrutura molecular (energeticamente estável) (VILLAMAGNA et al, 1995).

### **3.2.6. Materiais de Recheio**

Materiais usados como recheio podem estar em qualquer estado físico: líquido, sólido, gasoso, pode ser uma dispersão ou uma emulsão complexa (JACKSON & LEE, 1991).

Qualquer material que necessite de proteção, isolamento do meio ou liberação modulada pode ser encapsulado (RISCH, 1995). Alguns exemplos de materiais usados como recheio na área de alimentos são: acidulantes, *flavours*, corantes naturais, temperos, adoçantes, vitaminas e minerais, lipídios, enzimas, microrganismos, gases, entre vários outros (DZIEZAK, 1988; JACKSON & LEE, 1991).

### **3.2.7. Liberação do Recheio**

Microencapsulação tem sido usada com muitos objetivos, contudo, em recentes anos, o conceito de liberação modulada, ou seja, a liberação do recheio de uma forma controlada sob um período de tempo pré-determinado, se torna cada vez mais importante e, assim, interessante para a indústria (GOUIN, 2004). A

liberação modulada pode garantir efetividade do recheio, ampliação da gama de aplicabilidade e garantia da dose desejada, além da liberação em locais determinados, importante no caso da indústria farmacêutica (VOLOSOV et al, 2000).

As propriedades físicas e químicas tanto do recheio quanto do material de parede assim como a técnica usada na produção das cápsulas afetam diretamente a liberação do recheio no meio (JACKSON & LEE, 1991; DZIEZAK, 1993). No que diz respeito à matriz, densidade, cristalinidade, orientação, solubilidade, pré-tratamentos, nível de plasticidade e cross-linking são algumas propriedades diretamente ligadas ao perfil de liberação. Algumas propriedades da cápsula são tamanho (quanto menor o tamanho maior a liberação do recheio), espessura da parede (quanto menor a espessura maior a liberação), configuração e conformidade e quantidade de camadas de revestimento. Por fim, os parâmetros experimentais que possuem efeito no perfil de liberação são temperatura, pH, umidade, presença ou não de solvente e ações mecânicas (SHAHIDI & HAN, 1993).

A liberação do recheio pode acontecer de várias formas. A parede da partícula pode ser quebrada por ruptura mecânica, por difusão controlada, por aumento da temperatura, por dissolução em solventes (de longe a forma mais comumente usada na indústria de alimentos), por mudanças no pH do meio, por ação de força osmótica, por ação de enzimas, entre outros (JACKSON & LEE, 1991; REINECCIUS, 1995; GOUIN, 2004). Uma forma individual pode dominar, dependendo do material de parede e dos parâmetros experimentais, mas, geralmente, a forma de liberação varia durante o processo.

A ruptura mecânica, usada geralmente para liberação rápida, quando requerida, pode acontecer por forças externas, como pressão, ou por forças internas, como poderia ocorrer na micropartícula que inchasse por causa de seu revestimento seletivo. A liberação por ação de enzimas se dá quando o material de parede é biodegradado, implicando na liberação do recheio presente na cápsula. Já a difusão é regida por um gradiente de concentração e por forças

atrativas intermoleculares sendo a permeação modulada pela solubilidade da substância encapsulada na matriz e pela sua mobilidade através do material de cobertura (SHAHIDI & HAN, 1993; REINECCIUS, 1995).

Em alimentos, cristalização da matriz pode ser um fenômeno progressivo inicialmente criando barreiras para a difusão mas mais tarde se tornando tão impactante que a força da cristalização resulta em liberação rápida e não modulada, assim, é necessário o conhecimento e o controle deste processo para que a modulação da liberação não seja perdida (REINECCIUS, 1995).

A liberação pode ocorrer de diferentes formas, podendo representar quatro modelos teóricos de curva de liberação. O primeiro considera a existência de um mecanismo de “disparo” que inicia a liberação. Geralmente a presença de uma força externa é responsável pelo início da liberação, entretanto, outros fatores podem ser responsáveis por este “disparo”, tais como calor, luz, pH e degradações químicas da cápsula. O segundo mecanismo assume que a parede da cápsula atua como reservatório, supondo que a taxa de liberação é constante. O terceiro modelo pressupõe a migração através da parede mas considera um efeito adicional de liberação ocasionado por pequenos rompimentos na estrutura da cápsula, e o quarto modelo considera a parede como uma membrana semipermeável e seletiva a diferentes pesos moleculares (THIES, 1995).

Um estudo, encapsulando Verapamil, medicamento utilizado no tratamento de câncer, usando manteiga de cacau e um polissacarídeo como parede e Tween 80 como tensoativo, observou que o perfil de liberação foi independente da quantidade de recheio total presente na formulação; em todos os casos analisados o recheio foi liberado dentro de 12 horas, com um efeito “burst” nas primeiras três horas. Este perfil foi atribuído ao estado líquido da matriz lipídica a 37°C (temperatura usada no estudo) e à alta solubilidade do recheio na matriz lipídica (KIM et al, 2005).

### 3.2.8. *Spray Cooling*

É um processo semelhante ao *spray drying*, pois em ambos há uma dispersão do recheio no material liquefeito e aplicação de condições controladas (temperatura, agitação, tempo, etc) na fase de emulsão para produção das micropartículas. A diferença é que a temperatura usada no *spray drying* para a produção das partículas é alta, e no *spray cooling* a câmara é resfriada (THIES, 1987; DZIEZAK, 1988; SCHROOYEN et al, 2001).

São usados, no *spray cooling*, lipídios com pontos de fusão que podem variar de 45°C a 122°C, incluindo triglicerídios, diglicerídios, monoglicerídios, ácidos graxos livres, esteróides ou ceras (TAYLOR, 1983; DZIEZAK, 1988; JACKSON & LEE, 1991).

As micropartículas são produzidas pulverizando-se uma emulsão ou suspensão que contém o material de parede fundido com o recheio, que normalmente é líquido. Essa mistura é pulverizada por um atomizador ou bico aspersor e entra em uma câmara na qual o ar circula a uma temperatura baixa. A redução da temperatura resulta na solidificação do material e faz com que o recheio seja encapsulado (JACKSON & LEE, 1991).

Micropartículas produzidas por este processo são insolúveis em água. Assim, podem ser encapsulados produtos hidrofílicos, como minerais, vitaminas, enzimas, acidulantes, produtos voláteis e sensíveis a altas temperaturas, mas podem, também, serem encapsulados produtos hidrofóbicos, como alguns *flavours*, óleos essenciais, entre outros (DZIEZAK, 1988; JACKSON & LEE, 1991).

Este processo é o menos custoso e é rotineiramente usado para encapsular sais orgânicos e inorgânicos, ingredientes de textura, *flavours* e outros ingredientes para melhorar estabilidade em altas temperaturas e obter liberação modulada em ambientes aquosos; é usado também na conversão de ingredientes líquidos hidrofílicos em pós secos (GOUIN, 2004). As partículas assim produzidas são aplicadas em produtos de forno, misturas de sopa com alto teor de lipídios e outros alimentos gordurosos (TAYLOR, 1983).

Durante o processo de produção, é preciso que os parâmetros estabelecidos para as partículas sejam mantidos, caso contrário elas podem apresentar qualidade reduzida. Um ponto importante é a manutenção da temperatura durante todo o processo, evitando o fenômeno de polimorfismo dos lipídios, que pode levar a diferentes graus de cristalinidade nos lipídios, alterando características como liberação modulada e eficiente armazenamento do recheio (LAMB, 1987; DZIEZAK, 1988; JACKSON & LEE, 1991; SCHROOYEN et al, 2001).

As partículas produzidas por *spray cooling* podem conter quantidades de recheio não encapsulado, que se ligam à parte externa da matriz lipídica. Isto pode produzir uma elevada liberação inicial de recheio, sendo seguida de uma liberação que pode ser por força osmótica, difusão (mesmo que pequena) do recheio pela matriz, rupturas mecânicas e também por fusão dos lipídios formadores da matriz (GOUIN, 2004).

### **3.2.9. Nanopartículas Lipídicas**

#### *Surgimento e Desenvolvimento*

Matrizes com lipídios sólidos são usadas há anos, principalmente na indústria farmacêutica (MÜLLER et al, 2002a). No início dos anos 90, uma nova forma de matriz lipídica surgiu, produzida por homogeneização a alta pressão ou usando a técnica de precipitação de microemulsão, e foi chamada de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), uma vez que são usados apenas lipídios sólidos a temperatura ambiente (MÜLLER et al, 2002a). A SLN combinava as vantagens de outros sistemas carreadores, como estabilidade física, proteção a recheios sensíveis contra degradação, modulação da liberação e excelente tolerabilidade enquanto ao mesmo tempo minimizava alguns problemas (MEHNERT & MÄDER, 2001; WISSING et al, 2004a). A SLN, na área

farmacêutica, teve desenvolvimento para aplicação por várias rotas, incluindo parenteral, oral, dérmica, ocular, pulmonar e retal (WISSING et al, 2004a).

Posteriormente estas nanopartículas sofreram algumas modificações e foram produzidos mais dois tipos de matrizes lipídicas, os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) e as nanopartículas lipídicas conjugadas com recheio (LCD), que vieram superar as desvantagens apresentadas pelas SLN (WISSING et al, 2004a).

### *Características, Vantagens e Desvantagens*

SLN, NLC e LDC são partículas com matriz lipídica sólida e diâmetro médio na faixa de nanômetros. Além dos lipídios e do recheio, as partículas também possuem tensoativos (moléculas lipídicas como fosfolipídios ou também polímeros anfifílicos ou sais biliares), usados para auxiliar na estabilidade (HEURTAULT et al, 2003; WISSING et al, 2004a).

O recheio pode ser incorporado entre as cadeias de ácidos graxos, entre as camadas lipídicas ou ainda nas imperfeições da matriz. Dependendo da composição da formulação, da razão lipídio/recheio, de suas solubilidades e dos parâmetros de produção, o recheio pode estar localizado no interior das partículas, na parte externa da parede ou também disperso em toda a matriz lipídica (MÜLLER et al, 2002b ; WISSING et al, 2004a).

SLN são partículas feitas a partir de lipídios sólidos a temperatura ambiente, ou seja, podem ser usados triglicerídios altamente purificados, misturas de glicerídeos, ácidos graxos, esteróides e ceras (MEHNERT & MÄDER, 2001; WISSING et al, 2004a).

SLN, assim como lipossomas, micelas, nanoemulsões e microemulsões, têm uma série de vantagens sobre outras tecnologias, pois são preparadas com compostos que são bem tolerados, não apresentam toxicidade aguda ou crônica, é uma técnica com baixo custo de produção, podem ser encapsulados compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos, as partículas apresentam liberação modulada e

excelente estabilidade física e a produção em grande escala é possível. Contudo, há algumas potentes limitações, quais sejam: capacidade limitada de eficiência de encapsulação, expulsão do recheio durante o armazenamento e alto conteúdo de água na dispersão (MEHNERT & MÄDER, 2001; MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; HEURTAULT et al, 2003; WISSING et al, 2004a;).

A expulsão do recheio durante o armazenamento pode ser explicada pelo polimorfismo dos lipídios. Estes passam de uma formação menos ordenada para uma com mais ordem, mais perfeita, aumentando a quantidade de cristais lipídicos e assim diminuindo os espaços disponíveis para a acomodação do recheio, levando-o a expulsão. Este mesmo fenômeno limita a eficiência de encapsulação, pelo mesmo motivo, pois uma estrutura cristalina com poucas imperfeições não pode acomodar grandes quantidades de recheio. A cristalização dos lipídios ocorre com mais intensidade quando são usadas moléculas lipídicas quimicamente idênticas e espacialmente compatíveis, com cadeias carbônicas longas e perfeitas, como no caso das SLN, onde são usados apenas lipídios sólidos (MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; HEURTAULT et al, 2003; WISSING et al, 2004a;). Polimorfismo é uma das mais importantes alterações físicas que afeta a estabilidade das nanopartículas lipídicas porque lipídios que sofrem esta degradação têm propriedades termodinâmicas diferentes, como pontos de fusão, padrões de difração de raios-X e solubilidade (HEURTAULT et al, 2003).

Estas desvantagens levaram ao desenvolvimento de uma nova forma de nanopartículas lipídicas, chamadas de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), que são produzidas por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, com cadeias carbônicas espacialmente incompatíveis, diferentes, que formam pequenas micelas espalhadas no interior da matriz sólida, dando às nanopartículas melhores eficiências de encapsulação e propriedades de liberação (MÜLLER, et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; JORES et al, 2004). Como são usadas misturas de lipídios sólidos e líquidos, as cadeias de ácidos graxos são incompatíveis espacialmente, gerando maiores imperfeições nos cristais lipídicos,

e também retardando a transformação lipídica para formas mais estáveis, assim aumentando a capacidade de encapsulação (pela presença dos lipídios líquidos) e as propriedades de liberação (pela modulação da matriz sólida). Com a mistura lipídica de sólidos e líquidos o produto final é sólido, mas não cristalino (JENNING & GOHLA, 2001; MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; JORES et al, 2004; WISSING et al, 2004a).

Existem três tipos de NLC: no primeiro tipo, são misturados lipídios com cadeias carbônicas espacialmente diferentes, o que leva a maiores imperfeições na matriz lipídica e, assim, maiores espaços para acomodação do recheio. Maiores eficiências de encapsulação são conseguidas, assim, pela mistura de lipídios sólidos e pequenas quantidades de lipídios líquidos, apenas o suficiente para aumentar as imperfeições da matriz lipídica (MÜLLER et al, 2002b; WISSING et al, 2004a).

No segundo tipo, é usada uma grande quantidade de lipídio líquido, e o recheio, que, em geral, tem solubilidade maior em lipídios líquidos, fica mais disperso, e, após a solidificação da emulsão, fica encapsulado por este e o lipídio sólido, por sua vez, encapsula as micelas de lipídio líquido/recheio. Esta estrutura permite uma maior capacidade de encapsulação pois são formadas várias micelas de lipídio líquido/recheio, e também permite melhores propriedades de liberação, principalmente uma liberação mais prolongada. Tais micelas não podem ser criadas por mecanismos químicos, elas são geradas pelo processo de separação de fases durante a produção das partículas (MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; WISSING et al, 2004a).

Por fim, no último tipo, misturas especiais de lipídios são usadas para evitar a cristalização dos lipídios após o resfriamento, uma vez que estas misturas produzem partículas sólidas porém não cristalinas (MÜLLER et al, 2002b; WISSING et al, 2004a).

Apesar de estudos revelarem que o lipídio líquido ficaria no interior do lipídio sólido e por seus numerosos defeitos na estrutura cristalina a incorporação do recheio seria facilitada (JENNING & GOHLA, 2000), dados de difração de

raios-X, DSC e ressonância magnética nuclear indicaram que a distribuição dos lipídios líquidos dentro da matriz não é provável porque os lipídios sólidos apenas tolerariam pequenos defeitos em seus cristais, e então o lipídio líquido seria expulso durante o processo de cristalização (JORES et al, 2003).

SLN são úteis para a incorporação de recheios lipofílicos e em baixas quantidades. Para superar esta limitação, foi desenvolvida mais uma geração de nanopartículas, as nanopartículas lipídicas conjugadas com recheio (LCD), que podem encapsular mais de 33% de recheio. Em sua produção, o lipídio e o recheio, insolúveis entre si, são preparados pela formação de um sal ou por uma ligação covalente (por exemplo de éster ou éter). Na formação do sal, um recheio livre (básico) e um ácido graxo são dissolvidos em um solvente adequado, que é evaporado, depois, sob baixa pressão. Na ligação covalente, o recheio (um sal) e o lipídio, na forma de álcool graxo, reagem na presença de um catalisador, e o produto é então purificado por recristalização. Este produto obtido é então processado com tensoativo para formação das nanopartículas usando a homogeneização a alta pressão (WISSING et al, 2004a). Com LCD também podem ser encapsulados recheios hidrofílicos com grande eficiência (WISSING et al, 2004a).

### *Estabilidade*

A transformação dos lipídios resulta em aumento da superfície da partícula, diminuição da capacidade de encapsulação e perda do controle sob a liberação modulada, levando a problemas de estabilidade física das partículas. Por isso, esta estabilidade tem sido muito estudada, principalmente através de medidas de tamanho de partícula (por difração a laser), carga superficial (potencial zeta) e análise térmica (calorimetria diferencial de varredura - DSC) (MEHNERT & MÄDER, 2001; WISSING et al, 2004b; WISSING et al, 2004a). As técnicas de espectroscopia de infravermelho e reometria também estão sendo usadas para análises da estabilidade das nanopartículas (MEHNERT & MÄDER, 2001).

Numerosos fatores têm influência no tamanho médio das partículas, tais como a composição lipídica, o processo de formulação, a composição do recheio, os parâmetros do processo (temperatura, equipamento de homogeneização, etc.), a presença de tensoativo, as condições de estocagem, entre outros. Estes fatores têm influência no processo de cristalização lipídica e, portanto, no aumento do tamanho médio das partículas (HEURTAULT et al, 2003). Além da difração a laser, difração de luz dinâmica, ressonância magnética nuclear, microscopia óptica, microscopia eletrônica e microscopia de força atômica também têm sido usados para análise do tamanho de partículas (MEHNERT & MÄDER, 2001; HEURTAULT et al, 2003; WISSING et al, 2004b).

Quase todas as partículas em contato com um líquido adquirem uma carga em sua superfície, e o potencial elétrico no plano externo da partícula é chamado de potencial zeta (HEURTAULT et al, 2003). O potencial zeta é um indicador importante e útil de mudanças na carga da partícula, que pode ser usado para prever e controlar a sua estabilidade. A medida do potencial zeta é geralmente importante para o entendimento dos processos de dispersão e agregação nas aplicações das nanopartículas (MEHNERT & MÄDER, 2001; HEURTAULT et al, 2003). De forma geral, altas medidas de potencial zeta apresentam pouca ou nenhuma aglomeração, e vice versa, isso porque quanto maior o valor do potencial maior a carga da partícula e maior a força de repulsão. Contudo, esta regra não pode ser seguida rigorosamente quando se trata de sistemas com estabilizantes estéricos, porque sua absorção diminui o potencial zeta devido a mudanças no plano externo da partícula (MEHNERT & MÄDER, 2001; HEURTAULT et al, 2003).

Termoanálise por DSC fornece informações sobre o comportamento de cristalização, transição polimórfica, temperatura de fusão, entalpia e grau de cristalinidade das partículas. Outra técnica usada para análise do grau de cristalinidade é a difração de raios-X, que também torna possível a investigação da tendência de cristalinidade e a transição polimórfica das nanopartículas (MEHNERT & MÄDER, 2001; HEURTAULT et al, 2003; WISSING et al, 2004b).

Um estudo investigou o efeito da luz e da temperatura na estabilidade física de partículas de SLN. Foi encontrado que o aumento das partículas podia ser induzido por um aumento da energia cinética (luz, temperatura) no sistema. Estocagem sob luz artificial levou a gelatinização do sistema com 7 dias de armazenamento, sob luz natural dentro de 3 meses e em ambiente escuro o aumento das partículas começou depois de 4 meses de estocagem. Esta gelatinização foi acompanhada de uma diminuição do potencial zeta de -24,7 para menos de -18 mV. A influência da temperatura da estocagem no tamanho da partícula também foi analisada, e houve um aumento muito rápido quando em altas temperaturas enquanto que, sob refrigeração, o tamanho foi estável por 180 dias (FREITAS & MÜLLER, 1998).

Ainda neste mesmo estudo, foi analisado o estado polimórfico dos lipídios. Com o aumento da energia cinética, houve polimorfismo de uma mistura de formas  $\beta'$ ,  $\alpha$  e sub  $\alpha$  em apenas  $\beta'$ , acompanhada de formação de gel. Se as condições que aumentaram a energia cinética (temperatura e luz) tivessem sido controladas, esta transformação poderia ter sido evitada (FREITAS & MÜLLER, 1998).

Outro problema que pode dificultar a estabilidade física das partículas é o fenômeno de gelificação, que é a transformação de um sistema de baixa viscosidade para um gel viscoso (HEURTAULT et al, 2003). Este fenômeno apresenta alguns indutores, semelhante ao fenômeno da cristalização, como alta temperatura e presença de luz; o grau de gelificação está correlacionado com o grau de cristalização dos lipídios (MEHNERT & MÄDER, 2001; HEURTAULT et al, 2003). Assim como na cristalização, altos valores de potencial zeta indicam pouca ou nenhuma gelificação, e baixos valores de potencial zeta indicam a presença do fenômeno (MEHNERT & MÄDER, 2001).

A escolha do tensoativo e sua concentração também influenciam a estabilidade física da partícula. Foi encontrado que com tensoativos iônicos elas tiveram tamanho médio bem menor do que com tensoativos não iônicos, e também que, quando usada uma mistura de tensoativo as partículas

apresentaram baixos tamanhos médios e alta estabilidade durante a estocagem (MEHNERT & MÄDER, 2001).

Estudos analisaram a incorporação de lecitina na matriz lipídica para melhorar e aumentar a incorporação do recheio. Inicialmente, a incorporação do recheio aumentou linearmente com o aumento da concentração de lecitina presente, e este efeito foi atribuído à formação de micelas no meio da matriz lipídica, permitindo adicional incorporação do recheio (FRIEDRICH & MÜLLER-GOYMANN, 2003; SCHUBERT et al, 2006). Em análise com incorporação de até 50% de lecitina, medidas do tamanho da partícula mostraram que a incorporação de 30% de lecitina levou a grande redução de tamanho (de 278 para 100 nm), mas maiores incorporações não produziram alterações adicionais. Neste mesmo estudo foi detectado que o tamanho das partículas ficou constante durante 4 semanas. Análises de ressonância magnética nuclear indicaram que com até 30% de lecitina a estabilização da partícula ocorre com uma camada mononuclear de lecitina enquanto que com 40 e 50% são formadas várias camadas, e, como o tamanho das partículas não se altera, provavelmente não há interação adicional da lecitina dentro da matriz lipídica, indicando que este excesso de tensoativo se apresenta em multicamadas na superfície da matriz, o que mostra que não haverá maiores incorporações de recheio nestas partículas (SCHUBERT et al, 2006).

### *Liberção do Recheio*

O perfil de liberação pode ser influenciado por modificações na matriz lipídica, pela concentração de tensoativo e pelos parâmetros de produção (WISSING et al, 2004a). Quando usadas, na produção, temperaturas mais altas, o efeito de liberação rápido (efeito “burst”) é grande, assim como quando se usa alta concentração de tensoativo (MÜLLER et al, 2002b). Em resumo, quanto maior a solubilidade do recheio na fase aquosa durante a produção, mais pronunciado vai ser o efeito “burst”; a solubilidade aumenta com aumento da temperatura de produção e com o aumento da concentração de tensoativo, contudo, pouco ou

nenhum efeito “burst” é observado quando a partícula é produzida a baixas temperaturas, e baixa ou nenhuma concentração de tensoativo (MÜLLER et al, 2002b).

Outro cuidado é com os pontos de fusão dos lipídios e dos recheios. Acredita-se que recheios com pontos de fusão maiores que os apresentados pelos lipídios usados precipitam primeiro depois do processo de homogeneização a quente, e, então, este recheio se acomoda dentro da fase lipídica. Caso aconteça o contrário, ou seja, o recheio apresente um ponto de fusão menor do que o dos lipídios, ele vai se precipitar depois, e vai se distribuir na superfície lipídica, acarretando à nanopartícula baixa eficiência de encapsulação e liberação com acentuado efeito “burst” (JENNING & GOHLA, 2001).

São possíveis três tipos de perfis de liberação, de acordo com a localização do recheio na matriz lipídica. Se o recheio se encontra na superfície externa da matriz, a liberação será de forma rápida. Alguns fatores que contribuem para a ocorrência deste perfil são grande área de superfície, alto coeficiente de difusão (pequenas moléculas) e baixa viscosidade da matriz (WISSING et al, 2004a). O recheio pode ser também liberado de forma lenta e progressiva, quando este se encontrar espalhado por toda a extensão da matriz lipídica, e, por fim, o último perfil de liberação é aquele que ocorre quando o recheio se encontra no interior da partícula, envolto por uma grossa camada lipídica, implicando em uma liberação muito lenta, que se arrasta por semanas ou até meses (WISSING et al, 2004a).

Naturalmente, estes perfis não ocorrem isoladamente, podendo se intercalar, uma vez que o recheio pode estar depositado de várias formas em uma mesma formulação. Vários estudos têm sido feitos para análises de formulações farmacêuticas, com aplicações parenterais principalmente, que necessitam de uma liberação muito bem modulada, tanto na quantidade quanto no local, que geralmente é muito específico (WISSING et al, 2004a). Já em casos de aplicação dermatológica, uma liberação rápida pode ser desejada, o que poderia aumentar a penetração do recheio na pele (MÜLLER et al, 2002b).

Um estudo feito por JENNING et al (2000a), testando nanopartículas lipídicas compostas de uma mistura de mono-, di- e triglicerídios de ácido behênico na encapsulação de vitamina A, encontrou que nas primeiras seis horas a liberação foi constante e modulada, mas após houve um aumento considerado e imediato. Foi proposto que a mudança na conformação dos lipídios para uma forma mais estável alterou (diminuiu) os espaços onde o recheio estava alocado, acarretando a sua expulsão rápida e imediata. Ainda neste estudo, comparando-se a liberação da vitamina A em meio aquoso e lipídico, os autores encontraram que, no primeiro meio, a liberação do recheio foi constante e modulada nas primeiras 24 horas, mas depois foi consideravelmente aumentada, devido, como dito acima, às alterações polimórficas dos lipídios. Quando foi testada em meio lipídico a liberação foi rápida e imediata, por causa da solubilidade do recheio neste meio. Todos estes resultados foram confirmados por análises de difração de raios-X e medidas de DSC (JENNING et al, 2000a).

Partículas compostas por matriz lipídica na encapsulação de uma proteína foram avaliadas, e observou-se que a incorporação da proteína na matriz criou um ambiente propício para liberação a longo tempo; imagens de microscopia confocal, realizadas antes do início da liberação, mostraram uma distribuição fina e homogênea da proteína por toda a partícula, característico do segundo tipo de liberação, conforme explicado acima. Na análise da liberação, 60% do recheio foi liberado durante os primeiros quatro dias, aumentando para 85% no 20º dia e alcançando mais de 92% até o 63º dia. Foi encontrada uma boa correlação entre o estudo da liberação do recheio e imagens captadas por microscopia confocal realizados nos mesmos tempos; as imagens mostraram muito bem a difusão do recheio dentro da matriz lipídica (KOENNINGS, et al, 2007).

### *Aplicação*

Por causa do seu diminuto tamanho, as nanopartículas lipídicas podem ser injetadas por vias intravenosa, subcutânea, oral, tópica e intramuscular, e podem

ser usadas para fármacos que necessitam de liberação em locais específicos. Para esta última exigência podem ser usadas substâncias com reconhecimento específico de células, e assim, por exemplo, ficar garantida a liberação de um medicamento no combate a um câncer. E ainda ficaria minimizado o risco de embolia por um possível coágulo sanguíneo (MEHNERT & MÄDER, 2001; HEURTAULT et al, 2003; WISSING et al, 2004a).

Outra possível aplicação para estas nanopartículas seria uma forma de garantir resposta imunológica a certos antígenos. Os antígenos encapsulados induzem a resposta imunológica, assim evitando infecções e outras doenças. Estas partículas oferecem uma apresentação prolongada e controlada do antígeno ao sistema imune (WISSING et al, 2004a).

As nanopartículas podem ser aplicadas em formulações para usos dermatológicos, como cremes antiidade, protetor solar e loções hidratantes (MÜLLER et al, 2002b).

### **3.2.10. Técnicas Utilizadas para o Estudo da Estabilidade de Partículas Lipídicas**

Como exposto anteriormente, várias técnicas são usadas para estudo de micro e nanopartículas, avaliando características, alterações e comportamento dos compostos em diferentes meios, temperaturas, tempos, entre outros. Destas técnicas, duas bastante usadas são a Difração de Raios-X e a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

#### *Difração de Raios-X*

Raios-X são produzidos pelo bombardeamento de um metal com elétrons de alta energia, que podem ser difratados quando passam através de um cristal

(SUN, 2004). A difração de raios-X depende da incidência do feixe de luz no material (SUN, 2004).

Análises de difração de raios-X fornecem valores numéricos de dois importantes parâmetros, o espaço interplanar e a intensidade da difração. O primeiro é característica do padrão do cristal presente na amostra, e o segundo provê informação sobre a estrutura do cristal (SUN, 2004).

Na difração de raios-X, elétrons são a principal causa da dispersão. Esta técnica é usada para análises de estruturas moleculares, principalmente em amostras com reconhecida presença de cristais. É usada para muitos tipos de amostras, mas há ressalvas para análises de soluções. Uma aplicação muito comum é no estudo de proteínas, em que a técnica indica a estrutura molecular sem demoras e com precisão (SUN, 2004). Para estudos em lipídios, difração de raios-X fornece sem equívocos a forma polimórfica correta apresentada pela amostra, e esta análise pode prover informações adicionais além das características polimórficas, tais como comprimento da cadeia carbônica ou densidade da camada lipídica, através do espaço interplanar (TIMMS, 1984).

#### *Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)*

Por definição, análise térmica é “um grupo de técnicas no qual uma propriedade física de uma substância é determinada em função da temperatura enquanto esta é submetida a um programa controlado de temperatura” (MA et al, 1990). As técnicas de análise térmica podem ser utilizadas para determinação de capacidade calorífica, condutividade térmica, variações de entalpias, temperaturas de mudança de estados, investigação de estabilidade e decomposição térmica, caracterização de materiais, pureza de substâncias, entre outros, em vários produtos como materiais biológicos, materiais de construção, catalisadores, vidros, cerâmicas, explosivos, alimentos, entre muitos tipos (NASSU, 1994).

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica na qual a diferença de energia fornecida a uma substância e à referência é determinada em

função da temperatura enquanto ambas estão submetidas a um programa controlado de temperatura (MA et al, 1990).

O DSC é uma técnica muito versátil, permite a análise de amostras sólidas, líquidas e voláteis, tanto na forma de pó, filmes ou fibras, entre outras. Pode-se trabalhar em faixa de temperatura de  $-170^{\circ}\text{C}$  a  $725^{\circ}\text{C}$ , e operações que exigem temperaturas sub-ambientes são realizadas com auxílio de acessórios adequados, como cilindros de nitrogênio líquido, quando temperaturas muito baixas são necessárias (NASSU, 1994).

A velocidade de aquecimento/resfriamento pode variar de  $0,1$  a  $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ou ser constante, no caso de operações isotérmicas. Velocidades pequenas são usadas, geralmente, em estudos que envolvem cristais líquidos, pureza de compostos e cinética de reações. No que diz respeito ao tamanho da amostra, velocidades maiores que  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  são usadas para amostras pequenas e para amostras maiores são encontrados melhores resultados com análises a velocidades menores, como por exemplo  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (NASSU, 1994).

As curvas de DSC apresentam a energia diferencial fornecida à amostra (expressa como  $dH/dt$ , em  $\text{mJs}^{-1}$ ,  $\text{mW}$  ou  $\text{mcals}^{-1}$ ) na ordenada, contra temperatura ( $T$ ) ou tempo ( $t$ ) na abscissa, e os fenômenos térmicos se apresentam como desvios da linha de base na direção exotérmica ou endotérmica (NASSU, 1994).

Nas curvas, temperatura onset é aquela correspondente ao ponto no qual a curva começa a se desviar da linha base. Temperatura máxima de pico corresponde à evolução máxima de pico, na velocidade utilizada; esta temperatura não representa o máximo da reação nem o término do fenômeno, e sua posição é muito influenciada pela velocidade de aquecimento/resfriamento, se tornando um dado não muito relevante na análise geral da curva de DSC. Temperatura de conclusão do fenômeno térmico é a temperatura na qual a curva volta à linha base após a conclusão do fenômeno térmico (NASSU, 1994).

DSC pode fornecer informações sobre o comportamento térmico de proteínas, carboidratos, lipídios e água. Tanto transições de primeira ordem

quanto de segunda ordem podem ser detectadas, sendo que, em alimentos, a primeira é principalmente relacionada com desnaturação de proteínas, gelatinização de amido e fusão de gorduras, e um exemplo da segunda é a transição vítrea, uma característica de substâncias amorfas, encontrada em grânulos de amido e produtos congelados. Grau de pureza de aromas e estabilidade oxidativa de gorduras também podem ser analisadas por DSC (MA et al, 1990; RAEMY & LAMBELET, 1991).

No caso de lipídios, o DSC, acoplado a um acessório que permita operações a temperatura sub-ambiente, é uma ótima técnica para investigação de seus comportamentos térmicos e monitoramento de processos de modificação, como fracionamento, hidrogenação e interesterificação. Para tais substâncias, temperaturas entre -50 e 80°C são, geralmente, as de maior interesse, e as entalpias variam de 100 a 200 J/g (MA et al, 1990; RAEMY & LAMBELET, 1991). As curvas de fusão de DSC são complexas e não são diretas na interpretação; isto é conseqüência do polimorfismo dos lipídios, que depende da história térmica da amostra. Já as curvas de cristalização, que são influenciadas somente pela composição química da amostra, são mais reprodutíveis e simples que as de fusão (SZYDLOWSKA-CZERNIAK et al, 2005).

Polimorfismo, a existência de mais de uma forma cristalina em uma mesma substância, é freqüentemente encontrado em lipídios. Muitos triglicéridos ocorrem em  $\alpha$ ,  $\beta'$  ou  $\beta$ , que, nesta ordem, apresentam crescentes estabilidades termodinâmicas, temperaturas e entalpias de fusão e dilatação térmica (NASSU, 1994). O método mais usado para análise do polimorfismo é a difração de raios-X, pois as formas poliméricas possuem diferentes padrões de identificação, mas o DSC pode investigar a influência da composição química, parâmetros de processo e história térmica no polimorfismo, uma vez que temperatura, tempo e número de etapas de aquecimento e resfriamento podem ser reproduzidos sob controle de um microcomputador (MA et al, 1990; RAEMY & LAMBELET, 1991; NASSU, 1994).

DSC também pode ser usado para determinação qualitativa da composição de triglicerídios de óleos e gorduras naturais, e misturas de óleos em um alimento podem ser identificadas. Assim, DSC é uma técnica útil para detectar adulteração em gorduras comerciais (MA et al, 1990).

Medidas calorimétricas obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) podem permitir uma avaliação acurada do comportamento de fusão e de cristalização de materiais cristalinos como micropartículas produzidas com material lipídico. A quebra ou fusão das junções cristalinas durante o aquecimento ou o resfriamento da amostra pode produzir informações sobre o polimorfismo, a ordenação cristalina, a possibilidade de misturas eutéticas ou informações sobre o processo de transição vítrea (JENNING et al, 2000c).

Análise de DSC não deve ser a única e determinante no estudo de comportamento térmico de uma substância, uma vez que apenas monitora as mudanças ocorridas nas propriedades térmicas, que estão associadas com fenômenos físicos não especificados. Outras técnicas, como difração de raios-X, microscopia e termogravimetria, devem ser usadas para determinação precisa da natureza destes fenômenos (NASSU, 1994).

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Material**

Ácido esteárico puro (Synth, São Paulo, Brasil – 69,6°C, 18:0); ácido oléico (Synth, São Paulo, Brasil – 16°C, 18:1); gordura vegetal hydrogenada comercial (Mesa, Cia Leco de Produtos Alimentícios, acidez 0,05%, ponto de fusão 39°C ± 2°C, e composição de ácidos graxos: 11% C16:0, 12% C18:0, 27% C18:1, 22% C18:2, 25% trans e 3,8% outros, conforme informação do fabricante); lecitina de soja (E322, Caramuru, São Simão, GO); D-glicose anidra (Synth, São Paulo, Brasil); kit enzimático Laborlab para determinação da glicose; Tween 80 (Synth, São Paulo, Brasil); clorofórmio (F. Maia, São Paulo, Brasil).

### **4.2. Métodos**

#### **4.2.1. Métodos analíticos**

##### **4.2.1.1. Ponto de amolecimento – “Melting Point”**

O ponto de amolecimento das misturas de lipídios foi determinado pelo método do tubo capilar aberto, imerso em água sob agitação e aquecimento, de acordo com o método oficial Cc 3-25 da AOCS (1990). As amostras foram analisadas em triplicata.

#### **4.2.1.2. Determinação de glicose**

As quantidades de glicose presentes nas amostras analisadas foram determinadas por método enzimático, com leitura em espectrofotômetro Beckman DU-70 (CA, USA) com comprimento de onda de 505 nm, segundo HENRY et al (1974). A quantificação da glicose foi feita através da equação de uma curva padrão, construída previamente utilizando o referido método. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.2.1.3. Determinação da distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas**

Amostras de cada formulação foram suspensas em glicerol e observadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E800 (Tokyo, Japan). Foram coletadas imagens, através do programa Image Pro Plus 4.0, utilizando-se objetivas de 10x e 20x, e realizadas medidas de diâmetro médio de 300 partículas, com auxílio deste mesmo programa. As médias, desvio padrão e os gráficos destas medidas foram feitos com auxílio do programa Microcal Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

#### **4.2.1.4. Morfologia das micropartículas**

Para observação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram fixadas em stubs de alumínio com uma fita de cobre dupla face e cobertas com uma fina camada de ouro em sputter Balzers SCD50 (Baltec, Liechtensten) com corrente de 40 mA por 180 segundos. As imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JMS-T300 (Tokyo, Japan), com aceleração de voltagem de 10 kV e aumentos de 300x e 2500x.

#### **4.2.1.5. Determinação da eficiência de encapsulação**

##### **4.2.1.5.1. Determinação da eficiência de encapsulação total (EET)**

A eficiência de encapsulação total foi determinada pesando-se 200 mg de micropartículas, acrescentando-se 12,4 mL de clorofórmio, agitando em super mixer Cole-Parmer por 10 segundos e com descanso por 10 minutos, por duas vezes; após o descanso, foi acrescentado 12,4 mL de água destilada e agitou-se novamente no super mixer por 1 minuto com descanso por 10 minutos, repetindo-se este passo por mais duas vezes; então os tubos foram colocados na centrífuga Sorvall Instruments RC-5C (USA) por 10 minutos a 15000 rpm, segundo a metodologia, com modificações, de MASCHKE et al (2007). Ao final, alíquotas, retiradas da parte aquosa da mistura, foram analisadas para determinação da quantidade de glicose presente.

##### **4.2.1.5.2. Determinação de glicose superficial (GS)**

Foram pesadas 200 mg de micropartículas em tubo de ensaio com tampa e acrescentada 10 mL de solução de Tween 80 0,1%. O tubo foi agitado por 10 segundos, e então este conteúdo foi filtrado em papel filtro, de acordo com metodologia do grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade – FEA. Nas alíquotas deste filtrado foi determinada a quantidade de glicose.

##### **4.2.1.5.3. Determinação da eficiência de encapsulação efetiva (EEE)**

A eficiência de encapsulação efetiva foi calculada subtraindo-se a quantidade de glicose superficial da quantidade total de glicose determinada por grama de amostra. O valor obtido foi comparado à quantidade inicialmente pesada para a produção das micropartículas. O quociente expresso em porcentagem

representa o valor da eficiência de encapsulação efetiva, conforme demonstrado na equação abaixo.

$$\text{EEE (\%)} = \frac{\text{EET} - \text{GS}}{\text{g de glicose pesado}} \times 100$$

#### **4.2.1.6. Avaliação da liberação do recheio**

A porcentagem de recheio liberado foi determinada em duas horas, com análise nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Para cada amostra foram pesados 200 mg de micropartículas em tubo de ensaio com tampa, e então acrescentados 10 mL de solução de Tween 80 a 0,1%. Os tubos foram colocados sob agitação em agitador rotativo de tubos Phoenix AP-22 (São Paulo, Brasil) e, em cada intervalo de tempo, a solução foi filtrada em papel filtro, de acordo com metodologia do grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade – FEA, e nas alíquotas destes filtrados foi determinada a quantidade de glicose presente.

#### **4.2.1.7. Avaliação Calorimétrica**

As curvas de cristalização e fusão foram obtidas por análise calorimétrica de varredura, utilizando-se um DSC Perkin Elmer TA7 (Germany), com módulo de resfriamento com refrigeração mecânica.

As amostras (7,0 a 13,0 mg) foram colocadas em cápsulas de alumínio seladas e analisadas de acordo com o método oficial Cj 1-94 da AOCS (2004), em ambiente inerte (N<sub>2</sub>), no qual a amostra é submetida ao seguinte programa de temperatura: permanência a 80°C por 10 minutos, decréscimo de 80°C a -40°C a uma taxa de resfriamento de 10°C/min, manutenção a -40°C por 30 minutos e

aquecimento de -40°C a 80°C a uma taxa de aquecimento de 5°C/min. A referência utilizada foi uma cápsula vazia e o equipamento foi calibrado com Índio.

No gráfico de DSC, a temperatura de início é a temperatura na qual se inicia o processo (de cristalização ou de fusão), a temperatura final é aquela na qual o processo termina, a temperatura do pico é aquela na qual o efeito é máximo, e a área mostra a intensidade do efeito (entalpia).

#### **4.2.1.8. Difração de Raios-X**

As amostras, espalhadas na lâmina sem que nenhuma pressão fosse exercida sob elas, foram submetidas a análises de difração de raios-X em cinco tempos (0, 7, 14, 21 e 28 dias) em aparelho Shimadzu modelo XRD 7000 (Tokyo, Japan). Foram usadas radiação de cobre ( $\alpha = 1.54060$ ), voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA, intervalo de medida em  $2\theta$  de 3 a 35 graus, com tamanho de passo de 0,02 graus, usando contagem de tempo de 0,60 seg a temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). O aparelho foi equipado com fenda de divergência de 1 grau e fenda receptora de 0,30 mm, de acordo com metodologia do grupo de pesquisa do Laboratório de Difração de Raios-X – Instituto de Química da Unicamp.

As cristalinidades das amostras foram calculadas, com auxílio do programa Microcal Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA), através da seguinte equação:

$$\text{Cr} = \frac{\text{Fc}}{(\text{Fc} + \text{Fa})} \times 100\%$$

onde Cr é a cristalinidade, Fc é a região cristalina e Fa a região não cristalina da amostra.

## 4.2.2. Procedimento Experimental

### 4.2.2.1. Formulação das misturas lipídicas

Foram formadas cinco misturas lipídicas (Tabela 2), sendo três misturas ternárias e duas binárias, analisadas para serem usadas na produção das micropartículas. Nas misturas e também na gordura vegetal hidrogenada foi determinado o ponto de amolecimento (*melting point*).

**Tabela 2** – Misturas cujos pontos de amolecimento foram analisados

Mistura lipídica	Gordura vegetal hidrogenada (%)	Ácido oléico (%)	Ácido esteárico (%)
1	33,3	33,3	33,3
2	50	25	25
3	25	25	50
4	50	0	50
5	0	50	50

### 4.2.2.2. Determinação das condições de preparação da emulsão

Foi determinado o efeito do tensoativo e do tempo de agitação na estabilidade da emulsão. Para tal, foram preparadas emulsões água em óleo com solução de glicose 60% e a mistura lipídica 1, utilizando uma proporção lipídio/solução de glicose de 80/20 e velocidade de agitação de 10000 rpm, diferentes porcentagens de lecitina (0%, 3%, 4%, 5% e 7%, peso/peso em relação à quantidade lipídica presente) e diferentes tempos de agitação (30 segundos, 2 minutos e 5 minutos). Também foi analisada uma emulsão de referência, com as mesmas proporções lipídicas e proporção lipídio/solução de glicose, com tempo

de agitação de 30 segundos e com a adição de 5% de triestearato de sorbitana ao invés de lecitina, de acordo com os resultados de CHAMBI et al (2007); isto foi feito para permitir a comparação entre dois diferentes tensoativos.

Em uma segunda etapa, a emulsão que apresentou a melhor estabilidade foi testada em relação ao efeito da velocidade de agitação na estabilidade. A emulsão com mistura lipídica 1, solução de glicose 60%, 5% de lecitina de soja, proporção lipídio/solução de glicose 80/20 e tempo de agitação de 5 minutos foi testada em três diferentes velocidades (6000, 10000 e 14000 rpm). O procedimento de medida foi o mesmo em todas as análises, e está descrito abaixo.

Cada mistura de lipídios e lecitina foi pesada e aquecida a 70°C até a fusão completa. Acrescentou-se a solução de glicose e esta emulsão foi homogeneizada em ultraturrax Ika T18 Basic (Rio de Janeiro, Brasil) e colocada em proveta, em banho maria, também a 70°C. A separação de fases foi observada por 30 minutos, nos tempos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 e 30 minutos, e também foi observada a formação (presença e quantidade) de bolhas de ar em cada emulsão. As análises foram feitas em triplicata e a estabilidade da emulsão observada visualmente.

Emulsões totalmente estáveis foram quantificadas como 100% de estabilidade e aquelas que se desfizeram completamente no tempo de observação foram denominadas 0% de estabilidade. A escala graduada da proveta foi utilizada para conversão em porcentagem de estabilidade.

#### **4.2.2.3. Produção das micropartículas lipídicas (MpL)**

Definidas as condições de preparação da emulsão de melhor estabilidade, para a produção das micropartículas lipídicas foram selecionadas duas misturas lipídicas ternárias que, na avaliação do ponto de amolecimento (*melting point*), apresentaram as maiores temperaturas de *melting*.

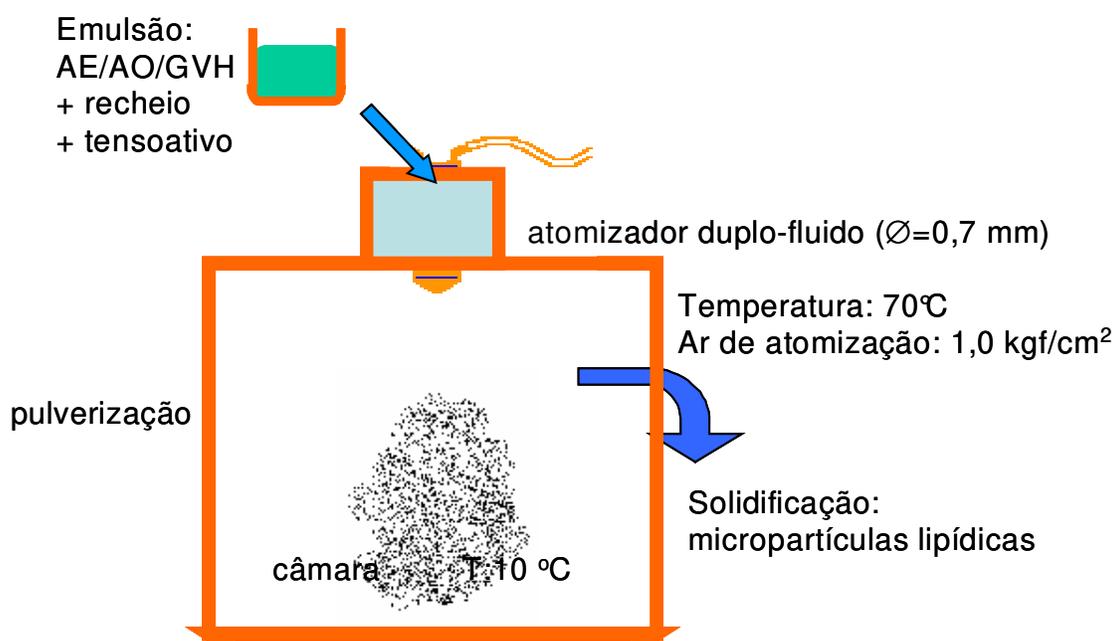
Na produção das micropartículas, a proporção lipídica foi mantida constante (2/4 de ácido esteárico, 1/4 de ácido oléico e 1/4 de gordura vegetal hidrogenada ou 1/3 de ácido esteárico, 1/3 de ácido oléico e 1/3 de gordura vegetal hidrogenada), bem como a quantidade de lecitina (5%, definida peso/peso em relação à quantidade lipídica presente), a velocidade (10000 rpm) e o tempo de agitação (5 minutos). A proporção lipídio/solução de glicose e a concentração da solução de glicose foram variadas de acordo com o planejamento experimental, apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3** – Composição das formulações analisadas

Formulações	Proporção lipídio/solução de glicose	Concentração da solução de glicose (%)	g de glicose/100g de micropartículas
F1	75/25	40	9,4
F2	90/10	40	3,9
F3	75/25	60	14,1
F4	90/10	60	5,6
F5	75/25	80	19,2
F6	90/10	80	7,3

Cada mistura de lipídios e lecitina foi pesada, aquecida a 70°C, e, após a total fusão, foi acrescentada a solução de glicose. Esta emulsão, mantida a esta temperatura, foi homogeneizada em ultraturrax Ika T18 Basic (Rio de Janeiro, Brasil) por cinco minutos a 10000 rpm, e então pulverizada em atomizador duplo-fluido (parte integrante do mini Spray Dryer Büchi-191, diâmetro de nozzle de 0,7 mm, Flawil, Switzerland) aquecido também a 70°C e pressão de ar de 1,0 kgf/cm<sup>2</sup> com a atomização efetuada dentro de uma câmara resfriada (Ultratorac, LKB – Bromma, Germany) a 10°C, conforme diagrama apresentado na Figura 1. As amostras foram então armazenadas, em recipientes fechados, em câmara climática, mantida a 4,8°C. Nas partículas produzidas foram determinadas

medidas de quantidade de glicose superficial, eficiência de encapsulação total e efetiva, liberação do recheio em duas horas, e também a caracterização morfológica, distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas, imediatamente após a sua produção.



**Figura 1** – Diagrama de produção das micropartículas

#### 4.2.2.4. Determinação da estabilidade das micropartículas lipídicas

Para o estudo da estabilidade foram selecionadas as formulações que apresentaram quantidade de glicose superficial menor, intermediária e maior. Foi incluída também uma nova formulação (MpLR – micropartícula lipídica de referência), igual àquela com a menor quantidade de glicose superficial, mas produzida sem a adição de lecitina. As formulações avaliadas estão apresentadas na Tabela 4.

Novas micropartículas foram então produzidas, da mesma forma descrita anteriormente, armazenadas a 23°C por 28 dias e submetidas a análises de glicose superficial, eficiência de encapsulação total e efetiva e difração de raios-X semanalmente, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias.

**Tabela 4** – Composição das formulações avaliadas no estudo da estabilidade

Formulações	Proporção lipídio/solução de glicose	Concentração da solução de glicose (%)	g de glicose/100g de micropartículas
F1	75/25	40	9,4
F4	90/10	60	5,6
F5	75/25	80	19,2
MpLR	75/25	40	9,4

#### 4.2.2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey através do programa Statistic 6.0 (Statsoft Inc Tulsa, OK, USA). Foram consideradas significativas as diferenças entre as médias no intervalo de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Ponto de amolecimento – “Melting Point”

Para a formação da matriz foram escolhidos três lipídios: ácido esteárico, por ser um lipídio sólido a temperatura ambiente; ácido oléico, por ser um lipídio líquido a temperatura ambiente e por apresentar estabilidade oxidativa superior a outros lipídios líquidos, o que conferiria maior segurança ao produto final; e gordura vegetal hidrogenada, por ser um produto com perfil lipídico simples, com poucos tipos de ácidos graxos presentes em sua formulação.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, observa-se que a mistura 2 não poderia ser usada como uma mistura lipídica apropriada para a produção das micropartículas pois apresentou uma temperatura de amolecimento relativamente baixa, o que poderia limitar sua utilização. As misturas 4 e 5 foram testadas mas não foram utilizadas para produção das micropartículas por serem misturas binárias, quando o objetivo foi produzir e testar micropartículas lipídicas que tivessem em sua formulação os três tipos de lipídios escolhidos. As misturas 1 e 3 apresentaram as duas maiores temperaturas de amolecimento entre as misturas ternárias testadas. Entre as duas, a mistura 1 foi utilizada para a realização do estudo das melhores condições para o preparo e a estabilidade das emulsões anteriores à produção das micropartículas. As duas misturas, entretanto, foram utilizadas para testar a produção das micropartículas.

**Tabela 5** – Temperatura de amolecimento das misturas analisadas e da gordura vegetal hidrogenada utilizada na produção das micropartículas

Mistura lipídica	Temperatura de amolecimento (°C) ± desvio padrão
1	44,0 ± 0,0
2	39,6 ± 0,6
3	49,3 ± 0,6
4	52,6 ± 0,6
5	46,0 ± 0,0
Gordura Vegetal Hidrogenada	40,0 ± 0,0

## 5.2. Estabilidade das emulsões

As variáveis concentração de tensoativo e tempo de agitação foram inicialmente avaliadas quanto à estabilidade das emulsões produzidas e os resultados estão apresentados na Tabela 6. Pode-se observar que, fixando o tempo de agitação em 30 segundos, quanto maior a concentração de lecitina maior foi a estabilidade da emulsão. Esta se mostrou ainda maior quando, além da concentração de lecitina, aumentou-se também o tempo de agitação. O melhor resultado quanto a estabilidade foi obtido com a emulsão de 5% de lecitina e tempo de agitação de cinco minutos. A emulsão com 7% de lecitina e tempo de agitação de 5 minutos não foi testada pois aquela contendo 7% de lecitina e 30 segundos de agitação, mesmo tendo boa estabilidade ao longo do tempo, apresentou formação de muitas bolhas de ar, o que poderia influir negativamente na formação das micropartículas, e por isso foi descartada.

A emulsão denominada de referência, que foi incluída no teste para permitir uma comparação entre dois diferentes tensoativos, mostrou que a lecitina foi mais eficiente do que o triestearato de sorbitana, pois, com o mesmo tempo de agitação e mesma concentração de tensoativo, a emulsão com lecitina apresentou

estabilidade bem melhor do que a com triestearato de sorbitana (em 30 minutos,  $85,1\% \pm 16,4$  com lecitina, e  $8,0\% \pm 13,9$  com triestearato de sorbitana). A emulsão de referência também apresentou uma estabilidade menor do que a emulsão sem nenhum tensoativo (0% de lecitina, 30 segundos de emulsificação), indicando, assim, que triestearato de sorbitana não foi tão eficaz como tensoativo na estabilização da emulsão com a formulação escolhida no presente estudo.

**Tabela 6** – Estabilidade das emulsões compostas por ácido esteárico, ácido oléico e gordura vegetal hidrogenada (estabilidade  $\pm$  desvio padrão) expressa em porcentagem com diferentes tempos de agitação e concentrações de tensoativo (velocidade de agitação  $\rightarrow$  10000 rpm)

Tempo de observação (min)	Estabilidade (% $\pm$ desvio padrão)								
	Tempo de agitação								
	Lecitina (%)								Triesteurato de sorbitana (%)
	0%	3%	4%	5%	7%	4%	5%	5%	5%
2	97,4 $\pm$ 1,1	98,6 $\pm$ 2,3	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	62,9 $\pm$ 54,5
3	94,9 $\pm$ 1,1	95,4 $\pm$ 3,1	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	56,8 $\pm$ 49,7
4	92,3 $\pm$ 1,9	92,9 $\pm$ 4,3	100 $\pm$ 0,0	98,7 $\pm$ 2,1	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	50,6 $\pm$ 46,9
5	89,1 $\pm$ 2,9	91,6 $\pm$ 5,2	100 $\pm$ 0,0	97,5 $\pm$ 4,3	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	45,7 $\pm$ 44,5
6	87,1 $\pm$ 2,9	90,9 $\pm$ 6,2	98,7 $\pm$ 1,1	96,3 $\pm$ 6,4	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	99,3 $\pm$ 1,1	100 $\pm$ 0,0	38,3 $\pm$ 38,9
7	86,5 $\pm$ 1,9	89,6 $\pm$ 5,2	98,7 $\pm$ 1,1	95,1 $\pm$ 8,5	100 $\pm$ 0,0	98,7 $\pm$ 1,0	99,3 $\pm$ 1,1	100 $\pm$ 0,0	32,1 $\pm$ 33,4
8	84,6 $\pm$ 1,9	89,0 $\pm$ 6,3	98,1 $\pm$ 1,9	94,4 $\pm$ 8,1	99,3 $\pm$ 1,1	98,7 $\pm$ 1,0	98,7 $\pm$ 2,1	100 $\pm$ 0,0	29,0 $\pm$ 29,6
9	83,9 $\pm$ 1,1	88,3 $\pm$ 7,4	97,4 $\pm$ 2,2	93,2 $\pm$ 8,7	98,7 $\pm$ 2,2	97,5 $\pm$ 2,1	98,7 $\pm$ 2,1	100 $\pm$ 0,0	27,1 $\pm$ 27,8
10	83,9 $\pm$ 1,1	87,7 $\pm$ 7,2	96,8 $\pm$ 2,9	92,6 $\pm$ 9,8	97,4 $\pm$ 2,2	96,3 $\pm$ 1,8	97,4 $\pm$ 2,9	100 $\pm$ 0,0	23,5 $\pm$ 24,1
20	83,9 $\pm$ 1,1	83,2 $\pm$ 8,4	95,5 $\pm$ 2,9	87,6 $\pm$ 15,4	94,2 $\pm$ 5,1	94,3 $\pm$ 1,8	94,3 $\pm$ 3,3	99,3 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 16,1
30	82,7 $\pm$ 0,0	79,3 $\pm$ 9,2	94,2 $\pm$ 3,3	85,1 $\pm$ 16,4	91,7 $\pm$ 5,5	89,4 $\pm$ 2,8	93,0 $\pm$ 2,9	98,7 $\pm$ 2,2	8,0 $\pm$ 13,9

Após a identificação da concentração de lecitina e do tempo de agitação que produziram a melhor estabilidade da emulsão, foram testadas três velocidades de agitação (6000, 10000 e 14000 rpm). Os resultados obtidos quanto à estabilidade estão apresentados na Tabela 7.

Observou-se que a velocidade de agitação também influenciou a estabilidade da emulsão, uma vez que aquela com agitação a 6000 rpm teve uma menor estabilidade comparada às apresentadas pelas emulsões produzidas a 10000 e a 14000 rpm após 4 minutos. Tanto a 10000 quanto a 14000 rpm as emulsões apresentaram boa estabilidade física, optando-se pela emulsão obtida com 5 minutos de agitação a 10000 rpm pois nesta condição ocorreu menor formação de bolhas de ar, que poderiam influenciar negativamente na qualidade das micropartículas.

Assim, a emulsão com 5% de lecitina e agitação por 5 minutos a 10000 rpm foi identificada como a melhor condição quanto a estabilidade da emulsão, sendo escolhida para a produção das micropartículas.

**Tabela 7** – Estabilidade da emulsão com 5% de lecitina e 5 minutos de emulsificação (estabilidade  $\pm$  desvio padrão) com diferentes velocidades de emulsificação

Tempo de observação (min)	Estabilidade (%)		
	Velocidade de emulsificação (rpm)		
	6000	10000	14000
2	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
3	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
4	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
5	98,7 $\pm$ 2,1	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
6	98,1 $\pm$ 3,2	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
7	98,1 $\pm$ 3,2	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
8	97,5 $\pm$ 4,3	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
9	97,5 $\pm$ 4,3	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
10	97,5 $\pm$ 4,3	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
20	94,4 $\pm$ 4,9	99,3 $\pm$ 1,1	100 $\pm$ 0,0
30	92,6 $\pm$ 6,6	98,7 $\pm$ 2,2	100 $\pm$ 0,0

### 5.3. Etapa 1 – Caracterização das micropartículas lipídicas

#### 5.3.1. Produção das micropartículas

Analisando-se as micropartículas produzidas com as duas misturas lipídicas ternárias escolhidas, observou-se que, para a proporção lipídica de 1/3 de ácido esteárico, 1/3 de ácido oléico e 1/3 de gordura vegetal hidrogenada, as micropartículas se apresentaram visualmente muito aglomeradas, dificultando o manuseio durante a caracterização e podendo mascarar a avaliação da liberação

do recheio. Este comportamento não foi observado na mistura lipídica contendo 2/4 de ácido esteárico, 1/4 de ácido oléico e 1/4 de gordura vegetal hidrogenada, e, portanto, somente as micropartículas produzidas com esta proporção lipídica foram analisadas quanto a quantidade de recheio superficial, eficiência de encapsulação, liberação do recheio e caracterização morfológica.

### **5.3.2. Caracterização das micropartículas**

#### **5.3.2.1. Distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas**

Não foram observadas diferenças nos diâmetros médios das micropartículas analisadas e todas as formulações apresentaram valores entre 25 e 32  $\mu\text{m}$ , conforme apresentado na Tabela 8. Esta falta de diferença pode ter sido decorrente dos altos desvios padrão observados, inerentes às características do material obtido por pulverização em *spray cooling*. A distribuição de tamanho das micropartículas (Figura 2) apresentou distribuição unimodal para todas as formulações estudadas.

Pode-se também observar na Tabela 8 que o aumento da quantidade de recheio não produziu variação no tamanho médio das micropartículas. Efeito oposto foi observado para partículas contendo cera de carnaúba ou ácido esteárico e dois recheios, um hidrofílico e outro hidrofóbico, onde foi observado que, independente do recheio usado, o tamanho médio da partícula diminuía com o aumento da quantidade de recheio encapsulado. Os autores justificaram a diminuição pelo aumento do tempo e da energia no processo de produção por causa do aumento do peso da emulsão, e isto conseqüentemente implicaria em maior fragmentação final e menor tamanho médio das micropartículas (RODRIGUEZ et al, 1999).

A faixa de tamanho médio obtida neste trabalho (25 a 32  $\mu\text{m}$ ) se situa na mesma faixa obtida (26 a 30  $\mu\text{m}$ ) quando diferentes matrizes lipídicas foram

produzidas utilizando um recheio hidrofóbico em condições operacionais semelhantes às usadas aqui (SAVOLAINEN et al, 2002).

**Tabela 8** – Diâmetro médio das micropartículas (média  $\pm$  desvio padrão)

Formulações	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )
F1	28,4 $\pm$ 12,0
F2	26,0 $\pm$ 10,9
F3	28,4 $\pm$ 10,8
F4	25,9 $\pm$ 9,9
F5	31,6 $\pm$ 13,4
F6	28,7 $\pm$ 12,1

F1  $\rightarrow$  formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F2  $\rightarrow$  formulação 2 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

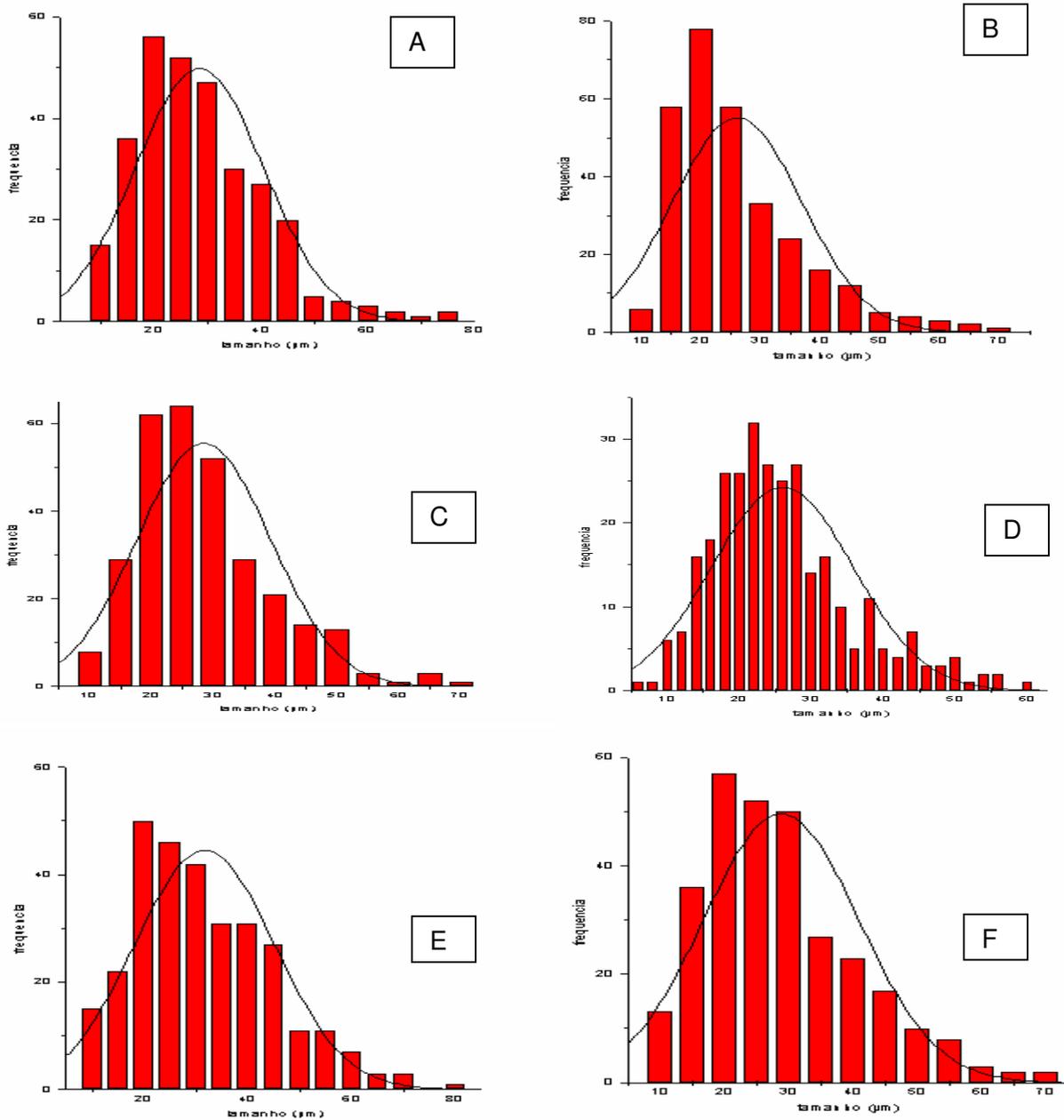
F3  $\rightarrow$  formulação 3 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F4  $\rightarrow$  formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

F5  $\rightarrow$  formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F6  $\rightarrow$  formulação 6 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

5% de lecitina em todas as formulações.



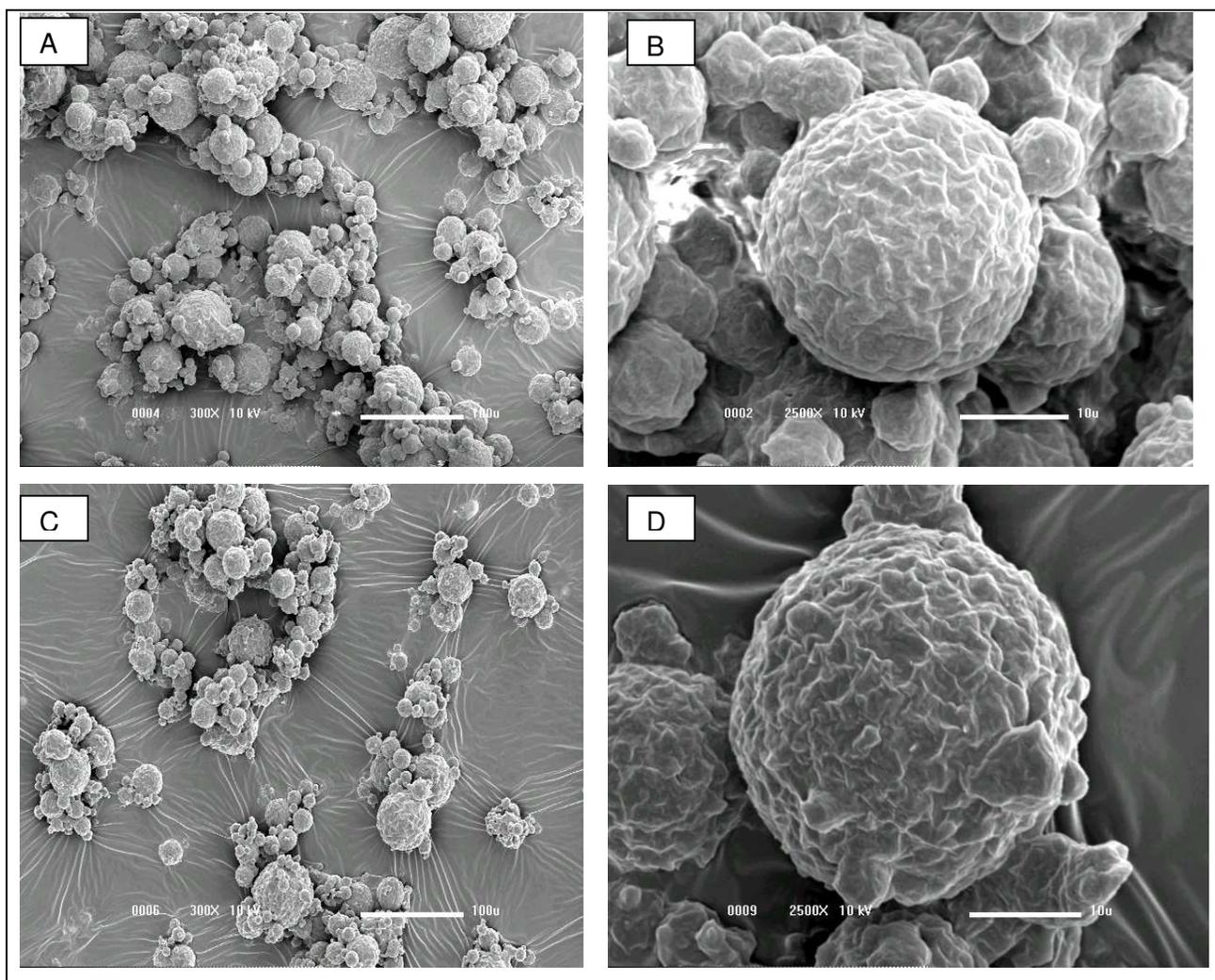
**Figura 2** – Distribuição de tamanho: (A) F1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25), (B) F2 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10), (C) F3 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25), (D) F4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10), (E) F5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25), (F) F6 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

### 5.3.2.2. Morfologia das micropartículas

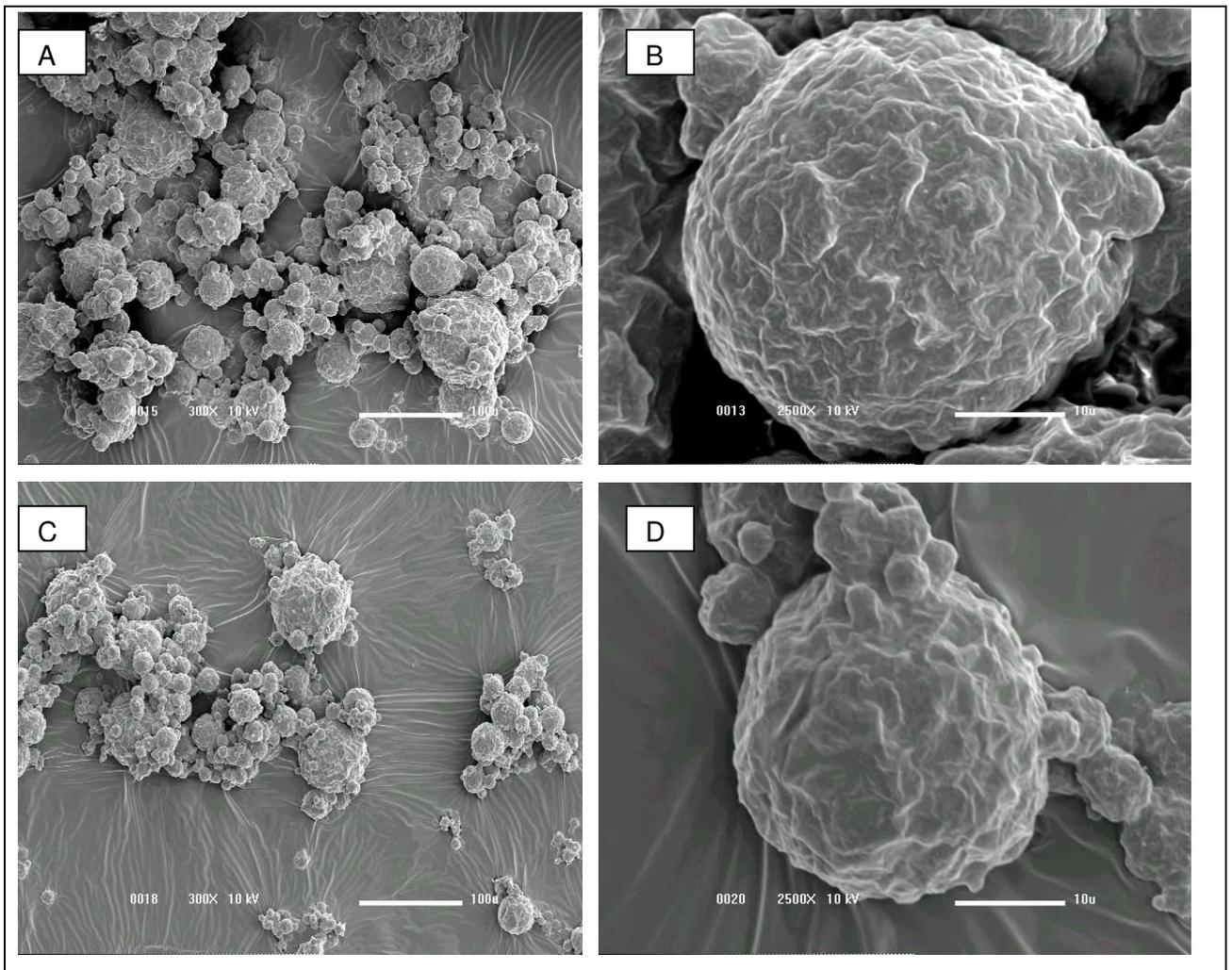
As imagens das micropartículas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das seis formulações estudadas estão apresentadas nas Figuras 3, 4 e 5.

As imagens mostram, em todas as formulações, partículas com paredes rugosas mas contínuas, sem rachaduras ou furos. Pode-se também observar a grande variação de tamanhos, confirmando os resultados observados na determinação do tamanho médio e distribuição de tamanho, obtidos por microscopia óptica. Formas irregulares, não lisas, observadas indicam que o lipídio líquido pode estar formando pequenas micelas no meio da matriz sólida, não alterando a aparência externa das micropartículas, uma vez que superfícies irregulares foram observadas anteriormente quando lipídios sólidos a temperatura ambiente foram utilizados para produzir micropartículas lipídicas (JORES et al, 2004). A rugosidade observada parece ser produzida pela presença de ácido esteárico conforme observado anteriormente por outros autores (RODRIGUEZ et al, 1999; SAVOLAINEN et al, 2002).

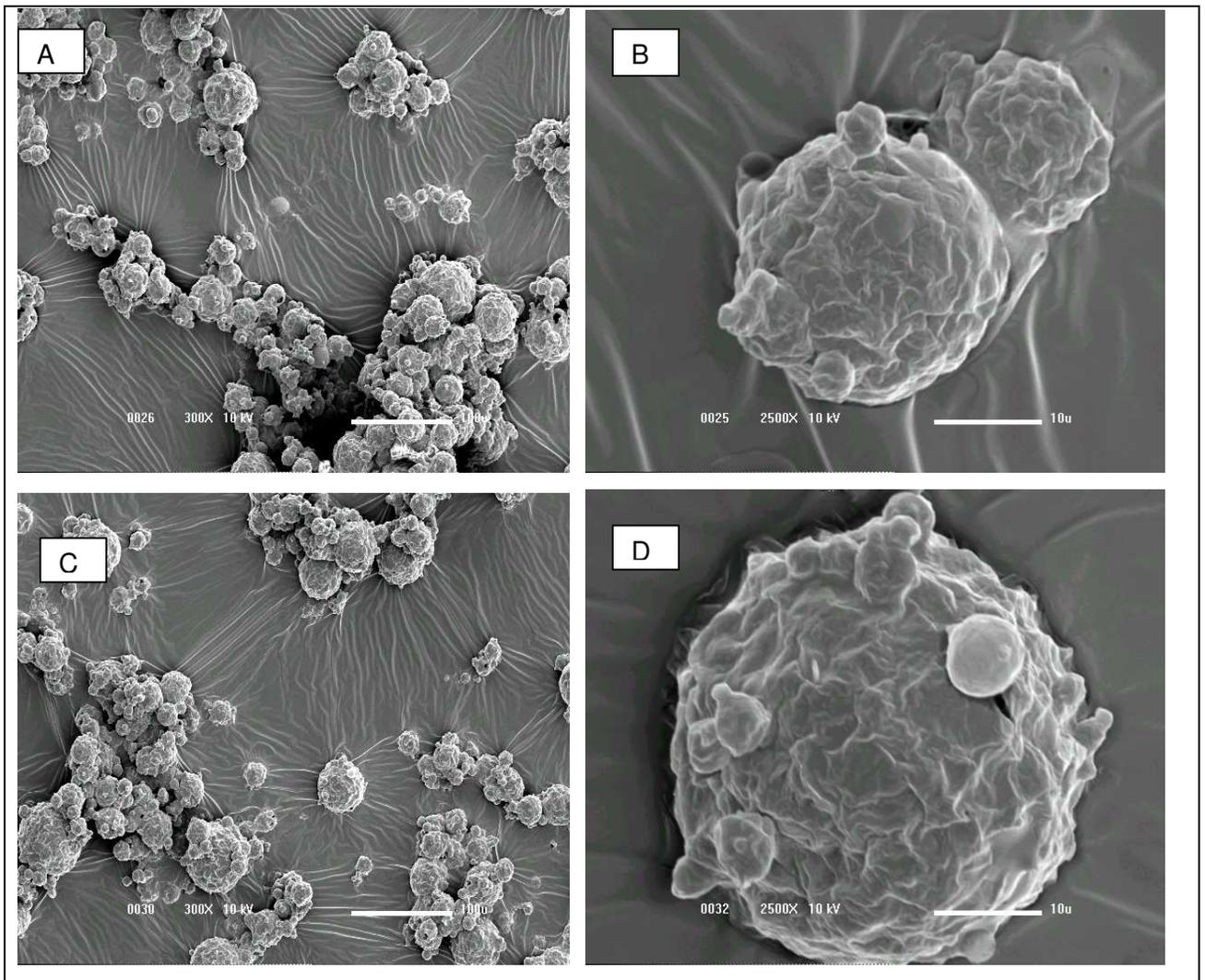
Por outro lado, matrizes lipídicas contendo triestearina e ácido behênico produzidas por *spray cooling* apresentaram-se esféricas e com paredes lisas. Estes autores observaram também que a adição de lecitina nas formulações estudadas melhorava a continuidade e homogeneidade das partículas (ELDEM et al, 1991a).



**Figura 3** – Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura das seguintes formulações: (A) F1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25) (300x), (B) F1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25) (2500x), (C) F2 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10) (300x), (D) F2 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10) (2500x)



**Figura 4** – Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura das seguintes formulações: (A) F3 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25) (300x), (B) F3 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25) (2500x), (C) F4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10) (300x), (D) F4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10) (2500x)



**Figura 5** – Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura das seguintes formulações: (A) F5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25) (300x), (B) F5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25) (2500x), (C) F6 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10) (300x), (D) F6 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10) (2500x)

### **5.3.3. Determinação de glicose superficial e eficiência de encapsulação efetiva**

As porcentagens de glicose superficial e de eficiência de encapsulação efetiva determinadas nas formulações estudadas, um dia após a produção das micropartículas, estão apresentadas na Tabela 9. Estes resultados mostram que a formulação contendo a maior quantidade de glicose (solução de glicose 80% e proporção lipídio/solução de glicose de 75/25 – formulação 5) apresentou a maior porcentagem de glicose superficial, indicando que parte do recheio não foi encapsulada durante o processo de produção. Por outro lado, a menor porcentagem de glicose não encapsulada foi observada na formulação 1 (solução de glicose 40% e proporção lipídio/solução de glicose de 75/25), na qual foi incluída metade da quantidade de glicose presente na formulação 5. Estes resultados indicam que a quantidade de glicose em solução aquosa incluída na micropartícula influenciou fortemente na capacidade de encapsulação da formulação.

Quanto à eficiência de encapsulação efetiva, todas as formulações apresentaram altas porcentagens de encapsulação (todas acima de 70%), que pode ter sido devido à composição da matriz lipídica utilizada: a presença do lipídio líquido a temperatura ambiente (ácido oléico), que pode ter auxiliado na retenção do recheio por dificultar a organização cristalina e a alteração polimórfica, resultando em maior espaço para a acomodação do recheio; este lipídio pode também ter produzido pequenas micelas com o recheio, distribuídas no interior da matriz sólida. Um terceiro efeito pode ser atribuído à presença da lecitina, que, por suas propriedades tensoativas, permite uma melhor interação e acomodação do recheio hidrofílico na matriz hidrofóbica (JENNING et al, 2000b; MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; SCHUBERT & MÜLLER-GOYMANN, 2005).

**Tabela 9** – Quantidade de glicose superficial (%) e eficiência de encapsulação efetiva (%) determinadas um dia após a produção

Formulações	Glicose superficial (%)	Eficiência de encapsulação efetiva (%)
F1	2,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	97,8 ± 4,0 <sup>b</sup>
F2	5,5 ± 0,8 <sup>b</sup>	78,3 ± 7,2 <sup>a</sup>
F3	2,9 ± 0,9 <sup>ab</sup>	97,8 ± 5,4 <sup>b</sup>
F4	6,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	93,7 ± 4,6 <sup>b</sup>
F5	19,7 ± 6,3 <sup>c</sup>	82,5 ± 5,8 <sup>ac</sup>
F6	13,9 ± 2,1 <sup>d</sup>	85,9 ± 2,9 <sup>c</sup>

letras iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença estatística a  $p < 0,05$

F1 → formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F2 → formulação 2 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

F3 → formulação 3 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F4 → formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

F5 → formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F6 → formulação 6 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

Altas eficiências de encapsulação utilizando matrizes lipídicas na produção de micropartículas por *spray cooling* foram anteriormente obtidas. Na encapsulação de solução de glicose em matriz lipídica contendo gordura de leite e os tensoativos Span 60 e Glicomul, obtiveram-se eficiências de encapsulação variando de 80 a 90% (MAGEE JR. & OLSON, 1981a). Em estudo, avaliando-se diferentes matrizes lipídicas e diferentes tensoativos, foram observadas, em todas as formulações testadas, altas eficiências de encapsulação, acima de 98,5% (QUINTANAR-GUERRERO et al, 2005). Na encapsulação de recheios lipofílicos em matriz lipídica usando como tensoativo a lecitina de soja, em todos os recheios testados a eficiência de encapsulação ficou entre 85 e 99% (ZUR MÜHLEN et al, 1998). Usando matriz lipídica para encapsular insulina, foram obtidos resultados

de eficiência de encapsulação de 103 a 107%; estes valores maiores que 100% foram atribuídos a uma perda do material lipídico durante o processo de produção das micropartículas (MASCHKE et al, 2007). Na encapsulação de tetracaína por diferentes tipos de triacilgliceróis e lecitina ou poloxamer 188 como tensoativos, obtiveram-se eficiências de encapsulação de 85 a 98%, sendo os menores valores encontrados quando foi usado o poloxamer 188; isto foi explicado pela maior solubilidade do recheio neste tensoativo, mas mesmo com uma ligeira diminuição da quantidade encapsulada, todos os valores ficaram acima de 80% (SCHWARZ & MEHNERT, 1999). Matrizes lipídicas compostas por triacilgliceróis de cadeia média encapsulando isoflavonas apresentaram eficiências de encapsulação variando de 57 a 70%, sendo que este aumento acompanhou um simultâneo aumento da proporção de lipídio em relação à quantidade de recheio no meio (JEON et al, 2005).

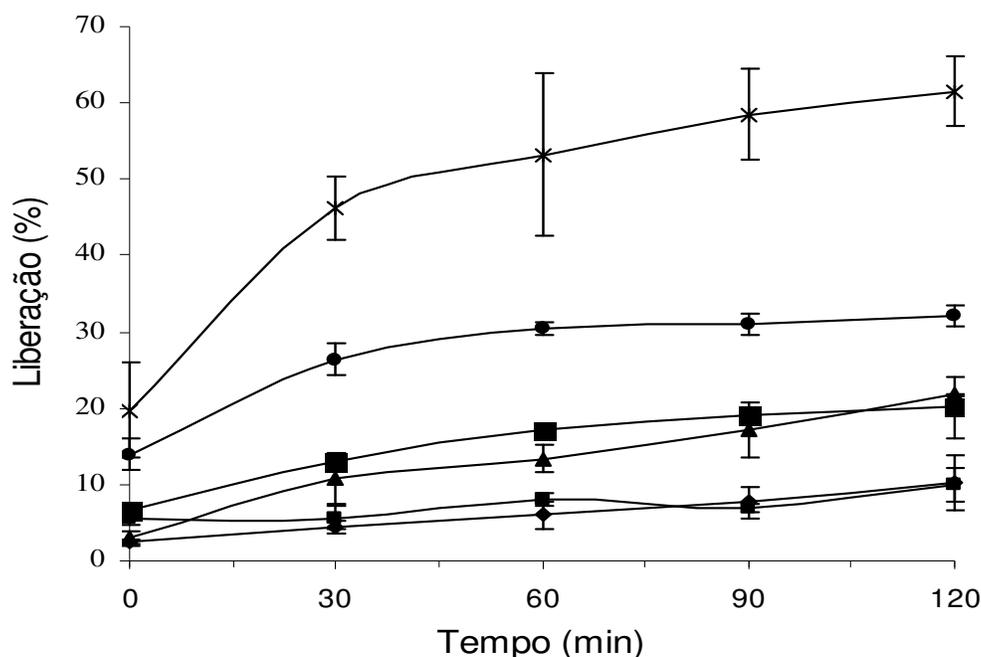
Matrizes lipídicas compostas por ácido esteárico e diferentes quantidades de ácido oléico indicaram que a eficiência de encapsulação aumentou de 47 para 70% quando a concentração de oléico no meio passou de 0 para 30%. Isto foi justificado pelo maior grau de distúrbio nos cristais lipídicos, aumentando as imperfeições e assim criando mais espaço para a acomodação do recheio dentro da matriz lipídica (HU et al, 2005).

#### **5.3.4. Avaliação da liberação do recheio em meio aquoso**

Os resultados da liberação do recheio, apresentados na Figura 6, indicam que a matriz usada possibilitou eficiente retenção do recheio, pois, no geral, todas as formulações apresentaram liberação, em 120 minutos, de até 30%. Apenas a formulação 5 (contendo solução de glicose 80% e proporção lipídio/solução de glicose de 75/25) apresentou maior quantidade de liberação, atingindo um pouco mais de 60% de recheio liberado ao final do tempo estudado (120 minutos). Adicionalmente, não foi observado grande efeito “burst” (grandes quantidades de

recheio liberadas no tempo zero devido ao material de recheio presente na superfície da partícula ou próximo à superfície, facilitando enormemente a sua retirada pelo solvente), uma vez que as liberações iniciais aconteceram a taxa modulada, exceto nas formulações 5 e 6, que já na primeira análise (tempo zero) mostraram liberações de 20% e 13% de recheio. Estes resultados confirmam a boa qualidade da matriz na retenção do recheio utilizado e indicam a possibilidade de eficaz liberação lenta ao longo do tempo, em futuras aplicações destas micropartículas. Estes resultados novamente parecem ser justificados pela presença do ácido oléico e da lecitina, que melhoraram a incorporação do recheio pela matriz lipídica, implicando em menor quantidade de recheio presente na superfície externa, o que poderia produzir o efeito “burst”, como observado na formulação 5, onde provavelmente a quantidade de glicose utilizada superou a capacidade de incorporação adequada do recheio na matriz. O ácido esteárico pode também ter auxiliado, uma vez que manteve a matriz sólida, modulando a difusão do recheio nas condições de temperatura ambiente utilizadas nestes experimentos de liberação (JENNING et al, 2000b; MEHNERT & MÄDER, 2001; MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; SCHUBERT & MÜLLER-GOYMANN, 2005).

Outro fator determinante nos resultados de liberação obtidos foi a quantidade de glicose presente no recheio, uma vez que as formulações contendo a solução de glicose mais concentrada (formulações 5 e 6 – solução de glicose 80%) apresentaram maiores quantidades liberadas inicialmente (efeito “burst”) e também no final do experimento, enquanto aquelas com solução de glicose menos concentrada (formulações 1 e 2 – solução de glicose 40%) apresentaram as menores liberações e mais bem moduladas de todas as formulações testadas, apresentando, ambas, somente 10% de recheio liberado em 120 minutos de experimento.



**Figura 6** – Liberação do recheio (média  $\pm$  desvio padrão) em solução aquosa, em 120 minutos, analisada pós-produção (—♦— F1; —■— F2; —▲— F3; —■— F4; —\*— F5; —•— F6)

Na liberação de compostos solúveis em água encapsulados em partículas compostas de cera (de abelha ou de carnaúba) ou óleo vegetal com lecitina ou poliglicerol poliricinoleato como tensoativos em meio aquoso com ou sem a presença de um sal, observou-se liberação mais rápida nas partículas com óleo vegetal em relação às partículas onde a cera foi utilizada como material de parede e que a presença de sal também acelerou a liberação, sendo ainda mais pronunciada quando estes dois fatores atuaram juntos, ou seja, nas partículas de óleo vegetal em presença do sal. Neste último caso a liberação atingiu cerca de 80% em menos de 28 dias, e o caso oposto, as partículas de cera na ausência de sal, atingiram menos de 10% no mesmo intervalo de tempo. Uma alternativa proposta foi a mistura destes dois materiais para a produção da matriz lipídica, ou seja, um lipídio líquido e outro sólido, o que melhoraria a liberação do recheio

provavelmente porque estes dois materiais tornariam as partículas menos rígidas em relação às produzidas com apenas cera, mas mais firmes do que com apenas a presença do óleo vegetal. Neste mesmo estudo outro fator que alterou a liberação do recheio foi o tamanho da partícula; quanto menor, maior a taxa de liberação obtida, sendo o efeito até maior do que o primeiro fator apresentado, uma vez que as menores partículas mostraram uma liberação de cerca de 100% em menos de 20 dias (MELLEMA et al, 2006).

No estudo de partículas de cera de carnaúba ou ácido esteárico contendo dois tipos de recheios, um hidrofílico e outro hidrofóbico, observou-se que o perfil de liberação sofreu influência tanto da natureza da matriz lipídica quanto da característica de polaridade do recheio. Comparando a liberação do mesmo recheio nas duas matrizes, um aumento significativo ocorreu na matriz de ácido esteárico em relação à de cera de carnaúba, independente da natureza do recheio, sendo este comportamento atribuído às diferentes hidrofobicidades das duas matrizes lipídicas utilizadas. Em relação aos dois recheios testados, tanto na matriz de cera de carnaúba quanto na de ácido esteárico, a liberação do recheio hidrofílico foi maior do que a do recheio hidrofóbico, em decorrência de suas diferentes solubilidades em água (RODRIGUEZ et al, 1999).

Avaliando partículas com matrizes lipídicas compostas por ácido esteárico e diferentes quantidades de ácido oléico na encapsulação de clobetasol, um recheio hidrofóbico, foi observado um perfil de liberação bifásico (efeito “burst” com posterior liberação a razão constante) em todas as formulações estudadas, sendo que a liberação se tornou mais rápida devido à inclusão do ácido oléico na matriz, aumentando com o aumento da quantidade do óleo na partícula. A liberação foi justificada pela possível presença do oléico na superfície externa da matriz, formando pequenos aglomerados contendo o recheio, que foi liberado mais rapidamente. Os autores também justificaram o aumento da liberação conforme a quantidade de ácido oléico era aumentada na formulação devido à diminuição do tamanho médio das partículas, aumentando assim a área superficial e conseqüentemente permitindo a maior liberação do recheio (HU et al, 2005). Outro

estudo avaliou a encapsulação de solução de glicose em duas diferentes matrizes lipídicas: ácido esteárico/ácido oléico e ácido esteárico/ácido láurico; observando que a primeira matriz foi mais eficiente na retenção do recheio do que a segunda, independente da concentração de glicose, da proporção lipídio/solução de glicose e da quantidade de tensoativo presente no meio; neste estudo foi encontrado um valor de T50, tempo necessário para a liberação de 50% de recheio, 4,3 vezes maior na mistura esteárico/oléico em relação ao uso da mistura esteárico/láurico na produção das micropartículas. Estes resultados indicaram que a mistura contendo um ácido graxo em estado líquido nas condições de temperatura dos experimentos contribuiu para formar uma partícula mais estável frente a variações na concentração de tensoativo ou quando diferentes proporções entre mistura lipídica e solução de glicose foram utilizadas (CHAMBI et al, 2007).

## **5.4. Etapa 2 – Estudo da Estabilidade**

### **5.4.1. Produção das micropartículas lipídicas**

Após a caracterização de tamanho médio, avaliação da morfologia, avaliação da quantidade de glicose superficial e dos perfis de liberação, foram selecionadas algumas formulações para o estudo da estabilidade durante estocagem a temperatura ambiente por 28 dias, com avaliações semanais das amostras. Foram selecionadas a formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25), que apresentou a menor quantidade de glicose superficial (Tabela 9) e também o melhor perfil de liberação após 120 minutos (10% de glicose liberada – Figura 6) entre as formulações, e a formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25), que continha a maior quantidade de glicose a ser encapsulada e que apresentou a maior quantidade de glicose superficial e a máxima liberação do recheio ao longo do tempo no experimento de liberação. Foi também selecionada a formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10), que

apresentou uma porcentagem de glicose superficial intermediária (6,7% – Tabela 9) e uma liberação ainda bastante baixa (menor que 20% – Figura 6) no final dos 120 minutos analisados. Finalmente, foi incluída uma formulação idêntica à formulação 1, denominada MpLR (micropartícula lipídica de referência), sendo suprimida a adição da lecitina em sua composição. Esta formulação foi adicionada ao estudo para determinação da possível ação da lecitina na retenção do recheio ao longo do tempo.

As micropartículas dos tratamentos selecionados para a avaliação da estabilidade na estocagem foram analisadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) em corridas de fusão e de cristalização após a produção; semanalmente foram determinadas porcentagens de glicose superficial, eficiência de encapsulação efetiva e análises de difração de raios-X, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias.

#### **5.4.2. Avaliação calorimétrica**

Calorimetria diferencial de varredura para observação do comportamento durante o aquecimento e o resfriamento foi efetuado para as formulações 1, 4, 5 e MpLR somente no tempo zero para verificar possíveis diferenças em relação às diferentes proporções lipídio/material de recheio e se diferentes concentrações de glicose poderiam produzir diferentes comportamentos nos picos obtidos. Os resultados estão apresentados na Tabela 10 e os termogramas com as corridas de fusão e de cristalização estão apresentados no anexo 1.

Na maioria dos termogramas foram observados três eventos térmicos em temperaturas negativas, dois observados entre -5°C a -15°C na curva de aquecimento, que poderiam ser atribuídos ao descongelamento da água e descongelamento da lecitina. JENNING et al (2000c), em experimentos com micropartículas lipídicas contendo misturas binárias de lipídio sólido e líquido, observaram cristalização da água nas partículas na faixa de -15 a -18°C utilizando

DSC para o acompanhamento. Transição cristalina para lecitina purificada de ovo ao redor de  $-15^{\circ}\text{C}$  para a curva de aquecimento e  $-7^{\circ}\text{C}$  para a curva de congelamento foi reportado anteriormente (CATALOGO SIGMA).

Um terceiro pico bem definido termicamente é comum a todas as formulações estudadas e aparece somente na curva de resfriamento em temperatura variando de  $-28,2$  a  $-33^{\circ}\text{C}$ . Este pico provavelmente representa a cristalização da glicose, porém, a temperatura identificada pelo aparelho pode não representar a real temperatura da amostra. Soluções muito concentradas de glicose foram utilizadas na encapsulação usando materiais lipídicos que apresentam viscosidades muito altas, o que poderia dificultar a transmissão de calor através do container de amostra e distorcer a temperatura indicada pelo calorímetro. Apesar da manutenção de  $-40^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos após o término do resfriamento, o pico não aparece quando após este tempo a amostra foi aquecida, indicando que o pico, apesar de poder representar a cristalização da glicose, pode estar em temperatura muito diferente da observada.

Os eventos térmicos (temperatura de pico e entalpia), relacionados aos lipídios utilizados nas diferentes formulações estudadas estão apresentados na Tabela 10. As temperaturas de fusão obtidas são muito próximas, variando de  $47,7$  a  $48,1^{\circ}\text{C}$  entre as formulações avaliadas. Este resultado era esperado considerando que a mistura lipídica utilizada para a produção das micropartículas foi a mesma para todas as formulações e que o recheio hidrofílico não apresentaria interação com a matriz lipídica e, portanto, não provocaria modificações no comportamento polimórfico da mistura utilizada. Entre as quatro formulações, três continham a mesma quantidade de lecitina (formulações 1, 4 e 5) enquanto a formulação de referência (MpLR) não continha lecitina. No entanto, as temperaturas de fusão ainda foram muito próximas, indicando pouca influência da lecitina na alteração da temperatura de fusão das micropartículas entre as diferentes formulações. Em geral, a inclusão de moléculas de recheios hidrofóbicos, e portanto parcialmente solúveis na matriz lipídica, é normalmente acompanhada por uma depressão do ponto de fusão (ZUR MUHLEN et al, 1998;

MÜLLER, 1986 citado por JENNING & GOHLA, 2001) o que não parece ser o caso de recheios hidrofílicos.

Quanto à presença da lecitina, alguns tensoativos possuem a habilidade de serem incorporados na estrutura cristalina, produzindo modificações na estrutura do cristal, podendo interferir nos processos de solidificação e fusão dos lipídios sem alteração detectável no empacotamento cristalino dos lipídios (ELDEM et al, 1991b). Adicionalmente, análise por DSC de sistemas lipídicos coloidais exibiram um decréscimo linear da entalpia coincidindo com um aumento linear do conteúdo de lecitina no interior da matriz lipídica, no entanto, a cristalinidade de diferentes matrizes lipídicas foi determinada pelo conteúdo de lipídio, uma vez que a lecitina estava presente em um estado não cristalino (SCHUBERT & MÜLLER-GOYMANN, 2005). Outro estudo observou que a presença da lecitina, bem como o estado disperso do lipídio, leva a distorções na estrutura cristalina lipídica que pode produzir uma depressão no ponto de fusão e de cristalização (ZUR MÜHLEN et al, 1998), efeito aparentemente não observado na formulação de referência (MpLR), isenta de lecitina neste estudo.

**Tabela 10** – Parâmetros calorimétricos (temperatura de pico, °C, e entalpia, J/g) obtidos nas curvas de cristalização e de fusão para as formulações analisadas no estudo da estabilidade no tempo zero

Formulações		Cristalização	Fusão
		Pico 1	Pico 1
F1	°C	42,6	47,7
	J/g	47,5	43,9
F4	°C	40,8	48,4
	J/g	63,1	67,2
F5	°C	42,5	48,0
	J/g	74,5	68,5
MpLR	°C	43,0	48,1
	J/g	76,7	63,2

F1 → formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F4 → formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

F5 → formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

MpLR → solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25, sem lecitina

É possível observar que o evento térmico relacionado à matriz lipídica, obtido durante o aquecimento em todas as formulações, encontra-se na forma de uma mistura não perfeitamente homogênea, representada por um pico largo com superposição de duas fusões. No entanto, quando as curvas de cristalização são observadas, o pico relacionado a esta matriz é único, estreito e simétrico em relação à temperatura de pico. BUNJES et al (1996) observou comportamento semelhante trabalhando com nanopartículas produzidas com os triacilgliceróis trilaurina, trimiristina, tripalmitina e triestearina, individualmente ou em misturas binárias. Foram observados dois picos, alargados, de fusão na curva de

aquecimento, enquanto na curva de resfriamento a cristalização ocorria produzindo um pico estreito, único e simétrico para a mesma mistura.

Por outro lado, partículas lipídicas obtidas com misturas de ácido oléico e ácido esteárico, avaliadas por DSC, mostraram somente um pico de fusão e sua temperatura decrescia conforme aumentava o conteúdo de ácido oléico na mistura (HU et al, 2005). Os autores, entretanto, apresentaram termogramas obtidos a partir de 20°C, portanto, inferior à temperatura de cristalização/fusão da forma polimérica principal do ácido oléico (forma  $\alpha$ , 13,0°C). Segundo estes autores a inclusão do ácido oléico diminuiu o grau de cristalinidade do ácido esteárico.

A temperatura de cristalização lipídica obtida nas diferentes formulações durante o resfriamento das amostras foi, em todos os casos, representada por um único pico, variando de 40,8 a 43,0°C entre as formulações, e sempre inferiores às temperaturas médias obtidas no aquecimento. Diferenças de mesma ordem, porém maiores, foram obtidas anteriormente, onde a temperatura de cristalização foi inferior à de fusão (BUNJES et al, 1996).

As entalpias obtidas foram crescentes na seguinte ordem  $F1 < F4 < F5 < MpLR$ , tanto para cristalização quanto para fusão, sendo ligeiramente superiores para a cristalização da mistura lipídica. Valores superiores para entalpia de fusão em relação à entalpia de cristalização foram obtidos anteriormente (BUNJES et al, 1996).

### **5.4.3. Análises do estudo da estabilidade**

#### **5.4.3.1. Determinação de glicose superficial e eficiência de encapsulação efetiva**

Os resultados das porcentagens de glicose superficial ao longo do tempo de estocagem estão apresentados na Tabela 11. Pode-se observar que a formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

que havia apresentado os melhores resultados de glicose superficial após a produção e a menor liberação em solução aquosa ao longo do tempo, também apresentou as menores quantidades de glicose superficial durante os 28 dias de armazenamento, com um máximo de 2,4% após 28 dias, embora as diferenças entre o primeiro (1,1%) e o 28º dia tenham sido significativas. A formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25), que apresentou o pior desempenho quanto a glicose superficial e a maior liberação em solução aquosa também apresentou uma porcentagem acentuada de glicose superficial ao longo da estocagem incluindo o tempo zero; a glicose superficial neste tratamento passou de 14,6% na primeira análise (tempo zero) para 18,8% após 28 dias. Comportamento intermediário foi observado para a formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10). A formulação denominada MpLR (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25, sem adição de lecitina) apresentou um comportamento muito diferenciado em relação às outras formulações estudadas. A quantidade de glicose inicial foi bastante alta e cresceu ligeiramente após 28 dias, indicando que a lecitina utilizada nas formulações 1, 4 e 5 foi determinante na capacidade de manutenção da glicose no interior das partículas, evitando que ela migrasse à superfície e pudesse ser lixiviada na determinação do recheio superficial. As diferenças entre as formulações 1 e 4 e a formulação 5 parecem associadas à maior quantidade de glicose inicialmente presente nesta última formulação.

Na encapsulação de peptona usando gordura de leite como matriz lipídica e Span 60 e Glicomul TS como tensoativos, foi encontrado que a liberação do recheio foi proporcionalmente maior nas formulações com maiores concentrações deste, quando as partículas foram incubadas a 32°C. Este resultado foi justificado pela competição entre os tensoativos e o recheio dentro da matriz lipídica, o que pode ter diminuído a estabilidade da partícula (MAGEE JR. & OLSON, 1981b).

**Tabela 11** – Quantidade de glicose superficial (%  $\pm$  desvio padrão) das quatro formulações analisadas durante vinte e oito dias

Tempo (dias)	Formulações			
	F1	F4	F5	MpLR
0	1,1 $\pm$ 0,32 <sup>bA</sup>	3,4 $\pm$ 0,68 <sup>bA</sup>	14,6 $\pm$ 1,23 <sup>aB</sup>	50,7 $\pm$ 4,05 <sup>bcC</sup>
7	2,5 $\pm$ 0,46 <sup>cA</sup>	5,7 $\pm$ 1,29 <sup>cB</sup>	14,6 $\pm$ 0,83 <sup>aC</sup>	40,5 $\pm$ 4,57 <sup>aD</sup>
14	2,2 $\pm$ 0,35 <sup>cA</sup>	3,7 $\pm$ 0,87 <sup>bA</sup>	13,1 $\pm$ 3,95 <sup>aB</sup>	45,4 $\pm$ 6,40 <sup>abC</sup>
21	0,5 $\pm$ 0,37 <sup>aA</sup>	1,6 $\pm$ 0,46 <sup>aA</sup>	18,0 $\pm$ 0,49 <sup>bB</sup>	44,4 $\pm$ 3,60 <sup>abC</sup>
28	2,4 $\pm$ 0,56 <sup>cA</sup>	5,2 $\pm$ 0,39 <sup>cA</sup>	18,8 $\pm$ 0,87 <sup>bB</sup>	56,4 $\pm$ 4,48 <sup>cC</sup>

letras minúsculas iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença estatística a  $p < 0,05$

letras maiúsculas iguais, na mesma linha, não apresentam diferença estatística a  $p < 0,05$

F1  $\rightarrow$  formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F4  $\rightarrow$  formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

F5  $\rightarrow$  formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

MpLR  $\rightarrow$  solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25, sem lecitina

A Tabela 12 apresenta os resultados da eficiência de encapsulação efetiva das formulações durante a estocagem, que apresentam o mesmo comportamento observado para as quantidades de glicose superficial determinadas ao longo de 28 dias. Embora as formulações apresentem diferenças entre si, as eficiências de encapsulação efetiva foram consideravelmente altas entre as formulações 1, 4 e 5, onde o menor valor obtido, na última análise (28<sup>o</sup> dia), foi de 85,9%. A ordem observada quanto a eficiência de encapsulação efetiva foi formulação 1 > formulação 4 > formulação 5 > MpLR.

Melhor eficiência de encapsulação efetiva e menor quantidade de glicose superficial parecem ter sido determinadas pela capacidade emulsificante da

lecitina presente nas formulações 1, 4 e 5 em relação à MpLR e também pela presença de um ácido graxo líquido a temperatura ambiente (ácido oléico) presente nestas formulações. A pouca variação observada ao longo do tempo em cada formulação avaliada individualmente indica que o ácido oléico e a lecitina, individual ou sinergicamente, podem ter funcionado como agentes de impedimento de uma reorganização polimórfica mais estável com uma conseqüente expulsão do recheio ao longo do tempo, efeito que aparentemente não foi observado nas formulações 1, 4 e 5, embora existam diferenças entre elas. Comportamento semelhante foi observado em vários trabalhos (ZUR MÜHLEN et al, 1998; JENNING et al, 2000b; MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; SCHUBERT & MÜLLER-GOYMANN, 2005).

**Tabela 12** – Valores de eficiência de encapsulação efetiva (%  $\pm$  desvio padrão) das quatro formulações analisadas durante vinte e oito dias

Tempo (dias)	Formulações			
	F1	F4	F5	MpLR
0	103,2 $\pm$ 6,91 <sup>aD</sup>	96,6 $\pm$ 4,57 <sup>aC</sup>	90,1 $\pm$ 1,79 <sup>bcB</sup>	54,6 $\pm$ 4,16 <sup>acA</sup>
7	101,8 $\pm$ 6,63 <sup>aC</sup>	94,3 $\pm$ 4,91 <sup>aB</sup>	90,1 $\pm$ 2,30 <sup>bcB</sup>	64,7 $\pm$ 5,38 <sup>ba</sup>
14	102,1 $\pm$ 6,67 <sup>aB</sup>	96,2 $\pm$ 4,87 <sup>aBC</sup>	91,6 $\pm$ 4,69 <sup>cC</sup>	59,9 $\pm$ 7,69 <sup>bcA</sup>
21	103,8 $\pm$ 6,45 <sup>aC</sup>	98,4 $\pm$ 4,50 <sup>aC</sup>	86,7 $\pm$ 1,73 <sup>abB</sup>	60,9 $\pm$ 3,46 <sup>bcA</sup>
28	101,9 $\pm$ 6,79 <sup>aD</sup>	94,8 $\pm$ 4,11 <sup>aC</sup>	85,9 $\pm$ 2,00 <sup>ab</sup>	48,8 $\pm$ 5,05 <sup>aA</sup>

letras minúsculas iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença estatística a  $p < 0,05$

letras maiúsculas iguais, na mesma linha, não apresentam diferença estatística a  $p < 0,05$

F1  $\rightarrow$  formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)  
 F4  $\rightarrow$  formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)  
 F5  $\rightarrow$  formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)  
 MpLR  $\rightarrow$  solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25, sem lecitina

Micropartículas lipídicas utilizadas na encapsulação de recheios lipofílicos indicaram que, quando foram usados apenas lipídios sólidos na matriz, a expulsão do recheio foi quase imediata, mas quando era incluído um lipídio líquido havia grande retardo da expulsão. Contudo, mesmo com a melhora apresentada quando da inclusão do lipídio líquido, a eficiência de encapsulação permaneceu baixa (PIETKIEWICZ et al, 2006).

Partículas lipídicas sólidas produzidas com triacilglicerol e fosfolipídios tendo como recheio palmitato de azidotimidina (AZT), estudadas quanto a estabilidade durante 10 semanas, não foram estáveis nem a 37°C nem a 4°C, mas foram estáveis a 20°C, uma vez que, nesta última situação, alterações de tamanho médio, potencial zeta e na quantidade de recheio encapsulado não foram encontradas. As alterações a 37°C foram justificadas pela alteração da fluidez que ocorre nos fosfolipídios devido ao seu ponto de fusão, afetando a continuidade da superfície da partícula. Já a 4°C, os resultados foram provavelmente devido à reorganização dos fosfolipídios e dos triacilgliceróis para um estado polimórfico mais estável, o que levou a agregação das partículas e expulsão do recheio (HEIATI et al, 1998).

De acordo com ZUR MÜHLEN et al (1998), em estudo de encapsulação de recheios lipofílicos em matriz lipídica usando como tensoativo a lecitina de soja, é concebível que haja um atraso na recristalização da matriz lipídica pela presença deste tensoativo, uma vez que a lecitina leva a alterações na estrutura cristalina, fazendo com que a organização polimórfica seja prevenida a temperatura ambiente (ZUR MÜHLEN et al, 1998). Na avaliação de partículas lipídicas compostas por óleo de palma hidrogenado e lecitina em diferentes concentrações, observou-se que com concentrações de lecitina até 30% havia estabilidade suficiente para estocagem por seis meses; porém, acima desta concentração as partículas foram estáveis apenas por quatro semanas, sendo encontrados, depois deste tempo, aumento de tamanho médio de partícula e também aumento da distribuição deste tamanho. Isto foi justificado pela possível acumulação e

mobilidade da lecitina na superfície da partícula (SCHUBERT & MÜLLER-GOYMANN, 2005).

Avaliaram-se, por três meses, partículas de tetracaína e etomidato encapsulados por diferentes tipos de triacilgliceróis e lecitina ou poloxamer 188 como tensoativos. Os resultados mostraram que baixas concentrações de tensoativos não foram capazes de estabilizar suficientemente a partícula, e que a lecitina foi mais eficiente na manutenção da estabilidade física do que o poloxamer 188 (SCHWARZ & MEHNERT, 1999).

#### **4.3.2. Difração de Raios-X**

Adicionalmente à quantificação da glicose superficial nas formulações avaliadas durante quatro semanas de estocagem a temperatura ambiente, a avaliação de uma possível reorganização polimórfica do material lipídico utilizado como material de parede foi feita pela técnica da difração de raios-X. A reorganização polimórfica para níveis mais organizados e energeticamente mais favoráveis é apontada como um problema na encapsulação de ativos cujo material de parede é lipídico, uma vez que esta reorganização poderia provocar a expulsão do material de recheio devido a produção de um material mais cristalino durante a transição de fase polimórfica lipídica após a produção das micropartículas lipídicas utilizando a técnica do *spray cooling* (ZUR MÜHLEN et al, 1998; JENNING et al, 2000b; MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; SCHUBERT & MÜLLER-GOYMANN, 2005).

Em padrões de difração de raios-X, a cristalinidade da amostra é caracterizada pela forma, intensidade/altura dos picos, onde picos mais estreitos e mais intensos indicam maior cristalinidade enquanto picos mais largos e pequenos são indicativos de regiões mais amorfas (ALVES & SANTANA, 2004).

As medidas de difração de raios-X foram feitas semanalmente para as formulações selecionadas para o estudo da estabilidade (formulações 1, 4, 5 e

MpLR, esta última sem adição de lecitina em sua composição) e a partir dos espectros obtidos foi calculada a cristalinidade observada em cada tempo para cada formulação; os valores estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** – Graus de cristalinidade (%) das quatro formulações analisadas durante vinte e oito dias

Tempo (dias)	Formulações			
	F1	F4	F5	MpLR
0	27,8	22,6	24,4	27,8
7	23,5	28,7	26,5	25,9
14	23,1	24,6	27,2	30,0
21	24,2	25,2	21,8	29,3
28	25,4	26,0	25,3	27,6

F1 → formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

F4 → formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10)

F5 → formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25)

MpLR → solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25, sem lecitina

Os resultados indicaram que as porcentagens de cristalinidade das formulações obtidas ao longo do tempo foram relativamente baixas, inferiores a 30%, sem diferenças com relação ao tempo de estocagem e muito semelhantes entre as formulações. Estes resultados eram esperados, considerando que a mistura lipídica (2/4 de ácido esteárico, 1/4 de ácido oléico e 1/4 de gordura vegetal hidrogenada) foi a mesma para todas as formulações, que diferiram apenas na proporção matriz/material de recheio, na concentração do material de recheio utilizado e na retirada da lecitina da composição na formulação MpLR.

A baixa cristalinidade observada para as formulações parece ter sido provocada pela utilização de mistura lipídica contendo lipídios sólidos e líquido na

produção das micropartículas. O lipídio líquido (ácido oléico) parece ter auxiliado no impedimento da reestruturação polimórfica da matriz durante o resfriamento para a produção das partículas ou durante o tempo de estocagem considerado, efeito anteriormente observado por vários trabalhos apresentados na literatura (ZUR MÜHLEN et al, 1998; JENNING et al, 2000b; MÜLLER et al, 2002a; MÜLLER et al, 2002b; SCHUBERT & MÜLLER-GOYMAN, 2005).

Este efeito parece se confirmar quando a formulação sem a lecitina (MpLR) é analisada. Os espectros de difração de raios-X para esta formulação são muito semelhantes aos das outras formulações avaliadas (Figuras 7, 8, 9 e 10) e o grau de cristalinidade é também semelhante. No entanto, a quantidade de glicose superficial observada para esta formulação foi bastante superior à quantidade de glicose superficial observada nas outras formulações, efeito observado imediatamente após a produção das micropartículas. Este efeito parece ter sido provocado fortemente pela ausência da lecitina na formulação, e, desta forma, tornando a exclusão do recheio do interior das micropartículas mais fácil e instantânea, sendo determinante em relação a um possível efeito de reorganização polimórfica da matriz lipídica que parece não ter ocorrido em intensidade suficiente para a total expulsão do recheio. A lecitina pode também ter contribuído, em alguma intensidade, nas formulações em que estava presente (formulações 1, 4 e 5) para auxiliar na perturbação da reorganização polimórfica, uma vez que se encontrava líquida à temperatura do experimento. A avaliação da matriz lipídica contendo diferentes quantidades de lecitina por difração de raios-X mostrou que o conteúdo de lecitina influenciou na intensidade dos sinais mas não na posição dos mesmos, observando que o aumento no conteúdo de lecitina provocava um decréscimo na intensidade dos sinais produzindo uma redução da cristalinidade na matriz lipídica utilizada; os autores sugerem que a matriz lipídica permaneceu inalterada durante o experimento de estocagem realizado durante 180 dias (SCHUBERT et al, 2006). Nos resultados observados no presente trabalho, a lecitina parece ter sido fundamental como emulsificante mais do que como um agente de perturbação do aumento da cristalinidade das micropartículas.

Na avaliação de micropartículas lipídicas encapsulando coenzima Q<sub>10</sub> e contendo lecitina como agente tensoativo, foi observado que os padrões de difração de raios-X apresentaram somente características difratométricas do material lipídico ( $\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta_i$ ), embora os picos tenham ficado menores, indicando maior incorporação do recheio (BUNJES et al, 2001).

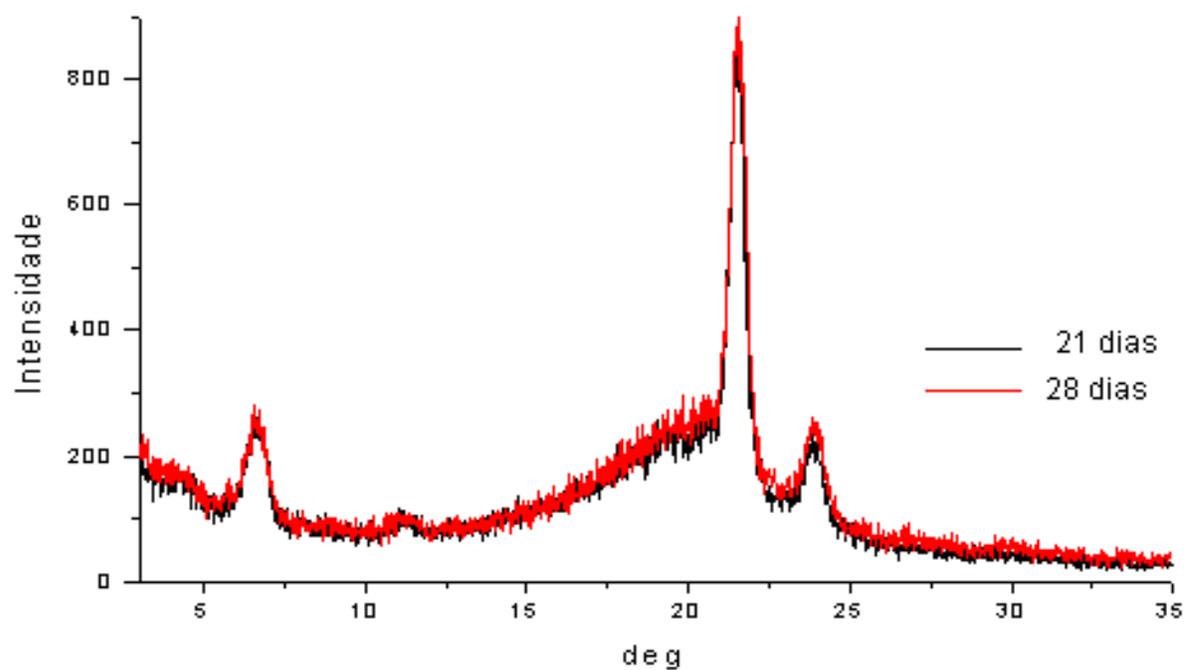
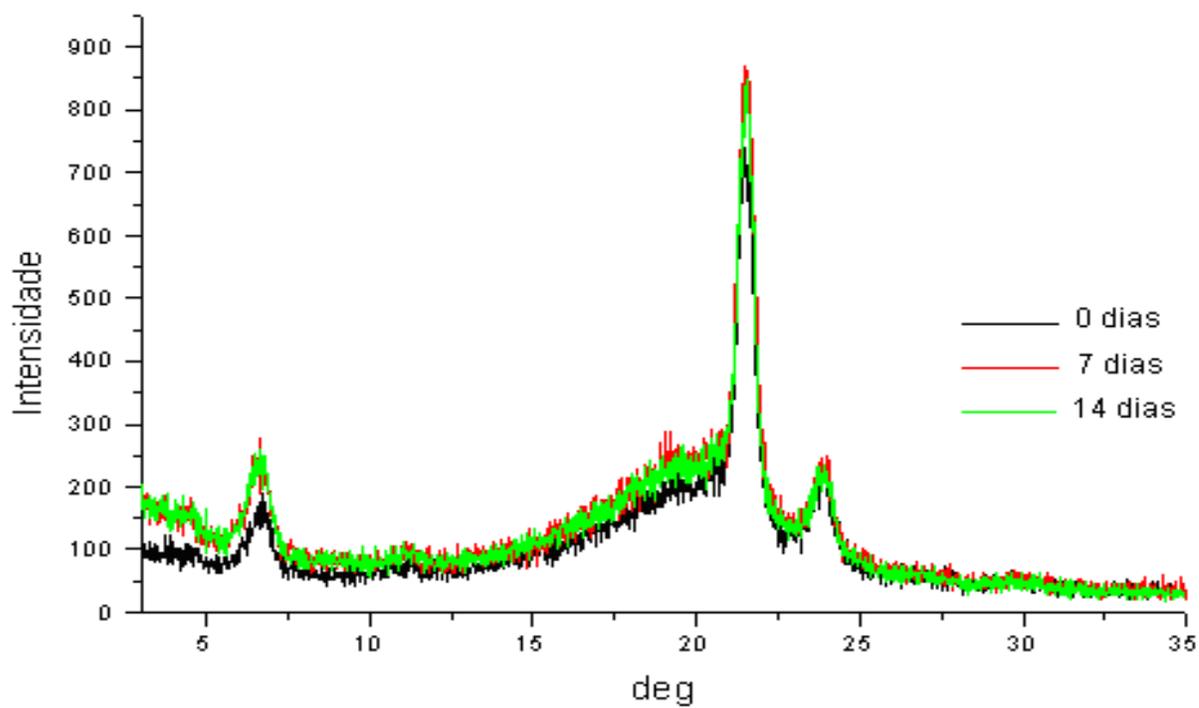
As Figuras 7, 8, 9, e 10 apresentam os espectros para cada formulação, obtidos ao longo das quatro semanas estudadas. Os padrões foram semelhantes e pela literatura parecem estar associados à forma polimórfica  $\beta'$ , característica de muitos triglicerídios e ácidos graxos, para as formulações 1, 4 e MpLR (JENNING et al, 2000a).

As intensidades do pico principal somente aumentaram da primeira para a segunda análise nas formulações 4 e 5 (Figuras 8 e 9). Após este evento a intensidade dos picos se tornou constante e muito semelhante entre as diferentes formulações. Embora o pico aumente da primeira para a segunda análise, a cristalinidade calculada permaneceu praticamente constante (Tabela 13). Entre as formulações estudadas, somente na formulação 5, a que continha a maior quantidade de glicose, foi observada uma forma polimórfica nas últimas duas semanas, caracterizada como  $\beta_i$  em trabalho anterior (JENNING et al, 2000a). A forma  $\alpha$  tem sido observada como característica da forma mais estável para o ácido oléico quando a temperatura de estudo é menor que sua temperatura de fusão ( $\sim -2,2^\circ\text{C}$  para a transformação da forma  $\gamma$  em  $\alpha$ ,  $13,3^\circ\text{C}$  para a forma  $\alpha$  e  $16,2$  para a forma  $\beta$ ) (SUZUKI & OGAKI, 1985; INOUE et al, 2004) ou seja, em temperaturas inferiores à temperatura estudada durante o estudo da estabilidade das formulações ( $\sim 23^\circ\text{C}$ ), no qual o ácido oléico se encontrava líquido.

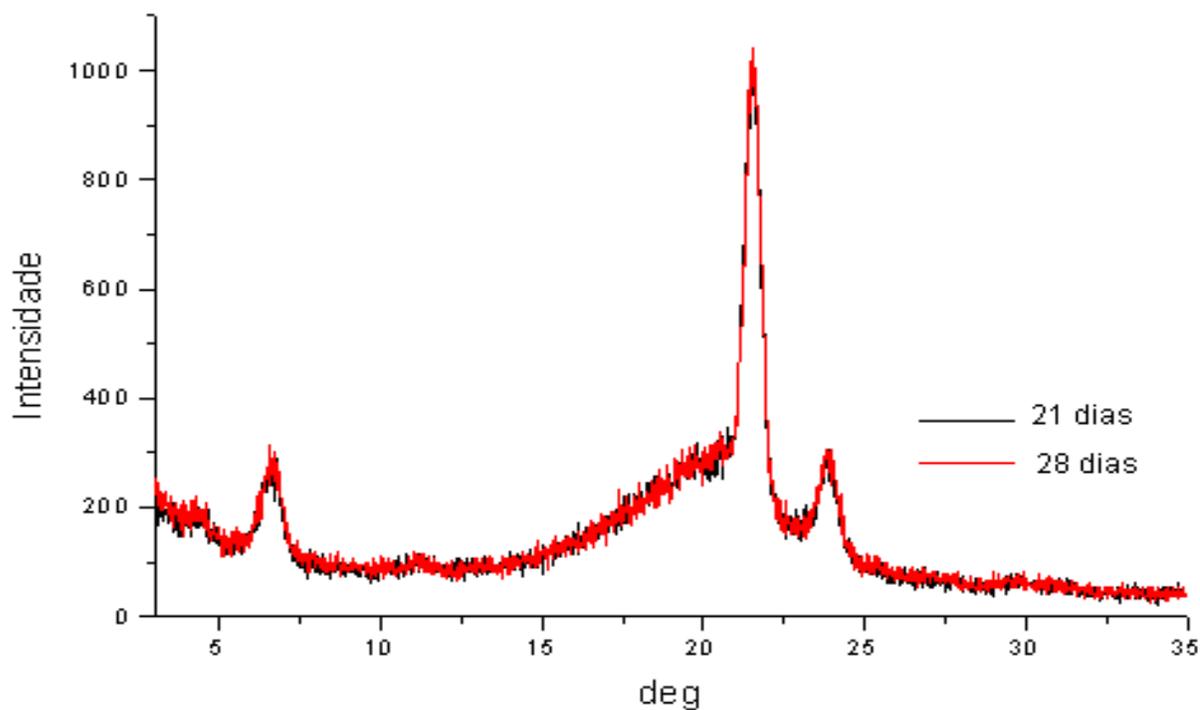
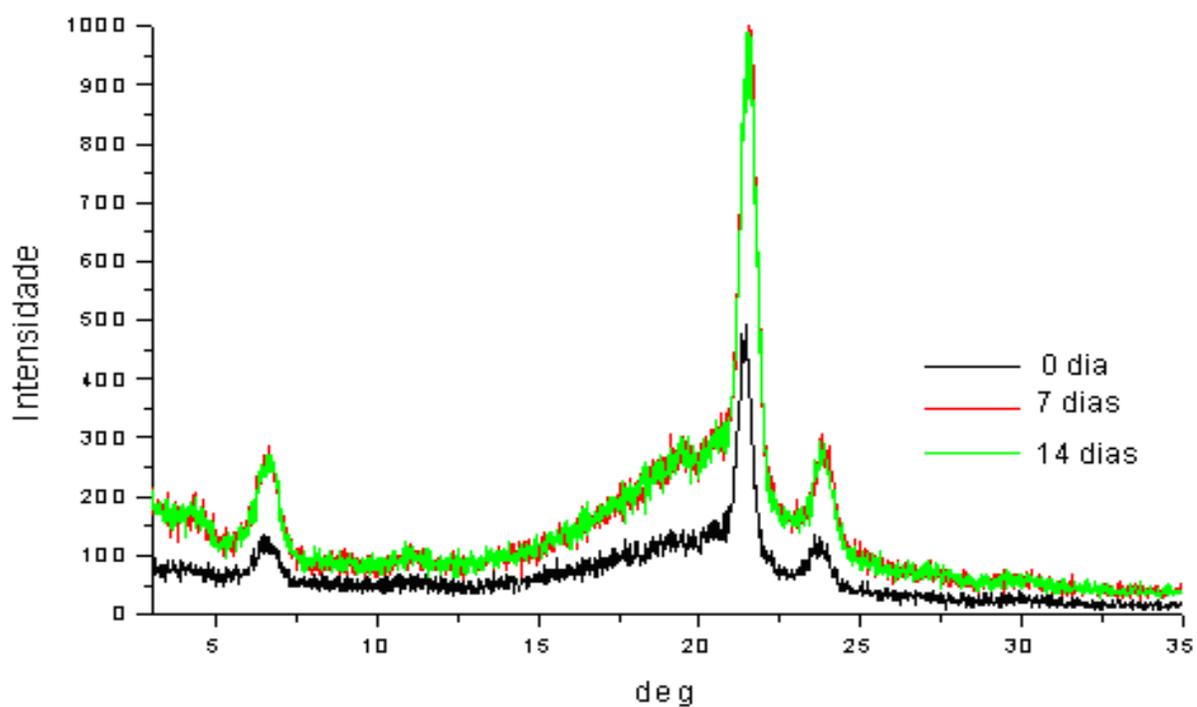
Cabe ressaltar que o estudo de JENNING et al (2000a), no qual a vitamina A foi encapsulada em matriz lipídica contendo gliceribehenato, apresentou forte correlação entre a mudança polimórfica de  $\beta'$  para  $\beta_i$  e o comportamento de liberação do recheio encapsulado. Neste trabalho, no entanto, somente lipídio sólido fazia parte da formação do material da matriz utilizado (JENNING et al,

2000a). Forma  $\beta'$  também foi obtida para o padrão polimórfico de nanopartículas observadas por difração de raios-X (JORES et al, 2003).

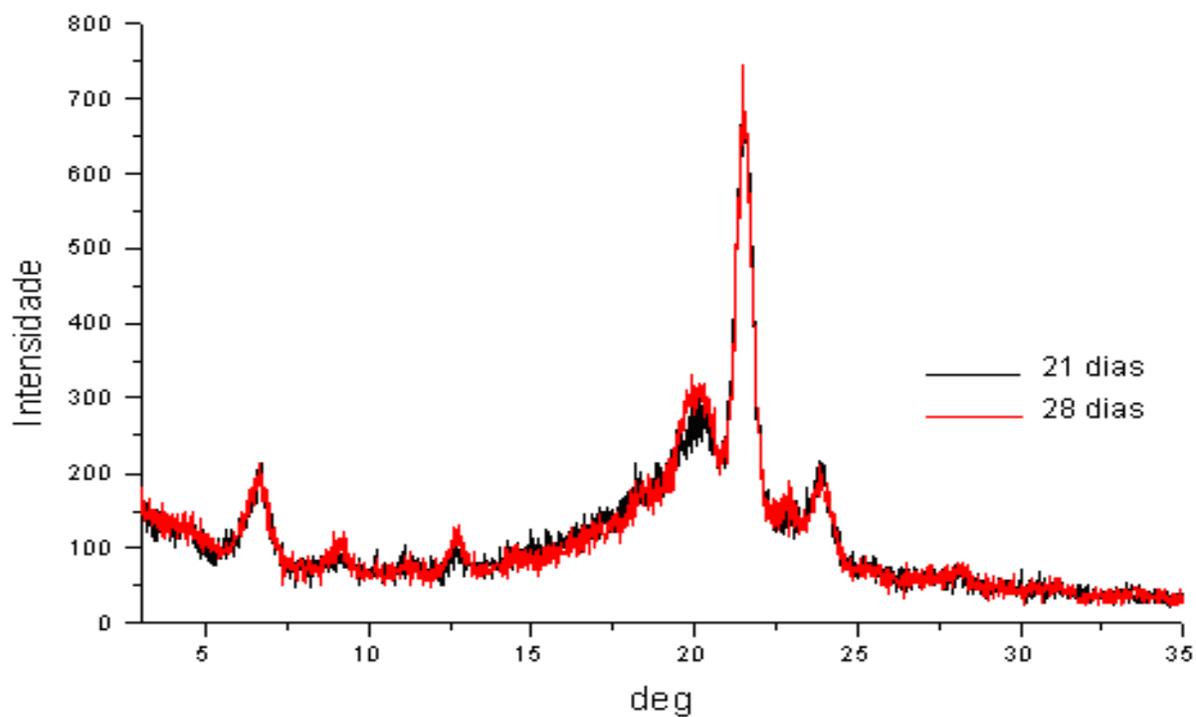
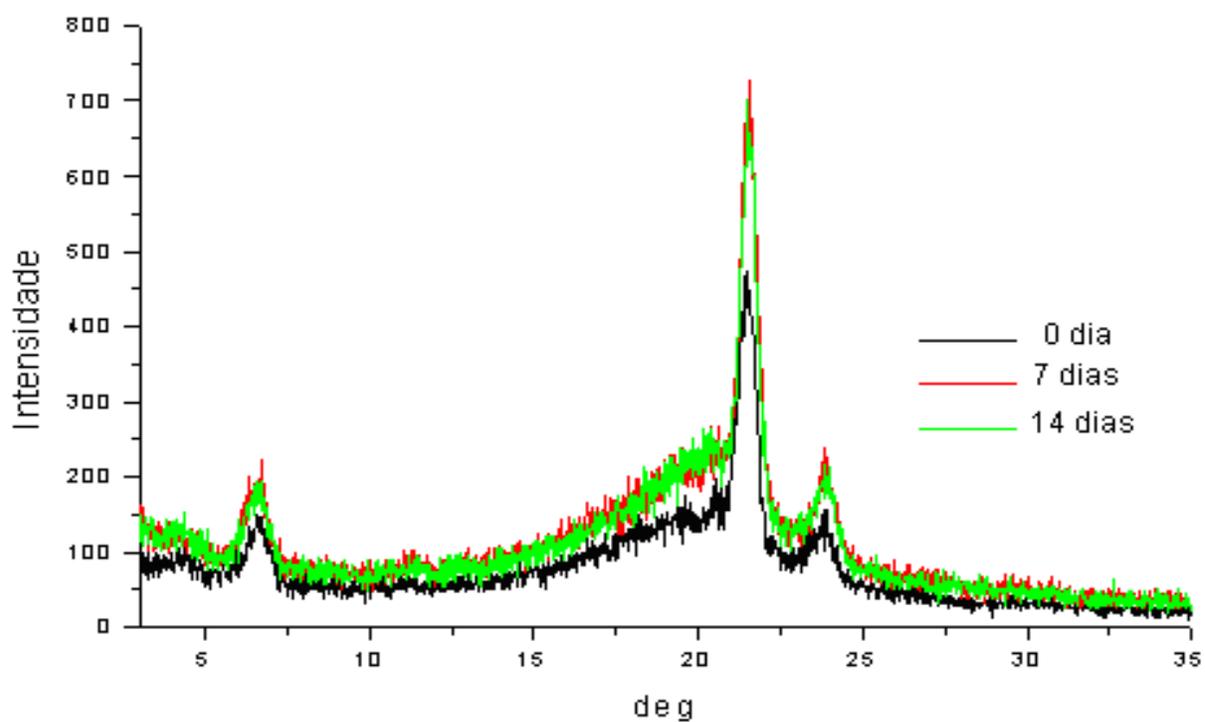
As intensidades e posições dos sinais de todas as formulações não se modificaram depois da segunda análise até o fim do experimento de estocagem, exceto para a formulação 5, o que sugere que a matriz lipídica pode ter sofrido pequenas alterações iniciais, permanecendo constante depois disto. Mesmo tendo sofrido alteração polimórfica na quarta análise (21º dia), de  $\beta'$  para  $\beta_i$ , a formulação 5, contendo a maior quantidade de glicose nas micropartículas, já apresentava alta quantidade de glicose superficial em relação às formulações 1 e 4, desde a produção das micropartículas. Adicionalmente, o grau de cristalinidade calculado (Tabela 13) não mostrou alterações ao longo da estocagem, permanecendo praticamente constante desde a produção das micropartículas.



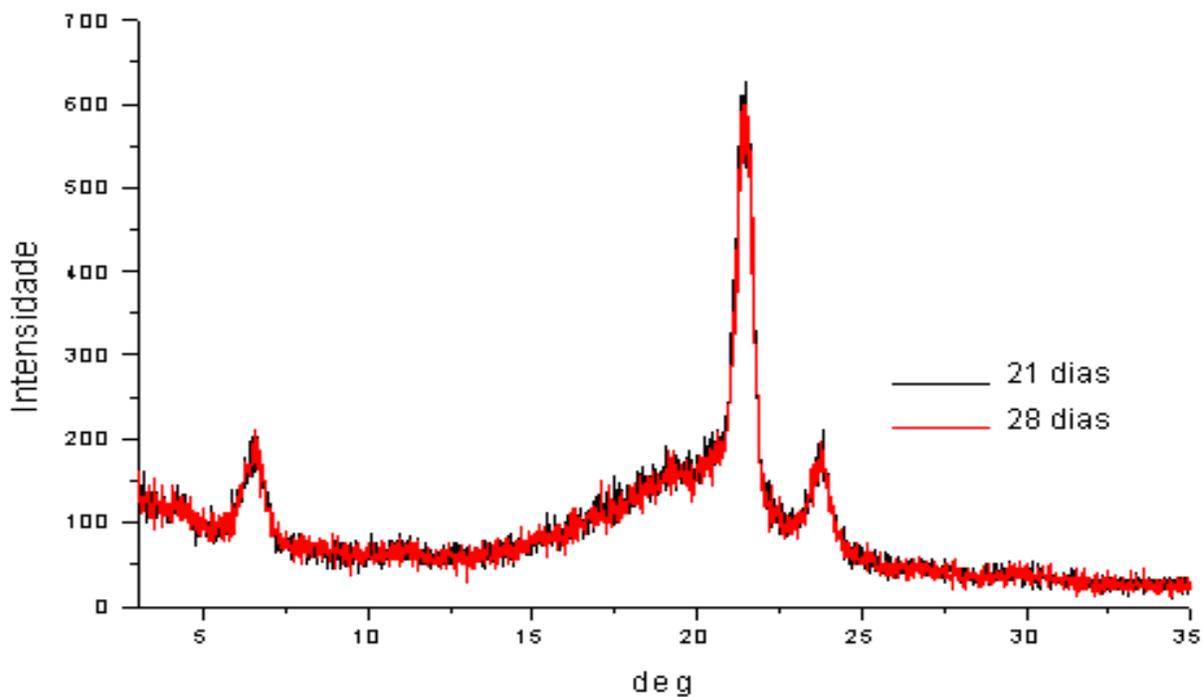
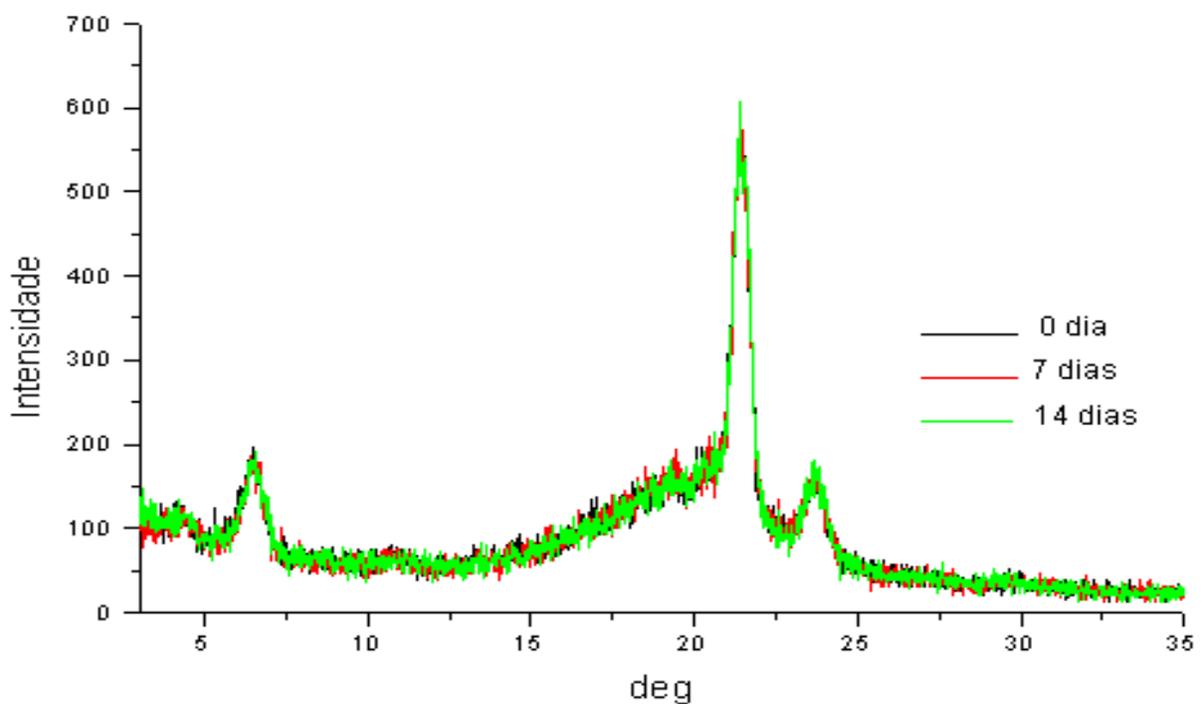
**Figura 7** – Curva de difração de raios-X da formulação 1 (solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25) nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias



**Figura 8** – Curva de difração de raios-X da formulação 4 (solução de glicose 60%, proporção lipídio/solução de glicose 90/10) nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias



**Figura 9** – Curva de difração de raios-X da formulação 5 (solução de glicose 80%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25) nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias



**Figura 10** – Curva de difração de raios-X da formulação de referência (M<sub>p</sub>LR – solução de glicose 40%, proporção lipídio/solução de glicose 75/25, sem lecitina) nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias

## 6. Conclusões

De forma geral, as partículas lipídicas estudadas neste trabalho apresentaram bons resultados quanto à eficiência de encapsulação e boa capacidade de controle da liberação do composto hidrofílico de baixa massa molar utilizado como recheio, mostrando-se potenciais para o uso futuro na indústria de alimentos. Adicionalmente, todos os materiais empregados são encontrados/extraídos de compostos/matérias primas alimentícias e o processo não utiliza solventes orgânicos, podendo, desta forma, serem consumidos por seres humanos.

Para os sistemas estudados, a emulsão obtida com 5% de lecitina em relação à quantidade lipídica utilizada com agitação a 10.000 rpm por 5 minutos apresentou a melhor estabilidade de emulsão, sendo usada para a produção das micropartículas.

O diâmetro médio das micropartículas situou-se entre 25 e 32  $\mu\text{m}$  e as micropartículas apresentaram forma esférica, com paredes contínuas porém rugosas, decorrente da utilização do ácido esteárico na formulação.

De forma geral, as formulações estudadas apresentaram alta eficiência de encapsulação efetiva, possibilitando a encapsulação de recheios hidrofílicos líquidos em quantidades razoáveis (~10%). A mistura de lipídios sólidos e líquido a temperatura ambiente e a presença de lecitina foram os fatores determinantes para a alta eficiência de encapsulação.

Maiores quantidades de glicose superficial foram observadas quando maiores quantidades de recheio estavam presentes na composição das micropartículas. De forma semelhante, menores quantidades de glicose encapsulada e a presença de lecitina produziram as maiores retenções no estudo de liberação do material de recheio. As curvas de liberação não apresentaram liberação inicial alta indicando a ausência de efeito “burst” e distribuição homogênea do material de recheio por toda a extensão da partícula.

O estudo de estabilidade indicou que, se houve alguma mudança polimórfica no sentido de aumentar a cristalinidade das micropartículas, esta mudança ocorreu durante o resfriamento, na produção das micropartículas. A quantidade de glicose superficial, embora tenha apresentado diferença entre as formulações, ficou praticamente constante após 28 dias de estocagem.

Os termogramas, obtidos por DSC, em tempo zero, não apresentaram diferenças entre as amostras.

Os difratogramas, obtidos por difração de raios-X, foram muito semelhantes entre as formulações e praticamente constantes durante a estocagem, corroborando com os resultados de glicose superficial obtidos no mesmo experimento.

## **7. Sugestões para Futuros Estudos**

- 7.1. Caracterizar as micropartículas quanto ao seu potencial zeta.
- 7.2. Verificar o comportamento das micropartículas em ambientes que simulem o trato gastrointestinal para possíveis aplicações em produtos para uso animal e humano.
- 7.3. Estudar a estabilidade quanto às propriedades de liberação do recheio em diferentes temperaturas.
- 7.4. Estudar a estabilidade de micropartículas em tempos mais longos quanto à liberação do recheio durante a estocagem.
- 7.5. Realizar estudos de estabilidade com auxílio da microscopia confocal de varredura a laser para observação de imagens que indiquem como está ocorrendo a expulsão do recheio.
- 7.6. Analisar outras misturas lipídicas e outros tensoativos, visando à maior eficiência de encapsulação.
- 7.7. Otimizar a relação material de parede/material de recheio, para maximizar a eficiência de encapsulação e o controle de liberação.

## 8. Referências Bibliográficas

- ALVES, G. P.; SANTANA, M. H. A. *Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties*. Powder Technology, v. 145, p. 139-148, 2004.
- AOCS, American Oil Chemists' Society. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, Champaign, 1990.
- AOCS, American Oil Chemists' Society. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, Champaign, 2004.
- BALASSA, L. L.; FANGER, G. O. *Microencapsulation in the food industry*. CRC Reviews in Food Technologie, p. 245, July, 1971.
- BUNJES, H.; DRECHSLER, M.; KOCH, M. H. J.; WESTESEN, K. *Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles*. Pharmaceutical Research, v. 18, n. 3, p. 287-293, 2001.
- BUNJES, H.; WESTESEN, K.; KOCH, M. H. J. *Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, v. 129, p. 159-173, 1996.
- CATÁLOGO SIGMA, *L $\alpha$ -phosphatidylcholine, Product number P5394, CAS Number 8002-43-5*)
- CHAMBI, H. N. M.; ALVIM, I. D.; BARRERA-ARELLANO, D.; GROSSO, C. R. F. *Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular*. Food Research International, doi:10.1016/j.foodres.2007.11.012, 2007.
- DUNCAN, D. P. *Practical implications of fatty acid topography modification by unsaturation*. JAOCS, v. 61, n. 2, p. 233-241, 1984.
- DZIEZAK, J. D. *Microencapsulation and encapsulated ingredients*. Food Technology, n. 42, p. 136-151, 1988.
- DZIEZAK, J. D. *Microencapsulation and encapsulated volatiles*. Hanser Publ. Co., Munich, p. 37-52, 1993.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; ALTORFER, H. *Polymorphic behavior of sprayed lipid micropellets and its evaluation by differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy*. *Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 2, p. 178-184, 1991b.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. *Optimization of spray-dried and –congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy*. *Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 1, p. 47-54, 1991a.

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

FRIEDRICH, I.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. *Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions*. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics*, n. 56, p. 111-119, 2003.

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

HEIATI, H.; TAWASHI, R.; PHILLIPS, N. C. *Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization*. *Journal of Microencapsulation*, v. 15, n. 2, p. 173-184, 1998.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WILKEMAN, J. *Clinical chemistry, principles and techniques*, 2<sup>a</sup> ed. New York: Harper and Harper Row Publishes, 1974.

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

HU, F. Q.; JIANG, S. P.; DU, Y. Z.; YUAN, H.; YE, Y.Q.; ZENG, S. *Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 45, p. 167-173, 2005.

INOUE, T.; HISATSUGU, Y.; YAMAMOTO, R.; SUZUKI, M. *Solid-liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures 1. oleic acid/stearic acid and oleic*

*acid/behenic acid mixtures*. Chemistry and Physics of Lipids, v. 127, p. 143-152, 2004.

JACKSON, L. S.; LEE, K. *Microencapsulation and the food industry*. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie. v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JENNING, V.; GOHLA, S. H. *Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN)*. International Journal of Pharmaceutics, n. 196, p. 219-222, 2000.

JENNING, V.; GOHLA, S. H. *Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN)*. Journal of Microencapsulation, v. 18, n. 2, p. 149-158, 2001.

JENNING, V.; MÄDER, K.; GOHLA, S. H. *Solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a H-NMR study*. International Journal of Pharmaceutics, v. 205, p. 15-21, 2000c.

JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. *Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties*. Journal of Controlled Release, n. 66, p. 115-126, 2000a.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. *Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids*. International Journal of Pharmaceutics, v. 199, p. 167-177, 2000b.

JEON, B. J.; KIM, N. C.; HAN, E. M.; KWAK, H. S. *Application of microencapsulated isoflavone into milk*. Archives of Pharmacal Research, v. 28, n. 7, p. 859-865, 2005.

JORES, K.; MEHNERT, W.; DRESHSLER, M.; BUNJES, H.; JOHANN, C.; MÄDER, K. *Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy*. Journal of Controlled Release, v. 95, p. 217-227, 2004.

JORES, K.; MEHNERT, W.; MÄDER, K. *Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study*. Pharmaceutical Research, v. 20, n. 8, p. 1274-1283, 2003.

KIM, B. D.; NA, K.; CHOI, H. K. *Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 24, p. 199-205, 2005.

KOENNING, S.; TESSMAR, J.; BLUNK, T.; GÖPFERICH, A. *Confocal microscopy for the elucidation of mass transport mechanisms involved in protein release from lipid-based matrices*. Pharmaceutical Research, v. 24, n. 7, p. 1325-1335, 2007.

LAMB, R. *Spray chilling*. Food Flavours, Ingredients, Packaging and Processing. v. 9, n. 12, p. 39, 1987.

LARSSON, K. *Lipids – molecular organization, physical functions and technical applications*. The Oily Press, Suécia, 237p., 1993.

MA, C. –Y.; HARWALKAR, V. R.; MAURICE, T. J. *Instrumentation and techniques of thermal analysis in food research*. In: HARWALKAR, V. R. & MA, C. –Y., Thermal Analysis of Foods. London, Elsevier, cap 1, p. 1-15, 1990.

MAGGE JR., E. L.; OLSON, N. F. *Microencapsulation of cheese ripening systems: stability of microcapsules*. Journal of Dairy Science, v. 64, p.611-615, 1981b.

MAGGE JR., E. L.; OLSON, N. F. *Microencapsulation of cheese ripening systems: formation of microcapsules*. Journal of Dairy Science, v. 64, p.600-610, 1981a.

MARANGONI, A. G. *Special issue of FRI – crystallization, structure and functionality of fats*. Food Research International, v. 35, p. 907-908, 2002.

MASCHKE, A.; BECKER, C.; EYRICH, D.; KIERMAIER, J.; BLUNK, T.; GÖPFERICH, A. *Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 65, p. 175-187, 2007.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. *Solid lipid nanoparticles – production, characterization and applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, n. 47, p. 165-196, 2001.

MELLEMA, M.; VAN BENTHUM, W. A. J.; BOER, B.; VON HARRAS, J.; VISSER, A. *Wax encapsulation of water-soluble compounds for application in foods*. Journal of Microencapsulation, v. 23, n. 7, p. 729-740, 2006.

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

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. Advanced Drug Delivery Reviews, n. 54, sup 1, p. S131-S155, 2002b.

NASSU, R. T. *Estudo do comportamento térmico de óleos e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC)*. Campinas, SP: Unicamp, 94p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1994.

NAWAR, W. W. *Lipids*. In: FENNEMA, O. R. Food Chemistry. 3<sup>o</sup> ed., Marcel Dekker, Inc. New York, 1996.

NORI, M. A. *Produção de microcápsulas de ácido cítrico para utilização em produtos cárneos*. São Paulo, SP: USP, 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, 1996.

OLLIVON, M. *Lipid structure and fat crystallization*. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 107, n. 9, p. 579-581, 2005.

PIETKIEWICZ, J.; SZNITOWSKA, M.; PLACZEK, M. *The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates*. International Journal of Pharmaceutics, v. 310, p. 64-71, 2006.

PORTER, M.R. *Handbook of surfactants*. New York: Chapman & Hall. p. 227, 1991.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; TAMAYO-ESQUIVEL, D.; GANEM-QUINTANAR, A.; ALLÉRMANN, E.; DOELKER, E. *Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 26, p. 211-218, 2005.

RAEMY, A.; LAMBELET, P. *Thermal behavior of foods*. Thermochemica Acta, v. 193, p. 417-439, 1991.

RÉ, M. I. *Microencapsulação em busca de produtos inteligentes*. São Paulo: Ciência Hoje. v. 27, n. 162, p. 24-29, 2000.

REINECCIUS, G. A. *Controlled release techniques in food industry*. In: RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. American Chemical Society, Washington, 214p., 1995.

RISCH, S. J. *Encapsulation: overview of uses and techniques*. In: RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. American Chemical Society, Washington, 214p., 1995.

RODRIGUEZ, L.; PASSERINI, N.; CAVALLARI, C.; CINI, M.; SANCIN, P.; FINI, A. *Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomizer for spray-congealing processes*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 183, p. 133-143, 1999.

ROSEN, M. J. *Surfactants and interfacial phenomena*. New York: Wiley. p.431, 1989.

SAVOLAINEN, M.; KHOO, C.; GLAD, H.; DAHLQVIST, C.; JUPPO, A. M. *Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 244, p. 151-161, 2002.

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

SCHUBERT, M. A.; HARMS, M.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. *Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, n. 27, p. 226-236, 2006.

SCHUBERT, M. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. *Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 61, p. 77-86, 2005.

SCHUWARZ, C.; MENHERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. *Solid lipid nanoparticles for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization*. *Journal of Controlled Release*, n. 30, p. 83-96, 1994.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. drug incorporation and physicochemical characterization*. Journal of Microencapsulation, v. 16, n. 2, p. 205-213, 1999.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. *Encapsulation of food ingredients*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. *Sub-micron sized parenteral carrier systems based on solid lipid*. Pharm. Pharmacological Lett., n. 1, p. 123-126, 1992.

SPARKS, R. E. *Microencapsulation*. In: Encyclopedia of chemical technology. Ed. Kirk-Othmer, 3<sup>a</sup>ed., vol. 15, p. 470, 1981.

SUN, S. F. *Physical chemistry of macromolecules: basic principles and issues*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2<sup>a</sup> ed, 2004.

SUZUKI, M.; OGAKI, T. *Crystallization and transformation mechanisms of  $\alpha$ ,  $\beta$ - and  $\gamma$ -polymorphs of ultra-pure oleic acid*. JAOCS, v. 62, n. 11, p. 1600-1604, 1985.

SZYDLOWSKA-CZERNIAK, A.; KARLOVITS, G.; LACH, M.; SZLYK, E. *X-ray diffraction and differential scanning calorimetry studies of  $\beta' \rightarrow \beta$  transitions in fat mixtures*. Food Chemistry, v. 92, p. 133-141, 2005.

TAYLOR, A. H. *Encapsulation systems and their applications in the flavour industry*. Food Flavours, Ingredients, Packaging and Processing, n. 5, p. 48, Sept, 1983.

THIES, C. *How to make microcapsules combined lecture and laboratory manual*. Thies Technology, St. Louis. Missouri, 1995.

THIES, C. *Microencapsulation*. In: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, p. 724-745 (H. F. Mark, N. M. Bikales. C. G. Overberger, G. Menges, J. I. Kroschwitz). New York, 1987.

TIMMS, R. E. *Phase behavior of fats and their mixtures*. Progress Lipid Research, v. 23, p. 1-38, 1984.

TODD, R. *Microencapsulation and the flavour industry*. The flav. Industry nov. p. 768, 1970.

VILLAMAGNA, F.; WHITEHEAD, M. A.; CHATTOPADYAY, A. K. *A molecular modelling approach to the analysis of present and design of future surfactants for water-in-oil emulsions*. Journal of Molecular Structure (Theochem), n. 343, p. 77-103, 1995.

VOLOSOV, A.; BIALER, M.; YAGEN, B. *Pharmaceutical compositions containing low-melting waxes*. Patente n° WO 00/01416, 2000.

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

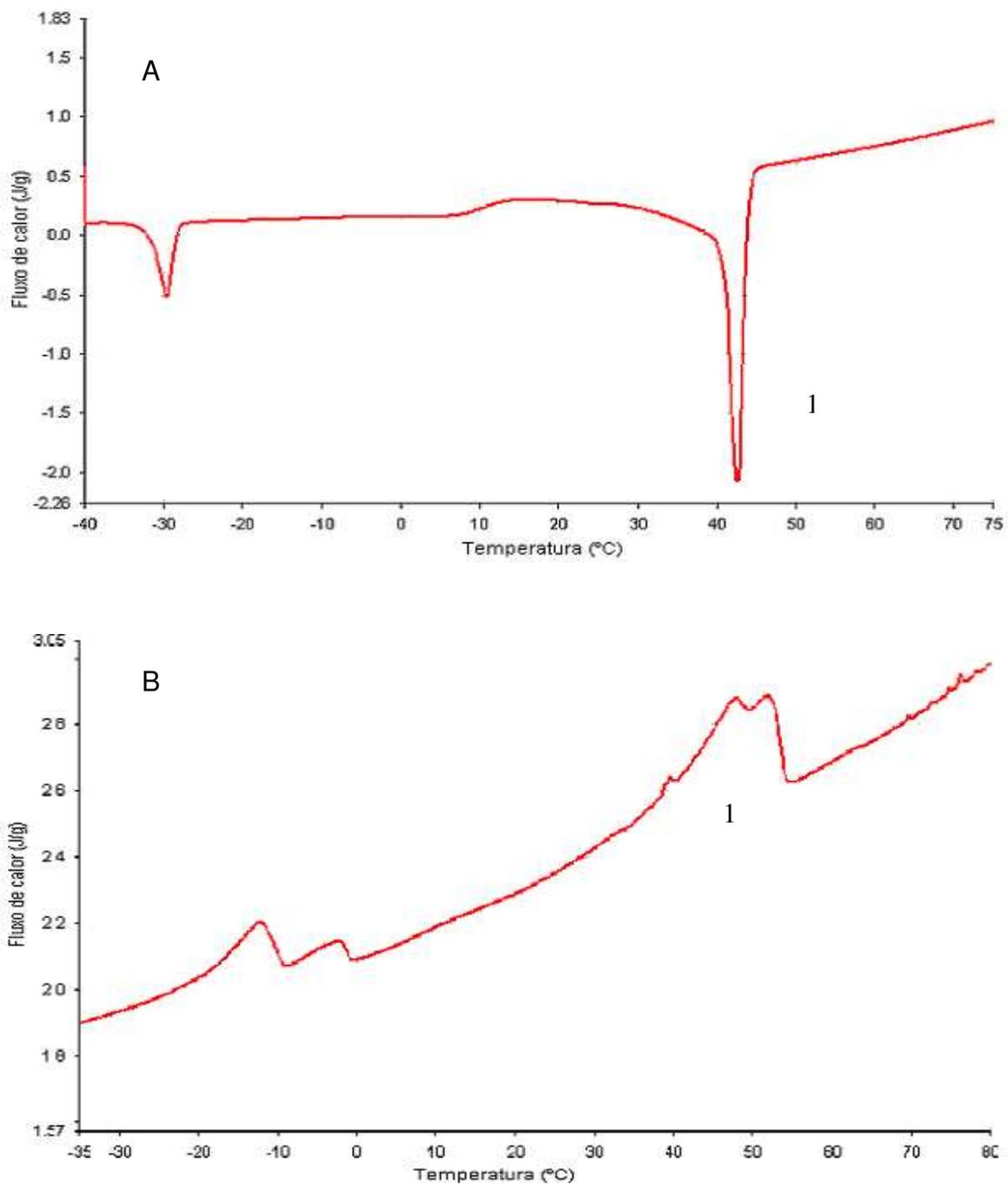
WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H.; MANTHEI, L.; MAYER, C. *Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy*. Pharmaceutical Research, v. 21, n. 3, p. 400-405, 2004b.

ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – drug release and release mechanism*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 45, p. 149-155, 1998.

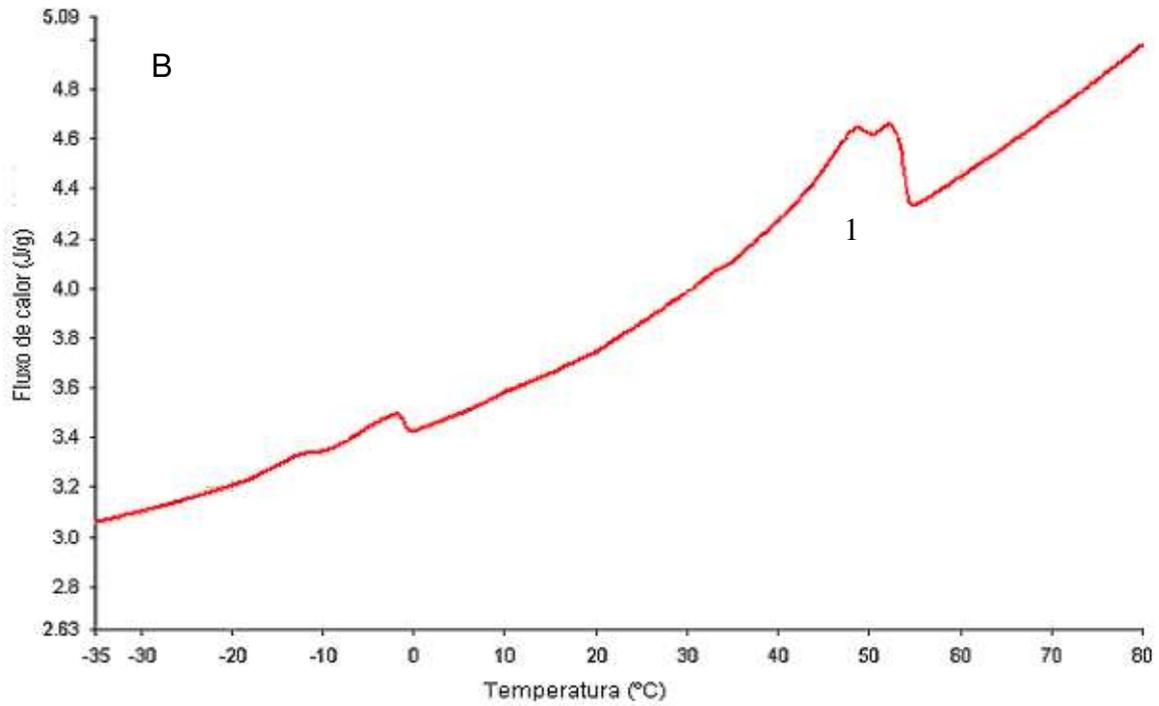
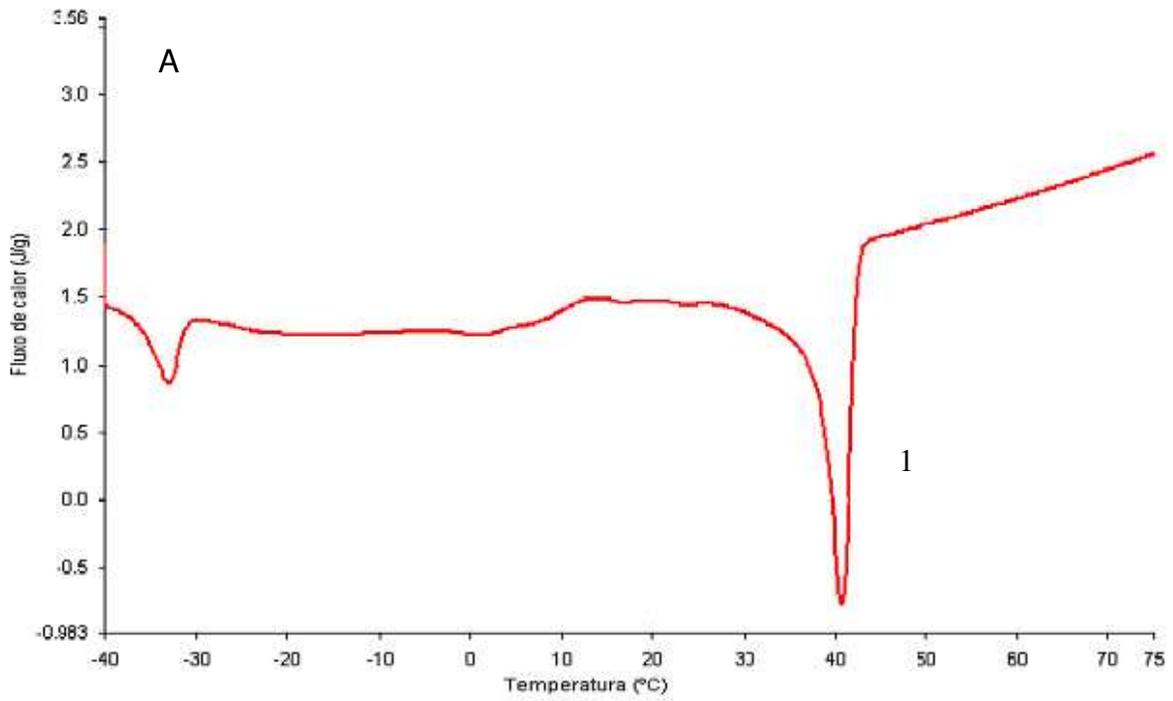
ZUR MÜHLEN, A.; ZUR MÜHLEN, E.; NIEHUS, H.; MEHNERT, W. *Atomic force microscopy studies of solid lipid nanoparticles*. Pharmaceutical Research, v. 13, n. 9, p. 1411-1416, 1996.

## **9. Anexo**

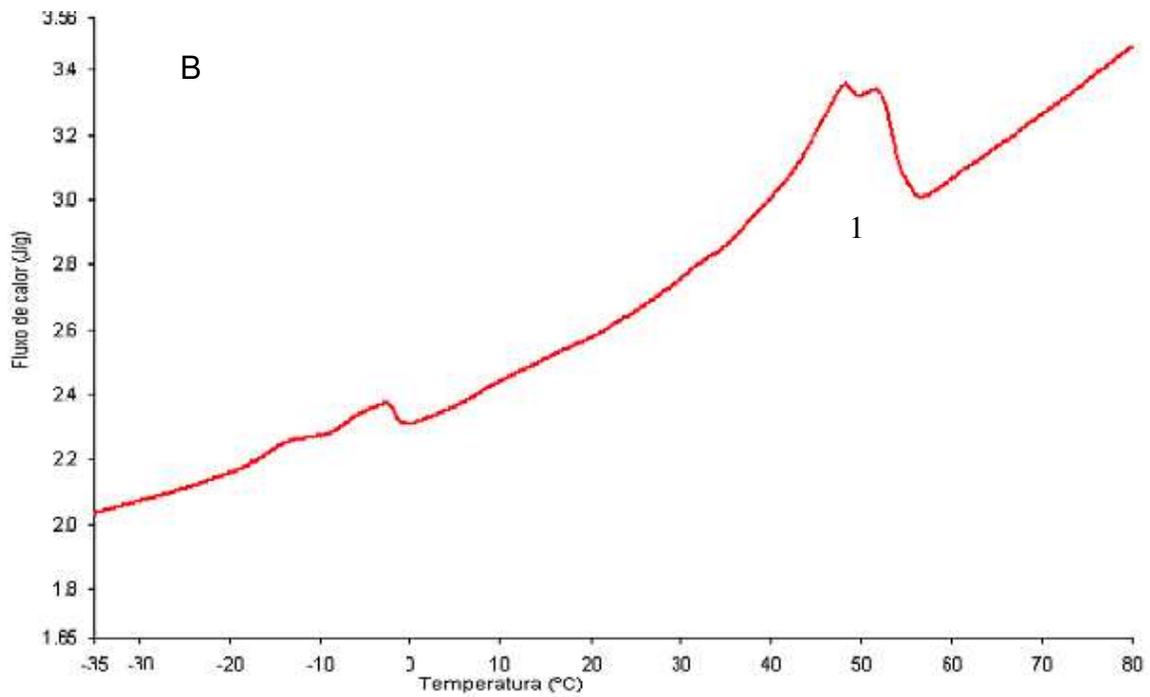
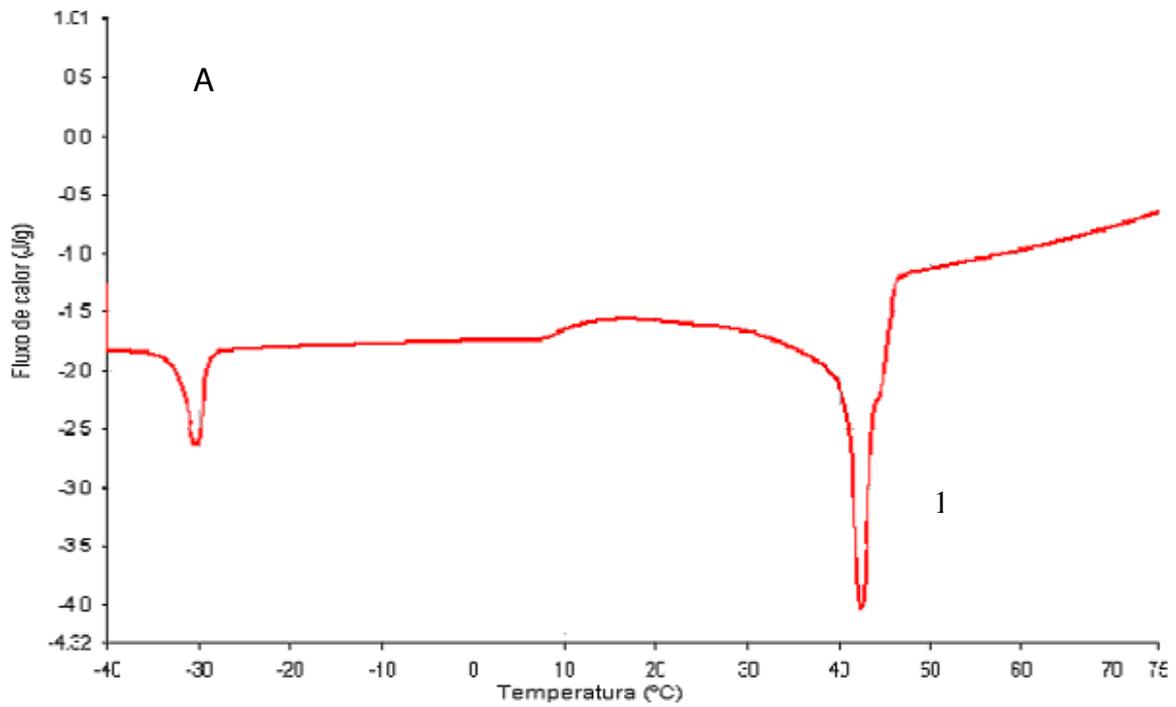
**9.1. Anexo 1** – Termogramas obtidos por DSC das amostras analisadas no estudo da estabilidade



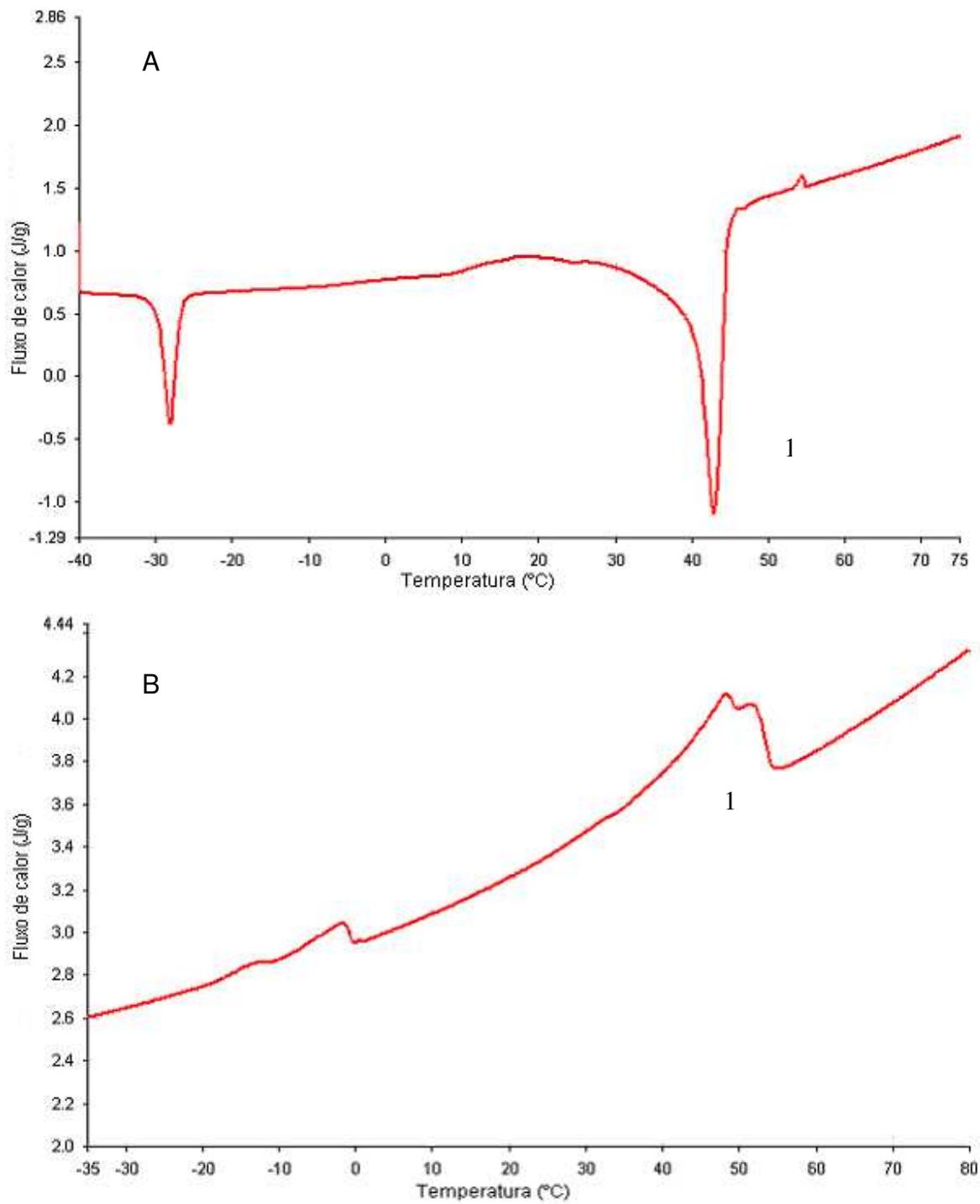
**Figura 11** – Termograma obtido por DSC da formulação 1 – Cristalização (A) e Fusão (B)



**Figura 12** – Termograma obtido por DSC da formulação 4 – Cristalização (A) e Fusão (B)



**Figura 13** – Termograma obtido por DSC da formulação 5 – Cristalização (A) e Fusão (B)



**Figura 14** – Termograma obtido por DSC da formulação de referência (MpLR) – Cristalização (A) e Fusão (B)