

Ana Paula Pereira de Melo Costa Silva

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA  
CONTENDO  $\gamma$ -ORIZANOL.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientador: Prof. Dr. Pedro L. Manique Barreto**

**Florianópolis  
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Ana Paula Pereira de Melo Costa  
Desenvolvimento de nanoparticulas de zeína  
contendo gama-orizanol / Ana Paula Pereira de Melo  
Costa Silva ; orientador, Pedro Luiz Manique  
Barreto, 2018.  
179 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Nanoparticulas. 3.  
Zeína. 4. Gama-orizanol. 5. Estabilização com  
polissacarídeos. I. Barreto, Pedro Luiz Manique. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Ana Paula Pereira de Melo

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA  
CONTENDO  $\gamma$ -ORIZANOL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup> Ana Carolina de Oliveira Costa, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Maria Manuela Camino Feltes, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof. Giustino Tribuzi, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof. Thiago Caon, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Aos meus pais e meu esposo pelo  
carinho, apoio e incentivo para  
realização deste trabalho.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Henrique e Tânia, pelo carinho e apoio em todos os momentos. Aos meus tios Luciane e Marcelo por todas as conversas, risadas e palavras de conhecimento. Ao meu esposo, Luis, pela compreensão, incentivo, paciência e pelas inestimáveis discussões sobre os experimentos.

Ao meu orientador, Pedro Barreto, pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Reologia e Polímeros Naturais; Aline, Ana, Bianca, Bruna, Carolina, Daniele, Giovana, Michelle, Matheus e Tiago, pelo suporte, conselhos e convivência. Vocês tornaram essa jornada mais agradável.

Aos amigos do Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia; Marta, Mariana, Carine, Talitha,, Luis, Sandra, Nilson, e aos Professores Ângela, Elenara e Thiago, agradeço pelas palavras de carinho, convívio e por me acolherem como um “membro externo” do laboratório.

Ao Prof. Flavio H. Reginatto por disponibilizar por inúmeras vezes o uso do rotaevaporador. À MSc. Gisele Olivo pelo suporte na análise cromatográfica. Ao Grupo de Estudos de Interação entre Mico e Macromoléculas e Laboratório de Controle de Qualidade, do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC) pela realização dos experimentos de espalhamento de luz e espectroscopia no infravermelho, respectivamente. Ao Grupo de Estudos de Materiais Poliméricos do Departamento de Engenharia de Materiais (UFSC) pelo estudo de estabilidade física acelerada. E ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (UFSC) pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, e aos professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos por possibilitar a realização deste trabalho.





## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas de zeína com adequada estabilidade física para liberação de  $\gamma$ -orizanol, uma mistura de ésteres do ácido trans-ferúlico com álcoois triterpênicos. Apesar de suas propriedades funcionais, o emprego deste fitoesterol em alimentos tem sido consideravelmente limitado devido à sua baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade. Sendo assim, o emprego de nanopartículas surge como uma estratégia viável para promoção da dispersibilidade do  $\gamma$ -orizanol em água, e proteção destas moléculas frente à degradação física e química. Dentre os materiais utilizados no preparo de nanopartículas para o emprego em alimentos, a zeína surge como uma alternativa interessante, sobretudo por ser uma proteína insolúvel em água e capaz de incorporar substâncias hidrofóbicas. No entanto, as nanopartículas de zeína tendem a apresentar baixa estabilidade em meio aquoso, principalmente devido a interações hidrofóbicas, o que dificulta seu emprego, sobretudo em produtos majoritariamente aquosos. Diferentes moléculas vêm sendo utilizadas como o intuito de estabilizar fisicamente nanopartículas de zeína, destacando-se os tensoativos e o polissacarídeos, que atuam conferindo estabilização eletrostática e/ou estérica às nanopartículas proteicas. Desta forma, foram desenvolvidas nanopartículas de zeína na ausência de tensoativos (NZ) e na presença de Kolliphor P188 (NZ<sub>K</sub>), e foram estudados os efeitos da interação destes sistemas com os polissacarídeos alginato de sódio, goma arábica, e quitosana de alta, média ou baixa massa molar. Observou-se que todos os polissacarídeos proporcionaram um aumento no potencial zeta das nanopartículas, e as interações entre os nanocarreadores e os polissacarídeos puderam ser caracterizadas por espectroscopia no infravermelho e microcalorimetria exploratória diferencial. Porém, em estudo de estabilidade física acelerada, verificou-se que o alginato de sódio e a goma arábica reduzem significativamente a estabilidade física das nanopartículas, enquanto a quitosana proporcionou um aumento significativo da estabilidade física do sistema nanoparticulado. Adicionalmente a interação entre as nanopartículas e o alginato de sódio proporcionou uma redução da eficiência de liberação do  $\gamma$ -orizanol, enquanto não houve diferença nas amostras que interagiram com a goma arábica, e aquelas incubadas com quitosana demonstraram um aumento significativo da eficiência de dissolução. O efeito antioxidante do  $\gamma$ -orizanol foi maximizado através da encapsulação dos fitoesteróis quando comparado com o  $\gamma$ -orizanol livre, demonstrando maior

atividade antioxidante quando as nanopartículas que interagiram com quitosana foram avaliadas. Sendo assim, a quitosana apresenta melhor capacidade de estabilização das nanopartículas de zeína, apresentando, também, um aprimoramento das propriedades físico-químicas, de liberação do  $\gamma$ -orizanol, e da atividade antioxidante dos fitoesteróis. Dentre as amostras avaliadas, as nanopartículas estabilizadas com quitosana de média massa molar, NZ-QMMM, apresentaram propriedades mais promissoras, sendo selecionadas como a formulação mais propícia para emprego na indústria alimentícia.

**Palavras-chave:** Nanopartículas. Zeína.  $\gamma$ -orizanol. Estabilização com polissacarídeos.

## ABSTRACT

This study aims to develop physically stable zein-based nanoparticles for the delivery of  $\gamma$ -oryzanol. Nonetheless, the use of  $\gamma$ -oryzanol, a mixture of trans-ferulic acid triterpene alcohol esters, in the food industry has been limited due to its low water solubility and low bioavailability. Therefore, the use of nanoparticles seems to be a viable approach to overcome the  $\gamma$ -oryzanol physicochemical problems and protect it against physical and chemical degradation. Among food grade biomaterials used to prepare nanoparticles, zein is an interesting candidate since it is a water-insoluble protein capable of incorporating hydrophobic bioactive substances. However, zein-based nanoparticles tend to have low physical stability in aqueous media, mainly due to hydrophobic interactions, which makes it difficult to use them, above all in aqueous products. Different molecules have been used to enhance physical stability of zein nanoparticles. Among them, surfactants and polysaccharides have been widely used due to their properties to provide electrostatic and/or steric stabilization to protein-based nanocarriers. Thus, zein nanoparticles were developed in the absence of surfactant (NZ) and in the presence of Kolliphor P188 surfactant (NZ<sub>K</sub>). The effect of sodium alginate, Arabic gum, and chitosan (high, medium and low molecular weight) on NZ and NZ<sub>K</sub> stabilization was studied. Polysaccharide-nanoparticles interaction was verified by nanocarriers physicochemical properties changes, as well as infrared spectroscopy and differential scan micro-calorimetry. Accelerated physical stability assay showed that sodium alginate and Arabic gum were able to decrease significantly the physical stability of nanoparticles, while chitosan highly increased protein-polysaccharide core-shell nanoparticles stability. Besides that, sodium alginate-nanoparticles interaction provided a decrease in dissolution efficiency of  $\gamma$ -oryzanol, while there were no changes when Arabic gum was used. On the other hand, when chitosans were used a significant increase in dissolution efficiency was observed. The antioxidant effect of  $\gamma$ -oryzanol was maximized by phytosterols encapsulation, compared with free  $\gamma$ -oryzanol, showing higher antioxidant activity when nanoparticles interacted with chitosan. So, chitosans shown higher zein nanoparticles stabilization capability, promoting, also, an enhancing of physicochemical,  $\gamma$ -oryzanol release, and phytosterols antioxidant activity properties. Among all formulations evaluated, medium molecular weight chitosan-stabilized nanoparticles prepared in the absence of surfactant (NZ-QMMM) shown more

promising properties, being selected as the drug delivery system more likely to be able to be used on food industry.

**Key words:** Nanoparticles. Zein.  $\gamma$ -oryzanol. Zein-based nanoparticles stabilization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química dos principais constituintes do $\gamma$ -orizanol	36
<b>Figura 2</b> – Rota parcial da biossíntese dos principais esteróis contidos no $\gamma$ -orizanol	37
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática do processo oxidativo de lipídeos e mecanismos de ataque de agentes antioxidantes.	39
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática dos mecanismos de liberação de compostos bioativos a partir de biomateriais	47
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática das nanoesferas e das nanocápsulas	48
<b>Figura 6</b> – Representações esquemáticas da estrutura tridimensional da $\alpha$ -zeína propostas por (A) Argos e colaboradores (1982); e (B) Matsushima e colaboradores (1997)	52
<b>Figura 7</b> – Representação da estrutura química do Poloxamer	55
<b>Figura 8</b> – Representação da estrutura química do polissacarídeo alginato de sódio	56
<b>Figura 9</b> – Representação de (A) estrutura química dos monossacarídeos que compõem a goma arábica e (B) da composição estrutural do polissacarídeo	57
<b>Figura 10</b> – Representação da estrutura química do polissacarídeo quitosana	57
<b>Figura 11</b> – Fluxograma do método de preparo das nanopartículas de zeína, onde (A) corresponde à Fase Orgânica, (B) à Fase Aquosa, (C) ao processo de agitação magnética, (D) remoção do etanol sob pressão reduzida, e (E) armazenamento das nanopartículas de zeína.	63
<b>Figura 12</b> – Representação esquemática da configuração da centrífuga analítica LUMiSizer	69
<b>Figura 13</b> – Efeito do Kolliphor P188 sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de zeína: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	76
<b>Figura 14</b> – Efeito do alginato de sódio sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	79
<b>Figura 15</b> – Efeito do alginato de sódio sobre as propriedades físico-químicas das NZ <sub>K</sub> : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	81
<b>Figura 16</b> – Efeito da goma arábica sobre as propriedades	83

físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	
<b>Figura 17</b> – Efeito da goma arábica sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	85
<b>Figura 18</b> – Efeito da quitosana de alta massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	87
<b>Figura 19</b> – Efeito da quitosana de alta massa molar sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	89
<b>Figura 20</b> – Efeito da quitosana de média massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	91
<b>Figura 21</b> – Efeito da quitosana de média massa molar sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	93
<b>Figura 22</b> – Efeito da quitosana de baixa massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	95
<b>Figura 23</b> – Efeito da quitosana de baixa massa molar sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta	97
<b>Figura 24</b> – Espectro de infravermelho da: (a) zeína; (b) Kolliphor P188; (c) NZ; e (d) $NZ_K$	98
<b>Figura 25</b> – Avaliação da interação entre NZ com alginato de sódio, onde; (a) é o espectro do alginato de sódio; (b) das NZs; e (c) das NZ-ASs	99
<b>Figura 26</b> – Avaliação da interação entre $NZ_K$ com alginato de sódio, onde; (a) é o espectro do alginato de sódio; (b) Kolliphor P188; (c) da $NZ_K$ ; e (d) da $NZ_K$ -AS	100
<b>Figura 27</b> – Avaliação da interação entre NZ com goma arábica, onde; (a) é o espectro da goma arábica; (b) das NZ; e (c) da NZ-GA	101
<b>Figura 28</b> – Avaliação da interação entre $NZ_K$ com goma arábica, onde; (a) é o espectro da goma arábica; (b) Kolliphor P188; (c) das $NZ_K$ ; e (d) da $NZ_K$ -GA	101
<b>Figura 29</b> – Avaliação da interação entre NZ e $NZ_K$ com a quitosana, onde; (a) é o espectro da Quitosana; (b) da NZ; (c) da NZ-Quitosana; (d) Kolliphor P188; (e) da $NZ_K$ ; e (f) da $NZ_K$ -Quitosana	102

<b>Figura 30</b> – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) zeína; (b) NZ; (c) Kolliphor P188; e (d) NZ <sub>K</sub>	103
<b>Figura 31</b> – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) alginato de sódio; (b) NZ; (c) NZ-AS; (d) NZ <sub>K</sub> ; e (e) NZ <sub>K</sub> -AS	106
<b>Figura 32</b> – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) goma arábica; (b) NZ; (c) NZ-GA; (d) NZ <sub>K</sub> ; e (e) NZ <sub>K</sub> -GA	107
<b>Figura 33</b> – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) quitosana de alta massa molar; (b) NZ; (c) NZ-QAMM; (d) NZ <sub>K</sub> ; e (e) NZ <sub>K</sub> -QAMM	108
<b>Figura 34</b> – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) quitosana de média massa molar; (b) NZ; (c) NZ-QMMM; (d) NZ <sub>K</sub> ; e (e) NZ <sub>K</sub> -QMMM	109
<b>Figura 35</b> – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) quitosana de baixa massa molar; (b) NZ; (c) NZ-QBMM; (d) NZ <sub>K</sub> ; e (e) NZ <sub>K</sub> -QBMM	110
<b>Figura 36</b> – Micrografia eletrônica de transmissão das amostras: (A) NZ; (B) NZ-AS; (C) NZ-GA; (D) NZ-QAMM; (E) NZ-QMMM; e (F) NZ-QBMM	111
<b>Figura 37</b> – Micrografia eletrônica de transmissão das amostras: (A) NZ <sub>K</sub> ; (B) NZ <sub>K</sub> -AS; (C) NZ <sub>K</sub> -GA; (D) NZ <sub>K</sub> -QAMM; (E) NZ <sub>K</sub> -QMMM; e (F) NZ <sub>K</sub> -QBMM	112
<b>Figura 38</b> – Relação do perfil de transmitância espaço e tempo dependente das nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188 em função do comprimento do porta-amostra em centrífuga analítica LUMiSizer	116
<b>Figura 39</b> – Relação do perfil de transmitância espaço e tempo dependente das nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188 em função do comprimento do porta-amostra em centrífuga analítica LUMiSizer	117
<b>Figura 40</b> – Representação gráfica: (A) do índice de instabilidade das nanopartículas de zeína; e (B) da densidade das nanopartículas de zeína secas por liofilização.	118
<b>Figura 41</b> – Representação gráfica do perfil do índice de instabilidade em função do tempo de centrifugação para: (A) nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188; e (B) nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188	120
<b>Figura 42</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> do $\gamma$ -orizanol a partir	121

das nanopartículas de zeína preparadas na ausência e na presença de Kolliphor P188 ( $n = 6$ )	
<b>Figura 43</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas de zeína contendo polissacarídeos quando preparadas: (A) na ausência de Kolliphor P188; e (B) na presença de Kolliphor P188 ( $n = 6$ )	122
<b>Figura 44</b> – Mecanismo de formação das nanopartículas de zeína através do método de evaporação do solvente	129
<b>Figura 45</b> – Perfil cromatográfico da solução de $\gamma$ -orizanol	154
<b>Figura 46</b> – Sobreposição dos cromatogramas das soluções preparadas a partir: (A) do diluente; (B) das nanopartículas brancas preparadas na ausência de Kolliphor P188; (C) das nanopartículas brancas preparadas na presença de Kolliphor P188; (D) da solução de $\gamma$ -orizanol; (E) da solução obtida a partir das nanopartículas brancas preparadas na presença de Kolliphor P188 e contaminadas com $\gamma$ -orizanol; (F) das nanopartículas contendo $\gamma$ -orizanol, preparadas na ausência de Kolliphor P188; e (G) das nanopartículas contendo $\gamma$ -orizanol, preparadas na presença de Kolliphor P188	153
<b>Figura 47</b> – Curva analítica do $\gamma$ -orizanol determinado por CLAE	156



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Efeito da concentração de Kolliphor P188 sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de zeína ( $n=3$ )	75
<b>Tabela 2</b> - Efeito da concentração de alginato de sódio sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ )	78
<b>Tabela 3</b> - Efeito da concentração de alginato de sódio sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ ( $n=3$ )	80
<b>Tabela 4</b> - Efeito da concentração de goma arábica sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ )	82
<b>Tabela 5</b> - Efeito da concentração de goma arábica sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ ( $n=3$ )	84
<b>Tabela 6</b> - Efeito da concentração da quitosana de alta massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ )	86
<b>Tabela 7</b> - Efeito da concentração da quitosana de alta massa molar sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ ( $n=3$ )	88
<b>Tabela 8</b> - Efeito da concentração da quitosana de média massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ )	90
<b>Tabela 9</b> - Efeito da concentração da quitosana de média massa molar sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ ( $n=3$ )	92
<b>Tabela 10</b> - Efeito da concentração da quitosana de baixa massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ )	94
<b>Tabela 11</b> - Efeito da concentração da quitosana de baixa massa molar sobre as propriedades físico-químicas das $NZ_k$ ( $n=3$ )	96
<b>Tabela 12</b> – Análise térmicas das matérias-primas e das nanopartículas de zeína	104
<b>Tabela 13.</b> Avaliação do teor de $\gamma$ -orizanol e eficiência de encapsulação das nanopartículas proteicas ( $n = 3$ )	114
<b>Tabela 14.</b> Avaliação do índice de instabilidade e da densidade aparente das formulações de nanopartículas de zeína contendo $\gamma$ -orizanol	119
<b>Tabela 15.</b> Dados de eficiência de dissolução do $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína ( $n = 6$ )	123
<b>Tabela 16</b> – Parâmetros calculados para determinação do mecanismo de liberação do $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína	125
<b>Tabela 17</b> – Avaliação da atividade antioxidante, pelo método	126

DPPH, das nanopartículas proteicas ( $n = 6$ )	
<b>Tabela 18.</b> Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade do método cromatográfico para determinação do $\gamma$ -orizanol	157
<b>Tabela 19.</b> Resultados obtidos na avaliação da precisão inter-dia do método cromatográfico para determinação do $\gamma$ -orizanol	157
<b>Tabela 20.</b> Recuperação do $\gamma$ -orizanol após contaminação da amostra branca de nanopartículas de zeína e meio de dissolução	158
<b>Tabela 21.</b> Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação do $\gamma$ -orizanol por CLAE	159

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA % - Atividade antioxidante  
ALT – Alanina transaminase  
ANOVA – Análise da variância  
AS – Alginato de sódio  
ASC – Área sob a curva  
AST – Aspartato transaminase  
BHA – Mistura do 2-terc-butil-4-hidroxianisol, e 3-terc-butil-4-hidroxianisol  
BHT – Di-terc-butil metil fenol  
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência  
CMC – Concentração micelar crítica  
COX-2 – Enzima ciclooxigenase 2  
DLS – Espalhamento de luz dinâmico  
DPPH<sup>•</sup> – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila  
DS<sub>μ</sub>C – Microcalorimetria exploratória diferencial  
ED – Eficiência de dissolução  
EE – Eficiência de encapsulação  
EPI – Equipamento de proteção individual  
EROS – Espécies reativas de oxigênio  
FcεRI – Receptor de alta afinidade por IgE  
FDA – *Food and Drug Administration*  
FTIR – Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier  
GA – Goma Arábica  
GRAS – Reconhecido como seguro (tradução livre do inglês *Generally Recognized as Safe*)  
GSH – Glutathiona hepática  
HDL – Lipoproteína de alta densidade  
ICH – Conferência Internacional de Harmonização (tradução livre do inglês, *International Conference on Harmonisation*)  
iNOS – Indutora da óxido nítrico sintetase  
Ig – Imunoglobulina  
IL – Interleucina  
MMPs – Matriz metaloproteases  
NF-κB – Fator nuclear κ B  
NZ – Nanopartícula de zeína preparada na ausência do tensoativo Kolliphor P188  
NZ<sub>K</sub> – Nanopartícula de zeína preparada na presença do tensoativo Kolliphor P188  
QAMM – Quitosana de alta massa molar

QBMM – Quitosana de baixa massa molar  
QMMM – Quitosana de média massa molar  
PDI – Índice de polidispersão  
pH – Potencial hidrogeniônico  
SOD – Enzima superóxido dismutase  
MET – Microscopia eletrônica de transmissão  
Tg – Temperatura de transição vítrea  
UV - Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	27
1.1	OBJETIVOS	31
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivos gerais</b>	31
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	31
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	33
2.1	$\gamma$ -ORIZANOL	35
2.2	NANOTECNOLOGIA	44
<b>2.2.1</b>	<b>Carreadores nanoestruturados</b>	45
<b>2.2.2</b>	<b>Mecanismo de liberação de substâncias bioativas a partir de sistemas nanoparticulados</b>	46
<b>2.2.3</b>	<b>Nanopartículas</b>	47
2.2.3.1	Nanopartículas proteicas	49
2.3	ZEÍNA	50
<b>2.3.1</b>	<b>Nanopartículas de zeína</b>	52
<b>2.3.2</b>	<b>Métodos de preparo de nanopartículas de zeína</b>	53
<b>2.3.3</b>	<b>Estabilidade física de nanopartículas de zeína</b>	54
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	59
3.1	MATERIAL	61
3.1.1	Matérias-primas	61
3.1.2	Solventes e reagentes	61
3.1.3	Equipamentos	61
3.2	MÉTODOS	62
<b>3.2.1</b>	<b>Desenvolvimento das nanopartículas de zeína</b>	62
<b>3.2.2</b>	<b>Estudo da interação de diferentes polissacarídeos com as nanopartículas de zeína contendo <math>\gamma</math>-orizanol</b>	63
<b>3.2.3</b>	<b>Caracterização físico-química das nanopartículas de zeína</b>	63
3.2.3.1	Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das nanopartículas	63
3.2.3.2	Determinação do potencial zeta das nanopartículas	64
3.2.3.3	Avaliação morfológica das nanopartículas	65
3.2.3.4	Espectroscopia no infravermelho	65
3.2.3.5	Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C)	65
<b>3.2.4</b>	<b>Determinação do teor e eficiência de encapsulação do <math>\gamma</math>-orizanol</b>	66
3.2.4.1	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação do $\gamma$ -orizanol	66

3.2.4.2	Avaliação do teor e da eficiência de encapsulação (EE%) do $\gamma$ -orizanol nas nanopartículas de zeína	66
3.2.5	<b>Avaliação da estabilidade física acelerada das nanopartículas de zeína</b>	67
3.2.6	<b>Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do <math>\gamma</math>-orizanol a partir das nanopartículas de zeína</b>	68
3.2.7	<b>Atividade antioxidante</b>	70
3.2.8	<b>Análise estatística</b>	71
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	73
4.1	<b>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO <math>\gamma</math>-ORIZANOL</b>	75
4.1.1	<b>Avaliação do efeito da composição da fase aquosa sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de zeína</b>	75
4.1.2	<b>Estudo de interação de diferentes polissacarídeos com as nanopartículas de zeína contendo <math>\gamma</math> – orizanol</b>	77
4.1.2.1	Alginato de sódio	77
4.1.2.1.1	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188</i>	77
4.1.2.1.2	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188</i>	79
4.1.2.2	Goma arábica	81
4.1.2.2.1	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188</i>	81
4.1.2.2.2	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188</i>	83
4.1.2.3	Quitosana de alta massa molar (QAMM)	85
4.1.2.3.1	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188</i>	85
4.1.2.3.2	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188</i>	87
4.1.2.4	Quitosana de média massa molar (QMMM)	89
4.1.2.4.1	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188</i>	89
4.1.2.4.2	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188</i>	91
4.1.2.5	Quitosana de baixa massa molar (QBMM)	93
4.1.2.5.1	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188</i>	93

4.1.2.5.2	<i>Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188</i>	95
<b>4.1.3</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho</b>	97
4.1.3.1	Alginato de sódio	98
4.1.3.1.1	<i>Avaliação da interação com as nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188</i>	98
4.1.3.1.2	<i>Avaliação da interação com as nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188</i>	99
4.1.3.2	Goma Arábica	100
4.1.3.2.1	<i>Avaliação da interação com as nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188</i>	100
4.1.3.2.2	<i>Avaliação da interação com as nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188</i>	101
4.1.3.3	Quitosana	102
<b>4.1.4</b>	<b>Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS<math>\mu</math>C)</b>	103
4.1.4.1	Alginato de sódio	105
4.1.4.2	Goma arábica	106
4.1.4.3	Quitosana	107
4.1.4.3.1	<i>Quitosana de Alta Massa Molar</i>	107
4.1.4.3.2	<i>Quitosana de Média Massa Molar</i>	108
4.1.4.3.3	<i>Quitosana de Baixa Massa Molar</i>	109
<b>4.1.5</b>	<b>Avaliação morfológica das nanopartículas</b>	110
4.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO $\gamma$ -ORIZANOL	113
<b>4.2.2</b>	<b>Avaliação do teor e da eficiência de encapsulação (EE%) do <math>\gamma</math>-orizanol nas nanopartículas de zeína</b>	113
4.3	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA ACELERADA DAS NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA	115
4.4	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO $\gamma$ -ORIZANOL A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA	120
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	123
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	127
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	147
	<b>APÊNDICE</b>	152
<b>1</b>	<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO <math>\gamma</math>-ORIZANOL</b>	153
1.1	PERFIL CROMATOGRÁFICO	153

1.2	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	154
1.2.1	Especificidade	154
1.2.2	Linearidade e limites de quantificação e de detecção	155
1.3.3	Precisão	156
1.3.4	Exatidão	157
1.3.5	Robustez	158
1.4	CONCLUSÃO	158
	REFERÊNCIAS	161



---

## **1 INTRODUÇÃO**

---



Alimentos funcionais vêm ganhando importância no mercado, apresentando um grande número de produtos, sendo desenvolvidos com o propósito de promover a saúde do consumidor (MENRAD, 2001), e incluem: (1) alimentos que contenham substâncias bioativas de forma natural; (2) alimentos suplementados com substâncias bioativas; e (3) derivados de ingredientes alimentares introduzidos em alimentos *in natura* (GRAJEK; OLEJNIK; SIP, 2005).

Várias substâncias, e/ou micro-organismos, são utilizados a fim de agregar valor nutricional e terapêutico em alimentos, como os probióticos, polifenóis, chalconas, vitaminas, minerais, entre outros (KWAK; JUKES, 2010). Algumas alternativas incluem compostos ou extratos provenientes de plantas utilizados para o melhoramento das propriedades dos alimentos. Uma das propriedades mais estudadas destes compostos é sua atividade antioxidante. Além da importância dos antioxidantes como conservantes naturais, estes compostos/extratos podem também proporcionar propriedades funcionais ao alimento (CALEJA et al., 2015).

Dentre os compostos bioativos mais empregados para conferir propriedade funcional aos alimentos, destacam-se substâncias dentro das classes dos flavonoides, dos lipídeos (como os fitoesteróis), pigmentos como os carotenoides, vitaminas, proteínas, carboidratos e minerais (MCCLEMENTS, 2012). Os fitoesteróis vem sendo empregados devido a suas características antioxidantes, possibilitando o aumento da estabilidade do alimento frente ao estresse oxidativo. Podem atuar conferindo atividade antioxidante no organismo humano, e também apresentam ação hipocolesterolêmica, induzindo a redução dos níveis plasmáticos de colesterol e/ou reduzindo a absorção intestinal do colesterol. Estas características promovem um forte apelo ao desenvolvimento de produtos que favorecem a atividade protetora contra doenças coronarianas, câncer, distúrbios cerebrais, entre outras (CHEN et al., 2011; MARANGONI; POLI, 2010; WONG, 2014).

Entre os fitoesteróis, destaca-se o  $\gamma$ -orizanol, extraído a partir do farelo do arroz. Consiste em uma mistura de ésteres do ácido transferúlico com álcoois triterpênicos, que tem atraído a atenção das indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia devido às suas atividades hepatoprotetora (CHOTIMARKORN; USHIO, 2008), redutora do colesterol plasmático, redutora da biossíntese hepática do colesterol, redutora da absorção do colesterol, aos efeitos antiaterosclerótico (RONG; AUSMAN; NICOLosi, 1997), anti-inflamatório, antioxidante, e antialérgico (AKIHISA et al., 2000; NAGASAKA; CHOTIMARKORN; SHAFIQU, 2007; OKA et al.,

2010; YASUKAWA et al., 1998). Sendo assim, o emprego do  $\gamma$ -orizanol vem sendo fundamentado na potencial aplicação como: (1) antioxidante em alimentos, retardando a lipoperoxidação do produto; e (2) atuando como antioxidante no indivíduo (WINKLE-MOSER et al., 2015).

Porém, os fitoesteróis presentes no  $\gamma$ -orizanol apresentam baixa estabilidade frente à temperatura (KHUWIJTJARU; TAENGTIENG; CHANGPRASIT, 2004), e baixa solubilidade em meios aquosos (devido à presença de álcoois triterpênicos), o que, conseqüentemente, limita a absorção intestinal e a biodisponibilidade do  $\gamma$ -orizanol, dificultando, assim, seu uso em sistemas alimentares, principalmente aqueles com elevado teor de água (HAKALA et al., 2002; WINKLER-MOSER et al., 2015). Concomitantemente, a adição de ingredientes funcionais a produtos alimentares frequentemente implica em problemas de formulação, tais como alterações sensoriais, problemas de estabilidade do produto, de aparência do alimento, possível redução da biodisponibilidade de alguns nutrientes, além da provável ocorrência de interações entre o composto adicionado com a complexa matriz do alimento (PATEL; VELIKOV, 2011).

Uma das principais estratégias para otimizar o uso do  $\gamma$ -orizanol é através da sua encapsulação em sistemas de liberação nano- ou microparticulados. As nanopartículas são sistemas capazes de proteger compostos frente à degradação química ou física, bem como possibilitar o aumento da capacidade de dispersão em água de moléculas lipofílicas e proporcionar a liberação localizada e de forma controlada desta substância, proporcionando um aumento na biodisponibilidade do fitoesterol (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2013).

Nanopartículas proteicas têm sido bastante estudadas para aplicação na indústria alimentícia, sendo preparadas a partir de materiais biocompatíveis, biodegradáveis, de grau alimentício e através de processos facilmente escalonáveis (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). A zeína é a principal proteína de armazenamento do milho, consiste de quatro grupos fundamentais:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, e  $\delta$ -zeína, sendo considerada uma importante matriz para encapsulação de moléculas lipofílicas, pois mais da metade dos seus resíduos de aminoácidos são apolares, configurando uma natureza hidrofóbica à proteína (HU; MCCLEMENTS, 2014). Devido a esta característica e reduzida carga (próxima ao ponto isoelétrico), as nanopartículas de zeína estão sujeitas a fortes interações hidrofóbicas e fraca repulsão elétrica, culminando na agregação das partículas e na redução da estabilidade física do sistema (HU; MCCLEMENTS, 2014; ZHANG et al., 2014). Tal condição, no

entanto, pode ser evitada mediante a estabilização das partículas de zeína através de eletrodeposição de polissacarídeos na superfície da proteína, promovendo impedimento eletrostático e estérico, otimizando a estabilidade física do sistema (LUO; TENG; WANG, 2012; ZHANG et al., 2014).

Sendo assim, este projeto busca o desenvolvimento de nanopartículas de zeína para liberação de  $\gamma$ -orizanól visando o aumento das estabilidade física das nanopartículas proteicas em solução através da estabilização com Kolliphor P188 e/ou polissacarídeos (alginato de sódio, goma arábica e quitosana de baixa, média e alta massa molar), bem como promover o aumento da capacidade de incorporação do fitoesterol  $\gamma$ -orizanól em meio aquoso, determinar o mecanismo de liberação do  $\gamma$ -orizanól a partir das nanopartículas de zeína, e conferir propriedades antioxidantes ao alimento, quer seja elevando sua estabilidade frente a agentes oxidantes, ou proporcionando ação antioxidante ao organismo humano.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas de zeína, contendo  $\gamma$ -orizanól, pela técnica de anti-solvente e caracterizá-las quanto à estabilidade e potencial antioxidante.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nanopartículas de zeína contendo  $\gamma$ -orizanól pela técnica do anti-solvente;
- Avaliar o potencial estabilizante de tensoativo Kolliphor P188 e de diferentes polissacarídeos sobre as nanopartículas de zeína;
- Caracterizar as nanopartículas de zeína contendo  $\gamma$ -orizanól quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão, características morfológicas, eficiência de encapsulação e teor de  $\gamma$ -orizanól;
- Avaliar possíveis interações químicas e/ou físicas entre as nanopartículas de zeína e os polissacarídeos;
- Avaliar a estabilidade física das nanopartículas através de método acelerado;

- Avaliar o perfil de liberação do  $\gamma$ -orizanol através das nanopartículas e determinação do mecanismo de liberação dos fitoesteróis;
- Avaliar a atividade antioxidante do  $\gamma$ -orizanol contido nas nanopartículas de zeína pelo método do DPPH.

---

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---





## 2.1 $\gamma$ -ORIZANOL

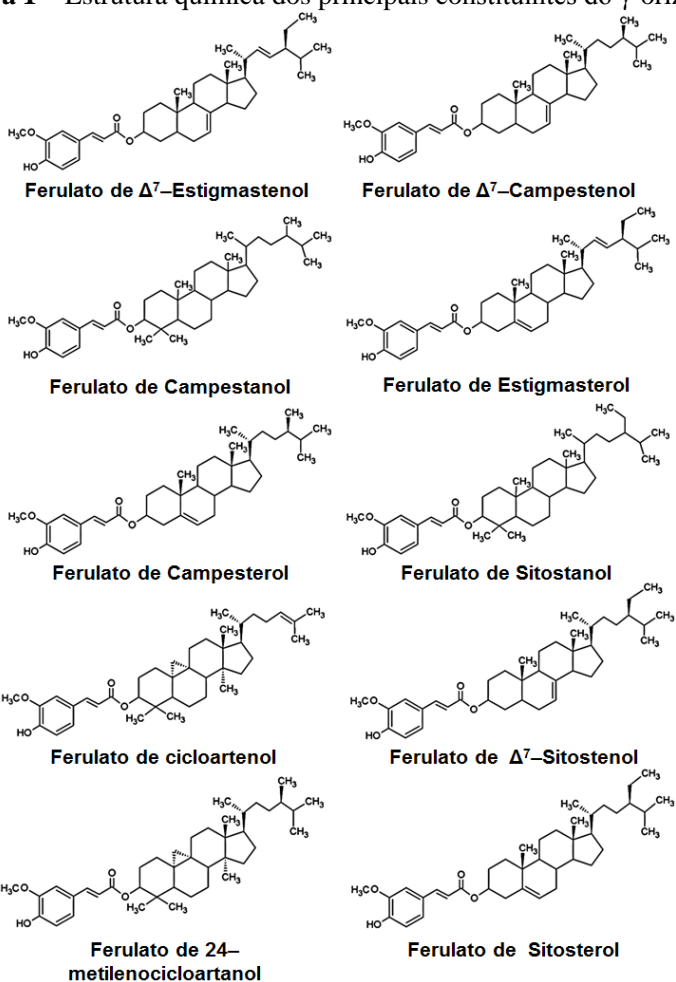
O  $\gamma$ -orizanol é um fitoesterol, composto por uma mistura de pelo menos 10 diferentes ésteres do ácido trans-ferúlico (ácido trans-hidroxicinâmico) com álcoois triterpênicos, sendo majoritariamente constituído por ferulato de cicloartenol, ferulato de 24-metilenocicloartenol, e ferulato campesterol, e menores concentrações de ferulato de  $\Delta^7$ -estigmastenol, ferulato de estigmasterol, ferulato de  $\Delta^7$ -campestenol, ferulato de  $\Delta^7$ -sitostenol, ferulato de sitosterol, ferulato de campestanol, e ferulato de sitostanol (Figura 1) (XU; GODBER, 1999). A principal diferença entre os ésteres do ácido ferúlico com esteroides encontrados no arroz e em outros cereais é a predominância de porções dimetilesteróis, como o ferulato de cicloartenol e o 24-metilenocicloartenol, no farelo do arroz, enquanto porções de dimetilesteróis, como o sitosterol, campesterol, e suas respectivas formas saturadas, são os fitoesteróis majoritários em outras fontes naturais como o milho, o trigo e a aveia (NYSTRÖM et al., 2007).

Os fitoesteróis são sintetizados a partir do esqualeno, via 2,3-epóxido de esqualeno. Após ciclização do 2,3-epóxido de esqualeno, o cicloartenol é o primeiro fitoesterol produzido na via metabólica (Figura 2). O 24-metilenocicloartenol e o campesterol podem ser considerados intermediários na biossíntese do campestanol a partir do cicloartenol.

Miller e Engel (2006) observaram que, quanto maior a proporção de ferulato de 24-metilenocicloartenol e ferulato de campesterol, menor a proporção dos ésteres ferúlicos de cicloartenol (antecessor na biossíntese) e campestanol (sucessor na biossíntese). No entanto, a biossíntese dos ésteres ferúlicos de fitoesteróis é pouco conhecida, e pode estar relacionada à razão de esteróis livres disponíveis para a síntese de ésteres ferúlicos, ou podem ser independentes da concentração de esteróis, mas regulada por esterificação substrato-específico. Quanto à variação do teor de  $\gamma$ -orizanol frente ao estágio de maturação do grão do arroz, e diferentes cultivares, os autores observaram que existe um aumento significativo no teor de  $\gamma$ -orizanol em grão maduros quando comparados com os grãos imaturos do mesmo cultivar, porém, sem alteração do perfil dos fitoesteróis. No entanto, não houve diferença estatística no teor de  $\gamma$ -orizanol quando comparados a grãos de diferentes cultivares e de mesma maturação, e o perfil de fitoesteróis (composição do  $\gamma$ -orizanol) é alterado em função do cultivar. Estes resultados indicam que o grau de maturidade não influenciou a composição do  $\gamma$ -orizanol, e que esta foi afetada, no trabalho citado, por

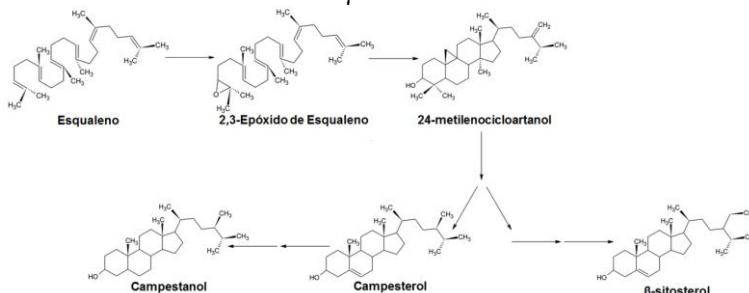
fatores, provavelmente, decorrentes das condições genéticas, de cultura, e/ou plantio do arroz.

**Figura 1** – Estrutura química dos principais constituintes do  $\gamma$ -orizanol.



Fonte: Adaptado de Xu; Godber (1999).

**Figura 2** – Rota parcial da biossíntese dos principais esteróis contidos no  $\gamma$ -orizanol



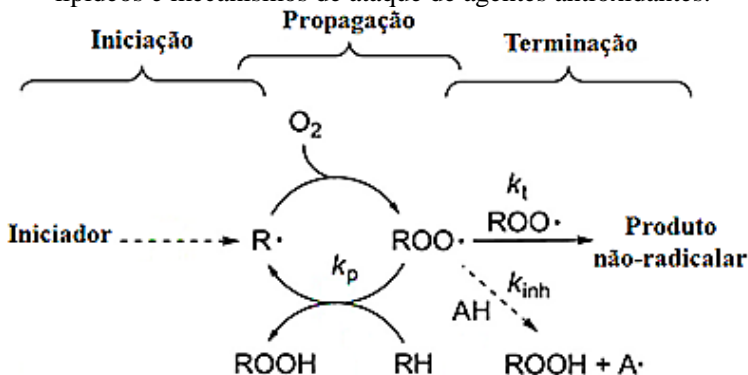
Fonte: Adaptado de Miller e Engel (2007).

Heinemann e colaboradores (2008) também evidenciaram que existe uma diferença significativa entre os teores de  $\gamma$ -orizanol entre diferentes cultivares das subespécies *Oryza sativa indica* e *Oryza sativa japonica*, sendo ainda o teor de fitoesteróis mais elevado na segunda subespécie. Britz e colaboradores (2007) avaliaram o teor e composição do  $\gamma$ -orizanol de *Oryza sativa indica*, *Oryza sativa japonica*, e *Oryza glaberrima* originárias de diferentes partes do mundo, em função da temperatura de plantio, e observaram que um aumento em 4,5 °C na temperatura de cultivo resultou em uma grande aumento do ferulato de 24-metilencicloartanol em cinco das seis linhagens estudadas, e em quatro destas cinco houve ainda um pequeno aumento no teor de ferulato de cicloartanol, além de elevar o teor de ferulato estigmastenol e/ou estigmasterol no arroz Arborio, e elevar o teor de ferulato de sitosterol e ferulato de campestanol no arroz Kaybonnet. Sendo assim, verificou-se, na pesquisa mencionada, que fatores como diferentes cultivares, temperatura, subespécies, e tempo de maturação do grão do arroz tendem a alterar o teor e a composição do  $\gamma$ -orizanol, e estas alterações podem ocasionar variação nas suas propriedades funcionais.

O  $\gamma$ -orizanol vem recebendo maior atenção das indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética devido a seus benefícios para a saúde, como: ação hepatoprotetora (CHOTIMARKORN; USHIO, 2008), redução do colesterol plasmático, redução da biossíntese hepática do colesterol, redução da absorção do colesterol, efeito antiaterosclerótico (RONG; AUSMAN; NICOLSI, 1997), efeito anti-inflamatório, antioxidante, e antialérgico (AKIHISA et al., 2000; NAGASAKA; CHOTIMARKORN; SHAFIQL, 2007; OKA et al., 2010; YASUKAWA et al., 1998).

Sabe-se que o processo oxidativo se inicia com a formação de espécies radiculares que, independentemente de sua origem ou estrutura, podem interagir com um substrato (RH), como os lipídeos, formando um radical alquilíco  $R^\bullet$  devido à subtração do próton  $H^+$  do substrato. O radical formado pode, sequencialmente, interagir com o oxigênio, dando origem ao radical peroxila ( $ROO^\bullet$ ), que, por sua vez, devido à reação em cadeia, atua como espécie radicalar e interage com uma nova molécula de substrato, formando o hidroperóxido ROOH, e um novo radical  $R'^\bullet$  (Figura 3). Esta reação ocorre de forma cíclica, até que duas espécies radiculares interajam entre si, formando a etapa de terminação (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001). Substâncias que apresentam propriedade de emparelhamento de elétrons para estabilização das espécies reativas radiculares são conhecidas como antioxidantes diretos. Estes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação como primários e secundários. Os antioxidantes primários são moléculas que inibem ou retardam o processo oxidativo através da doação de átomos de hidrogênio ou elétrons, promovendo a estabilidade química das espécies reativas de oxigênio (EROS), interrompendo as reações de cadeia do processo oxidativo. Podem atuar estabilizando os radical alquilínicos ( $R^\bullet$ ) e peroxila ( $ROO^\bullet$ ) dos estágios de iniciação e propagação, respectivamente. Entre os antioxidantes primários, destacam-se os compostos fenólicos e polifenóis, como o ácido ferúlico, que doam átomos de hidrogênio para estabilizar a EROS e consistem na principal classe de antioxidantes utilizados pelas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Já os antioxidantes secundários englobam moléculas que atuam por diferentes mecanismos, incluindo quelantes de metais, ligação ao oxigênio, conversão de peróxidos em espécies não-radicalares, absorvedores de radiação UV, ou desativadores de oxigênio singlete, retardando a reação de auto-oxidação (GORDON, 1990; GUNSTONE, 2004; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

**Figura 3** – Representação esquemática do processo oxidativo de lipídeos e mecanismos de ataque de agentes antioxidantes.



Fonte: Adaptado de Amorati, Foti e Valgimigli (2013).

Islam e colaboradores (2009) demonstraram, através de estudos *in vitro*, que ferulato de cicloartenol, ferulato de 24-metilenocicloartenol, ferulato de sitosterol, e ácido ferúlico apresentaram forte atividade doadora de hidrogênio, e atividade antioxidante comparável ao  $\alpha$ -tocoferol. No entanto, a porção esteroidal cicloartenol, quando isolada, não apresentou atividade antioxidante ou efeito sequestrante de radicais livres, sugerindo que o potencial antioxidante destes compostos está relacionado com a porção ferúlica das moléculas. Entretanto, a porção cicloartenol inibiu significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio em modelo celular, sugerindo que devido à similaridade estrutural ao colesterol, a porção cicloartenol pode atuar estabilizando a bicamada lipídica celular, possibilitando a redução do dano oxidativo, e induzindo o aumento do potencial sequestrador de radicais livres. Por fim, os autores relatam que ferulato de cicloartenol, ferulato de 24-metilenocicloartenol, ferulato de sitosterol, assim como a porção esteroidal cicloartenol isolada, inibiram significativamente a atividade do fator nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) em modelo celular *in vitro*. O NF- $\kappa\beta$  é um regulador da expressão de genes pró-inflamatórios e induz a transcrição de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, matriz metaloprotease (MMPs), ciclooxigenase 2 (COX-2), além de apresentar atividade indutora da óxido nítrico sintetase (iNOS). NF $\kappa$ B é ativado em tecidos inflamados, além de regular as respostas da imunidade inata e adquirida (LI; VERMA, 2002), sustentando a hipótese de atividade anti-inflamatória e antioxidante do  $\gamma$ -orizanol.

Em concordância com os resultados de atividade antioxidante do  $\gamma$ -orizanol, anteriormente descritos, Nagasaka e colaboradores (2007) indicaram que o  $\gamma$ -orizanol, assim como o ferulato de cicloartenol, suprimem a expressão da iNOS, COX-2, e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), onde a produção de óxido nítrico foi inibida pelo ferulato de cicloartenol, e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) aumentada. O aumento da atividade da SOD eleva a dismutação do superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), atuando como importante defesa antioxidante. O mecanismo antioxidante do  $\gamma$ -orizanol parece estar relacionado à doação de um átomo de hidrogênio da porção ferúlica, levando à formação do radical fenoxila, de forma semelhante aos antioxidantes fenólicos, estabilizando o ânion superóxido (KIM et al., 2001; TAJIMA et al., 1983).

Oka e colaboradores (2010) demonstraram que o ferulato de cicloartenol atua capturando imunoglobulina E (IgE), impedindo que esta se ligue ao receptor Fc $\epsilon$ RI. A IgE, um anticorpo amplamente expresso em doenças alérgicas e infecções parasitárias, uma vez ligada ao receptor Fc $\epsilon$ RI (receptor de alta afinidade por IgE), ativa a degranulação de mastócitos ou basófilos, ocasionando a liberação de mediadores inflamatórios como a histamina, leucotrieno, proteases, fatores quimiotáticos e citocinas. Uma vez que o ferulato de cicloartenol sequestra a IgE, existe uma inibição da ativação do receptor específico, o que resulta na atenuação de reações alérgicas por redução dos mediadores inflamatórios. Concomitantemente, este tende a inibir a atividade do NF- $\kappa$ B (NAGASAKA et al., 2007), indicando a possível prevenção da fase tardia da inflamação.

Estudos vêm sendo conduzidos a fim de estabelecer uma relação entre o consumo de  $\gamma$ -orizanol e níveis plasmáticos de colesterol. Wilson e colaboradores (2007) avaliaram que a adição de 0,5 % de  $\gamma$ -orizanol, ou de 0,5 % de ácido ferúlico à dieta de hamsters hipercolesterolêmicos provocou uma redução no teor de colesterol plasmático total e do colesterol não-HDL, sendo o efeito do  $\gamma$ -orizanol mais pronunciado. Outros estudos observaram uma redução significativa no colesterol não-HDL plasmático em ratos com suplementação de 0,2 % ou mais de  $\gamma$ -orizanol na dieta após 7 semanas de tratamento, e que em ratos saudáveis não houve alteração do teor lipídico no plasma, sugerindo que o  $\gamma$ -orizanol pode afetar o metabolismo do colesterol através da alteração da absorção do colesterol da dieta (SEETHARAMAIAH; CHANDRASEKHARA, 1988 *apud* WILSON et al., 2007). Wilson e colaboradores (2007) descrevem um aumento da excreção fecal de coprostanol e colesterol em hamsters cuja dieta foi complementada com

0,5 % de  $\gamma$ -orizanol, indicando que a redução do colesterol sérico está relacionada ao aumento da excreção fecal do colesterol e de seus produtos metabólicos (por exemplo, coprostanol). Adicionalmente, este estudo ainda demonstrou que a complementação dietética com  $\gamma$ -orizanol, ou com ácido ferúlico, reduziu o acúmulo de colesterol na artéria aorta dos hamsters, no entanto somente a adição de  $\gamma$ -orizanol à dieta foi capaz de reduzir significativamente o depósito de ésteres de colesterol. Rong, Ausman e Nicolosi (1997) demonstraram que a adição de 0,5 % de  $\gamma$ -orizanol à dieta de hamsters foi capaz de reduzir em 67 % a aterosclerose, indicando que a redução da camada lipídica na artéria aorta ocorre devido à redução do colesterol sérico, associado à atividade antioxidante, que impede a formação dos ateromas responsáveis por obstruir os vasos sanguíneos.

No entanto, Weststrate e Meijer (1998) não observaram diferença estatística no perfil colesterolêmico entre humanos, saudáveis ou levemente hipercolesterolêmicos, que consumiram margarina comercial, e margarina enriquecida com óleo de farelo de arroz por um período de 3,5 semanas. Os autores indicam que por razões técnicas não foi possível enriquecer a margarina com óleo de farelo de arroz nas mesmas concentrações que aquelas enriquecidas com óleo de soja, cuja atividade hipocolesterolêmica foi evidenciada. Sendo assim, a falta de atividade pode estar relacionada à concentração de  $\gamma$ -orizanol administrado, e os autores indicam a importância de se realizar mais estudos a fim de comprovar se o  $\gamma$ -orizanol apresenta eficácia terapêutica em humanos, ou se sua atividade se restringe a estudos *in vivo*.

Chotimarkorn e Ushio (2008) demonstraram, através de um modelo de lesão hepática por ingestão de etanol em camundongos, que o  $\gamma$ -orizanol apresenta atividade hepatoprotetora, atenuando o aumento da atividade das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) induzidas pelo etanol. Este estudo ainda evidencia a redução proeminente da lipoperoxidação hepática, ocorrida devido à atividade antioxidante exercida pelo  $\gamma$ -orizanol. Foi observado ainda um aumento significativo no teor de glutatona hepática (GSH), peptídeo que desempenha importante papel não enzimático no sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROS), mantendo adequadamente a viabilidade dos hepatócitos, prevenindo lesão hepática. O efeito hepatoprotetor do  $\gamma$ -orizanol ainda pode ser explicado pelo aumento da atividade da SOD hepática, que aprimora a resposta antioxidante no fígado.

Paralelamente, estudos vêm sendo realizados empregando o  $\gamma$ -orizanol como agente antioxidante de lipídeos presentes em matrizes alimentares. Antioxidantes fenólicos, como o  $\gamma$ -orizanol, geralmente

inibem a lipoperoxidação mediante doação de um átomo de hidrogênio ao radical peroxila, formando peróxido de hidrogênio, impedindo a reação do radical na produção do radical lipídico e propagação da cadeia de radicais livres. Neste sentido, Kim e colaboradores (2001) demonstraram que a adição de  $\gamma$ -orizanol preveniu a oxidação do colesterol, em solução aquosa. Juliano e colaboradores (2005) também demonstraram a atividade antioxidante do  $\gamma$ -orizanol frente a aquecimento e também à exposição de diferentes óleos ao oxigênio, e verificou-se que o fitoesterol apresentou potencial antioxidante, semelhante ao BHA e BHT, nos óleos de amêndoa, gergelim, trigo, uva, amendoim, abacate, e rosa mosqueta (uma mistura de 41 % de ácido linoleico e 39 % de ácido linolênico). Estes autores indicam que a adição destes fitoesteróis pode aumentar o valor nutricional, atuando como ingredientes funcionais, assim como inibir a lipoperoxidação, aumentando a estabilidade de alimentos enriquecidos com  $\gamma$ -orizanol (JULIANO et al., 2005; KIM et al., 2001).

No entanto, para que haja atividade funcional, a estabilidade do  $\gamma$ -orizanol, frente às severas condições durante os processos de preparo dos alimentos, deve ser garantida. Khuwijitjaru, Taengtieng e Changprasit (2004), demonstraram um decréscimo na concentração de  $\gamma$ -orizanol com o aumento do tempo de aquecimento, nas temperaturas de 120, 150 e 200 °C, do óleo do farelo de arroz. Os autores sugerem que o principal mecanismo de degradação do  $\gamma$ -orizanol seja a oxidação por indução térmica, e demonstram que o aumento da temperatura reduz o tempo de meia vida dos fitoesteróis. Por outro lado, Shopova e Milkova (2000) demonstraram que a esterificação do ácido ferúlico, que apresenta temperatura de degradação entre 125 e 230 °C, com esteroides promove maior estabilidade térmica ao composto que passa a apresentar degradação térmica entre 245 e 415 °C, indicando que ésteres do ácido ferúlico poderiam ser utilizados como antioxidantes em alimentos onde se empregam processos de alta temperatura. A divergência entre os dados obtidos pelos autores pode estar relacionada ao método de detecção utilizado, enquanto Khuwijitjaru, Taengtieng e Changprasit (2004) utilizaram espectroscopia de absorção no ultravioleta, Shopova e Milkova (2000) utilizaram termogravimetria para análise da degradação térmica do  $\gamma$ -orizanol. Sendo assim, modificações químicas que não conferem perda de massa podem ocorrer em temperaturas mais brandas, podendo alterar as propriedades funcionais do fitoesterol.

Winkle-Moser e colaboradores (2015) avaliaram o potencial antioxidante de diferentes ésteres do ácido ferúlico com esteroides frente ao processo de fritura utilizando óleo de soja a 180 °C. O óleo



empregado na fritura foi enriquecido com 8,85  $\mu\text{mol}$  de ésteres/g de óleo, para todos os ésteres testados, e a atividade antioxidante foi correlacionada com a estrutura dos ésteres obtidos sinteticamente. Os resultados indicaram que os ésteres que continham esteroides saturados (como o ferulato de colestanol) apresentaram perfil antioxidante mais potente que aqueles insaturados, com dupla ligação no carbono 5 (como o ferulato de estigmasterol e o ferulato de campesterol), e ambos grupos apresentaram atividade superior aqueles esteroides que apresentam grupos 4,4'-dimetil, e grupo ciclopropano entre os carbonos 9 e 19 (como o ferulato de campestanol e o ferulato de sitostanol; e o ferulato de cicloartenol e o ferulato de 24-metilenocicloartenol, respectivamente). O grupo 9,19-ciclopropano parece possuir maior impacto no potencial antioxidante durante a fritura. Sendo assim, observa-se que os fitoesteróis mais abundantes no  $\gamma$ -orizanol apresentam baixa atividade antioxidante em processo de fritura. Fatores relacionados à estabilidade térmica e oxidativa dos fitoesteróis desempenham uma papel importante no potencial antioxidante, porém parecem não ser os únicos fatores envolvidos neste processo, podendo estar mais diretamente relacionado com as propriedades químicas do grupo esteroide (WINKLE-MOSER et al., 2015).

Além disso, a hidrofobicidade conferida pelo grupamento esteroide, e o aumento da massa molar (em relação ao ácido ferúlico) permitem que os ésteres ferúlicos dos esteróis sejam solúveis em óleo, tornando-os excelentes candidatos como antioxidantes em alimentos ricos em material graxo. No entanto, a baixa solubilidade em água do  $\gamma$ -orizanol tende a dificultar seu uso em sistemas alimentares, e conseqüentemente reduzir sua absorção intestinal e biodisponibilidade (HAKALA et al., 2002; WINKLER-MOSER et al., 2015). Kim e colaboradores (2010) avaliaram a biodisponibilidade de uma única dose de 20 mg/Kg de  $\gamma$ -orizanol, via oral, em ratos, e observaram que a concentração plasmática é elevada rapidamente e alcança concentração máxima 4 horas após ingestão dos fitoesteróis, seguido de rápida eliminação. Isto indica que o  $\gamma$ -orizanol é rapidamente absorvido no intestino dos animais, provavelmente por um mecanismo de difusão passiva devido ao alto coeficiente de partição óleo/água. Fujima e colaboradores (1983) avaliaram farmacocineticamente o  $\gamma$ -orizanol radiomarcado ( $^{14}\text{C}$ - $\gamma$ -orizanol) administrado em forma de emulsão por via oral, e observaram que após 50 minutos da administração, somente 0,2 % da dose administrada foi absorvida para a corrente sanguínea, sugerindo que o  $\gamma$ -orizanol seja pouco absorvido no intestino, provavelmente devido ao caráter hidrofóbico dos fitoesteróis. As

concentrações de  $\gamma$ -orizanol e ácido ferúlico absorvidos foram aumentadas com o tempo, e cerca de 10 a 20 % do  $\gamma$ -orizanol administrado foi metabolizado no tecido intestinal, produzindo ácido ferúlico. Sendo que a porção remanescente foi absorvida, em parte, pela veia porta. Neste estudo cerca de 9,2 % do  $\gamma$ -orizanol foi eliminado na urina dos ratos, enquanto que 78,4 % foi eliminado nas fezes durante as primeiras 24 horas. O baixo tempo de meia vida destes fitoesteróis parece estar relacionado ao rápido metabolismo, e estas características farmacocinéticas tendem a reduzir a eficácia terapêutica, sendo desejável assumir estratégias que aumentem a absorção, o tempo de circulação na corrente sanguínea e, conseqüentemente elevar o potencial terapêutico e atividade funcional do  $\gamma$ -orizanol.

Conseqüentemente, estratégias que visam aumentar a capacidade de incorporação de  $\gamma$ -orizanol em sistemas aquosos, aumentar sua estabilidade frente às condições químicas e físicas, além de modular a biodisponibilidade dos fitoesteróis, são de extrema importância para a indústria de alimentos. Um dos métodos mais empregados na literatura, e que possui aplicabilidade para a indústria, é a vetorização de compostos bioativos em micro- ou nanopartículas (KIM et al., 2001; LEE; KIM; LEE, 2009).

## 2.2 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a ciência que estuda a aplicação, produção e processamento de materiais que possuam tamanho inferior a 1000 nm. O desenvolvimento destes novos materiais, mais especificamente voltados à área dos alimentos, pode envolver operações unitárias como aquecimento, agitação, secagem e congelamento, bem como, possivelmente, alterações de formulação, como pH, força iônica, adição de surfactantes, e adição de açúcares, para o delineamento, transformação e criação de diferentes texturas e propriedades em alimentos de variadas composições (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006). Esta tecnologia vem demonstrando potencial aplicação em alimentos funcionais e nutracêuticos para a liberação de compostos bioativos afim de aprimorar os benefícios à saúde promovidos pelo alimento (CHAU; WU; YEN, 2007), sobretudo devido à capacidade de: (1) proteger ingredientes ativos da degradação química ou física, reduzindo sua exposição às condições em que este apresenta sensibilidade; (2) aprimorar a dispersão em água de ingredientes ativos hidrofóbicos; (3) proporcionar liberação controlada de ingredientes bioativos, ou nutracêuticos, em função de um tempo específico ou de

condições ambientais específicas; (4) melhorar a biodisponibilidade oral de nutracêuticos, aumentando a fração absorvida no intestino, bem como retardando o processo de metabolismo hepático e conjugação à proteínas plasmáticas; (5) mascarar características sensoriais indesejáveis; e (6) separar dois ou mais compostos que possam apresentar interação, caracterizando uma melhora da estabilidade física e/ou química do alimento (DAVIDOV-PARDO; JOYE; MCCLEMENTS, 2015).

Logo, a nanotecnologia vem sendo aplicada em diversas áreas da ciência dos alimentos, entre as quais destacam-se: processos de purificação de água, ruptura de parede celular, liberação prolongada de nutracêuticos, microencapsulação de compostos ativos, eliminação de odores indesejáveis, processos desinfetantes, uso de compostos com atividade antimicrobiana e antifúngica, e aumento do tempo de prateleira dos produtos. Estas aplicações podem ser divididas em sub-áreas como; processos em alimentos, liberação de nutracêuticos, embalagens, e segurança em alimentos (CHAU; WU; YEN, 2007).

### **2.2.1 Carreadores nanoestruturados**

Com a finalidade de assegurar a eficácia da atividade desejada, diferentes nanoestruturas vêm sendo empregadas na ciência dos alimentos, como: (1) lipossomas, que compreendem vesículas coloidais compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, com compartimentos intermitentes de água ou solução tampão, sendo capazes de veicular substâncias bioativas hidrofóbicas associadas à bicamada lipídica, e substâncias bioativas hidrofílicas no interior da vesícula recoberto pela fase aquosa. Os principais materiais utilizados no preparo dos lipossomas são sais biliares, colesterol, e outros fosfolipídeos; (2) micro- ou nanoemulsões, ao contrário das nanoemulsões, que são dispersões termodinamicamente instáveis compostas de uma mistura de dois líquidos imiscíveis utilizando moléculas de surfactante para estabilizar o sistema nanométrico, as microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis que possuem configuração semelhante, e normalmente uma maior concentração de surfactante, o que confere um diâmetro de gotícula mais reduzido que aquele encontrado nas nanoemulsões formando um sistema translúcido, ao passo que as nanoemulsões apresentam maior opalescência. Normalmente são preparadas a partir de óleos estabilizados por polímeros anfífilos e/ou fosfolipídios; (3) as micelas são definidas como associações coloidais de moléculas anfífilas, que ocorre a partir de uma concentração definida, chamada de concentração micelar crítica

(CMC). Em meios polares, como a água, a porção hidrofóbica tende a se localizar no interior da estrutura, enquanto a porção hidrofílica se dispõe na interface da molécula com o solvente, estas podem apresentar diferentes formas, e serem preparadas com base em fosfolípídeos, sais biliares, colesterol, caseína, entre outros; e principalmente (4) nanopartículas, que compreendem sistemas carreadores, que possuem diâmetro na escala nanométrica, preparados com diferentes materiais, como lipídeos, polímeros (sintéticos ou naturais) e minerais. Estas partículas, normalmente, possuem sua matriz circundada por surfactantes que estabilizam a partícula em suspensão (AUGUSTIN; OLIVER, 2012; AUGUSTIN; SANGUANSRI, 2009; CHAU; WU; YEN, 2007; MCCLEMENTS, 2012; PATEL; VELIKOV, 2011).

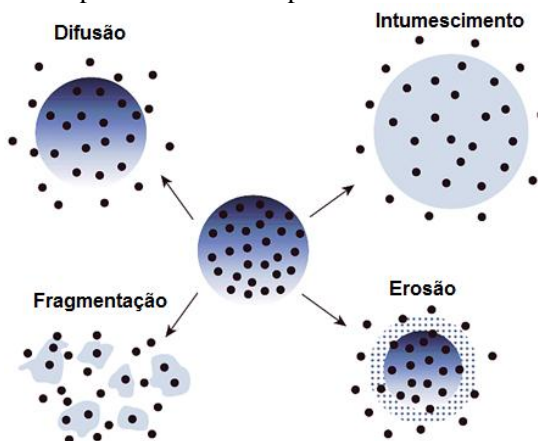
### **2.2.2 Mecanismo de liberação de substâncias bioativas a partir de sistemas nanoparticulados**

O desenvolvimeto de sistemas de liberação têm sido objeto de investigação nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, visando condicionar a velocidade e o local de liberação de moléculas bioativas. Estes sistemas podem apresentar estruturas, e composições variadas, conferindo propriedades distintas no que se refere ao perfil de liberação das substâncias encapsuladas (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Os compostos bioativos podem ser liberados a partir da matriz por quatro principais mecanismos físico-químicos, como: (1) a difusão, ou mecanismo Fickiano, onde a molécula pode permear através da matriz, até o fluido de liberação, unicamente devido a difusão, sendo dependente exclusivamente de suas características físicas, como tamanho, forma, estrutura, coeficiente de difusão através dos componentes da matriz, e do gradiente de concentração entre o interior da partícula e o meio circundante; (2) mecanismo de fragmentação, caracterizado pela liberação do composto bioativo quando a matriz é fisicamente rompida, seja por fratura mecânica ou força de cisalhamento. A razão de liberação, neste caso, é dependente das propriedades de fratura da partícula, assim como o tamanho e forma dos fragmentos formados. Uma vez que o carreador é fragmentado, o composto bioativo difunde através da matriz, sendo este processo acelerado em fragmentos menores, devido à maior área de superfície; (3) mecanismo de erosão, quando a liberação do composto bioativo ocorre em função da erosão da camada externa da matriz. A erosão pode ocorrer por degradação física, química, ou enzimática da matriz, e a

liberação será dependente da velocidade de erosão, assim como a magnitude e a duração do fator responsável pela erosão (força de cisalhamento, força do ácido ou base, tipo da enzima, e concentração do agente promotor da erosão); e (4) mecanismo mediado pelo intumescimento, que corresponde à liberação do composto bioativo devido à absorção de solvente e intumescimento da matriz carreadora, permitindo a liberação do composto bioativo por difusão devido à alteração da permeabilidade da matriz e à formação de uma matriz mais fracamente compactada (Figura 4) (MCCLEMENTS, 2012).

**Figura 4** – Representação esquemática dos mecanismos de liberação de compostos bioativos a partir de biomateriais



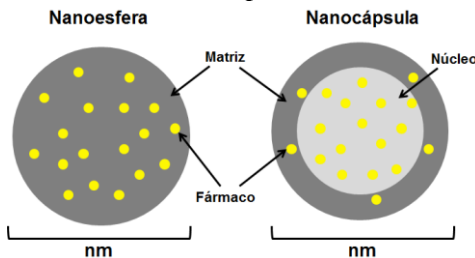
Fonte: Adaptado de McClements (2012).

### 2.2.3 Nanopartículas

As nanopartículas são sistemas coloidais com tamanho entre 10 e 1000 nm, onde o composto bioativo pode estar dissolvido, adsorvido, encapsulado ou disperso, e podem ser classificadas, de acordo com sua estrutura, em: nanoesferas e nanocápsulas. As nanocápsulas são sistemas vesiculares, onde o composto bioativo se encontra no interior de uma cavidade aquosa ou oleosa, circundada por uma membrana matricial onde o fármaco pode estar disperso e/ou adsorvido, enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais, maciços, onde o fármaco se encontra fisicamente disperso e/ou adsorvido (Figura 5) (BAZYLIŃSKA et al., 2014).

As nanopartículas devem ser preparadas com materiais biodegradáveis e biocompatíveis e, quando utilizadas pela indústria alimentícia, devem ainda ser preparadas com materiais de grau alimentício, destacando-se os lipídeos, surfactantes, minerais, e polímeros sintéticos ou naturais, como proteínas e carboidratos (JOYE; MCCLEMENTS, 2014; MCCLEMENTS, 2012). Estes materiais podem ser utilizados para encapsular, proteger, e liberar compostos bioativos como nutracêuticos, corantes, flavorizantes, conservantes, vitaminas, probióticos, minerais, entre outros (MCCLEMENTS, 2015).

**Figura 5** – Representação esquemática das nanoesferas e das nanocápsulas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez que as nanopartículas apresentam a capacidade de otimizar propriedades físico-químicas de nutracêuticos, estudos vêm sendo realizados sobre o efeito da encapsulação do  $\gamma$ -orizanol para contornar problemas referentes à instabilidade térmica, solubilidade, e consequentemente biodisponibilidade dos fitoesteróis. Suh, Yoo e Lee (2007) prepararam micropartículas de ágar e amido ceroso do milho contendo  $\gamma$ -orizanol e avaliaram o efeito da microencapsulação sobre estabilidade térmica dos fitoesteróis frente ao aquecimento a 180 °C em banha suína. Os autores observaram que após 7 dias, o teor de  $\gamma$ -orizanol encontrado na banha suína foi muito maior quando o material microencapsulado foi empregado, possivelmente devido a um efeito barreira produzido pela matriz polimérica, protegendo o  $\gamma$ -orizanol da oxidação induzida pelo tratamento térmico.

Kim e colaboradores (2010) avaliaram, ainda, o efeito de micropartículas de pectina recobertas com quitosana sobre a biodisponibilidade do  $\gamma$ -orizanol, e observaram que os fitoesteróis apresentam uma maior concentração plasmática máxima quando comparado com o  $\gamma$ -orizanol livre, indicando que as micropartículas tendem a aumentar sua absorção intestinal, e que o tempo para atingir a

concentração máxima foi elevado de 4 h ( $\gamma$ -orizanol livre) para 6 h ( $\gamma$ -orizanol microencapsulado). Este evento ocorre, provavelmente, devido ao efeito da matriz carreadora em liberar de forma controlada o  $\gamma$ -orizanol. Ainda foi relatado que a concentração do  $\gamma$ -orizanol plasmático é reduzida gradativamente após 12 e 24 h da administração, ao contrário do  $\gamma$ -orizanol livre que é rapidamente metabolizado/eliminado da corrente sanguínea durante as primeiras 12 h do experimento. Neste sentido, a biodisponibilidade relativa do  $\gamma$ -orizanol foi de  $17,46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  enquanto o  $\gamma$ -orizanol microencapsulado apresentou biodisponibilidade relativa de  $47,26 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 171 % maior.

Sendo assim, a escolha de biomateriais adequados para o carregamento do  $\gamma$ -orizanol, que sejam compatíveis com o uso em alimentos, e que proporcionem características desejáveis de proteção e liberação controlada dos fitoesteróis, é de extrema importância.

### 2.2.3.1 Nanopartículas proteicas.

Entre os biomateriais de grau alimentar utilizados para o preparo de nanopartículas, destacam-se as proteínas. As proteínas originárias de fontes animais ou vegetais exibem ampla diversidade molecular e de características físico-químicas como massa molar, conformação, flexibilidade, polaridade, carga superficial, ponto isoelétrico, solubilidade, e potenciais interações químicas com outras matrizes. Para a escolha do material utilizado como matriz devem-se considerar as propriedades físico-químicas da proteína, capacidade de carregamento do nutracêutico selecionado, segurança, biocompatibilidade, bem como os fatores econômicos envolvidos no preparo das nanopartículas (DAVIDOV-PARDO; JOYE; MCCLEMENTS, 2015).

Existem vários estudos sobre a aplicação das nanopartículas proteicas para liberação de nutracêuticos, e melhoria de suas propriedades físico-químicas. Dentre estes, destaca-se o estudo da zeína por Diarrassouba e colaboradores (2015), onde foram desenvolvidas nanopartículas de  $\beta$ -lactoglobulina contendo vitamina D<sub>3</sub>. Os autores demonstraram um aumento: da capacidade de dispersão da vitamina D<sub>3</sub> em meio aquoso; da estabilidade frente à fotólise; e da biodisponibilidade oral do bioativo. Wei e colaboradores (2014), por sua vez, desenvolveram nanopartículas de albumina, contendo escutelarina, demonstrando o aumento da biodisponibilidade, e do tempo de meia vida do flavonoide na corrente sanguínea.

Karthikeyan e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas de gelatina para a administração de resveratrol, e

observaram que este flavonoide apresentou maior capacidade de dispersão em água quando nanoencapsulado, além do aumento de sua biodisponibilidade oral, apresentando atividade farmacológica no tratamento de modelo de câncer de pulmão em camundongos. Os estudos envolvendo a encapsulação de nutracêuticos por nanopartículas proteicas são variados, visando tanto sua aplicação na indústria farmacêutica, quanto nas indústrias cosmética e alimentícia.

Considerando o exposto, observa-se que as desvantagens descritas para o  $\gamma$ -orizanol, decorrente de sua instabilidade física, e deficiente solubilidade em água, podem ser contornadas com o emprego do processo encapsulamento destes fitoesteróis, podendo assim, elevar o potencial terapêutico do  $\gamma$ -orizanol.

### 2.3. ZEÍNA

Dentre as proteínas possivelmente empregadas para o transporte de nutracêuticos, destaca-se a zeína, uma proteína da classe das prolaminas, rica em prolina, que é encontrada no endosperma de grãos de milho em regiões denominadas “corpos de zeína”, e corresponde a aproximadamente 50% do total de proteínas do grão, sendo responsável pela dureza do mesmo. A zeína é reconhecida pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como uma proteína de grau alimentício, e segura para o consumo em humanos (GRAS, *Generally Recognized as Safe*), que apresenta resistência à digestão enzimática, retardando a digestibilidade da zeína no trato gastrointestinal. A zeína consiste de uma mistura complexa de peptídeos, que podem ser divididos em quatro grupos ou frações:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -zeína, classificados devido à diferença de solubilidade em soluções hidroalcoólicas (GAUCHE et al., 2013; MATSUSHIMA et al. 1997; PATEL; VELIKOV, 2014; SHUKLA; CHERYAN, 2001; THOMPSON; LARKINS, 1989). A alta proporção de aminoácidos apolares e sua deficiência em aminoácidos ácidos e básicos são responsáveis pela solubilidade da zeína, alcançada em água somente na presença de álcool, em altas concentrações de ureia, em pH alto ( $> 11,0$ ) ou em detergentes aniônicos. Soluções aquosas alcoólicas são utilizadas para a extração da  $\alpha$ -zeína, enquanto a extração das outras frações requer a adição de um agente redutor (THOMPSON; LARKINS, 1989).

As frações de zeínas diferem entre si ainda quanto à massa molar, carga, sequência de aminoácidos, composição e concentração. Essa diferença entre as frações é atribuída aos diferentes genótipos de milho, bem como localização ao longo do endosperma, e a maturidade do grão

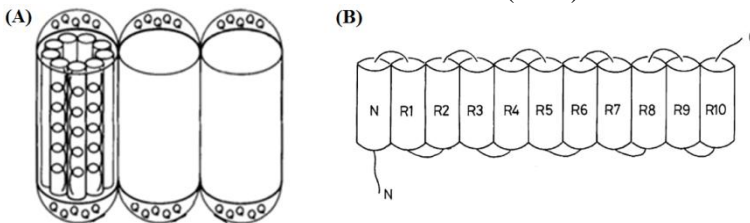


(SHUKLA; CHERYAN, 2001; ZHU; KALE; CHERYAN, 2007). Quanto à composição de aminoácidos, as zeínas, apresentam uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos tais como glutamina, prolina, leucina e alanina (ARGOS et. al, 1982; MATSUSHIMA et al. 1997; POMES, 1971). Este grupo de proteínas apresenta deficiência em aminoácidos essenciais, tais como lisina e triptofano, sendo consideradas proteínas de baixa qualidade nutricional. Essa característica associada à insolubilidade em água limita a sua utilização em produtos alimentícios; tendo, portanto, aplicação voltada, principalmente, para indústria como polímero industrial (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

A  $\alpha$ -zeína corresponde à fração da proteína mais abundante, correspondendo a aproximadamente 70 % de zeína total do grão de milho, sendo constituída de um fragmento de 19 kDa e outro fragmento de 22 kDa (THOMPSON; LARKINS, 1989). Em estudo realizado por Wilson e colaboradores (1991), as frações de zeína foram quantificadas e os valores encontrados para  $\alpha$ -zeína corroboraram com pesquisas anteriores (75 a 80 %), sendo seguida pela  $\gamma$ -zeína (10 a 20 %),  $\beta$ -zeína (1 a 5 %) e  $\delta$ -zeína (1 a 5 %). A zeína comercial é constituída principalmente de  $\alpha$ -zeína com pequenas quantidades das demais frações, e vem sendo empregada na fabricação de plásticos, fibras, alimentos, produtos farmacêuticos, e nutracêuticos (SHUKLA; CHERYAN, 2001). Argos e colaboradores (1982) demonstraram que a  $\alpha$ -zeína apresenta sequência de aminoácidos que conferem propriedade hidrofóbica ao material, e apresenta uma conformação cilíndrica, em solução, composta de estruturas altamente helicoidais, que se agregam espontaneamente formando fibras. Os autores indicam que a estrutura cilíndrica da zeína é revestida por resíduos polares de glutamina, que permitem a formação de ligações de hidrogênio, e interações hidrofóbicas de van der Waals para manter a integridade estrutural e empacotamento intermolecular. Matsushima e colaboradores (1997) demonstram que a fração de  $\alpha$ -zeína de 19 kDa apresentam 9 unidades de repetição (compostas, cada uma, por 20 resíduos de aminoácidos) adjacentes, enquanto a fração que possui 22 kDa é formada de 10 unidades de repetição. Essas unidades formam 9 ou 10 hélices arranjadas em forma de anéis anti-paralelos, unidos por porções ricas em glutamina (Figura 6). Através de dicroísmo circular, foi possível verificar que a  $\alpha$ -hélice corresponde de 50 a 60 % da conformação total da proteína, enquanto pouca ou nenhuma conformação do tipo  $\beta$ -folha foi observada. No entanto, Matsushima e colaboradores (1997) indicam que o empacotamento da  $\alpha$ -zeína ocorre na forma de cilindros planos,

com comprimento de aproximadamente 13 nm, refutando o modelo de conformação globular proposto anteriormente por Argos e colaboradores (1982). Com este novo modelo, cada uma das unidades de repetição formam uma única  $\alpha$ -hélice e que estão ligadas entre si por ligações ricas em glutamina, assumindo a conformação de hélices anti-paralelas de unidades de repetição linearmente orientadas na direção perpendicular ao eixo helicoidal.

**Figura 6** – Representações esquemáticas da estrutura tridimensional da  $\alpha$ -zeína propostas por (A) Argos e colaboradores (1982); e (B) Matsushima e colaboradores (1997).



Fonte: Adaptado de Argos e colaboradores (1982) e Matsushima e colaboradores (1997).

### 2.3.1 Nanopartículas de zeína

Diferentes sistemas nanoparticulados à base de zeína, são descritos na literatura tanto para o carregamento de fármacos, quanto nutracêuticos, óleos voláteis, entre outros. Nanopartículas de zeína foram propostas para a encapsulação de timol e carvacrol (da ROSA et al., 2015; WU; LUO; WANG, 2012), óleo de hortelã-pimenta (CHEN; ZHONG, 2015), óleo de tomilho vermelho, óleo de orégano, óleo de cassia (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005),  $\alpha$ -tocoferol (LUO et al., 2011), vitamina D<sub>3</sub> (LUO; TENG; WANG, 2011), tangeretina (CHEN et al., 2014), luteína (HU et al., 2012), quercetina (PATEL et al., 2012), resveratrol (JOYE et al., 2015), entre outros. As nanopartículas de zeína são, normalmente, preparadas com a finalidade de aumentar a dispersibilidade de substância bioativas em meio aquoso, assim como promover a estabilidade química destas, protegendo-as da degradação física ou química, e aprimorar a atividade antimicrobiana, antioxidante ou anti-inflamatória das moléculas encapsuladas.

### 2.3.2 Métodos de preparo de nanopartículas de zeína

Alguns métodos vêm sendo propostos para o preparo de nanopartículas de zeína, e se baseiam na redução da solubilidade da proteína em meio aquoso. O método mais empregado na literatura para preparo das nanopartículas de zeína é a técnica da nanoprecipitação, também conhecida como deslocamento do solvente, ou método do anti-solvente, que consiste na interação interfacial da zeína após deslocamento de um solvente semi-polar, miscível em água. A rápida difusão do solvente orgânico resulta na redução da tensão interfacial entre as duas fases, aumentando a área superficial, induzindo à formação de pequenas gotículas de solvente orgânico contendo zeína. Este método emprega a adição de uma solução de zeína em um anti-solvente, um solvente onde a zeína seja insolúvel. A precipitação da proteína de forma controlada, devido à redução da solubilidade no meio, permite a formação das nanopartículas. Vários parâmetros podem ser modulados a fim de otimizar as propriedades físico-químicas das nanopartículas, destacando-se a dependência sobre a velocidade de adição da fase orgânica; taxa de agitação da fase aquosa; razão volumétrica entre a fase orgânica e a fase aquosa; viscosidade da fase orgânica; pH de ambas fases; temperatura; emprego de tensoativos; entre outros. O tamanho das partículas preparadas a partir desta técnica ainda pode ser modulado através do emprego de processos altamente energéticos como homogeneização de alto cisalhamento ou de alta velocidade, ultrassonificação, ou agitação magnética. (REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011; ZHONG; JIN, 2009). O mecanismo de formação das nanopartículas tem sido explicado pela turbulência interfacial entre as duas fases dos líquidos, que é governada pelo efeito Marangoni, que consiste nos movimentos físicos das gotículas da solução de zeína no fluido, devido ao gradiente de concentração do soluto. A formação das partículas também parece ser influenciada por nucleação e difusão controlada, também conhecida como maturação de Ostwald (PATEL; VELIKOV, 2014; SITNIKOVA; SPRIK; WEGDAM, 2005).

Outra técnica bastante utilizada é a precipitação no anti-solvente supercrítico, que se baseia no uso de um solvente e de um anti-solvente completamente miscíveis no estado líquido. Em condições específicas de temperatura e pressão, a zeína solubilizada é nebulizada em uma câmara que contém o fluido supercrítico, geralmente dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>). A rápida difusão dos solventes resulta na saturação do soluto, e consequentemente na precipitação das partículas (REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011).

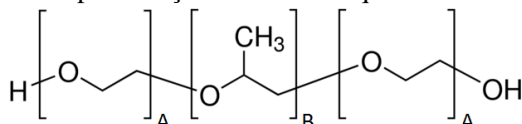
### 2.3.3 Estabilidade física de nanopartículas de zeína

As nanopartículas de zeína possuem pouca estabilidade física frente à agregação quando expostas em determinadas condições de pH, força osmótica, e temperatura, principalmente devido à elevada hidrofobicidade, e à baixa distribuição de carga, especialmente próximo ao ponto isoelétrico ( $pI \approx 6,2$ ) (HU; MCCLEMENTS, 2014). As nanopartículas de zeína apresentam baixa estabilidade frente ao pH, apresentando agregação das partículas em pH entre 5 e 6,5, bem como em concentrações de NaCl maior que  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  (HU; MCCLEMENTS, 2014; HU; MCCLEMENTS, 2015). Assim, estratégias para reduzir as fortes interações hidrofóbicas, e a aumentar a repulsão eletrostática entre as nanopartículas de zeína podem ser empregadas para contornar os problemas de estabilidade da formulação.

O uso de tensoativos para aprimorar a estabilidade de nanopartículas é uma das possíveis estratégias para o aumento da repulsão estérica, bem como redução da hidrofobicidade na região superficial das partículas, resultando na redução das interações hidrofóbicas. Hu e McClements (2014) empregaram o tensoativo Tween 80 em diferentes concentrações para estabilizar as nanopartículas de zeína. No entanto, somente foi possível reduzir o tamanho das nanopartículas, enquanto a estabilidade não foi significativamente alterada.

Poloxamers, como o Pluronic F68<sup>®</sup> e o Kolliphor P188<sup>®</sup> também são utilizados no desenvolvimento de nanopartículas proteicas. São polímeros tribloco (tipo ABA), surfactantes hidrofílico não-iônico, compostos de um bloco hidrofóbico de óxido de polipropileno (bloco B) ligado em suas duas extremidades a blocos hidrofílicos de óxido de polietileno (bloco A) (Figura 7) (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016). Da Rosa e colaboradores (2015) empregaram o polímero tribloco anfifílico como tensoativo para o preparo de nanopartículas com tamanho reduzido, e que apresentaram estabilidade física quanto ao tamanho das partículas, durante o período avaliado de 90 dias. Porém, existe uma carência de dados que demonstrem os efeitos de diferentes tensoativos na estabilidade física das nanopartículas de zeína a longo prazo, tornando necessário estudos adicionais a cerca deste fenômeno.

**Figura 7** – Representação da estrutura química do Poloxamer.

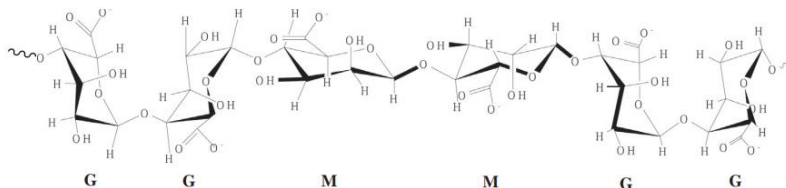


FONTE: Adaptado de Patel, Patel e Patel (2009).

Outra estratégia utilizada para aumento da estabilidade física das nanopartículas refere-se à deposição eletrostática de diferentes polissacarídeos e proteínas à superfície das partículas de zeína, como a quitosana (LUO et al., 2011), a carboximetil quitosana (LUO et al., 2012), caseinato de sódio (ZHANG et al., 2014), o alginato de sódio (HU; MCCLEMENTS, 2015), pectina (HU et al., 2015), entre outros. Estas moléculas tendem a reduzir a hidrofobicidade do sistema, aumentar a carga elétrica, e promover repulsão estérica entre as nanopartículas (HU; MCCLEMENTS, 2014). As nanopartículas estabilizadas com polissacarídeos e proteínas tendem a possuir maior estabilidade frente ao pH e à força iônica, sendo ainda uma estratégia mais viável do que o uso de tensoativos, principalmente por se tratar de materiais seguros para o emprego em matrizes alimentares, além do uso em concentrações mais reduzidas.

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear, isolado a partir de algas marrons (*Phaeophyceae*), constituído de ligações (1→4) de resíduos de β-D-ácido manurônico (M) e α-L-ácido gulurônico (G), podendo ser formado por sequências obtidas a partir de blocos M, G e MG (Figura 8). Devido às constantes de dissociação dos monômeros M e G serem 3,38 e 3,65, respectivamente, o alginato de sódio possui a propriedade de apresentar-se negativamente carregado e formar complexos eletrostáticos com a zeína em pHs próximos ao ponto isoelétrico (FIORAMONTI et al., 2014; HARNISILAWAT; PONGSAWATMANIT; MCCLEMENTS, 2006; HU; MCCLEMENTS, 2015).

**Figura 8** – Representação da estrutura química do polissacarídeo alginato de sódio.

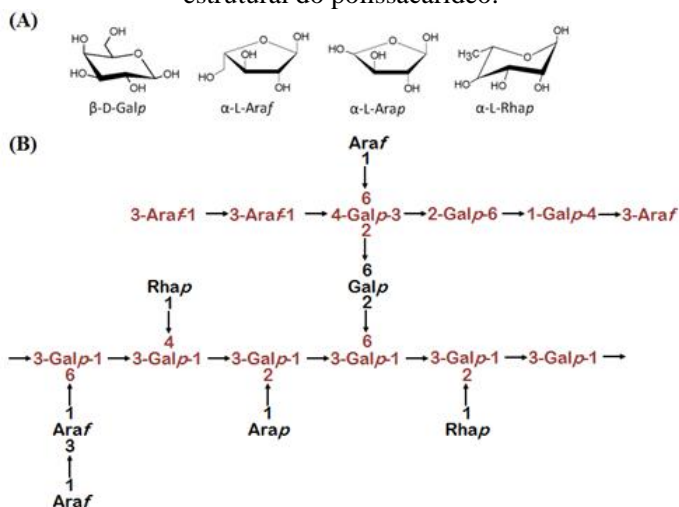


FONTE: Fertah e colaboradores (2017).

A goma arábica é outro polissacarídeo amplamente utilizado, consiste de um heteropolissacarídeo de estrutura complexa e ramificada, com cadeia principal composta por unidades de  $\beta$ -galactopiranosil com resíduos laterais de *L*-arabinose, *L*-ramnose, *D*-galactose e *D*-ácido glutâmico, ligados através de ligações  $\beta(1\rightarrow6)$ . Este complexo polimérico pode ser composto por frações variáveis de arabinogalactana, glicoproteínas e arabinogalactana-proteína (Figura 9) (GASHUA; WILLIAMS; BALDWIN, 2016; TSAI; KITAMURA; KOKAWA, 2017). Chen e Zhong (2015) demonstraram que goma arábica foi capaz de induzir ao aumento das cargas negativas na superfície de nanopartículas, promovendo sua estabilização.

A quitosana é um polissacarídeo linear obtido através da desacetilação da quitina, que pode ser extraída a partir da carapaça de crustáceos. Este polímero catiônico é composto por resíduos de *N*-acetil-*D*-glucosamina e unidades de  $\beta(1,4)$ -*D*-glucosamina dispostas aleatoriamente. Apresenta um  $pK_a$  de aproximadamente 6,5 e dependendo do grau de depolimerização pode ser disponibilizada como quitosana de baixa, média ou alta massa molar, apresentando diferenças quanto à densidade de cargas positivas e viscosidade (LIANG et al., 2017; LUO et al., 2011). As interações entre a zeína e a quitosana podem ocorrer por interação eletrostática, ligação de hidrogênio ou interação hidrofóbica (BEKALE; AGUDELO; TAJMIR-RIABI, 2015; FARRIS et al., 2017; LUO et al., 2011).

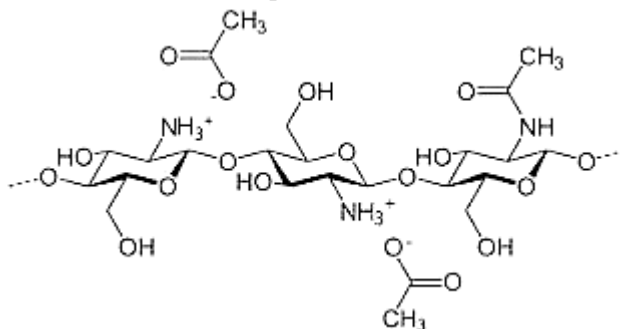
**Figura 9** – Representação de (A) estrutura química dos monossacarídeos que compõem a goma arábica e (B) da composição estrutural do polissacarídeo.



onde  $\beta$ -D-Galp corresponde ao grupo  $\beta$ -galactopiranosil,  $\alpha$ -L-Araf é  $\alpha$ -L-Arabinofuranose,  $\alpha$ -L-Arap é o grupo  $\alpha$ -L-Arabinopiranosil, e  $\alpha$ -L-Rhap o grupamento  $\alpha$ -L-Raminopiranosil.

FONTE: Adaptado de Cornelsen e colaboradores (2015) e Nie e colaboradores (2013).

**Figura 10** – Representação da estrutura química do polissacarídeo quitosana.



FONTE: Madeleine-Perdrillat e colaboradores (2016)

Uma vez estabilizadas, por deposição eletrostática ou interações hidrofóbicas a partir das estratégias mencionadas anteriormente, as

nanopartículas de zeína destacam-se como uma estratégia promissora para carreamento de substâncias hidrofóbicas, como o  $\gamma$ -orizanol, podendo promover sua dispersibilidade em meio aquoso, estabilidade química e física frente a processos tecnológicos, e aumento da absorção intestinal, biodisponibilidade, e potencialmente, de sua atividade funcional.



---

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---



### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Matérias-primas

Alginato de sódio (Sigma, EUA)  
Goma arábica (Sigma, EUA)  
Kolliphor<sup>®</sup> P 188 (Sigma, EUA)  
 $\gamma$ -orizanol (Pharmanostra, Brasil)  
Quitosana de massa molar alta (grau de deacetilação  $\geq 75\%$ ) (Sigma, Japão)  
Quitosana de massa molar baixa (Sigma, Japão)  
Quitosana de massa molar média (Sigma, Japão)  
Zeína (Sigma, EUA).

#### 3.1.2 Solvente e reagentes

Acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker, EUA)  
Ácido clorídrico 37 % (Merck, EUA)  
Ácido fosfotúngstico (Sigma, EUA)  
Etanol (Merck, Brasil)  
Fosfato de sódio dibásico (Sigma, EUA)  
Fosfato de sódio monobásico (Sigma, EUA)  
Hidróxido de sódio (Vetec, Brasil)  
Laurilsulfato de sódio (Sigma, EUA)  
Metanol grau HPLC (J.T.Baker, EUA)

#### 3.1.3 Insumos

Dispositivos de ultrafiltração Ultracel YM-100 (limite de massa molecular nominal de 100.00 Da) (Amicon<sup>®</sup> Millipore Corp. EUA).  
Cubetas eletroforéticas (Malvern Instruments, Reino Unido)  
Cubetas de plástico (Malvern Instruments, Reino Unido)  
*Grid* de cobre, de 200 mesh, recoberto com uma fina camada de carbono (Koch Electron Microscopy LTDA, Brasil)  
Membranas de diálise (SpectraPor<sup>®</sup> CE MWCO 10000, EUA)

#### 3.1.4 Equipamentos

Aagitador magnético (Dist, Brasil).  
Balança analítica FA2204C (Bioscale, EUA)  
Bomba a vácuo V-100 (Büchi, Suíça)  
Centrífuga analítica LUMiSizer (LUM, Alemanha).

Cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10A (Shimadzu, Japão).  
Dissolutor Modelo 299 (Nova Ética, Brasil)  
Espectrômetro de infravermelho Spectrum 400 FT IR (PerkinElmer, EUA)  
Liofilizador LJJ02 (JJCientífica, Brasil)  
Microcalorímetro diferencial MC-DSC (TA Instruments, EUA)  
Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (JEOL Inc., Japão)  
pHmetro W3B pHmeter (Bel Engineering, Itália)  
Recirculador de água Chiller F-100 (Büchi, Suíça)  
Rotaevaporador R-114 (Büchi, Suíça)  
Ultracentrífuga Ministar (Ministar, EUA)  
ZetaSizer Nano S (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).

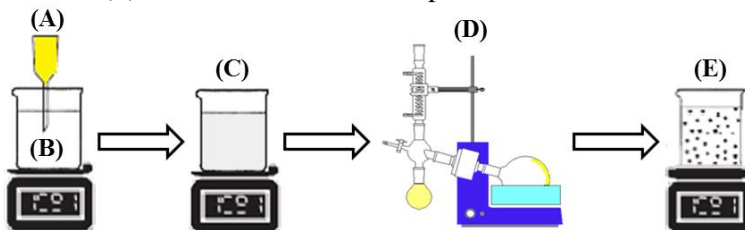
## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Desenvolvimento das nanopartículas de zeína

Para o desenvolvimento das nanopartículas de zeína, foram preparadas soluções de zeína 2,0% (m/v) e de  $\gamma$ -orizanol 0,1% (m/v) em solução etanol:água (85:15, v/v, pH 5,8). À uma alíquota de 4 mL de solução hidroalcoólica de zeína, foi adicionado 1 mL da solução de  $\gamma$ -orizanol, constituindo a fase orgânica da formulação. As nanopartículas de zeína foram preparadas pelo método do anti-solvente (HU; MCCLEMENTS, 2014; PATEL et al., 2012), onde a fase orgânica foi vertida sobre uma fase aquosa em pH 4,0, sob agitação magnética. Posteriormente, o etanol foi removido sob pressão reduzida utilizando um rotaevaporador com temperatura constante de 40 °C (Büchi, Suíça) e a formulação armazenada a 4 °C (Figura 11).

Para a avaliação do efeito da composição da fase aquosa sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de zeína, as formulações foram preparadas utilizando água acidificada, pH 4,0, ou soluções aquosas de Kolliphor P188, pH 4,0, nas concentrações de 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 ou 1,50 % (m/v). As formulações foram preparadas em triplicata, e a fase aquosa que conferiu melhores propriedades físico-químicas às nanopartículas de zeína foi utilizada para os ensaios subsequentes.

**Figura 11** – Fluxograma do método de preparo das nanopartículas de zeína, onde (A) corresponde à Fase Orgânica, (B) à Fase Aquosa, (C) ao processo de agitação magnética, (D) remoção do etanol sob pressão reduzida, e (E) armazenamento das nanopartículas de zeína.



### 3.2.2 Estudo da interação de diferentes polissacarídeos com as nanopartículas de zeína contendo $\gamma$ -orizanól

Para o estudo de interação das nanopartículas de zeína, preparadas na presença e na ausência de Kolliphor P188<sup>®</sup>, com diferentes polissacarídeos foram preparadas misturas de volumes equivalentes de suspensão de nanopartículas de zeína e soluções polissacarídicas (1:1, v/v). As misturas foram mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por um período de 1 hora. As amostras foram preparadas em triplicata e armazenadas a 4 °C.

Para este estudo foram avaliadas soluções aquosas de: alginato de sódio, pH 4,0, nas concentrações de  $2,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-1}$  % (m/v); goma arábica, pH 4,0, nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-2}$  a  $4,0 \times 10^{-1}$  % (m/v), quitosana de alta massa molar, em solução de ácido acético 1,0 % (v/v), nas concentrações de  $2,0 \times 10^{-3}$  a  $2,0 \times 10^{-1}$  % (m/v); quitosana de massa molar média, em solução de ácido acético 1,0 % (v/v), nas concentrações de  $2,0 \times 10^{-3}$  a  $2,0 \times 10^{-1}$  % (m/v), e quitosana de baixa massa molar, em solução de ácido acético 1,0 % (v/v), nas concentrações de  $5,0 \times 10^{-4}$  a  $5,0 \times 10^{-2}$  % (m/v). As concentrações dos polissacarídeos foram determinadas com base em estudos preliminares..

### 3.2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas de zeína

#### 3.2.3.1 Determinação do diâmetro e distribuição granulométrica das nanopartículas

O diâmetro e a distribuição granulométrica das nanopartículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em

ângulo 173 ° utilizando o equipamento ZetaSizer Nano S (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). As amostras foram diluídas apropriadamente em água ultrapura, e analisadas a 25 °C, em triplicata. O raio hidrodinâmico foi calculado pela equação de Stokes-Einstein (Equação 1), assumindo a esfericidade das nanopartículas, e expresso como a média das replicatas. O índice de polidispersão das nanopartículas (PDI) foi utilizado como parâmetro para verificação de uma distribuição granulométrica homogênea, ou monodispersa ( $PDI \leq 0,2$ ), ou distribuição polidispersa, ou polimodal ( $PDI > 0,2$ ) (HU; MCCLEMENTS, 2015).

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{Equação 1}$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann (J/K),  $T$  é a temperatura (K),  $D$  é o coeficiente de difusão, e  $\eta$  é a viscosidade do meio, neste caso água ( $\eta = 0,89$  cP a 25 °C).

### 3.2.3.2 Determinação do potencial zeta das nanopartículas

O potencial zeta foi avaliado por anemometria laser Doppler, onde as amostras foram inseridas em um célula eletroforética e submetidas a uma voltagem alternante de  $\pm 150$  mV. O potencial zeta foi calculado como a média dos valores de mobilidade eletroforética utilizando a equação de Helmholtz–Smoluchowski (Equação 2), e todas as medidas foram realizadas a 25 °C e em triplicata (HU; MCCLEMENTS, 2015; SZE et al., 2003).

$$v_E = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r \frac{\zeta}{6\pi\mu} (1 + \kappa r) \quad \text{Equação 2}$$

onde  $v_E$  é a mobilidade elétrica das nanopartículas,  $\epsilon_0$  e  $\epsilon_r$  são a constante dielétrica relativa e a permitividade elétricas no vácuo, respectivamente,  $\zeta$  o potencial zeta,  $\mu$  é a viscosidade da solução,  $r$  o raio das nanopartículas, e  $\kappa$  o parâmetro de Debye-Hückel expresso como  $\kappa = (2n_0 z^2 e^2 / \epsilon_r \epsilon_0 k_B T)^{1/2}$  onde  $n_0$  é a concentração iônica,  $z$  a valência do íon,  $e$  é a carga do elétron,  $k_B$  é a constante de Boltzmann, e  $T$  a temperatura absoluta.

### 3.2.3.3 Avaliação morfológica das nanopartículas

A avaliação da morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando um microscópio JEM-1011 (JEOL Inc., Japão). As amostras foram depositadas em um *grid* de cobre, de 200 mesh, recoberto com uma fina camada de carbono, e o excesso removido com um papel filtro. As nanopartículas depositadas foram coradas com uma solução 1,0 % de ácido fosfotúngstico (m/v), e o excesso de agente corante removido igualmente com um papel filtro. Uma vez secos, os *grids* contendo as nanopartículas coradas foram avaliadas por MET.

### 3.2.3.4 Espectroscopia no infravermelho

As nanopartículas de zeína contendo  $\gamma$ -orizanol, estabilizadas e não estabilizadas com polissacarídeos, foram analisadas por espectroscopia no infravermelho para determinação de possíveis interações química e/ou eletrostática entre a proteína e os polissacarídeos.

Para a análise no infravermelho as amostras foram congeladas a -20 °C e submetidas ao processo de liofilização por um período de 24 h. As amostras liofilizadas foram analisadas utilizando um espectrômetro de infravermelho Spectrum 400 FT IR (PerkinElmer, EUA). As análises foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando o acessório de reflexão total atenuada (ATR), realizando espectros de transmitância entre os números de onda de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.3.5 Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C)

A análise térmica por calorimetria exploratória diferencial foi realizada para avaliação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e/ou eventos característicos dos materiais utilizados, bem como verificação da possível interação química entre a proteína e os polissacarídeos, e outras transições térmicas dos compostos presentes nas formulações.

Para a análise, as amostras foram previamente secas pelo método de liofilização, como descrito anteriormente. Aproximadamente 100 mg de amostra foram exatamente pesada em um porta-amostra reutilizável de aço inoxidável, fechado hermeticamente e submetido a aquecimento no intervalo de -20 a 150 °C com razão de aquecimento de 1 °C.min<sup>-1</sup>, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>, utilizando um microcalorímetro diferencial MC-DSC (TA Instruments, EUA). Para

determinação da linha de base foi utilizado como referência um porta-amostra vazio, submetido às condições descritas anteriormente. Os eventos térmicos foram integrados com relação à linha de base e através da área resultante da integração foram calculadas as entalpias dos eventos observados (ZHANG et al., 2014).

### **3.2.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do $\gamma$ -orizanol**

#### **3.2.4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação do $\gamma$ -orizanol**

Para determinação do teor e da eficiência de encapsulação do  $\gamma$ -orizanol nas nanopartículas, foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) hifenizado com detector de arranjo de diodos (DAD) utilizando como referência o comprimento de onda de 330 nm. As amostras foram injetadas a um volume de 10  $\mu$ L, eluindo com fase móvel isocrática composta de metanol:acetonitrila (6:4, v/v), com fluxo de 2,0 mL.min<sup>-1</sup> através de uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), com tempo de análise de 60 minutos. As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo LC-10A (Shimadzu, Japão).

O método foi validado (Apêndice) quanto às especificações dos guias de qualidade do *International Conference on Harmonisation* (ICH) e do Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016), utilizando os parâmetros: especificidade, linearidade, determinação dos limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez (ICH, 2005).

#### **3.2.4.2 Avaliação do teor e da eficiência de encapsulação (EE%) do $\gamma$ -orizanol nas nanopartículas de zeína**

Para a determinação do teor de  $\gamma$ -orizanol nas nanopartículas, os fitoesteróis foram extraídos em 10,0 mL de metanol, a partir de uma alíquota de 1,0 mL da suspensão de nanopartículas não estabilizada com polissacarídeos ou 2,0 mL da suspensão de nanopartículas estabilizada com polissacarídeos, por 30 minutos, sob agitação magnética constante. Após a extração, as suspensões foram centrifugadas a 20000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante coletado, filtrado através de membrana de PVDF com diâmetro de poro de 0,45  $\mu$ m, e analisado por CLAE



utilizando método validado conforme item 3.2.4.1. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata, e o resultado expresso como  $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -orizanol. $\text{mL}^{-1}$  de suspensão de nanopartículas ( $c_{Total}$ ).

Para determinação da eficiência de encapsulação do  $\gamma$ -orizanol (EE %), uma alíquota das nanopartículas de zeína foi submetida a ultrafiltração/centrifugação, utilizando unidade de ultrafiltração Ultracel YM-100 (com limite de massa molecular nominal de 100.00 Da, Amicon® Millipore Corp. EUA), para separação das nanopartículas do sobrenadante contendo o  $\gamma$ -orizanol não encapsulado. O sobrenadante foi coletado e analisado por CLAE. As amostras foram avaliadas em triplicata, e o resultado expresso, como a média das três medidas, em  $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -orizanol. $\text{mL}^{-1}$  de nanopartículas ( $c_{Sobrenadante}$ ). A EE % foi determinada conforme descrito na Equação 3 (ZHANG et al., 2014).

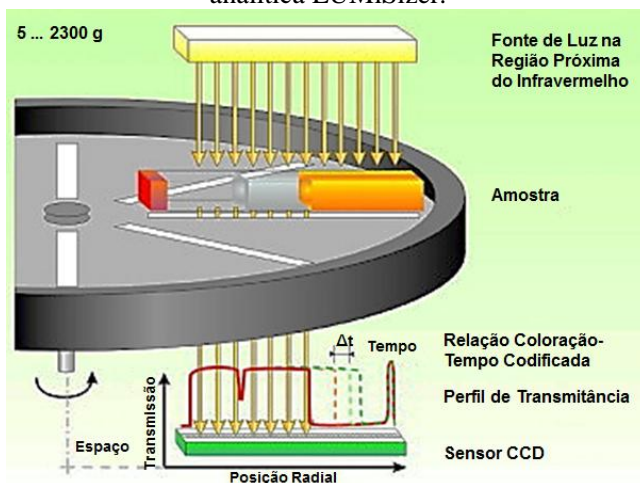
$$EE \% = \left( \frac{c_{Total} - c_{Sobrenadante}}{c_{Total}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

onde  $c_{Total}$  é a concentração de  $\gamma$ -orizanol extraída das nanopartículas ( $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -orizanol. $\text{mL}^{-1}$ ) determinada para ensaio de teor, e  $c_{Sobrenadante}$  a concentração de  $\gamma$ -orizanol quantificada no sobrenadante obtido por ultrafiltração/centrifugação ( $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -orizanol. $\text{mL}^{-1}$ ).

### 3.2.5 Avaliação da estabilidade física acelerada das nanopartículas de zeína

A estabilidade física das nanopartículas de zeína foi avaliada em condição acelerada através do método de análise de sedimentação utilizando uma centrífuga analítica LUMiSizer (LUM, Alemanha). Esta centrífuga multi-amostras realiza medidas de alteração de concentração de partículas (transmitância), *in situ*, em função do tempo de centrifugação ao longo de todo o comprimento da célula porta-amostra. As alterações de transmitância de luz na região do infravermelho próximo (NIR, com comprimento de onda,  $\lambda$ , de 870 nm) são avaliadas por um arranjo de milhares de detectores (Figura 12) (LERCHE, 2002; SOBISCH; LERCHE, 2008; LERCHE; SOBISCH, 2014). As amostras foram acondicionadas em células PC-cells com 2 mm de espessura (volume de 0,4 mL), e as alterações de concentração de partículas em regiões específicas da célula foram avaliadas utilizando velocidade de rotação de 4000 rpm, por um período de tempo de 7650 s, à temperatura de 25 °C, com intervalo de tempo entre as medidas de 30 s (LIU et al., 2016).

**Figura 12** – Representação esquemática da configuração da centrífuga analítica LUMiSizer.



Fonte: Sobisch e Lerche (2008)

### 3.2.6 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína

Para realização do ensaio de liberação uma alíquota de 3 mL das suspensões de nanopartículas foi transferida para membranas de diálise (SpectraPor® CE MWCO 10000, EUA), fechadas e inseridas em 300 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo 0,25 % (m/V) de laurilsulfato de sódio. O ensaio foi conduzido em aparelho de dissolução Dissolutor modelo 299 (Nova Ética, Brasil) sob agitação de 50 rpm utilizando o aparato pá, e temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em intervalos de tempo de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 h, e o volume reposto com meio de dissolução fresco. As alíquotas foram analisadas conforme descrito no item 3.2.4.1, e o resultado expresso como a média de 6 análises. A eficiência de dissolução (ED%) foi determinada através dos gráficos de porcentagem de  $\gamma$ -orizanol liberado (%) em função do tempo conforme descrito na Equação 4.

$$ED \% = \frac{ASC}{A_r} \times 100$$

Equação 4

onde ASC é a área sob a curva do perfil de dissolução calculada através da integração da curva do perfil de liberação do  $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína e  $A_r$  é a área do retângulo definido pela ordenada (100 % de dissolução) e pela abscissa (tempo igual a 48 h).

O mecanismo de liberação foi determinado por regressão linear utilizando os modelos seguintes: (I) cinética de ordem zero (Equação 5); (II) cinética de primeiro ordem (Equação 6); (III) Higuchi (Equação 7); (IV) Korsmeyer–Peppas (Equação 8); (V) Hixson-Crowell (Equação 9); e (VI) Peppas–Sahlin (Equação 10). O modelo que melhor descreve o mecanismo de liberação do  $\gamma$ -orizanol foi determinado através da análise do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 t + b \quad \text{Equação 5}$$

onde  $M_t$  é a massa absoluta de  $\gamma$ -orizanol quantificada em um tempo  $t$ ,  $M_\infty$  é a quantidade total de  $\gamma$ -orizanol liberado em um tempo infinito,  $K_0$  é a constante cinética, e  $b$  a massa de  $\gamma$ -orizanol no tempo zero (resultando do efeito *burst*).

$$M_t = M_0 e^{-kt} \quad \text{Equação 6}$$

onde  $M_0$  e  $M_t$  correspondem à massa de  $\gamma$ -orizanol no tempo inicial e a massa de  $\gamma$ -orizanol liberada em um tempo “ $t$ ”, respectivamente. A constante de liberação de Primeira Ordem é representada por  $K$  e  $t$  é o tempo em horas.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} + b \quad \text{Equação 7}$$

onde  $K_H$  é a constante de liberação de Higuchi.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad \text{Equação 8}$$

onde  $K$  é a constante cinética, e  $n$  é o expoente de liberação.

$$3\sqrt{M_0} - 3\sqrt{M_t} = K_{HC} t \quad \text{Equação 9}$$

onde  $M_0$  e  $M_t$  correspondem à massa de  $\gamma$ -orizanol no tempo inicial e a massa de  $\gamma$ -orizanol liberada em um tempo “ $t$ ”, respectivamente. A constante de liberação de Hixson-Crowell é representada por  $K_{HC}$  e  $t$  é o tempo em horas.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad \text{Equação 10}$$

onde  $K_1$  e  $K_2$  correspondem às constantes que refletem as contribuições relativas do mecanismo de difusão Fickiana e do mecanismo de erosão/relaxamento (transporte Caso II), respectivamente, e o coeficiente  $m$ , que é o expoente da constante de liberação.

### 3.2.7 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA %) das nanopartículas de zeína contendo  $\gamma$ -orizanol foi avaliada através da capacidade das amostras de sequestrar o radical DPPH $\bullet$  (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Para atividade antioxidante, as nanopartículas de zeína foram liofilizadas e a massa equivalente a 100  $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -orizanol foi pesada e submetida à extração exaustiva, sob agitação magnética à temperatura ambiente, em 2,0 mL de etanol. Foram misturados 1,5 mL do extrato etanólico a 1,5 mL de uma solução 0,1 mM de DPPH $\bullet$ , e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro em UV-visível L-1800 (Hitachi, Japão), utilizando comprimento de onda,  $\lambda$ , 517 nm. As soluções controle foram preparadas através da incubação de 1,5 mL de etanol e 1,5 mL da solução do radical DPPH $\bullet$ , e as amostras foram comparadas com a atividade antioxidante de uma solução etanólica de 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de  $\gamma$ -orizanol, e às mesmas massas de nanopartículas preparadas na ausência de  $\gamma$ -orizanol.

O radical DPPH $\bullet$  possui coloração púrpura, que apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 517 nm. Durante o ensaio, o antioxidante doa um elétron para neutralizar o radical DPPH $\bullet$  e a coloração é gradualmente perdida, com conseqüente redução da absorbância. Neste sentido, a atividade antioxidante (AA%) foi calculada de acordo com a Equação 11 (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995; LI et al., 2013; WU; LUO; WANG, 2012).

$$AA \% = \left( \frac{A_{Controle} - A_{Amostra}}{A_{Controle}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

onde  $A_{Amostra}$  é a absorvância das soluções do radical DPPH<sup>•</sup> contendo as amostras, enquanto  $A_{Controle}$  é a absorvância da solução de radical DPPH<sup>•</sup> na ausência de amostra.

### 3.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média das determinações e os valores analisados e comparados por meio da Análise da Variância (ANOVA) ( $\alpha = 0,05$ ), seguido de pós-teste de Tukey.



---

## **4 RESULTADOS**

---





## 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO $\gamma$ -ORIZANOL

### 4.1.1 Avaliação do efeito da composição da fase aquosa sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de zeína

Com a finalidade de otimizar o processo de preparo das nanopartículas de zeína pelo método do anti-solvente realizou-se avaliação da influência da composição da fase aquosa sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de zeína. Para tanto, nanopartículas foram preparadas na ausência de tensoativo, e na presença de Kolliphor P188, um polímero tribloco composto de um bloco de óxido de polipropileno ligado a um bloco de óxido de poliestireno nas duas extremidades, variando a concentração do tensoativo entre 0,50 e 1,50 % (m/v).

**Tabela 1** – Efeito da concentração de Kolliphor P188 sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de zeína ( $n=3$ ).

Concentração de Kolliphor P188 (% m/v)	Diâmetro médio $\pm$ D.P. (nm)	PDI médio $\pm$ D.P.	Potencial zeta médio $\pm$ D.P. (mV)
<b>0,00</b>	131,53 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	0,168 $\pm$ 0,036 <sup>a</sup>	-5,0 $\pm$ 16,3 <sup>a</sup>
<b>0,50</b>	131,23 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>	0,146 $\pm$ 0,016 <sup>a</sup>	-16,4 $\pm$ 9,5 <sup>a</sup>
<b>0,75</b>	130,13 $\pm$ 10,60 <sup>a</sup>	0,157 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup>	28,8 $\pm$ 8,6 <sup>b</sup>
<b>1,00</b>	128,37 $\pm$ 4,98 <sup>a</sup>	0,122 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>	28,2 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>
<b>1,25</b>	145,80 $\pm$ 15,10 <sup>a</sup>	0,175 $\pm$ 0,037 <sup>a</sup>	35,4 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>
<b>1,50</b>	132,70 $\pm$ 8,98 <sup>a</sup>	0,120 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup>	36,4 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>

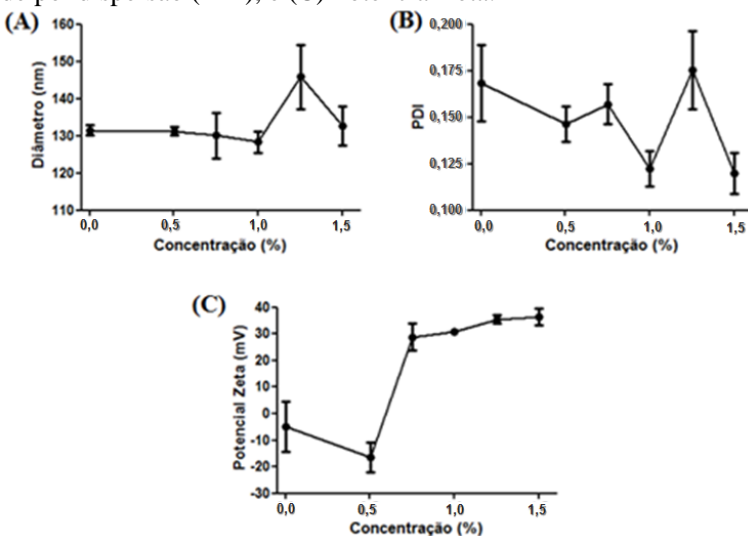
<sup>a</sup>D.P. referente ao desvio padrão.

ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos de diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das nanopartículas de zeína em função da concentração de tensoativo na fase aquosa. Pode-se observar que o diâmetro médio das nanopartículas varia de 128,37 a 145,80 nm, enquanto que o PDI variou de 0,120 a 0,175, e o potencial zeta oscilou

de -16,4 a 36,4 mV. Através da análise estatística, pode se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de diâmetro e PDI das nanopartículas em função da concentração de Kolliphor P188. No entanto, com o aumento do teor de tensoativo, nas concentrações iguais ou superiores a 0,75 % (m/v) as nanopartículas passaram a apresentar carga positiva, e um aumento no potencial zeta do sistema nanoestruturado. Não houve diferença estatisticamente significativa no potencial zeta entre os sistemas preparados com 0,75, 1,00, 1,25, e 1,50 % (m/v).

**Figura 13** – Efeito do Kolliphor P188 sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de zeína: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



Quando as representações gráficas foram avaliadas, verificou-se o aumento do diâmetro das partículas em concentrações superiores a 1,0 % (m/v), redução do PDI nas concentrações de 1,0 e 1,5 % (m/v) e um leve aumento do potencial zeta com elevação do teor de Kolliphor P188 em concentrações superiores a 0,75 % (m/v).

Considerando os resultados obtidos, as nanopartículas preparadas utilizando 1,0 % (m/v) de Kolliphor P188 (referenciada como NZ<sub>K</sub>) na fase aquosa apresentaram menores variações quanto ao diâmetro das nanopartículas, maior homogeneidade na distribuição do tamanho de partícula e valores de potencial zeta maiores que +20 mV, indicando

maior estabilidade física do sistema nanoestruturado. Sendo assim, esta formulação foi selecionada para os ensaios subsequentes, sendo comparada com as nanopartículas preparadas na ausência de tensoativo (codificada como NZ).

#### **4.1.2 Estudo de interação de diferentes polissacarídeos com as nanopartículas de zeína contendo $\gamma$ -orizanol**

##### 4.1.2.1 Alginato de sódio

###### *4.1.2.1.1 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188*

Na Tabela 2, pode-se observar que a adição de alginato de sódio à suspensão de nanopartículas resultou em uma variação do diâmetro das partículas de 131,53 a 2208,67 nm, e que em baixas concentrações do polissacarídeo, a formulação resultante da interação alginato-nanopartícula apresentou baixa reprodutibilidade, evidenciada pelos elevados valores de desvio padrão. O PDI oscilou entre 0,168 a 0,583, caracterizando um sistema polidisperso ou multimodal. O potencial zeta das nanopartículas variou de -5,0 a -58,3 mV.

A adição de alginato de sódio às formulações implica em um abrupto aumento do tamanho das partículas seguido de redução para cerca de 600 nm, quando o tamanho passa a ser pouco afetado pela adição de concentrações do polissacarídeo a partir de  $1,0 \times 10^{-3}$  % (m/v). Quando o alginato de sódio é adicionado às formulações em concentrações finais de 1,0 e  $2,0 \times 10^{-3}$  % (m/v), observa-se a formação de precipitados, dificultando a redispersão do sistema em água, podendo ser responsáveis pelos altos valores de desvio padrão verificados no diâmetro das partículas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Efeito da concentração de alginato de sódio sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ ).

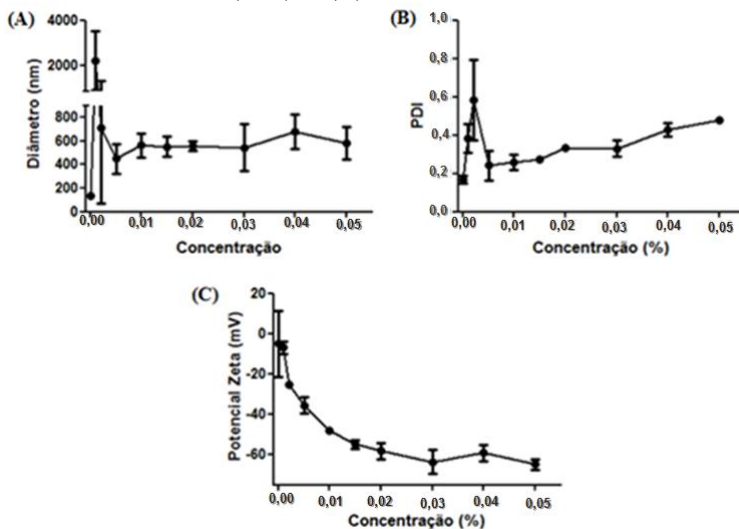
<b>Concentração de alginato de sódio (% m/v)</b>	<b>Diâmetro médio ± D.P. (nm)</b>	<b>PDI médio ± D.P.</b>	<b>Potencial zeta médio ± D.P. (mV)</b>
<b>0,00</b>	131,53 ± 2,55 <sup>a</sup>	0,168 ± 0,036 <sup>a</sup>	-5,0 ± 16,3 <sup>a</sup>
<b>1,0x10<sup>-3</sup></b>	2208,67 ± 1296,20 <sup>b</sup>	0,382 ± 0,130 <sup>a,b</sup>	-6,9 ± 3,1 <sup>a</sup>
<b>2,0x10<sup>-3</sup></b>	707,37 ± 634,94 <sup>a</sup>	0,583 ± 0,365 <sup>b</sup>	-25,2 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>5,0x10<sup>-3</sup></b>	450,37 ± 126,16 <sup>a</sup>	0,241 ± 0,131 <sup>a,b</sup>	-35,5 ± 4,2 <sup>b,c</sup>
<b>1,0x10<sup>-2</sup></b>	562,50 ± 100,83 <sup>a</sup>	0,258 ± 0,067 <sup>a,b</sup>	-48,0 ± 1,0 <sup>c,d</sup>
<b>1,5x10<sup>-2</sup></b>	551,63 ± 87,19 <sup>a</sup>	0,275 ± 0,028 <sup>a,b</sup>	-54,9 ± 2,2 <sup>d</sup>
<b>2,0x10<sup>-2</sup></b>	555,50 ± 43,22 <sup>a</sup>	0,333 ± 0,022 <sup>a,b</sup>	-58,3 ± 3,9 <sup>d</sup>
<b>3,0x10<sup>-2</sup></b>	544,23 ± 195,62 <sup>a</sup>	0,331 ± 0,077 <sup>a,b</sup>	-63,6 ± 6,1 <sup>d</sup>
<b>4,0x10<sup>-2</sup></b>	681,13 ± 145,55 <sup>a</sup>	0,428 ± 0,059 <sup>a,b</sup>	-59,2 ± 4,1 <sup>d</sup>
<b>5,0x10<sup>-2</sup></b>	584,23 ± 137,91 <sup>a</sup>	0,478 ± 0,031 <sup>a,b</sup>	-64,9 ± 2,6 <sup>d</sup>

\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.

ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

O aumento do tamanho de partícula é um indicativo de que houve interação do polissacarídeo, depositado na superfície das nanopartículas proteicas. E a presença do alginato de sódio, polissacarídeo que apresenta elevada carga negativa em pH 4,0, aumentou consideravelmente o potencial zeta do sistema formado (Figura 14). A interação alginato-nanopartícula parece apresentar concentração limite de  $2,0 \times 10^{-2}$  % (m/v) de alginato de sódio, uma vez que pouca ou nenhuma alteração das propriedades físico-químicas avaliadas foi observada em concentrações maiores. Desta forma, as amostras preparadas através da interação das NZs com alginato de sódio na concentração de  $2,0 \times 10^{-2}$  % serão utilizadas nos experimentos posteriores, e será codificada como NZ-AS.

**Figura 14** – Efeito do alginato de sódio sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



#### 4.1.2.1.2 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188

De acordo com a Tabela 3 pode-se observar que a adição de alginato de sódio à suspensão de nanopartículas, preparadas com fase aquosa composta de solução de Kolliphor P188 1,0 % (m/v), pH 4,0, resultou em uma variação do diâmetro das partículas de 128,37 a 946,63 nm. As formulações com concentrações finais de 2,0 e  $5,0 \times 10^{-3}$  % (m/v) de alginato de sódio apresentaram formação de agregados, acarretando em um aumento do tamanho das partículas e do PDI. No entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre as concentrações avaliadas, quanto ao diâmetro e o PDI do sistema ( $\alpha = 0,05$ ). Este fenômeno pode ser explicado devido à alta variância das formulações preparadas com menores concentrações do polissacarídeo.

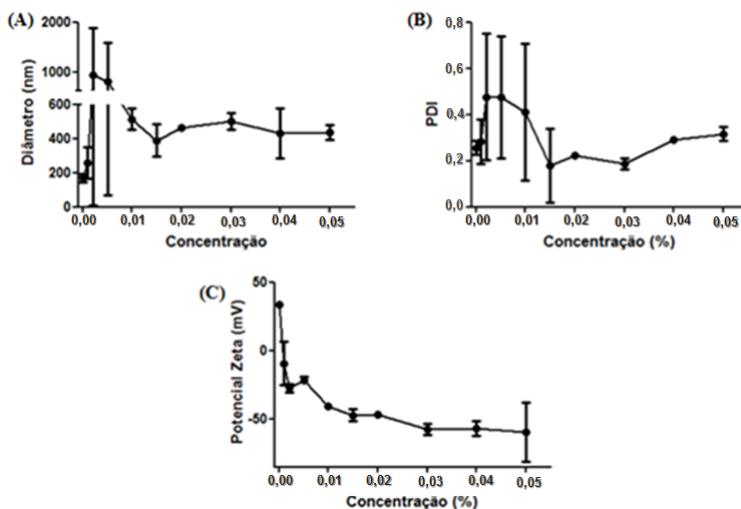
**Tabela 3** - Efeito da concentração de alginato de sódio sobre as propriedades físico-químicas das NZ<sub>K</sub> (*n*=3).

Concentração de alginato de sódio (% m/v)	Diâmetro médio ± D.P. (nm)	PDI médio ± D.P.	Potencial zeta médio ± D.P. (mV)
0,00	128,37 ± 4,98 <sup>a</sup>	0,122 ± 0,017 <sup>a</sup>	28,2 ± 4,8 <sup>a</sup>
1,0x10 <sup>-3</sup>	258,83 ± 90,76 <sup>a</sup>	0,281 ± 0,165 <sup>a</sup>	-9,4 ± 15,8 <sup>b</sup>
2,0x10 <sup>-3</sup>	946,63 ± 938,60 <sup>a</sup>	0,476 ± 0,476 <sup>a</sup>	-27,3 ± 3,0 <sup>b,c</sup>
5,0x10 <sup>-3</sup>	831,20 ± 722,28 <sup>a</sup>	0,475 ± 0,460 <sup>a</sup>	-21,5 ± 2,6 <sup>b,c</sup>
1,0x10 <sup>-2</sup>	513,50 ± 62,42 <sup>a</sup>	0,411 ± 0,513 <sup>a</sup>	-40,4 ± 1,6 <sup>c,d</sup>
1,5x10 <sup>-2</sup>	389,27 ± 94,23 <sup>a</sup>	0,179 ± 0,280 <sup>a</sup>	-47,2 ± 4,6 <sup>c,d</sup>
2,0x10 <sup>-2</sup>	460,70 ± 20,03 <sup>a</sup>	0,223 ± 0,009 <sup>a</sup>	-46,9 ± 2,5 <sup>c,d</sup>
3,0x10 <sup>-2</sup>	499,70 ± 48,78 <sup>a</sup>	0,186 ± 0,044 <sup>a</sup>	-57,7 ± 4,1 <sup>d</sup>
4,0x10 <sup>-2</sup>	430,70 ± 144,67 <sup>a</sup>	0,292 ± 0,015 <sup>a</sup>	-56,7 ± 5,3 <sup>d</sup>
5,0x10 <sup>-2</sup>	437,30 ± 43,93 <sup>a</sup>	0,316 ± 0,051 <sup>a</sup>	-59,4 ± 21,5 <sup>d</sup>

\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.  
ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Em um primeiro momento, a adição do alginato de sódio confere uma redução do potencial zeta de 28,2 para -9,4 mV quando uma concentração 1,0x10<sup>-3</sup> % (m/v) de alginato de sódio é alcançada. A elevação da concentração de alginato de sódio proporcionou um aumento das cargas negativas do sistema, culminando em incremento do potencial zeta em até -59,4 mV.

**Figura 15** – Efeito do alginato de sódio sobre as propriedades físico-químicas das NZ<sub>K</sub>: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



A interação alginato-nanopartícula parece apresentar concentração limite em torno de  $1,0 \times 10^{-2}$  % (m/v) de alginato de sódio, uma vez que pouca variação ocorre no tamanho e potencial zeta do sistema. No entanto, em concentrações iguais ou superiores a  $2,0 \times 10^{-2}$  % (m/v), pode-se observar uma maior reprodutibilidade do sistema, sobretudo quanto ao índice de polidispersão.

Para tanto, a formulação contendo uma concentração final de  $2,0 \times 10^{-2}$  % (m/v) do polissacarídeo será utilizada nos ensaios posteriores e referenciada como NZ<sub>K</sub>-AS.

#### 4.1.2.2 Goma arábica

##### 4.1.2.2.1 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188

De acordo com a Tabela 4, pode se observar que, na ausência de tensoativo na fase aquosa, as nanopartículas adicionadas de goma arábica apresentaram uma variação no diâmetro de 131,53 a 2780,52 nm, e que, em baixas concentrações do polissacarídeo (0,05 a 0,20 % (m/v)), a formulação resultante da interação polissacarídeo-

nanopartícula apresentou baixa reprodutibilidade, evidenciada pelos elevados valores de desvio padrão. O PDI oscilou entre 0,128 a 0,723, caracterizando um sistema polidisperso ou multimodal em concentrações inferiores a 1,0 % (m/v). O potencial zeta das nanopartículas variou de -5,0 a -29,1 mV.

**Tabela 4** - Efeito da concentração de goma arábica sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ ).

<b>Concentração de goma arábica (% m/v)</b>	<b>Diâmetro médio ± D.P. (nm)</b>	<b>PDI médio ± D.P.</b>	<b>Potencial zeta médio ± D.P. (mV)</b>
<b>0,00</b>	131,53 ± 2,55 <sup>a</sup>	0,168 ± 0,036 <sup>a</sup>	-5,0 ± 16,3 <sup>a</sup>
<b>0,05</b>	785,40 ± 127,73 <sup>b,c</sup>	0,369 ± 0,066 <sup>b</sup>	-28,6 ± 4,5 <sup>b</sup>
<b>0,10</b>	508,10 ± 405,70 <sup>a,c</sup>	0,418 ± 0,011 <sup>b</sup>	-16,2 ± 7,2 <sup>c</sup>
<b>0,20</b>	2780,52 ± 3209,77 <sup>d</sup>	0,723 ± 0,106 <sup>c</sup>	-13,4 ± 2,0 <sup>c</sup>
<b>0,50</b>	235,30 ± 20,98 <sup>a</sup>	0,358 ± 0,016 <sup>b</sup>	-29,1 ± 2,0 <sup>b</sup>
<b>1,00</b>	200,60 ± 10,36 <sup>a</sup>	0,161 ± 0,028 <sup>a</sup>	-28,5 ± 0,3 <sup>b</sup>
<b>2,00</b>	168,57 ± 10,00 <sup>a</sup>	0,128 ± 0,023 <sup>a</sup>	-27,2 ± 2,1 <sup>b</sup>

\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.

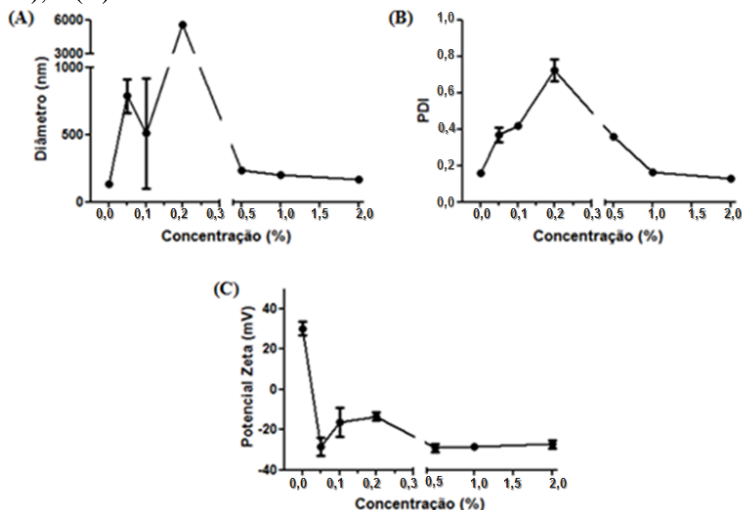
ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

A adição de goma arábica às formulações implica em um abrupto aumento do tamanho das partículas seguido de redução a cerca de 200 nm, quando o tamanho passa a ser pouco afetado pela adição de maiores concentrações do polissacarídeo. Quando a goma é adicionada à formulação nas concentrações finais de 0,1 e 0,20 % (m/v), observou-se a formação de precipitados, dificultando a redispersão do sistema em água, podendo ser responsável pelo elevado valor de desvio padrão verificado no diâmetro das partículas (Tabela 4). Os resultados de potencial zeta apresentados por essas duas concentrações indicam que a baixa estabilidade física do sistema, nessas concentrações, pode estar relacionada à reduzida repulsão eletrostática entre as partículas (potencial zeta < -20 mV). A adição de goma arábica em concentrações superiores a 0,2 % (m/v) induziu ao aumento do potencial zeta das partículas, devido à presença de grupos carboxila ionizados (COO<sup>-</sup>),



pondo conferir maior estabilidade eletrostática ao sistema nanoestruturado.

**Figura 16** – Efeito da goma arábica sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



A interação goma-nanopartícula parece apresentar concentração limite em torno de 1,0 % (m/v) de goma arábica (Figura 16), uma vez que pouca variação quanto ao tamanho e potencial zeta e uma redução estatisticamente significativa do índice de polidispersão de sistema (Tabela 4). Para tanto a formulação contendo uma concentração final de 1,00 % (m/v) do polissacarídeo será utilizada nos ensaios posteriores e codificada como NZ-GA.

#### 4.1.2.2.2 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188

Na Tabela 5, pode-se observar que a adição de goma arábica à suspensão de nanopartículas, preparadas com tensoativo, resultou em uma variação no diâmetro das partículas de 128,37 a 728,40 nm. As formulações preparadas com adição de goma arábica nas concentrações finais de 0,1 e 0,2 % (m/v) apresentaram formação de agregados, implicando na elevação do PDI e no tamanho das partículas, sugerindo a formação de um sistema polidisperso.

**Tabela 5** - Efeito da concentração de goma arábica sobre as propriedades físico-químicas das  $NZ_k$  ( $n=3$ ).

<b>Concentração de goma arábica (% m/v)</b>	<b>Diâmetro médio ± D.P. (nm)</b>	<b>PDI médio ± D.P.</b>	<b>Potencial zeta médio ± D.P. (mV)</b>
<b>0,00</b>	128,37 ± 4,98 <sup>a</sup>	0,122 ± 0,017 <sup>a</sup>	28,2 ± 4,8 <sup>a</sup>
<b>0,05</b>	321,73 ± 27,68 <sup>a</sup>	0,313 ± 0,034 <sup>a</sup>	-6,1 ± 3,8 <sup>b</sup>
<b>0,10</b>	293,59 ± 250,73 <sup>a</sup>	1,000 ± 0,001 <sup>b</sup>	-18,6 ± 3,1 <sup>c</sup>
<b>0,20</b>	728,40 ± 515,06 <sup>b</sup>	0,695 ± 0,286 <sup>b</sup>	-23,1 ± 5,3 <sup>c,d</sup>
<b>0,50</b>	172,20 ± 15,00 <sup>a</sup>	0,375 ± 0,047 <sup>a</sup>	-29,2 ± 1,3 <sup>d</sup>
<b>1,00</b>	186,33 ± 8,66 <sup>a</sup>	0,114 ± 0,030 <sup>a</sup>	-28,3 ± 0,8 <sup>d</sup>
<b>2,00</b>	181,03 ± 10,14 <sup>a</sup>	0,145 ± 0,018 <sup>a</sup>	-27,4 ± 2,0 <sup>d</sup>

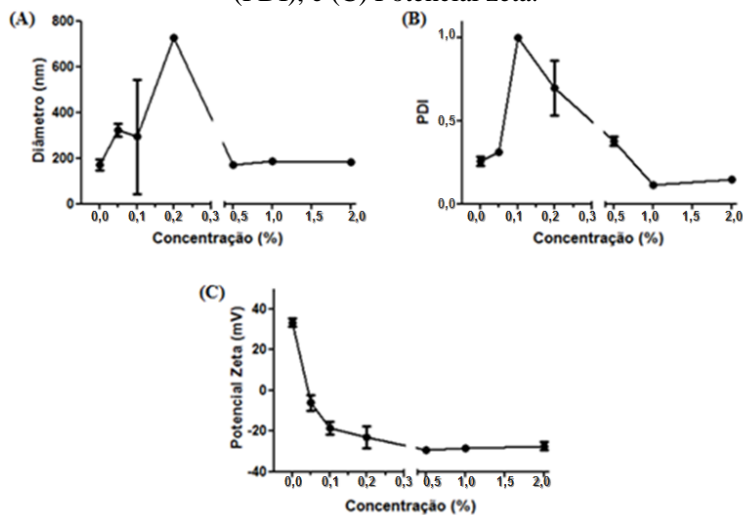
\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.

ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

A interação das nanopartículas, preparadas na presença de Kolliphor P188, com a goma arábica apresentou em um primeiro momento uma redução do potencial zeta de 28,2 para -6,1 mV quando uma concentração 0,05 % (m/v) é alcançada. A proximidade do potencial zeta nesta concentração a 0 mV confere baixa repulsão eletrostática entre as partículas, implicando em pouca estabilidade física ao sistema. A adição continuada de polissacarídeo induz uma elevação das cargas negativas devido à presença de grupos carboxílicos da goma e aumento do potencial zeta até -29,2 mV.

Apesar de não haver diferenças significativas estatisticamente entre as concentrações de 0,5 e 1,0 % (m/v) de goma arábica, observa-se uma tendência à redução do PDI a medida que a concentração aumenta. Sendo assim, a formulação preparada com concentração final de 1,0 % (m/v) de goma arábica foi considerada ideal e será utilizada nos ensaios posteriores (referenciada como  $NZ_k$ -GA).

**Figura 17** – Efeito da goma arábica sobre as propriedades físico-químicas das  $NZ_k$ : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



#### 4.1.2.3 Quitosana de alta massa molar (QAMM)

##### 4.1.2.3.1 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188

As nanopartículas complexadas com QAMM apresentaram uma variação no diâmetro de 120,40 a 169,97 nm. Pode-se observar uma redução no tamanho das partículas com adição inicial de QAMM, evidenciando a interação eletrostática entre as NZs, carregadas negativamente, e as moléculas de quitosana, de carga positiva. Em concentrações superiores a 0,050 % (m/v) do polissacarídeo, um aumento no tamanho de partícula pode ser observado, provavelmente relacionado à deposição superficial da quitosana. Estes resultados corroboram com Luo e colaboradores (2011), onde se constatou a redução do diâmetro hidrodinâmico com a adição de quitosana em pequenas concentrações, seguido de um aumento no tamanho de partícula com a elevação da concentração do polissacarídeo, evidenciando a interação da zeína com a quitosana.

**Tabela 6** - Efeito da concentração da quitosana de alta massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ ).

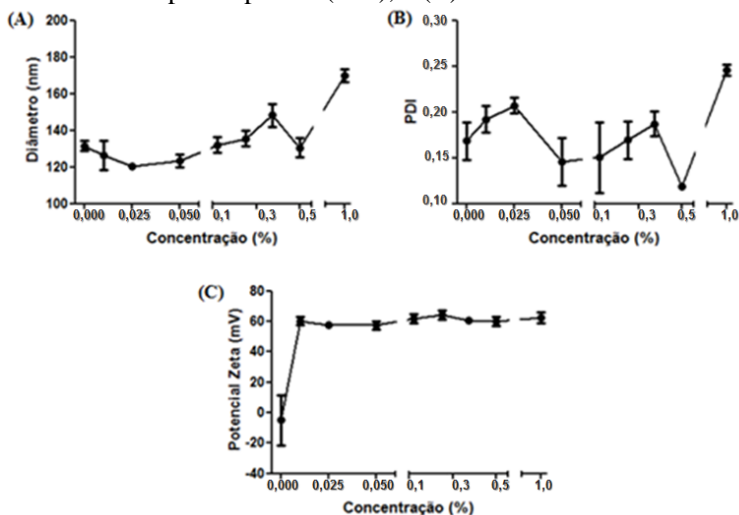
Concentração de QAMM (% <i>, m/v</i> )	Diâmetro médio $\pm$ D.P. (nm)	PDI médio $\pm$ D.P.	Potencial zeta médio $\pm$ D.P. (mV)
<b>0,000</b>	131,53 $\pm$ 2,55 <sup>a,b</sup>	0,168 $\pm$ 0,036 <sup>a</sup>	-5,0 $\pm$ 16,3 <sup>a</sup>
<b>0,010</b>	126,17 $\pm$ 8,08 <sup>a,b</sup>	0,195 $\pm$ 0,099 <sup>a</sup>	48,5 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>
<b>0,025</b>	120,40 $\pm$ 1,83 <sup>b</sup>	0,199 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	50,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
<b>0,050</b>	123,43 $\pm$ 3,39 <sup>a,b</sup>	0,176 $\pm$ 0,047 <sup>a</sup>	54,7 $\pm$ 7,9 <sup>b</sup>
<b>0,125</b>	132,00 $\pm$ 4,40 <sup>a,b</sup>	0,150 $\pm$ 0,049 <sup>a</sup>	52,7 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>
<b>0,250</b>	135,42 $\pm$ 4,29 <sup>a,c</sup>	0,175 $\pm$ 0,022 <sup>a</sup>	55,2 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>
<b>0,375</b>	148,10 $\pm$ 6,39 <sup>c,d</sup>	0,234 $\pm$ 0,047 <sup>a</sup>	56,0 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>
<b>0,500</b>	130,47 $\pm$ 5,24 <sup>a,b</sup>	0,219 $\pm$ 0,036 <sup>a</sup>	57,2 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>
<b>1,000</b>	169,97 $\pm$ 3,40 <sup>e</sup>	0,261 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	64,4 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>

\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.  
ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

A interação ainda pode ser caracterizada pelo aumento do potencial zeta de -5,0 a 64,4 mV à medida que o polissacarídeo é adicionado. Dentre as concentrações de quitosana utilizadas, não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos valores do potencial zeta.

Dentre as concentrações avaliadas, destaca-se a formulação preparada com teor final de 0,025 % (m/v) de QAMM, apresentando menor diâmetro hidrodinâmico. Esta formulação demonstrou adequada reprodutibilidade, devido a seus reduzidos valores de desvios padrão, e potencial zeta elevado, sugerindo uma maior estabilidade física ao sistema. Esta formulação será utilizada para estudos posteriores e referenciada como NZ-QAMM.

**Figura 18** – Efeito da quitosana de alta massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



#### 4.1.2.3.2 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188

O sistema formado pela interação de NZ<sub>K</sub> e QAMM apresentou diâmetro entre 128,37 e 170,63 nm, PDI de 0,132 a 0,257 e o potencial zeta variou de 28,2 a 68,2 mV. A Tabela 7 demonstra que não houve redução inicial do diâmetro das partículas com adição de QAMM, isso pode estar relacionado com um possível impedimento estérico do tensoativo, presente na superfície da partícula, somado à elevada massa molar do polissacarídeo, dificultando a interação entre a QAMM e as nanopartículas.

O tamanho das partículas não foi afetado significativamente até a concentração de 0,5 % (m/v) do polissacarídeo. Em concentração igual ou superior a 0,375 % (m/v), o sistema passou a adotar um comportamento polidisperso, possivelmente devido ao excesso de moléculas de quitosana.

**Tabela 7** - Efeito da concentração da quitosana de alta massa molar sobre as propriedades físico-químicas das  $NZ_k$  ( $n=3$ ).

Concentração de QAMM (% m/v)	Diâmetro médio $\pm$ D.P. (nm)	PDI médio $\pm$ D.P.	Potencial zeta médio $\pm$ D.P. (mV)
<b>0,000</b>	128,37 $\pm$ 4,98 <sup>a</sup>	0,122 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>	28,2 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>
<b>0,010</b>	140,03 $\pm$ 3,11 <sup>a,b</sup>	0,132 $\pm$ 0,020 <sup>a,b</sup>	59,4 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>
<b>0,025</b>	137,00 $\pm$ 4,61 <sup>a,b</sup>	0,187 $\pm$ 0,058 <sup>a,b,c,d</sup>	57,9 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>
<b>0,050</b>	140,70 $\pm$ 2,91 <sup>a,b</sup>	0,133 $\pm$ 0,005 <sup>a,b</sup>	60,7 $\pm$ 5,0 <sup>b</sup>
<b>0,125</b>	135,70 $\pm$ 2,86 <sup>a,b</sup>	0,152 $\pm$ 0,010 <sup>a,b,c</sup>	63,9 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>
<b>0,250</b>	154,17 $\pm$ 6,24 <sup>b,c</sup>	0,179 $\pm$ 0,018 <sup>a,b,c</sup>	68,2 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
<b>0,375</b>	137,50 $\pm$ 1,48 <sup>a,b</sup>	0,218 $\pm$ 0,033 <sup>c,d</sup>	67,1 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>
<b>0,500</b>	165,80 $\pm$ 16,13 <sup>c</sup>	0,201 $\pm$ 0,020 <sup>b,d</sup>	66,3 $\pm$ 12,1 <sup>b</sup>
<b>1,000</b>	170,63 $\pm$ 9,87 <sup>c</sup>	0,257 $\pm$ 0,026 <sup>d</sup>	63,8 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>

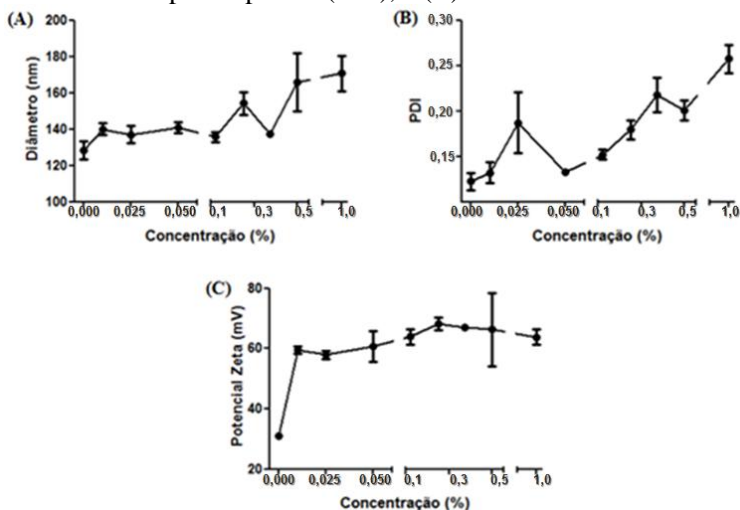
\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.

ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Como descrito anteriormente, a quitosana interagiu com as nanopartículas de zeína, em um primeiro momento, elevando significativamente o potencial zeta do sistema. O aumento da concentração do polissacarídeo não alterou significativamente a carga superficial das nanopartículas, permanecendo em torno de 60 mV (Figura 15C).

Dentre as concentrações de QAMM avaliadas com nanopartículas, formuladas na presença de Kolliphor P188, a concentração de 0,0250 % (m/v) apresentou propriedades físico-químicas adequadas, e em concentração reduzida de quitosana. Para tanto, esta formulação foi selecionada para as análises posteriores e codificada como  $NZ_k$ -QAMM.

**Figura 19** – Efeito da quitosana de alta massa molar sobre as propriedades físico-químicas das  $NZ_k$ : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



#### 4.1.2.4 Quitosana de média massa molar (QMMM)

##### 4.1.2.4.1 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de zeína formadas pela interação com QMMM, na ausência de tensoativo, variou de 114,30 a 148,67 nm. PDI de 0,119 a 0,246 e potencial de -5,0 a 64,3 mV. Não houve diferença significativa quanto ao tamanho e PDI das nanopartículas contendo quitosana (Tabela 8). No entanto, o perfil de interação inicial seguiu uma tendência de comportamento similar ao observado nas interações de QAMM com as nanopartículas formadas sem tensoativo. Redução característica do diâmetro, em concentrações iniciais de quitosana, e posterior aumento do tamanho com a elevação da concentração de quitosana.

**Tabela 8** - Efeito da concentração da quitosana de média massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ ).

Concentração de QMMM (% m/v)	Diâmetro médio $\pm$ D.P. (nm)	PDI médio $\pm$ D.P.	Potencial zeta médio $\pm$ D.P. (mV)
<b>0,000</b>	131,53 $\pm$ 2,55 <sup>a,b</sup>	0,168 $\pm$ 0,036 <sup>a,b</sup>	-5,0 $\pm$ 16,3 <sup>a</sup>
<b>0,010</b>	121,67 $\pm$ 3,86 <sup>a,b</sup>	0,192 $\pm$ 0,025 <sup>a,b</sup>	60,2 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
<b>0,025</b>	141,93 $\pm$ 6,60 <sup>a,b</sup>	0,207 $\pm$ 0,014 <sup>a,b</sup>	57,5 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>
<b>0,050</b>	117,33 $\pm$ 6,28 <sup>a</sup>	0,146 $\pm$ 0,045 <sup>a</sup>	57,5 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
<b>0,125</b>	131,30 $\pm$ 28,05 <sup>a,b</sup>	0,150 $\pm$ 0,067 <sup>a,b</sup>	61,7 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>
<b>0,250</b>	127,63 $\pm$ 9,72 <sup>a,b</sup>	0,169 $\pm$ 0,035 <sup>a,b</sup>	64,3 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>
<b>0,375</b>	127,47 $\pm$ 0,95 <sup>a,b</sup>	0,187 $\pm$ 0,023 <sup>a,b</sup>	60,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
<b>0,500</b>	114,30 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>	0,119 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	59,8 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>
<b>1,000</b>	148,67 $\pm$ 7,24 <sup>b</sup>	0,246 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>	62,5 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>

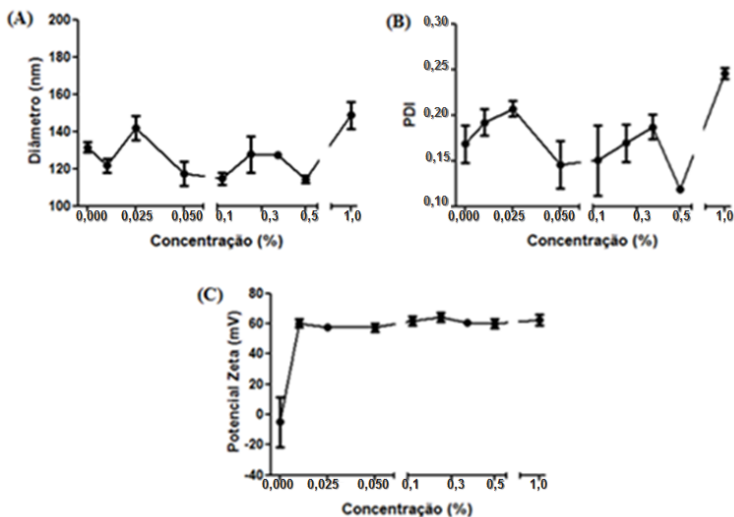
\* Sendo D.P. referente ao desvio padrão.  
ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

O menor diâmetro hidrodinâmico observado nas interações com QMMM, em relação à QAMM, pode estar relacionado à sua menor massa molar e consequente menor tamanho de cadeia polimérica. Houve aumento significativo do potencial zeta após interação de quitosana com as nanopartículas de zeína. Este aumento está relacionado à protonação dos grupamentos amino da quitosana (pKa 6,5).

Dentre as concentrações de QMMM complexadas com nanopartículas, formuladas na ausência de tensoativo, 0,125 % (m/v) apresentou propriedades físico-químicas adequadas, e em concentração intermediária de quitosana. Para tanto, esta formulação foi selecionada para as análises posteriores e serão citadas como NZ-QMMM.



**Figura 20** – Efeito da quitosana de média massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



#### 4.1.2.4.2 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188

As nanopartículas apresentaram diâmetro de 126,73 a 184,67 nm. O mesmo efeito característico de redução inicial do diâmetro do sistema, em função da interação com polissacarídeo, foi observado. Isso pode estar associado à menor massa molar da quitosana causando maior mobilidade da cadeia polissacarídica, e elevando seu potencial de interação com as nanopartículas de zeína. Houve aumento do tamanho de partícula de acordo com a concentração de QMMM em concentração igual ou superior a 0,050 % (m/v).

O sistema apresentou característica monodispersa, com PDI de 0,149 a 0,247, e com potencial zeta oscilando de 28,2 a 68,0 mV. A adição de quitosana conferiu elevada carga superficial ao sistema, promovendo uma maior estabilidade física ao mesmo.

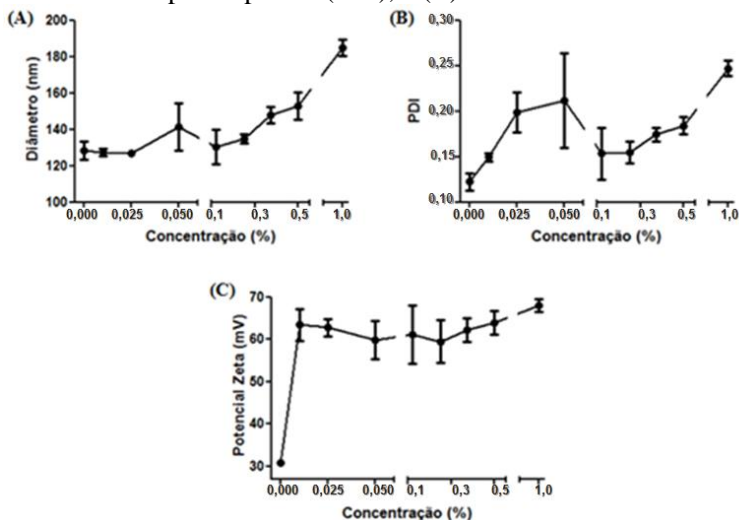
**Tabela 9** - Efeito da concentração da quitosana de média massa molar sobre as propriedades físico-químicas das  $NZ_k$  ( $n=3$ ).

Concentração de QMMM (% m/v)	Diâmetro médio $\pm$ D.P. (nm)	PDI médio $\pm$ D.P.	Potencial zeta médio $\pm$ D.P. (mV)
<b>0,000</b>	128,37 $\pm$ 4,98 <sup>a</sup>	0,122 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>	28,2 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>
<b>0,010</b>	127,40 $\pm$ 2,17 <sup>a</sup>	0,149 $\pm$ 0,007 <sup>a,b</sup>	63,4 $\pm$ 3,8 <sup>b</sup>
<b>0,025</b>	126,73 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	0,198 $\pm$ 0,038 <sup>a,b</sup>	62,7 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
<b>0,050</b>	141,30 $\pm$ 13,02 <sup>a,b,c</sup>	0,212 $\pm$ 0,091 <sup>a,b</sup>	59,7 $\pm$ 4,6 <sup>b</sup>
<b>0,125</b>	130,40 $\pm$ 9,62 <sup>a,b</sup>	0,153 $\pm$ 0,049 <sup>a,b</sup>	61,0 $\pm$ 6,9 <sup>b</sup>
<b>0,250</b>	134,90 $\pm$ 2,34 <sup>a,b,c</sup>	0,155 $\pm$ 0,021 <sup>a,b</sup>	59,5 $\pm$ 5,1 <sup>b</sup>
<b>0,375</b>	147,87 $\pm$ 4,62 <sup>a,b,c</sup>	0,174 $\pm$ 0,013 <sup>a,b</sup>	62,1 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
<b>0,500</b>	152,83 $\pm$ 7,42 <sup>c</sup>	0,184 $\pm$ 0,017 <sup>a,b</sup>	64,0 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
<b>1,000</b>	184,67 $\pm$ 4,55 <sup>d</sup>	0,247 $\pm$ 0,014 <sup>b</sup>	68,0 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>

\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.  
ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Dentre as concentrações de QMMM complexadas com  $NZ_K$ , 0,125 % (m/v) apresentou propriedades físico-químicas adequadas, e em concentração intermediária de quitosana. Para tanto, esta formulação foi selecionada para as análises posteriores e será referenciada como  $NZ_K$ -QMMM.

**Figura 21** – Efeito da quitosana de média massa molar sobre as propriedades físico-químicas das  $NZ_k$ : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



#### 4.1.2.5 Quitosana de baixa massa molar (QBMM)

##### 4.1.2.5.1 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188

As nanopartículas, formuladas na ausência de tensoativo, e obtidas através da interação com QBMM, apresentaram diâmetro de 131,53 a 154,90 nm, PDI de 0,143 a 0,187 e potencial zeta de -5,0 a 61,0 mV. Não foi observada diferença estatisticamente significativa no diâmetro das nanopartículas em função da concentração de quitosana (Tabela 10). Porém observa-se tendência ao aumento de tamanho com a adição do polissacarídeo. As concentrações avaliadas para a interação com QBMM foram inferiores em função da menor massa molar do polissacarídeo quando em comparação com as de QAMM e QMMM. A distribuição granulométrica das nanopartículas apresentou perfil monodisperso, com PDI inferior a 0,2.

**Tabela 10** - Efeito da concentração da quitosana de baixa massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ ( $n=3$ ).

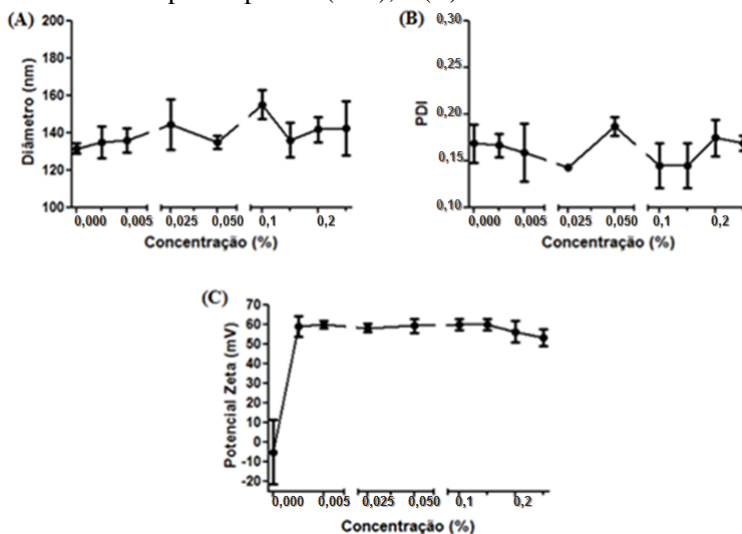
Concentração de QBMM (% <i>, m/v</i> )	Diâmetro médio $\pm$ D.P. (nm)	PDI médio $\pm$ D.P.	Potencial zeta médio $\pm$ D.P. (mV)
<b>0,000</b>	131,53 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	0,168 $\pm$ 0,036 <sup>a</sup>	-5,0 $\pm$ 16,3 <sup>a</sup>
<b>2,5x10<sup>-3</sup></b>	134,87 $\pm$ 8,34 <sup>a</sup>	0,146 $\pm$ 0,056 <sup>a</sup>	61,0 $\pm$ 6,3 <sup>b</sup>
<b>5,0x10<sup>-3</sup></b>	135,83 $\pm$ 6,69 <sup>a</sup>	0,166 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup>	58,9 $\pm$ 5,3 <sup>b</sup>
<b>2,5x10<sup>-2</sup></b>	144,30 $\pm$ 13,6 <sup>a</sup>	0,159 $\pm$ 0,054 <sup>a</sup>	59,8 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
<b>5,0x10<sup>-2</sup></b>	134,73 $\pm$ 3,40 <sup>a</sup>	0,143 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	58,2 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
<b>1,0x10<sup>-1</sup></b>	154,90 $\pm$ 7,81 <sup>a</sup>	0,187 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>	59,2 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>
<b>1,5x10<sup>-1</sup></b>	136,03 $\pm$ 9,32 <sup>a</sup>	0,144 $\pm$ 0,041 <sup>a</sup>	59,7 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
<b>2,0x10<sup>-1</sup></b>	141,60 $\pm$ 6,87 <sup>a</sup>	0,174 $\pm$ 0,034 <sup>a</sup>	56,3 $\pm$ 5,6 <sup>b</sup>
<b>2,5x10<sup>-1</sup></b>	142,37 $\pm$ 14,58 <sup>a</sup>	0,169 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup>	53,1 $\pm$ 4,3 <sup>b</sup>

\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.

ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Para todas as concentrações avaliadas, a quitosana conferiu elevada carga superficial aos sistemas formados, propiciando maior estabilidade física às nanopartículas de zeína. Para tanto, a formulação preparada através da interação com QBMM na concentração de  $2,5 \times 10^{-3}$  % (m/v) foi selecionada para realização dos ensaios subsequentes e será citada como NZ-QBMM.

**Figura 22** – Efeito da quitosana de baixa massa molar sobre as propriedades físico-químicas das NZ: (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



#### 4.1.2.5.2 Interação com nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188

O sistema formado pela interação de nanopartículas de zeína, formuladas na presença de Kolliphor P188, e QBMM apresentou diâmetro entre 128,37 a 149,97 nm, PDI de 0,122 a 0,172 e o potencial zeta variou de 28,2 a 59,2 mV (Tabela 11). Com a adição de quitosana em concentração final de  $2,5 \times 10^{-3}$  % (m/v), existe aumento estatisticamente significativo no tamanho das partículas, este fenômeno pode ocorrer em função da interação do polissacarídeo com a superfície das nanopartículas. Com a adição de concentrações superiores de quitosana, o diâmetro hidrodinâmico do sistema permanece constante. Não foi observada variação significativa no índice de polidispersão, e o mesmo se mostrou monomodal.

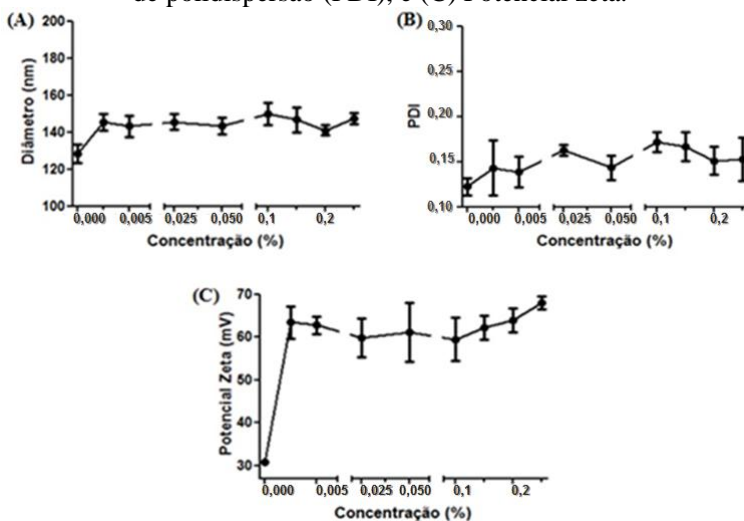
**Tabela 11** - Efeito da concentração da quitosana de baixa massa molar sobre as propriedades físico-químicas das  $NZ_k$  ( $n=3$ ).

Concentração de QBMM (% <sub>v</sub> , m/v)	Diâmetro médio ± D.P. (nm)	PDI médio ± D.P.	Potencial zeta médio ± D.P. (mV)
<b>0,000</b>	128,37 ± 4,98 <sup>a</sup>	0,122 ± 0,017 <sup>a</sup>	28,2 ± 4,8 <sup>a</sup>
<b>2,5x10<sup>-3</sup></b>	145,40 ± 4,33 <sup>b</sup>	0,143 ± 0,052 <sup>a</sup>	54,7 ± 1,5 <sup>b</sup>
<b>5,0x10<sup>-3</sup></b>	143,1 ± 5,93 <sup>b</sup>	0,139 ± 0,030 <sup>a</sup>	59,2 ± 5,7 <sup>b</sup>
<b>2,5x10<sup>-2</sup></b>	145,47 ± 4,21 <sup>b</sup>	0,163 ± 0,011 <sup>a</sup>	58,5 ± 1,3 <sup>b</sup>
<b>5,0x10<sup>-2</sup></b>	143,20 ± 4,42 <sup>b</sup>	0,143 ± 0,024 <sup>a</sup>	58,6 ± 4,8 <sup>b</sup>
<b>1,0x10<sup>-1</sup></b>	149,97 ± 5,92 <sup>b</sup>	0,172 ± 0,018 <sup>a</sup>	52,0 ± 5,7 <sup>b</sup>
<b>1,5x10<sup>-1</sup></b>	146,63 ± 6,81 <sup>b</sup>	0,167 ± 0,028 <sup>a</sup>	50,4 ± 5,2 <sup>b</sup>
<b>2,0x10<sup>-1</sup></b>	141,07 ± 2,91 <sup>a,b</sup>	0,151 ± 0,026 <sup>a</sup>	59,2 ± 2,3 <sup>b</sup>
<b>2,5x10<sup>-1</sup></b>	147,30 ± 3,21 <sup>b</sup>	0,153 ± 0,042 <sup>a</sup>	55,1 ± 4,6 <sup>b</sup>

\*Sendo D.P. referente ao desvio padrão.  
ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Assim como para as partículas complexadas com QAMM e QMMM, a QBMM conferiu elevada carga superficial aos sistemas formados, propiciando maior estabilidade física às nanopartículas de zeína. A concentração de  $2,5 \times 10^{-3}$  % (m/v) de QBMM foi selecionada para realização dos ensaios subsequentes, por apresentar características físico-químicas adequadas e na menor concentração avaliada do polissacarídeo (Figura 23). Este sistema será utilizado nos estudos posteriores e será referenciado como  $NZ_k$ -QBMM.

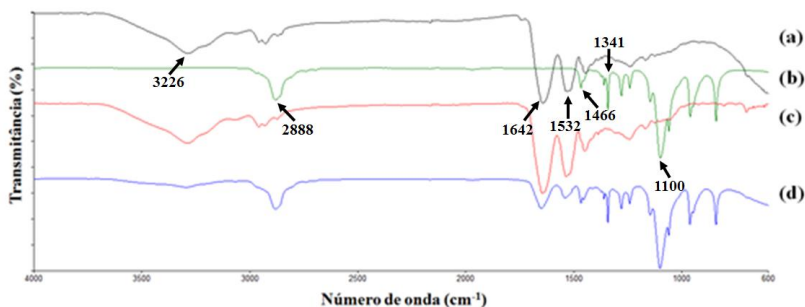
**Figura 23** – Efeito da quitosana de baixa massa molar sobre as propriedades físico-químicas das  $NZ_k$ : (A) Diâmetro médio, (B) Índice de polidispersão (PDI), e (C) Potencial zeta.



#### 4.1.3 Espectroscopia no infravermelho

A Figura 24 apresenta o espectro no infravermelho da zeína, Kolliphor P188, e as nanopartículas de zeína preparadas na ausência e na presença de Kolliphor 188. Pode-se observar que as nanopartículas de zeína mantêm as bandas características das matérias-primas. A zeína e as nanopartículas de zeína apresentam bandas referentes ao estiramento das hidroxilas em  $3226\text{ cm}^{-1}$ , e características dos grupamentos amida em  $1642$  e  $1532\text{ cm}^{-1}$  (C=O e C–N, respectivamente) (LUO et al., 2011).

**Figura 24** – Espectro de infravermelho da: (a) zeína; (b) Kolliphor P188; (c) NZ; e (d) NZ<sub>K</sub>.



O Kolliphor é um polímero tribloco composto de um bloco de óxido de polipropileno ligado a blocos de óxido de poliestireno nas extremidades (PEO-PPO-PEO). O tensoativo apresenta bandas características de estiramento C–O em  $1100\text{ cm}^{-1}$ , e ligações C–H em  $2880\text{ cm}^{-1}$ , além de bandas em  $1466$  e  $1341\text{ cm}^{-1}$  referentes às ligações  $\text{sp}^3$  de C–H (LIAO et al., 2015). Estas bandas características (Figura 24B) do tensoativo Kolliphor P188 são conservadas nas nanopartículas de zeína preparadas com o tensoativo (NZ<sub>K</sub>) (Figura 24D).

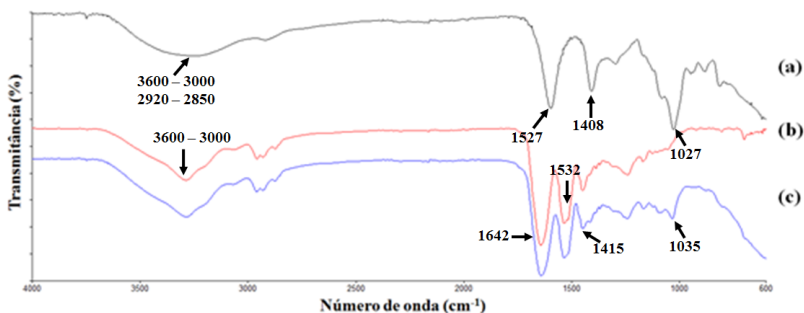
#### 4.1.3.1 Alginato de sódio

##### 4.1.3.1.1 Avaliação da interação com as nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188

Na Figura 25, pode-se observar o espectro de infravermelho do alginato de sódio (AS), das NZs, e de sua mistura com o alginato de sódio (NZ-AS). O polissacarídeo apresenta bandas características de estiramento de hidroxila (O–H), e de ligações C–H alifáticas em números de onda de  $3000\text{--}3600$  e  $2920\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Apresenta, também, vibrações em números de onda de  $1597$  e  $1408\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento assimétrico e simétrico do íon carboxilato, respectivamente, além de pico em  $1027\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação C–O–C do anel piranosil (DAEMI; BARIKANI, 2012; EL-GHAFFAR et al., 2012). As NZs apresentaram picos entre  $3600$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , característicos de estiramento de ligações O–H, em  $1642$  e  $1532\text{ cm}^{-1}$ , relativos aos estiramentos das ligações C=O e C–N dos grupamentos amida, respectivamente (LUO et al., 2011).



**Figura 25** – Avaliação da interação entre NZ com alginato de sódio, onde; (a) é o espectro do alginato de sódio; (b) das NZs; e (c) das NZ–ASs.

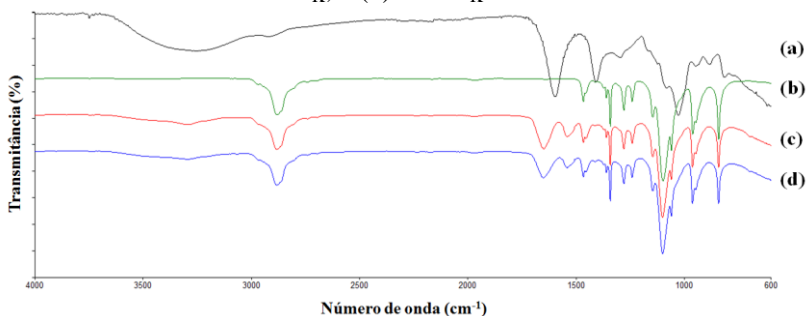


No entanto, pode-se observar no espectro obtido das NZ–AS que uma pequena alteração foi verificada quanto ao pico relacionado ao estiramento do ácido carboxílico do alginato de sódio, de  $1408\text{ cm}^{-1}$  para  $1415\text{ cm}^{-1}$ , e uma leve alteração de  $1027$  para  $1035\text{ cm}^{-1}$ , característico de estiramento C–O de grupamento alcóxila do alginato de sódio. Adicionalmente, a sobreposição das bandas em  $1527\text{ cm}^{-1}$ , referente ao grupamento ácido carboxílico do alginato de sódio, e da banda característica do estiramento C=O da zeína, em  $1642\text{ cm}^{-1}$ , impossibilita a verificação de uma possível interação eletrostática entre as nanopartículas e o polissacarídeo através do deslocamento do comprimento de onda. Os resultados obtidos devido aos deslocamentos das bandas características do polissacarídeo sugerem uma interação por ligações de hidrogênio entre os materiais avaliados.

#### 4.1.3.1.2 Avaliação da interação com as nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188

Na Figura 26, observa-se que nenhuma interação pode ser observada através da espectroscopia de infravermelho, uma vez que somente as bandas referentes ao tensoativo Kolliphor P188 e à zeína podem ser visualizadas no espectro das NZ<sub>K</sub>, que foram incubadas com o alginato de sódio.

**Figura 26** – Avaliação da interação entre  $NZ_K$  com alginato de sódio, onde; (a) é o espectro do alginato de sódio; (b) Kolliphor P188; (c) da  $NZ_K$ ; e (d) da  $NZ_K$ -AS.

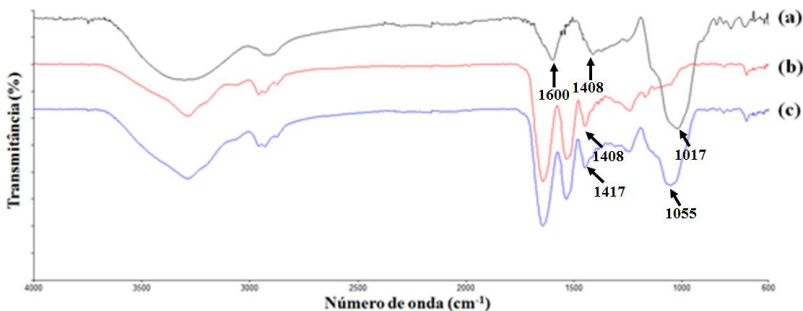


#### 4.1.3.2 Goma arábica

##### 4.1.3.2.1 Avaliação da interação com as nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188

Na Figura 27, podem-se observar bandas intensas em 1600 e 1400  $\text{cm}^{-1}$  características dos estiramentos assimétricos e simétricos da carboxila presente na goma arábica, respectivamente, além da banda relativa a estiramentos C–O–C em número de onda em 1017  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 22A) (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010). A interação entre as NZ e a goma arábica resultou na alteração das bandas referentes ao estiramento C–O–C para o número de onda 1055  $\text{cm}^{-1}$ , e da banda referente ao estiramento simétrico da carboxila para 1417  $\text{cm}^{-1}$ . Estas alterações podem estar relacionadas à interação entre a goma arábica e as nanopartículas de zeína preparadas na ausência de tensoativo.

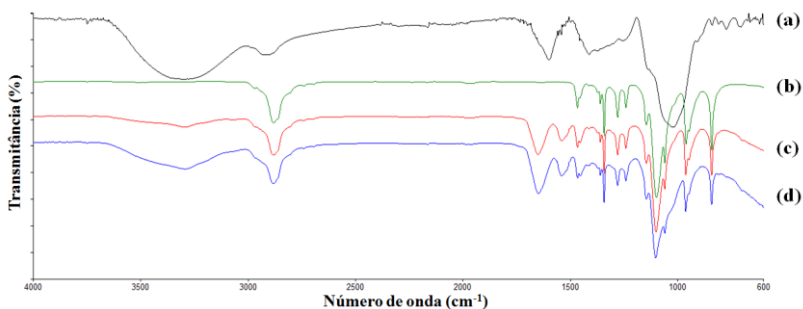
**Figura 27** – Avaliação da interação entre NZ com goma arábica, onde; (a) é o espectro da goma arábica; (b) das NZ; e (c) da NZ-GA.



#### 4.1.3.2.2 Avaliação da interação com as nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188

Na Figura 28, pode-se observar que o espectro referente às NZ<sub>K</sub> misturadas com goma arábica corresponde a uma soma das bandas referentes ao tensoativo e à nanopartícula de zeína. Nenhuma alteração no número de onda foi observada, logo a interação entre as nanopartículas e o polissacarídeo não pôde ser evidenciada pela espectroscopia no infravermelho.

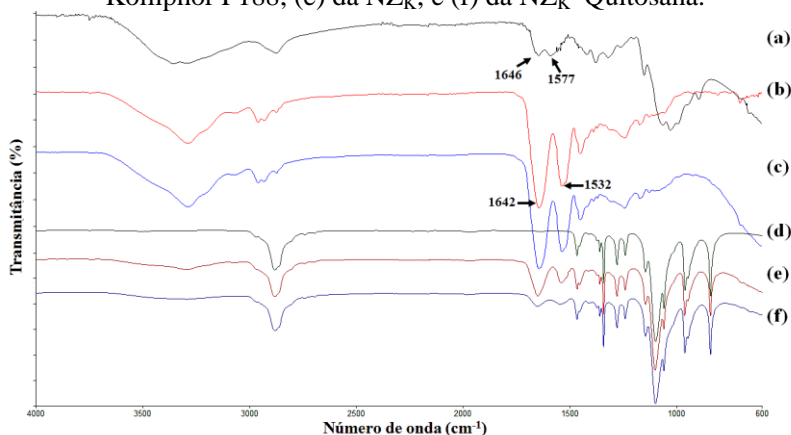
**Figura 28** – Avaliação da interação entre NZ<sub>K</sub> com goma arábica, onde; (a) é o espectro da goma arábica; (b) Kolliphor P188; (c) das NZ<sub>K</sub>; e (d) da NZ<sub>K</sub>-GA.



## 4.1.3.3 Quitosana

Na Figura 29, pode-se observar bandas entre  $3600$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  características de hidroxilas, sobrepondo bandas de estiramento características de amida, relacionadas à ligação  $\text{C}=\text{O}$  das unidades acetiladas da quitosana, e bandas em  $1646$  e em  $1577\text{ cm}^{-1}$  relacionadas às ligações  $\text{N}-\text{H}$  da quitosana (TAN et al., 2016). No espectro referente à  $\text{NZ}$  e da  $\text{NZ}_K$  misturadas com as quitosanas, independentemente da massa molar do polissacarídeo, nenhuma alteração no número de onda foi observada, logo a interação entre as nanopartículas  $\text{NZ}$  e  $\text{NZ}_K$  com os polissacarídeos  $\text{QAMM}$ ,  $\text{QMMM}$  e  $\text{QBMM}$  não puderam ser evidenciadas por espectroscopia no infravermelho. Adicionalmente, não existe diferença entre os espectros no infravermelho entre os polímeros  $\text{QAMM}$ ,  $\text{QMMM}$  e  $\text{QBMM}$ , uma vez que estes diferem unicamente quanto à massa molar, logo a Figura 24 representa a interação das nanopartículas  $\text{NZ}$  e  $\text{NZ}_K$  com as três variações de quitosana avaliadas neste estudo.

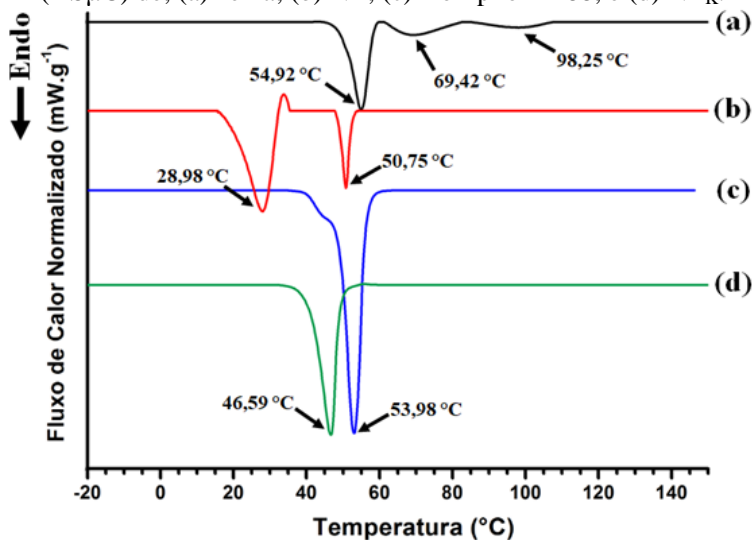
**Figura 29** – Avaliação da interação entre  $\text{NZ}$  e  $\text{NZ}_K$  com a quitosana, onde; (a) é o espectro da Quitosana; (b) da  $\text{NZ}$ ; (c) da  $\text{NZ}$ -Quitosana; (d) Kolliphor P188; (e) da  $\text{NZ}_K$ ; e (f) da  $\text{NZ}_K$ -Quitosana.



#### 4.1.4 Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DSμC)

Na Figura 30 pode-se observar os termogramas da zeína, Kolliphor P188, e das nanopartículas preparadas na ausência e na presença de tensoativo. A zeína apresenta um evento pouco pronunciado a 54,92 °C, com entalpia de 3,2 J.g<sup>-1</sup> (Tabela 12) enquanto as NZs exibem uma redução da temperatura e da entalpia de fusão, 50,75 °C e 1,2 J.g<sup>-1</sup>, respectivamente. O sistema nanoestruturado, provavelmente, se apresenta de forma menos estruturada que a zeína, uma vez que uma menor energia é necessária para que ocorra a fusão/desnaturação da proteína.

**Figura 30** – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DSμC) de: (a) zeína; (b) NZ; (c) Kolliphor P188; e (d) NZ<sub>K</sub>.



O Kolliphor P188 apresenta temperatura de fusão de 53,98 °C e entalpia de fusão de 136,8 J.g<sup>-1</sup>, é um polímero cristalino que funde em temperatura próxima à temperatura de fusão/desnaturação da zeína. As formulações NZ<sub>K</sub> apresentaram somente um evento endotérmico a 46,59 °C, com entalpia de fusão de 77,1 J.g<sup>-1</sup>. Uma possível interação entre a zeína e o Kolliphor P188 induz à redução da energia necessária para fusão do sistema nanoestruturado.

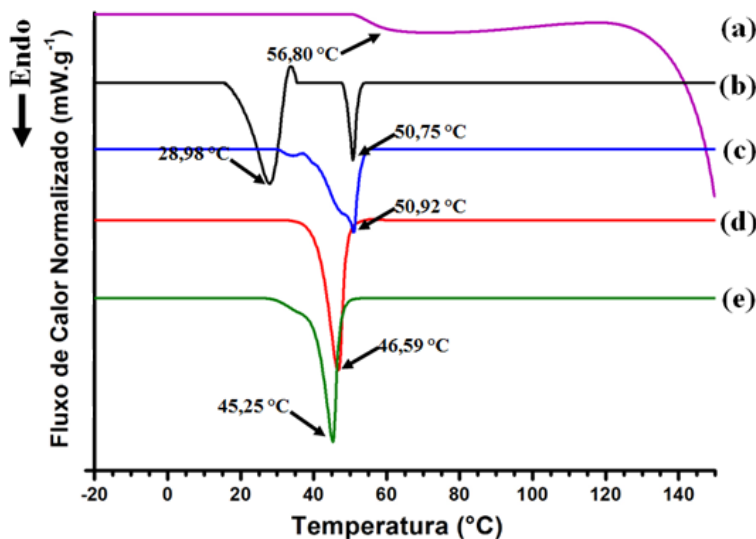
**Tabela 12** – Análise térmicas das matérias-primas e das nanopartículas de zeína.

Amostra	Evento 1		Evento 2		Evento 3	
	Temperatura (°C)	Entalpia (J.g <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Entalpia (J.g <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Entalpia (J.g <sup>-1</sup> )
Zeína	54,92	3,166	69,42	1,083	98,25	0,496
Kolliphor P188	53,09	136,832	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NZ	28,98	5,467	50,75	1,222	n.a.	n.a.
NZ <sub>K</sub>	46,59	77,075	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AS	56,80	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NZ-AS	50,92	2,774	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NZ <sub>K</sub> -AS	45,25	72,829	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
GA	23,17	n.a.	53,59	n.a.	n.a.	n.a.
NZ-GA	20,43	n.a.	51,09	3,230	109,76	100,330
NZ <sub>K</sub> -GA	42,25	65,109	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
QAMM	27,75	0,255	39,09 e 56,42	1,350	n.a.	n.a.
NZ-QAMM	38,65 e 47,09	3,022	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NZ <sub>K</sub> -QAMM	47,09	75,987	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
QMMM	27,59	0,282	41,78; 51,12 e 51,26	0,976	n.a.	n.a.
NZ-QMMM	39,04 e 50,92	2,369	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NZ <sub>K</sub> -QMMM	44,92	64,302	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
QBMM	27,42	0,270	39,50 e 55,42	1,248	n.a.	n.a.
NZ-QBMM	39,98 e 48,92	2,229	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NZ <sub>K</sub> -QBMM	46,92	77,743	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

#### 4.1.4.1 Alginato de sódio

Na Figura 31 observa-se que a incorporação de alginato de sódio às nanopartículas NZ e NZ<sub>K</sub> não alterou significativamente a temperatura dos eventos endotérmicos das respectivas formulações. O alginato de sódio apresenta um leve evento característico de transição vítrea (T<sub>g</sub>) próximo a 56,80 °C, não apresentando quaisquer outros eventos endo ou exotérmicos (LIN; YEH, 2004). Quando incubadas com o alginato de sódio, as formulações NZ-AS e NZ<sub>K</sub>-AS apresentaram uma leve alteração na temperatura do principal evento endotérmico. O pequeno aumento da temperatura do evento endotérmico para 50,92 °C entre as amostras NZ e NZ-AS, respectivamente, é pouco significativo para indicar interação entre o polissacarídeo e as nanopartículas. No entanto, verifica-se uma alteração do formato do pico característico, bem como um aumento da entalpia indicando uma possível interação entre os biomateriais. Por outro lado, houve uma leve redução da temperatura do evento endotérmico, de 46,59 °C para 45,25 °C, das formulações NZ<sub>K</sub> para NZ<sub>K</sub>-AS, respectivamente. A redução da temperatura, associada à redução da entalpia do evento endotérmico, evidenciam a interação entre as nanopartículas preparadas na presença do surfactante não-iônico e o alginato de sódio.

**Figura 31** – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) alginato de sódio; (b) NZ; (c) NZ-AS; (d) NZ<sub>K</sub>; e (e) NZ<sub>K</sub>-AS.

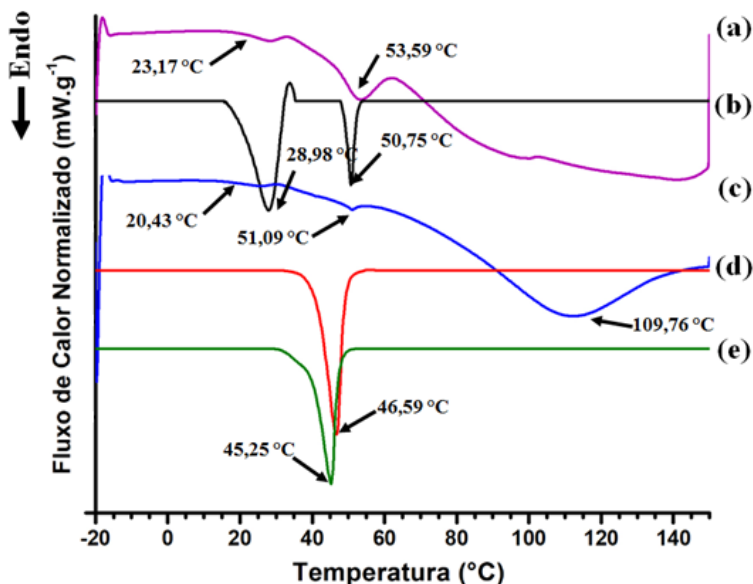


#### 4.1.4.2 Goma arábica

Na Figura 32 pode-se observar que a goma arábica apresenta uma alteração no perfil de fluxo de calor característico de perda de água, iniciando em 23,17 °C até aproximadamente 100 °C, apresentando um evento endotérmico em 53,59 °C (MOTHÉ; RAO, 2000). A incorporação do polissacarídeo às nanopartículas proporcionou leve alteração no segundo evento endotérmico de 50,75 °C para 51,09 °C nas amostras NZ e NZ-GA, respectivamente. Adicionalmente, na amostra NZ-GA, observa-se um discreto evento na temperatura de 20,43 °C. Por outro lado, quando analisadas as amostras NZ<sub>K</sub> e NZ<sub>K</sub>-GA, verifica-se que a interação entre o sistema nanoparticulado e o polissacarídeo induz a uma redução na temperatura do evento endotérmico principal de 46,59 °C para 45,25 °C, respectivamente.



**Figura 32** – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DSμC) de; (a) goma arábica; (b) NZ; (c) NZ–GA; (d) NZ<sub>K</sub>; e (e) NZ<sub>K</sub>–GA.

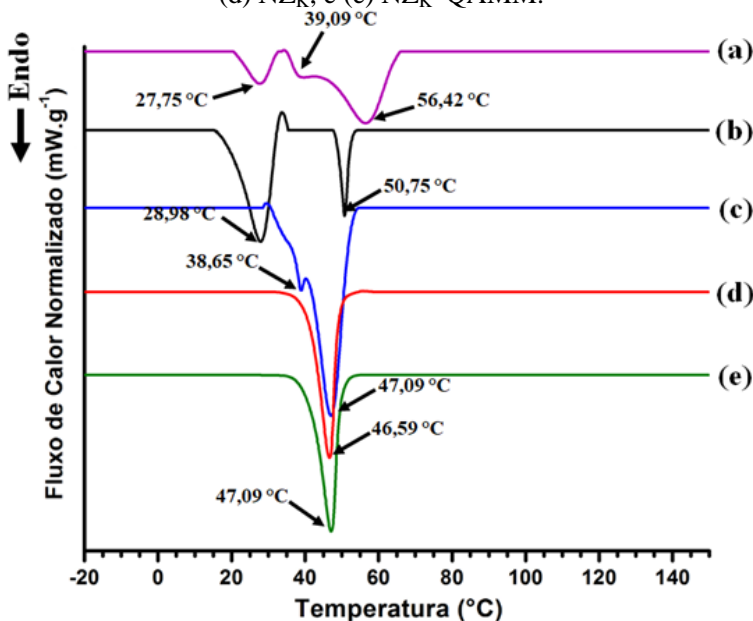


#### 4.1.4.3 Quitosana

##### 4.1.4.3.1 Quitosana de Alta Massa Molar

A quitosana de alta massa molar (Figura 33A) apresenta eventos endotérmicos em 27,75 °C, 39,09 °C e 56,42 °C, e a interação deste polissacarídeo com as nanopartículas proporcionou alterações na temperatura dos eventos endotérmicos. A temperatura do evento endotérmico da formulação NZ foi alterada de 50,75 °C para 47,09 °C nas NZ–QAMM com o surgimento de um pequeno evento em 38,65 °C, indicando interação entre o polissacarídeo e as nanopartículas. Quando avaliadas as NZ<sub>K</sub>, verifica-se que a temperatura do evento endotérmico apresentou sutil aumento de 46,59 °C para 47,09 °C nas amostras NZ<sub>K</sub>–QAMM.

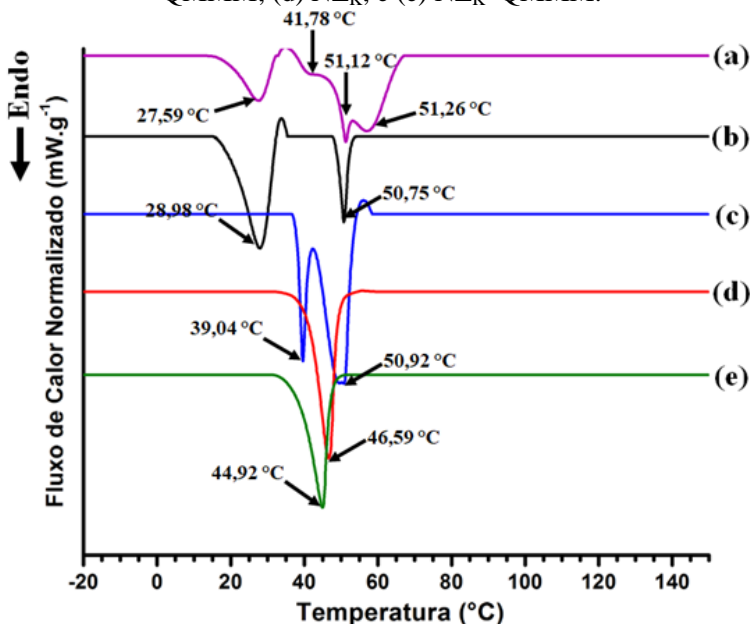
**Figura 33** – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) quitosana de alta massa molar; (b) NZ; (c) NZ-QAMM; (d) NZ<sub>K</sub>; e (e) NZ<sub>K</sub>-QAMM.



#### 4.1.4.3.2 Quitosana de Média Massa Molar

Na Figura 34, observa-se que a interação entre a quitosana de média massa molar e as nanopartículas induziu a alteração do perfil de fluxo de calor em função da temperatura. Verificou-se que o evento endotérmico da NZ em 50,75 °C foi alterado para dois eventos endotérmicos, o primeiro em 39,04 °C e o segundo em 50,92 °C na amostra NZ-QMMM. A interação entre o polissacarídeo e as nanopartículas contendo Kolliphor P188 proporcionou uma redução da temperatura do evento endotérmico de 46,59 °C para 44,92 °C nas amostras NZ<sub>K</sub> e NZ<sub>K</sub>-QMMM, respectivamente. As alterações nos eventos endotérmicos das amostras confirmam a interação entre a quitosana de média massa molar e as nanopartículas.

**Figura 34** – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) quitosana de média massa molar; (b) NZ; (c) NZ–QMMM; (d) NZ<sub>K</sub>; e (e) NZ<sub>K</sub>–QMMM.



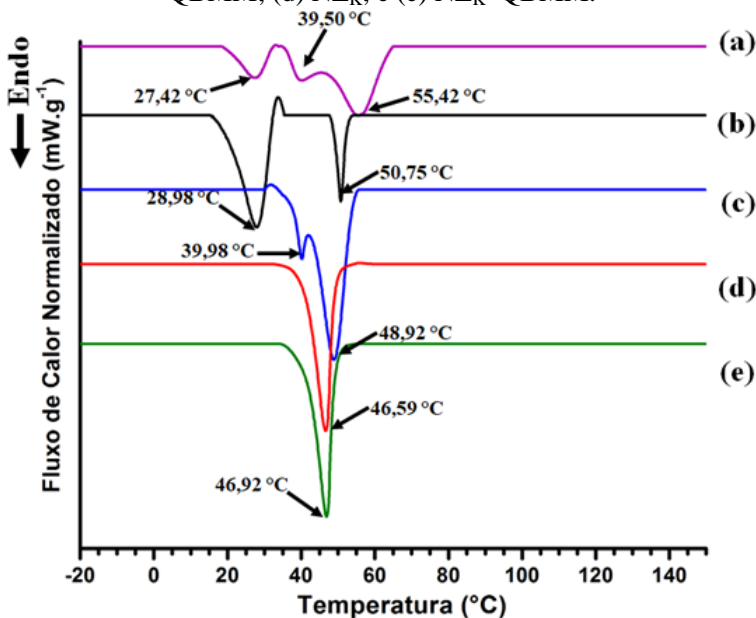
#### 4.1.4.3.3 Quitosana de Baixa Massa Molar

Assim como observado na quitosana de alta massa molar, a interação entre a quitosana de baixa massa molar e as nanopartículas induziu a alteração nas temperaturas dos eventos endotérmicos das amostras NZ e NZ<sub>K</sub> (Figura 35). A amostra NZ apresentou evento endotérmico em 50,75 °C que foi alterado para 48,92 °C com surgimento de um evento pouco intenso a 39,98 °C quando as NZ–QBMM foram avaliadas. Adicionalmente, um leve aumento na temperatura do evento endotérmico principal da amostra NZ<sub>K</sub> de 46,59 °C para 46,92 °C na amostra NZ<sub>K</sub>–QBMM foi observado.

Neste sentido, a interação entre QBMM e as nanopartículas NZ são evidenciadas através da análise de microcalorimetria exploratória diferencial, enquanto a presença do tensoativo Kolliphor P188 nas amostras NZ<sub>K</sub> e NZ<sub>K</sub>–QBMM parece modificar o potencial de interação entre o polissacarídeo e as nanopartículas, sendo que tal interação não

pode ser evidenciada com clareza devido a uma modificação muito sutil na temperatura do principal evento endotérmico das formulações.

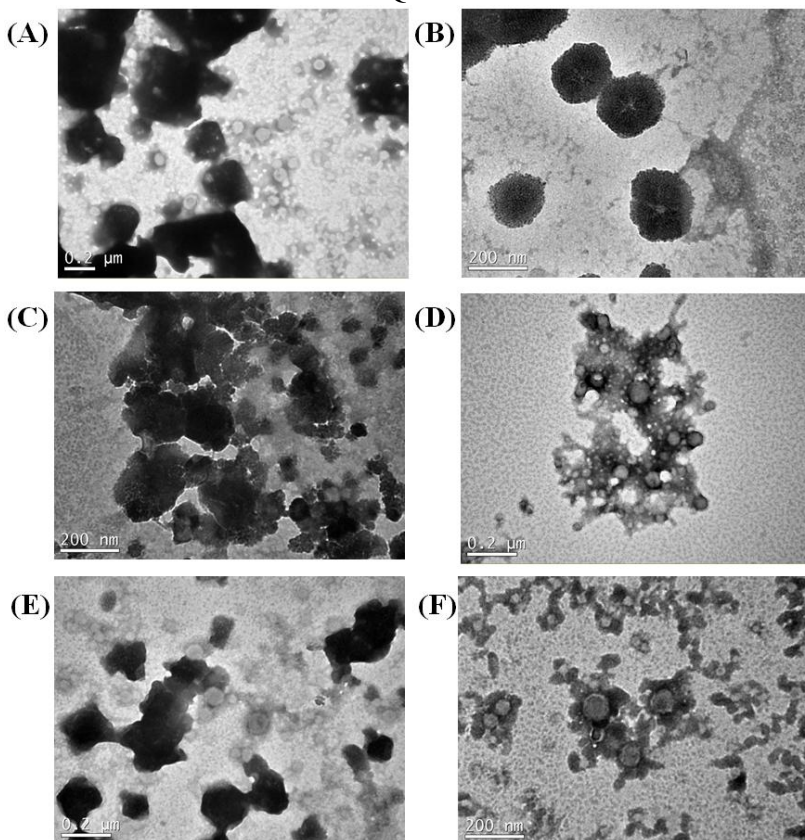
**Figura 35** – Análise por microcalorimetria exploratória diferencial (DS $\mu$ C) de; (a) quitosana de baixa massa molar; (b) NZ; (c) NZ–QBMM; (d) NZ<sub>K</sub>; e (e) NZ<sub>K</sub>–QBMM.



#### 4.1.5 Avaliação morfológica das nanopartículas

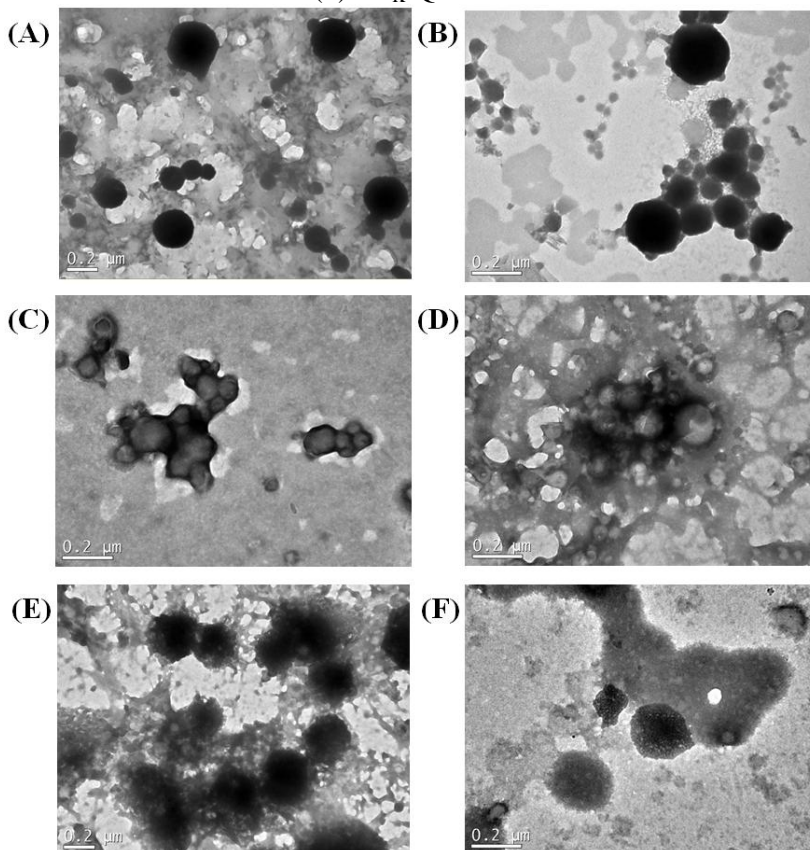
As Figuras 36 e 37 apresentam as micrografias eletrônicas de transmissão das amostras NZ e NZ<sub>K</sub> e suas respectivas amostras oriundas da interação com os polissacarídeos alginato de sódio, goma arábica e quitosana de alta, média e baixa massa molar. Na Figura 32, verifica-se que as NZ apresentam estrutura pouco elíptica, com arestas bem definidas (Fig. 36A) e que, após interagir com os polímeros naturais, apresentam estrutura mais elíptica, com zonas marginais de menor densidade eletrônica, caracterizando a interação entre os polissacarídeos e a zeína (Fig. 36B–F). No entanto, a Figura 37A demonstra que, quando há a incorporação de tensoativos como o Kolliphor P188, a NZ<sub>K</sub> uma estrutura esférica é alcançada, provavelmente devido à redução da tensão interfacial,

**Figura 36** – Micrografia eletrônica de transmissão das amostras: (A) NZ; (B) NZ-AS; (C) NZ-GA; (D) NZ-QAMM; (E) NZ-QMMM; e (F) NZ-QBMM.



Na Figura 37B–F, é possível verificar que as nanopartículas de zeína  $NZ_K$  que interagem com os polissacarídeos mantem a estrutura esférica, e que, assim como tanto as amostras NZ quanto  $NZ_K$  apresentam maior formação de redes poliméricas quando a goma arábica e a quitosana de alta massa molar são empregadas.

**Figura 37** – Micrografia eletrônica de transmissão das amostras: (A)  $NZ_K$ ; (B)  $NZ_K$ -AS; (C)  $NZ_K$ -GA; (D)  $NZ_K$ -QAMM; (E)  $NZ_K$ -QMMM; e (F)  $NZ_K$ -QBMM.



Desta forma, as alterações de superfície das nanopartículas são condizentes com interações entre os polissacarídeos e a proteína zeína, proporcionando a decoração da superfície. Os diâmetros geométricos das nanopartículas são semelhantes ao diâmetro hidrodinâmico determinado por espalhamento de luz dinâmico.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO $\gamma$ -ORIZANOL

As análises foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10 (Shimadzu, Japão), hifenizado com detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando como referência o comprimento de onda de 330 nm. Para a metodologia analítica, que contempla os ensaios de teor, eficiência de encapsulação e perfil de dissolução *in vitro*, as amostras foram injetadas a um volume de 10  $\mu\text{L}$ , eluindo com fase móvel isocrática composta de metanol:acetoneitrila (6:4, v/v), utilizando fluxo de 2,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , através de uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Para todas as análises, metanol foi utilizado como diluente.

### 4.2.1 Avaliação do teor e da eficiência de encapsulação (EE%) do $\gamma$ -orizanol nas nanopartículas de zeína

A Tabela 13 apresenta os resultados de teor e eficiência de encapsulação das formulações preparadas. Pode-se observar que o  $\gamma$ -orizanol é encapsulado com eficiência próxima a 100 %, uma vez que o  $\gamma$ -orizanol presente na fase aquosa apresentou concentração inferior ao limite de detecção ( $\text{LD} = 0,095 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), onde nenhum pico cromatográfico fora detectado. Soma-se o fato de que o teor de  $\gamma$ -orizanol é próximo a  $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de formulação, indicando uma recuperação próxima a 100 % dos ésteres de ácido ferúlico com álcoois triterpênicos. Através da Análise da Variância (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ) foi possível verificar que o teor de  $\gamma$ -orizanol não difere estatisticamente dentre as formulações avaliadas ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ , onde  $0,546 < 3,982$ ), e que, portanto, a interação entre os polissacarídeos e as nanopartículas de zeína não altera estatisticamente o teor e a eficiência de encapsulação do  $\gamma$ -orizanol.

**Tabela 13.** Avaliação do teor de  $\gamma$ -orizanol e eficiência de encapsulação das nanopartículas proteicas ( $n = 3$ ).

Formulação	Teor de $\gamma$ -orizanol $\pm$ Desvio Padrão ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de formulação)	Eficiência de Encapsulação das Nanopartículas Proteicas (%)
NZ	$62,28 \pm 0,03^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ <sub>K</sub>	$62,24 \pm 0,06^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ-AS	$62,19 \pm 0,08^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ <sub>K</sub> -AS	$62,21 \pm 0,03^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ-GA	$62,17 \pm 0,10^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ <sub>K</sub> -GA	$62,23 \pm 0,05^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ-QAMM	$62,18 \pm 0,07^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ <sub>K</sub> -QAMM	$62,22 \pm 0,14^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ-QMMM	$62,15 \pm 0,11^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ <sub>K</sub> -QMMM	$62,24 \pm 0,08^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ-QBMM	$62,22 \pm 0,12^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$
NZ <sub>K</sub> -QBMM	$62,20 \pm 0,04^a$	$\approx 100,00 \pm 0,00^a$

O  $\gamma$ -orizanol é uma mistura de fitoesteróis que apresentam baixa solubilidade aquosa, principalmente devido à porção esteroidal. Este fato é evidenciado pelo emprego, predominante, de solventes como hexano, acetato de etila, diclorometano, metanol, etanol, isopropanol e outros solventes apolares para a extração do  $\gamma$ -orizanol a partir do *Oryza sativa* L. (CAPELLINI et al., 2017; MASSAROLO et al., 2017; MILLER; ENGEL, 2006; XU; GODBER, 1999).

Logo, devido às propriedades físico-químicas dos esteroides, verifica-se que o  $\gamma$ -orizanol, uma vez solubilizado na fase orgânica, apresentam baixa partição para a fase aquosa, principalmente devido a hidrofobicidade da mistura de fitoesteróis. Uma vez que o solvente orgânico é removido a pressão reduzida, estima-se que o  $\gamma$ -orizanol permaneça em contato com a zeína através de interações de porções hidrofóbicas, proporcionando alta eficiência de encapsulação ao sistema nanoestruturado (MEUNIER; GOUPIL; LIENARD, 2017; SHI et al., 2016; TAKEUCHI et al., 2017). Como os ésteres do ácido ferúlico com álcoois triterpênicos apresentam baixa solubilidade em água, após o processo de formação das nanopartículas proteicas, o  $\gamma$ -orizanol não difunde para a fase aquosa, mesmo na presença do tensoativo Kolliphor P188, e desta forma os esteroides presentes no  $\gamma$ -orizanol não puderam



ser identificados e quantificados na fase aquosa, caracterizando uma eficiência de encapsulação próxima a 100 %.

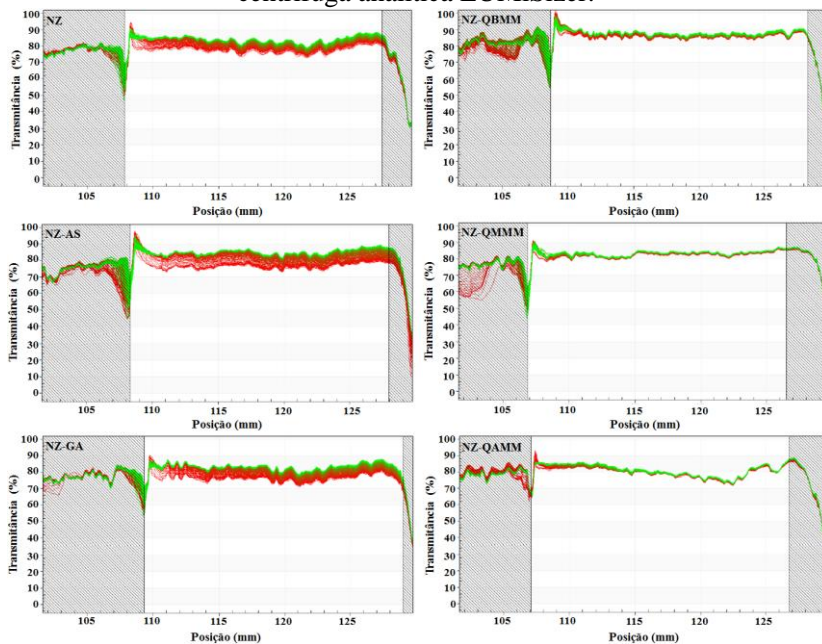
#### 4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA ACELERADA DAS NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA

Através da análise de estabilidade acelerada utilizando o equipamento LUMiSizer foi possível monitorar as variações de transmitância ao longo de um volume de suspensão de nanopartículas de zeína em função da aplicação de uma força centrífuga, podendo ser verificada a ocorrência de fenômenos de instabilidade como sedimentação, floculação ou cremagem (LIU et al., 2016; WEI; GAO, 2016).

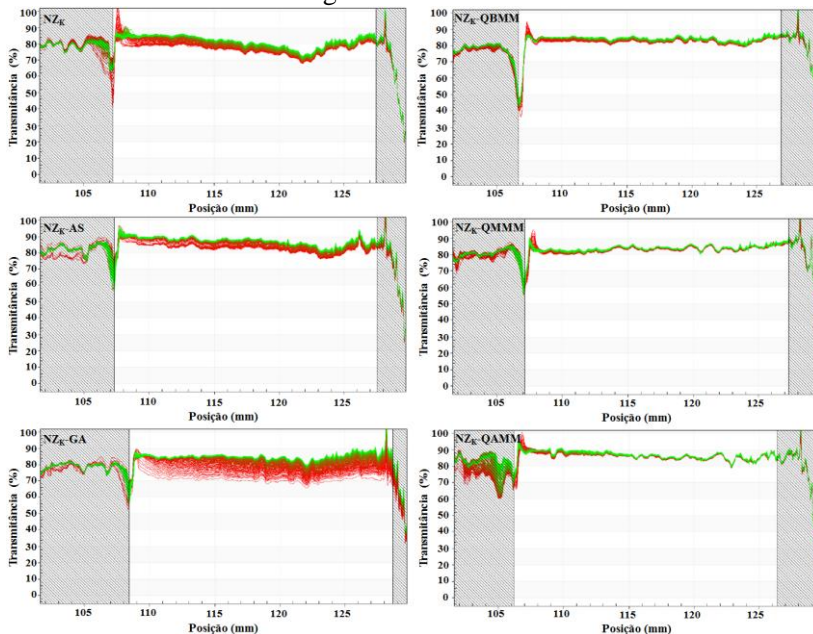
A estabilidade das formulações foi avaliada como perfil de transmitância relacionado ao espaço e tempo em função do comprimento da amostra disposta em um porta-amostra. As Figuras 38 e 39 demonstram os perfis de transmitância iniciais em vermelho, sendo deslocados para os perfis em verde de acordo com a evolução do tempo de centrifugação. A relação dos perfis de transmitância relacionados ao espaço e tempo em função do comprimento da amostra disposta em um porta-amostra reflete o movimento das nanopartículas ao longo do porta-amostra, onde, quanto maior a variação da transmitância devido à centrifugação, menor a estabilidade das nanopartículas (CHEN et al., 2016; LIU et al., 2016).

Com a centrifugação, as partículas ou agregados mais densos irão se movimentar para a porção inferior do porta-amostra, promovendo a clarificação das porções superiores do porta-amostra. Esta redução da concentração das nanopartículas nas porções superiores eleva a transmitância da luz (CHEN et al., 2016). Desta forma, é possível verificar que o processo de instabilidade das nanopartículas de zeína, assim como o esperado, está diretamente relacionado à sedimentação dos nanocarreadores (LERCHE; SOBISCH, 2014).

**Figura 38** – Relação do perfil de transmitância espaço e tempo dependente das nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188 em função do comprimento do porta-amostra em centrífuga analítica LUMiSizer.



**Figura 39** – Relação do perfil de transmitância espaço e tempo dependente das nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188 em função do comprimento do porta-amostra em centrífuga analítica LUMiSizer.

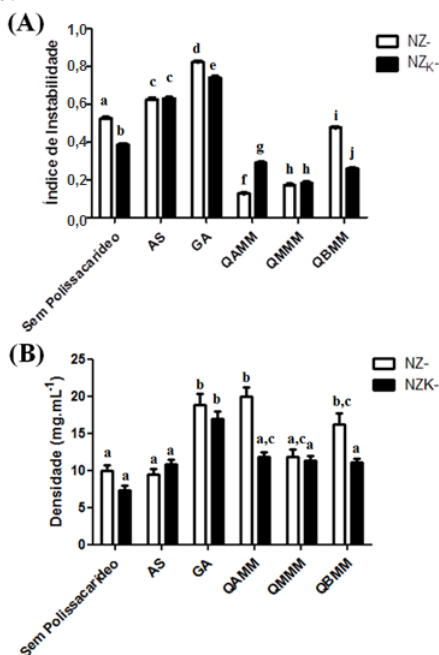


Para avaliar a estabilidade frente à sedimentação das nanopartículas, determinou-se o intercepto da curva da integral do perfil de transmitância *versus* o tempo ( $\partial T/\partial t$ ). Este intercepto é inversamente proporcional à estabilidade da suspensão, onde maiores índices de instabilidade indicam maiores velocidades de sedimentação da suspensão de nanocarreadores (CHEN et al., 2016; LIU et al., 2016; WEI; GAO, 2016). A Figura 40 representa a evolução do índice de instabilidade em função do tempo, enquanto a Tabela 14 apresenta os índices de instabilidade e as densidades aparente das nanopartículas de zeína após secagem por liofilização.

Na Figura 40 e na Tabela 14 pode-se observar que a utilização de Kolliphor P188 no preparo das nanopartículas reduz significativamente ( $P < 0,05$ ) o índice de instabilidade das nanopartículas quando compara-se as formulações NZ e NZ<sub>K</sub>. Esta redução pode estar relacionada a um efeito estérico causado pelas cadeias do polímero tribloco PEO-PPO-PEO, e à elevação do potencial zeta (de -5,0 para 28,2 mV para NZ e

NZ<sub>K</sub>, respectivamente), causando maior repulsão eletrostática entre as nanopartículas e prevenindo a formação de agregados que levam à sedimentação das nanopartículas proteicas (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016; PODARALLA; PERUMAL, 2012). Hu e McClements (2014) realizaram estudo semelhante utilizando Tween 80 como tensoativo para estabilizar nanopartículas de zeína, e indicam que existe uma interação entre das regiões apolares do surfactante com as porções apolares das nanopartículas de zeína, fazendo com que as cadeias polares do tensoativo exerçam efeito estérico, evitando agregação entre as nanopartículas.

**Figura 40** – Representação gráfica: (A) do índice de instabilidade das nanopartículas de zeína; e (B) da densidade das nanopartículas de zeína secas por liofilização.



onde letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) no teste de ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

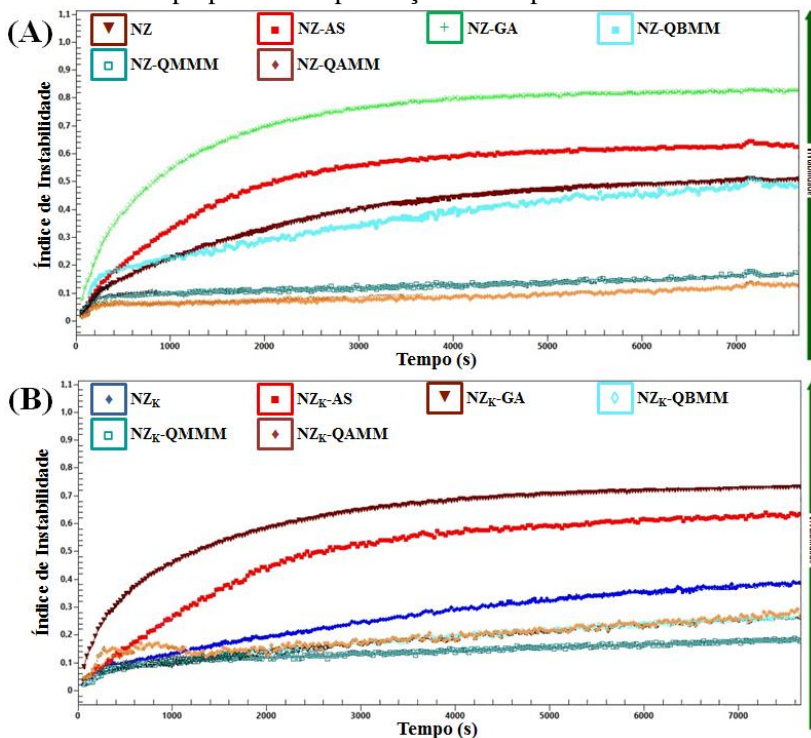
**Tabela 14.** Avaliação do índice de instabilidade e da densidade aparente das formulações de nanopartículas de zeína contendo  $\gamma$ -orizanól.

Formulação	Índice de Instabilidade $\pm$ Desvio Padrão	Densidade das Nanopartículas de Zeína ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )
NZ	$0,525 \pm 0,005^a$	$9,947 \pm 1,412^a$
NZ <sub>K</sub>	$0,387 \pm 0,004^b$	$7,329 \pm 0,985^b$
NZ-AS	$0,625 \pm 0,006^c$	$9,440 \pm 1,368^a$
NZ <sub>K</sub> -AS	$0,631 \pm 0,004^c$	$10,871 \pm 1,013^c$
NZ-GA	$0,824 \pm 0,003^d$	$18,818 \pm 2,627^d$
NZ <sub>K</sub> -GA	$0,741 \pm 0,004^e$	$16,977 \pm 1,651^e$
NZ-QAMM	$0,126 \pm 0,003^f$	$20,000 \pm 2,064^d$
NZ <sub>K</sub> -QAMM	$0,289 \pm 0,003^g$	$11,840 \pm 1,136^c$
NZ-QMMM	$0,173 \pm 0,003^h$	$11,836 \pm 1,809^a$
NZ <sub>K</sub> -QMMM	$0,182 \pm 0,005^h$	$11,332 \pm 1,082^c$
NZ-QBMM	$0,476 \pm 0,005^i$	$16,231 \pm 2,513^d$
NZ <sub>K</sub> -QBMM	$0,258 \pm 0,003^j$	$11,100 \pm 0,887^c$

ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

A interação entre as nanopartículas de zeína e os polissacarídeos apresentaram efeitos distintos sobre o índice de instabilidade dos sistemas nanoestruturados. Um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do índice de instabilidade pode ser observado quando os polissacarídeos alginato de sódio e goma arábica são utilizados, enquanto a interação com a quitosana de alta, média e baixa massa molar reduziu significativamente o índice de instabilidade, conferindo menor velocidade de sedimentação às nanopartículas estabilizadas com este polissacarídeo (Figura 41).

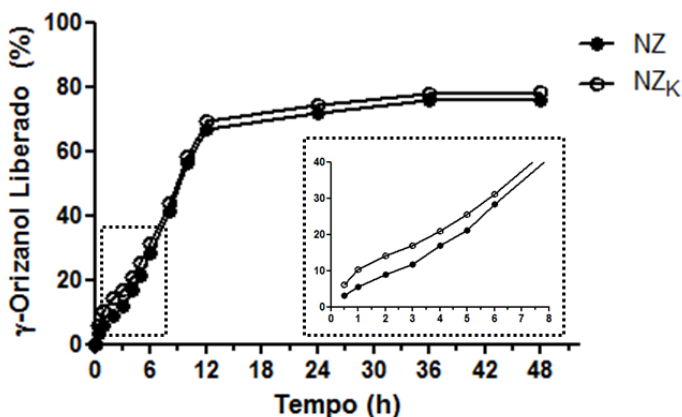
**Figura 41** – Representação gráfica do perfil do índice de instabilidade em função do tempo de centrifugação para: (A) nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188; e (B) nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188.



#### 4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO $\gamma$ -ORIZANOL A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA

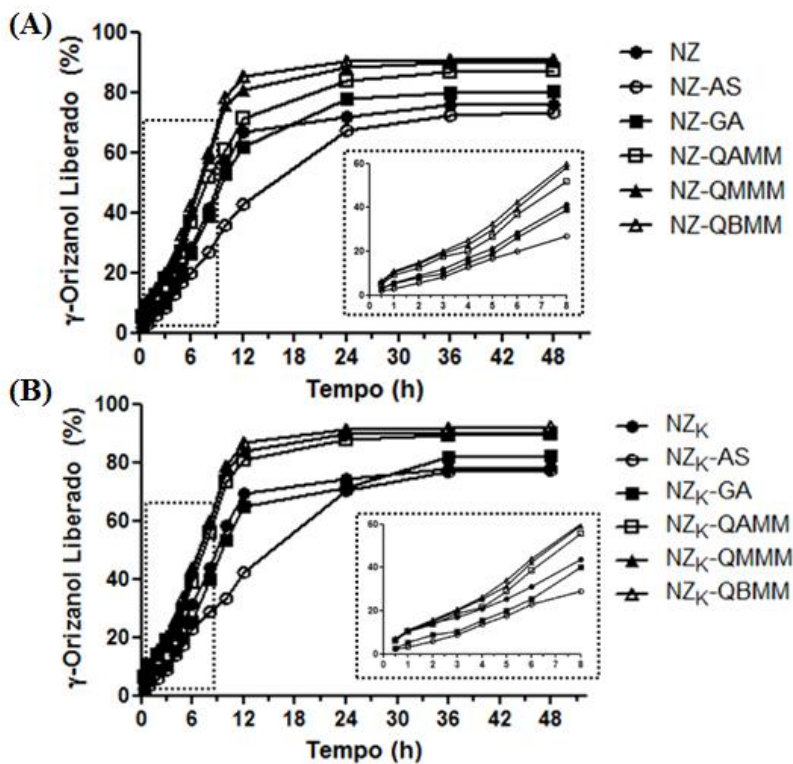
A Figura 42 representa o perfil de liberação do  $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína preparadas na ausência (NZ) e na presença (NZ<sub>K</sub>) de Kolliphor 188. Observa-se que o perfil de dissolução das amostras NZ e NZ<sub>K</sub> permanece semelhante no decorrer de 36 h, e que o Kolliphor P188 infere um aumento sutil na massa de  $\gamma$ -orizanol liberado nos primeiros tempos iniciais, indicando um leve aumento do efeito *burst*. As formulações preparadas atingem o *plateau* de liberação do  $\gamma$ -orizanol no tempo de 12 h, onde um máximo de aproximadamente 76 e 78 % do  $\gamma$ -orizanol foi liberado pelas formulações NZ e NZ<sub>K</sub>, respectivamente.

**Figura 42** – Perfil de liberação *in vitro* do  $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína preparadas na ausência e na presença de Kolliphor P188 ( $n = 6$ ).



À medida que as nanopartículas de zeína interagem com os polissacarídeos, observa-se a alteração do perfil de liberação *in vitro* do  $\gamma$ -orizanol (Figura 43). O alginato de sódio foi capaz de reduzir significativamente ( $P < 0,05$ ) a eficiência de dissolução do  $\gamma$ -orizanol, enquanto a goma arábica não alterou significativamente este parâmetro, e a quitosana elevou, de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) a eficiência de dissolução (Tabela 15).

**Figura 43** – Perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas de zeína contendo polissacarídeos quando preparadas: (A) na ausência de Kolliphor P188; e (B) na presença de Kolliphor P188 ( $n = 6$ ).





**Tabela 15.** Dados de eficiência de dissolução do  $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína ( $n = 6$ ).

Formulação	Eficiência de Dissolução $\pm$ Desvio Padrão (%)
NZ	62,38 $\pm$ 1,27 <sup>a,b</sup>
NZ <sub>K</sub>	64,97 $\pm$ 2,01 <sup>a,c</sup>
NZ-AS	54,43 $\pm$ 2,14 <sup>d</sup>
NZ <sub>K</sub> -AS	57,05 $\pm$ 3,13 <sup>b,d</sup>
NZ-GA	64,28 $\pm$ 3,32 <sup>a,b,c</sup>
NZ <sub>K</sub> -GA	63,97 $\pm$ 2,19 <sup>a,b</sup>
NZ-QAMM	71,65 $\pm$ 2,06 <sup>c,e</sup>
NZ <sub>K</sub> -QAMM	75,79 $\pm$ 3,23 <sup>e,f</sup>
NZ-QMMM	76,58 $\pm$ 2,04 <sup>e,f</sup>
NZ <sub>K</sub> -QMMM	77,62 $\pm$ 3,22 <sup>e,f</sup>
NZ-QBMM	78,19 $\pm$ 3,26 <sup>e,f</sup>
NZ <sub>K</sub> -QBMM	79,47 $\pm$ 2,12 <sup>f</sup>

ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Os modelos matemáticos que melhor descrevem o mecanismo de liberação do  $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína foi definido através da avaliação do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), sendo considerados adequados os modelos que apresentam maiores coeficientes de correlação. Na Tabela 16, pode-se verificar os parâmetros calculados para os modelos matemáticos propostos, onde o modelo de Hixson-Crowell apresenta maior coeficiente de correlação. Porém o modelo de Peppas-Sahlin também se apresenta adequado para prever o mecanismo de liberação do  $\gamma$ -orizanol, evidenciando uma cinética de liberação bimodal (CHANG et al., 2017; LUO et al., 2011). Observa-se, também, que os coeficientes de correlação apresentam-se adequados para os modelos de primeira ordem e de Korsmeyer-Peppas. No entanto, dependendo do polissacarídeo utilizado, diferentes valores da constante  $n$  são obtidos, indicando que o tipo de polissacarídeo impacta diretamente no mecanismo de liberação do  $\gamma$ -orizanol.

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A Tabela 17 apresenta os resultados da atividade antioxidante do  $\gamma$ -orizanol. Observa-se que o  $\gamma$ -orizanol apresenta uma atividade antioxidante de  $33,7 \pm 0,7$  % e que a atividade é elevada significativamente ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ , onde  $527,779 > 3,885$  para  $\alpha =$

0,05) quando os fitoesteróis são encapsulados em nanopartículas de zeína, podendo variar de 58,7 a 90,3 %. A atividade antioxidante das nanopartículas de zeína sem encapsulação de  $\gamma$ -orizanol (brancas) também foram avaliadas, e pôde-se observar que a matriz apresenta baixa atividade antioxidante (inferior a 8 %), indicando que o aumento estatisticamente significativo ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ , onde  $5385,63 > 3,422$  para  $\alpha = 0,05$ ) da atividade antioxidante não está relacionado a um efeito sequestrador de elétrons da matriz proteica ou dos polissacarídeos utilizados no preparo do sistema nanoestruturado. Dentre os componentes do sistema nanoestruturado, a atividade antioxidante da zeína tem sido atribuída à presença dos resíduos dos aminoácidos histidina, arginina, alanina, valina, metionina e leucina (WU; LUO; WANG, 2012; ZHANG; LUO; WANG, 2011).

**Tabela 16** – Parâmetros calculados para determinação do mecanismo de liberação do  $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína.

Formulação	Ordem Zero		Primeira Ordem		Higuchi		Korsmeyer–Peppas			Hixson–Crowell		Peppas–Sahlin				
	k	r <sup>2</sup>	k	r <sup>2</sup>	k	r <sup>2</sup>	k	n	r <sup>2</sup>	k	r <sup>2</sup>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	m	r <sup>2</sup> <sub>1</sub>	r <sup>2</sup> <sub>2</sub>
NZ	5,467	0,977	0,015	0,990	20,42	0,889	1,658	0,935	0,974	7,018	0,993	1,687	1,015	0,724	<b>0,996</b>	<b>0,996</b>
NZ <sub>K</sub>	5,234	0,979	0,016	0,986	19,59	0,903	2,216	0,704	0,963	6,894	0,996	2,249	1,620	0,563	0,979	0,988
NZ–AS	3,642	<b>0,996</b>	0,013	0,995	15,02	0,940	1,158	1,019	0,990	5,728	<b>0,999</b>	1,168	0,901	0,828	0,990	0,995
NZ <sub>K</sub> –AS	3,534	0,993	0,013	0,996	14,75	0,956	1,262	0,982	0,986	5,646	<b>0,998</b>	1,261	1,101	0,788	0,978	0,990
NZ–GA	5,164	0,967	0,014	0,990	19,15	0,873	1,560	0,934	0,961	6,816	0,990	1,560	0,746	0,674	0,991	0,997
NZ <sub>K</sub> –GA	5,199	0,972	0,014	0,991	19,43	0,882	1,535	0,968	0,976	6,851	<b>0,992</b>	1,566	0,830	0,786	<b>0,979</b>	<b>0,998</b>
NZ–QAMM	6,025	0,982	0,016	<b>0,989</b>	22,66	0,914	2,095	0,811	0,968	7,366	0,995	2,127	1,308	0,647	<b>0,990</b>	<b>0,984</b>
NZ <sub>K</sub> –QAMM	6,243	0,965	0,015	0,989	21,31	0,883	2,237	0,742	0,955	7,546	<b>0,991</b>	2,258	1,147	0,592	<b>0,987</b>	<b>0,998</b>
NZ–QMMM	6,569	0,965	0,015	0,984	22,38	0,886	2,241	0,765	0,963	7,723	<b>0,992</b>	2,261	1,239	0,630	<b>0,988</b>	<b>0,998</b>
NZ <sub>K</sub> –QMMM	6,732	0,976	0,015	0,985	23,08	0,904	2,295	0,763	0,969	7,829	<b>0,994</b>	2,313	1,462	0,644	0,989	0,992
NZ–QBMM	6,847	0,978	0,016	0,983	23,37	0,905	2,305	0,761	0,968	7,879	<b>0,995</b>	2,323	1,463	0,628	<b>0,993</b>	<b>0,999</b>
NZ <sub>K</sub> –QBMM	6,898	0,983	0,016	0,985	23,60	0,916	2,360	0,745	0,970	7,913	<b>0,996</b>	2,377	1,600	0,615	<b>0,996</b>	<b>0,998</b>

**Tabela 17** – Avaliação da atividade antioxidante, pelo método DPPH, das nanopartículas proteicas ( $n = 6$ ).

<b>Formulação</b>	<b>Atividade Antioxidante das amostras na ausência de <math>\gamma</math>-orizanol <math>\pm</math> Desvio Padrão (%)</b>	<b>Atividade Antioxidante das amostras contendo <math>\gamma</math>-orizanol <math>\pm</math> Desvio Padrão (%)</b>
$\gamma$ -orizanol	–	$33,7 \pm 0,7^a$
NZ	$8,3 \pm 0,4^a$	$62,9 \pm 1,4^b$
NZ <sub>K</sub>	$7,9 \pm 0,3^{a,b}$	$71,3 \pm 1,8^c$
NZ-AS	$6,1 \pm 0,2^{b,c}$	$58,7 \pm 0,9^d$
NZ <sub>K</sub> -AS	$5,7 \pm 0,2^c$	$70,8 \pm 0,4^c$
NZ-GA	$7,7 \pm 0,3^d$	$78,3 \pm 1,6^e$
NZ <sub>K</sub> -GA	$5,9 \pm 0,1^c$	$82,3 \pm 1,1^{f,g}$
NZ-QAMM	$5,6 \pm 0,4^{c,e}$	$80,6 \pm 0,6^{e,f}$
NZ <sub>K</sub> -QAMM	$4,6 \pm 0,3^{f,g}$	$84,4 \pm 1,1^g$
NZ-QMMM	$5,1 \pm 0,1^{e,f}$	$81,5 \pm 0,9^{f,g}$
NZ <sub>K</sub> -QMMM	$4,7 \pm 0,2^f$	$85,8 \pm 1,2^h$
NZ-QBMM	$4,8 \pm 0,3^f$	$87,4 \pm 1,1^h$
NZ <sub>K</sub> -QBMM	$4,1 \pm 0,4^g$	$90,3 \pm 1,5^i$

ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

---

## **5 DISCUSSÃO GETAL**

---



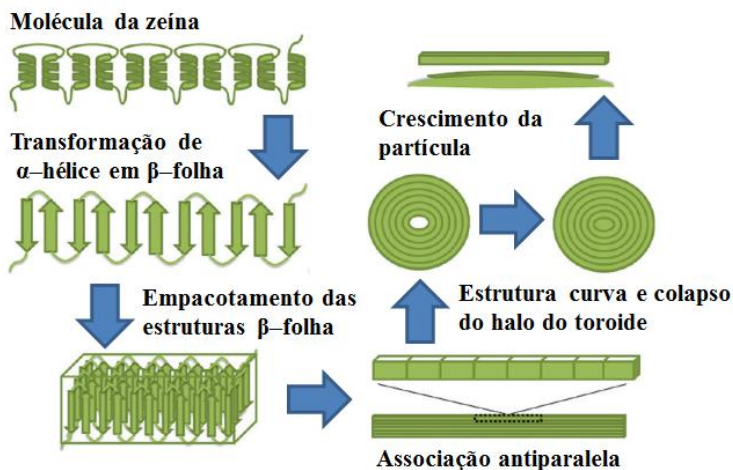
Nanopartículas de zeína foram preparadas através do método do anti-solvente. Segundo Zhong e Lin (2009) uma vez que uma solução hidroalcoólica de zeína é adicionada em água, sob agitação, pequenas gotículas de etanol contendo zeína são formadas. Devido à excelente miscibilidade do etanol em água, o solvente se difunde da fase orgânica para a fase aquosa, reduzindo a solubilidade da zeína que se organiza formando as nanopartículas. A auto-organização entre as cadeias da zeína tem relação direta com sua propriedade anfifílica (LÖWIK; van HEST, 2004; WANG et al., 2004). Durante o processo de evaporação do etanol, ocorre um aumento da hidrofiliicidade da fase aquosa, induzindo a interação hidrofóbica entre as cadeias proteicas (WANG; PADUA, 2010).

A zeína é uma proteína que apresenta estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice, com 9 a 10 segmentos helicoidais conectados através de ligações dissulfeto entre os resíduos ricos em glutamina, resultando em uma estrutura em forma de prisma. A superfície formada pelas estruturas  $\alpha$ -hélice apresentam propriedade hidrofóbica, enquanto que, a porção superior e inferior, são compostas por resíduos hidrofílicos ricos em glutamina (ARGOS et al., 1982; WANG; PADUA, 2012). Wang e Padua (2012) descrevem a auto-organização da zeína induzida pela evaporação do solvente como um processo que envolve quatro principais etapas (Figura 44). Em uma primeira etapa, a zeína, que em solução hidroalcoólica apresenta conformação  $\alpha$ -hélice, altera sua estrutura secundária para uma conformação  $\beta$ -folha à medida que o etanol é evaporado dado ao aumento da hidrofiliicidade do meio no qual a proteína se encontra. Com a evaporação do solvente, as estruturas em  $\beta$ -folha se empacotam através de associações que formam uma zona hidrofóbica interna com superfícies hidrofílicas. Na sequência, as moléculas de zeína empacotadas na forma de  $\beta$ -folha antiparalelas se associam lado a lado, devido a interações hidrofóbicas, originando uma estrutura em forma de bastão. Posteriormente os bastões se curvam formando anéis ou toroides que crescem à medida que novas camadas de zeína são adicionadas à superfície da estrutura.

Adicionalmente, fatores como tipo de solvente, velocidade de evaporação do solvente, e polaridade da fase aquosa tendem a influenciar a formação das nanopartículas de zeína. Nonthanum, Lee e Padua (2013) demonstraram que o pH da solução de zeína apresenta influência quanto à morfologia das estruturas formadas durante o processo de auto-organização proteica, onde soluções em pH extremamente ácidos (pH igual a 2,0) proporcionaram a formação de filmes transparentes, enquanto soluções em pH próximos ao ponto

isoeletrico (pH 6,0) apresentaram formação de micropartículas esféricas, e soluções extremamente alcalinas (pH 12,0) apresentaram a formação de micropartículas com maior nível de agregação. Os resultados obtidos por Nonthanum, Lee e Padua (2013) indicam que formulações preparadas em pH próximo ao ponto isoeletrico tendem a formar estruturas de morfologia esférica e com menor formação de agregados que processos envolvendo pH extremamente alcalinos ou ácidos.

**Figura 44** – Mecanismo de formação das nanopartículas de zeína através do método de evaporação do solvente.



FONTE: Adaptado de Wang e Padua (2012).

Quando avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), pode-se observar que as nanopartículas de zeína NZ apresentam morfologia irregular, de tendência à esfericidade, porém mantendo arestas bem definidas. As nanopartículas de zeína, nas condições empregadas no processo de obtenção do sistema nanoparticulado, direcionam à formação de estrutura esférica (NONTHANUM; LEE; PADUA, 2013), no entanto a rápida evaporação do solvente pode induzir à rápida alteração de conformação  $\alpha$ -hélice para  $\beta$ -folha, apresentando lâminas características da etapa de crescimento das nanoestruturas, culminando em regiões mais planares (WANG; PADUA, 2012). A formação de agregados entre NZ pode ocorrer devido ao processo de secagem no preparo dos *grids*, combinado à baixa repulsão eletrostática entre as nanopartículas.



Surfactantes podem ser utilizados no preparo das nanopartículas, visando o aumento da estabilidade dos nanocarreadores. Neste trabalho, foi utilizado o polímero tribloco (tipo ABA) Kolliphor P188, um surfactante hidrofílico não-iônico, composto de um bloco hidrofóbico de óxido de polipropileno (bloco B) ligado em suas duas extremidades a blocos hidrofílicos de óxido de polietileno (bloco A) (Figura 44) (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016). Na Tabela 1, observou-se que a adição de Kolliphor P188 não modificou estatisticamente o diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersão (PDI), porém pôde-se verificar uma tendência à redução do PDI com a adição do tensoativo não-iônico.

Em contrapartida, a adição de Kolliphor P188 alterou significativamente o potencial zeta das nanopartículas. As nanopartículas de zeína preparadas na ausência de tensoativo apresentam carga superficial igual a  $-5,0 \pm 16,3$  mV, provavelmente devido à baixa protonação dos grupamentos amino e carboxila ( $-\text{NH}_3^+$  e  $-\text{COO}^-$ ) decorrente da proximidade do pH da formulação do ponto isoelétrico da proteína ( $\text{pI} \approx 5,8$ ) (HU; MCCLEMENTS, 2014). A adição de tensoativo recobrando a superfície das nanopartículas promoveu um aumento do potencial zeta e predomínio de cargas positivas na superfície das nanopartículas. As nanopartículas de zeína apresentam baixo potencial zeta, sendo um indicativo de sua baixa estabilidade física devido à reduzida repulsão eletrostática entre as partículas. Uma vez que a força de atração entre as nanopartículas, potencialmente devido à interação hidrofóbica, supera a força repulsiva das cargas superficiais dos carreadores em pH próximo ao ponto isoelétrico, as partículas tendem a se agregar, formando *clusters* de maior densidade e menor movimento Browniano, levando à sedimentação das nanopartículas proteicas e à consequente instabilidade física do sistema (CHEN; YE; LIU, 2013; HU; MCCLEMENTS, 2014). A presença do tensoativo não-iônico Kolliphor P188 na superfície das nanopartículas, por sua vez, tende a promover uma proteção estérica às nanopartículas, reduzindo a probabilidade de agregação entre as nanoestruturas e sua consequente sedimentação. O efeito do tensoativo sobre a formulação das nanopartículas pode ser observado através das micrografias obtidas das formulações  $\text{NZ}_K$ , onde verifica-se que partículas contendo tensoativo apresentam estrutura esférica, provavelmente, devido à redução da tensão interfacial causada pelo surfactante.

Adicionalmente, a elevação do potencial zeta do sistema indica um provável aumento na estabilidade física do sistema carreador, com

predominância de cargas positivas quando a concentração de tensoativo utilizada é igual ou superior a 0,75 % (m/V). Estes resultados corroboram com as imagens obtidas através da análise por MET, onde houve uma redução da formação de agregados entre as nanopartículas proteicas, provavelmente devido à maior repulsão estérica e eletrostática entre os nanocarreadores (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016; PODARALLA; PERUMAL, 2012; WULFF-PÉREZ et al., 2009).

Dentre as formulações obtidas, observa-se que existe uma tendência à redução do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e do índice de polidispersão (PDI) com o aumento da concentração de Kolliphor P188 até 1,0 % (m/V). Apesar da elevação do potencial zeta, quando concentrações superiores a 1,0 % foram empregadas, uma redução da reprodutibilidade no preparo das formulações inviabilizou o uso de concentrações de tensoativo superiores a 1,0 %. Assim, uma vez que as nanopartículas de zeína preparadas com Kolliphor na concentração de 1,0 % (m/V) apresentam menor diâmetro hidrodinâmico, adequado PDI, potencial zeta que confira maior estabilidade físicas ao sistema nanoparticulado, e proporcione reprodutibilidade no desenvolvimento dos carreadores, esta formulação foi selecionada para realização de ensaios posteriores.

Dentre as estratégias adotadas atualmente para o aumento da estabilidade física das nanopartículas de zeína, destaca-se a interação eletrostática entre os sistemas nanoestruturados com moléculas capazes de conferir repulsão eletrostática entre as partículas e/ou impedimento estérico entre as mesmas (CHANG et al., 2017; HU; MCCLEMENTS, 2015; LUO et al., 2011). Diferentes moléculas vêm sendo utilizadas, entre estas: proteínas, como o caseinato de sódio (CHANG et al., 2017) e  $\beta$ -lactoglobulina (CHEN; ZHONG, 2014); e polissacarídeos, como o alginato de sódio (HU; MCCLEMENTS, 2015), pectina (HU et al., 2015), quitosana (LUO et al., 2011; ZHANG et al., 2014),  $\iota$ -carragena (CHENG; JONES, 2017), goma arábica (CHEN; ZHONG, 2015); carboximetilcelulose (LUO; TENG; WNAG, 2012), entre outros. As nanopartículas de zeína preparadas na ausência de Kolliphor P188 (NZ) e as nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188 na concentração de 1,0 % (m/V) (NZ<sub>K</sub>) foram submetidas à interação com diferentes concentrações dos polissacarídeos alginato de sódio (AS), goma arábica (GA), quitosana de alta massa molar (QAMM), quitosana de média massa molar (QMMM) e quitosana de baixa massa molar (QBMM).

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear, isolado a partir de algas marrons (*Phaeophyceae*), constituído de ligações (1→4) de

resíduos de  $\beta$ -D-ácido manurônico (M) e  $\alpha$ -L-ácido gulurônico (G). Devido às constantes de dissociação dos monômeros M e G serem 3,38 e 3,65, respectivamente, o alginato de sódio possui a propriedade de apresentar-se negativamente carregado e formar complexos eletrostáticos com a zeína em pHs próximos ao ponto isoelétrico (FIORAMONTI et al., 2014; HARNISILAWAT; PONGSAWATMANIT; MCCLEMENTS, 2006; HU; MCCLEMENTS, 2015). Observou-se que, tanto para NZ quanto para NZ<sub>K</sub>, o aumento da concentração de alginato de sódio é seguido de um aumento significativo do potencial zeta das formulações, conferindo carga superficial mais negativa. Inicialmente observa-se um aumento do tamanho de partícula e do PDI dos complexos, levando à formação de precipitados, provavelmente devido à baixa concentração de polissacarídeo. À medida que a concentração é elevada, e a competição elétrica ocorre pela interação com as nanopartículas, o diâmetro dos nanocarreadores de zeína é reduzido, bem como o PDI, indicando que ocorre uma interação mais ordenada entre o alginato de sódio e as nanopartículas. Hu e McClements (2015) indicam que, abaixo de uma concentração crítica, o alginato de sódio interage com as nanopartículas de zeína formando uma rede de floculação, sendo provavelmente a causa da formação de estruturas de elevado diâmetro e dos precipitados inicialmente observados. Uma vez que a concentração de polissacarídeo é superior a esta concentração de saturação, uma interação mais ordenada toma conta, estabilizando as nanopartículas proteicas.

Porém, provavelmente devido à alta massa molar e ao elevado raio de giração do polissacarídeo, o diâmetro das nanopartículas aumenta entre de 3 a 16 vezes em relação, e o PDI indica um sistema polidisperso (PDI > 0,20). Sendo assim, os nanocomplexos formados com a adição de uma concentração final de alginato de sódio igual a  $2,0 \times 10^{-2}$  % (m/v) foi selecionada para os ensaios posteriores, uma vez que apresentam as propriedades físico-químicas mais adequadas, bem como maior reprodutibilidade entre as formulações, sendo assim denominadas NZ-AS e NZ<sub>K</sub>-AS.

As interações entre o alginato de sódio e as nanopartículas puderam ser evidenciadas através das análises subsequentes de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e microcalorimetria exploratória diferencial (DSμC). Uma pequena alteração no número de onda relativo ao estiramento do ácido carboxílico e do grupamento C–O presentes no alginato de sódio (DAEMI; BARIKANI, 2012; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013) é observada para as amostras NZ-AS, no entanto, alterações mais significativas não foram observadas devido à

sobreposição de bandas de interesse entre o polissacarídeo e a proteína. Entretanto, a análise por espectroscopia no infravermelho das amostras NZ<sub>K</sub>-AS não foram conclusivas, uma vez que bandas bastante intensas do tensoativo Kolliphor P188 impossibilitaram a verificação de interações entre a zeína e o polissacarídeo. Quando avaliadas por DS $\mu$ C observou-se que o alginato de sódio apresenta em 56,80 °C um evento característico de transição vítrea (LIN; YEH, 2004) que não pode ser observado nas amostras NZ-AS e NZ<sub>K</sub>-AS devido à sobreposição de eventos endotérmicos mais intensos. As NZ apresentam eventos endotérmicos nas temperaturas de 28,98 e 50,75 °C, enquanto a amostra NZ-AS apresenta uma alteração do formato do pico endotérmico com T<sub>máxima</sub> em 50,92 °C. Esta pequena alteração observada por DS $\mu$ C não é conclusiva quanto a interação entre o polissacarídeo e a NZ, no entanto os resultados obtidos por FT-IR sugerem uma interação, provavelmente por ligação de hidrogênio. Por outro lado, as NZ<sub>K</sub> apresentam evento endotérmico proeminente em 46,59 °C que fora reduzido para 45,25 °C quando o sistema foi submetido à interação com o polissacarídeo. Sendo assim, observa-se que através dos resultados obtidos por FT-IR é caracterizada a interação entre a proteína e o polissacarídeo em NZ-AS, e a interação na amostra NZ<sub>K</sub>-AS é verificada por DS $\mu$ C.

Indícios de interação puderam ser visualizadas através da análise por MET, onde houve uma redução da densidade eletrônica na superfície das nanopartículas NZ-AS, apresentando uma morfologia mais elíptica e menos regular, provavelmente devido ao recobrimento das nanopartículas com o polissacarídeo. As formulações NZ<sub>K</sub>-AS, por sua vez, mantiveram sua morfologia esférica, apresentando estruturas de baixa densidade eletrônica na superfície das partículas, sendo um indicativo de interação eletrostática entre as nanopartículas estabilizadas com tensoativo e o polímero alginato de sódio. No entanto, as formulações preparadas a partir da interação com o polissacarídeo alginato de sódio revelaram a formação de redes, potencialmente formadas pelo polímero, contendo nanopartículas imobilizadas em seu interior. Este fenômeno pode estar relacionado diretamente ao aumento do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas proporcionado pela interação destas com o polímero natural.

De forma semelhante, pôde-se verificar a interação entre as nanopartículas de zeína NZ e NZ<sub>K</sub> com o polímero natural goma arábica. A goma arábica é um heteropolissacarídeo de estrutura complexa e ramificada, com cadeia principal composta por unidades de  $\beta$ -galactopiranosil com resíduos laterais de <sub>L</sub>-arabinose, <sub>L</sub>-ramnose, <sub>D</sub>-galactose e <sub>D</sub>-ácido glutâmico, ligados através de ligações  $\beta(1\rightarrow6)$ . Este

complexo polimérico pode ser composto por frações variáveis de arabinogalactana, glicoproteínas e arabinogalactana-proteína (GASHUA; WILLIAMS; BALDWIN, 2016; TSAI; KITAMURA; KOKAWA, 2017).

Considerando que a goma arábica apresenta carga levemente negativa (CHEN; ZHONG, 2015), observou-se que a adição de goma arábica induziu um aumento das cargas negativas na superfície das nanopartículas. Em um primeiro momento, houve um aumento exacerbado do diâmetro hidrodinâmico e do PDI, induzindo à sedimentação dos sistemas nanoestruturados, seguido de uma redução do diâmetro das nanopartículas decoradas com goma arábica, e do PDI, ao passo que o potencial zeta é estabilizado em aproximadamente  $-28$  mV. A redução do PDI, associado à elevação do potencial zeta, são indícios de que um aumento da estabilidade das nanopartículas de zeína pode ter sido alcançado através da interação das nanopartículas com os polissacarídeos. (CHEM; ZHONG, 2015; GASHUA; WILLIAMS; BALDWIN, 2016). As análises por MET demonstram que existe um envelopamento das nanopartículas pelas cadeias de goma arábica, observado através da redução da densidade eletrônica das nanopartículas NZ-GA e NZ<sub>K</sub>-GA, com formação de agregados de nanocomplexos. Sendo assim, através das características físico-químicas das nanopartículas, a concentração de 1,0 % de goma arábica foi selecionada para realização dos ensaios posteriores.

Quando avaliadas por FT-IR, verificou-se que a interação entre NZ e a goma arábica resultou em um deslocamento das bandas características do estiramento C-O-C e do estiramento simétrica da carboxila, indicando que possivelmente existe uma relação entre o grupamento carregado negativamente da goma arábica com resíduos de aminoácidos carregados positivamente na zeína. Esta interação eletrostática, possivelmente, ocorre concomitantemente às interações hidrofóbicas entre os biomateriais (CHEN; ZHONG, 2015; ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010). Os resultados obtidos a partir do ensaio de DS<sub>μ</sub>C corroboram com a hipótese de interação entre o polissacarídeo e a proteína, considerando o desaparecimento do evento endotérmico característico da zeína em 28,98 °C, e a redução da entalpia e alteração da temperatura do segundo evento endotérmico, 53,59 °C e 50,75 °C, para a goma arábica e as NZ, respectivamente, e a NZ-GA em 51,09 °C. Por outro lado a interação entre NZ<sub>K</sub> e goma arábica somente pôde ser evidenciada através da análise térmica, reduzindo a temperatura do evento endotérmico de 46,59 °C e 45,25 °C para a NZ<sub>K</sub> e a NA<sub>K</sub>-GA.

Por fim, três diferentes massas molares de quitosana foram avaliadas quanto à capacidade de estabilizar as nanopartículas de zeína. A quitosana é um polissacarídeo linear obtido através da desacetilação da quitina, que pode ser extraída a partir da carapaça de crustáceos. Este polímero catiônico é composto por resíduos de N-acetil-D-glucosamina e unidades de  $\beta$ -(1,4)-D-glucosamina dispostas aleatoriamente. Apresenta um  $pK_a$  de aproximadamente 6,5 e dependendo do grau de depolimerização pode ser disponibilizada como quitosana de baixa, média ou alta massa molar, apresentando diferenças quanto à densidade de cargas positivas e viscosidade (LIANG et al., 2017; LUO et al., 2011). Quando as formulações NZ e NZ<sub>K</sub> foram incubadas com a quitosana, independentemente da massa molar do polissacarídeo, verificou-se um aumento estatisticamente significativo do potencial zeta das nanopartículas, elevando sua carga superficial positiva, mesmo nas menores concentrações avaliadas.

Quando as quitosanas foram utilizadas, independentemente da massa molar do polímero, não foi observado um aumento estatisticamente significativo no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, apesar de haver uma oscilação do tamanho dos sistemas nanoparticulados à medida que a concentração do polissacarídeo é aumentada. Um aumento estatisticamente significativo foi verificado somente nas concentrações mais elevadas da QAMM e na QMMM. Este fator pode estar relacionado à formação de uma rede entre as cadeias de polissacarídeo nos polímeros de maior massa molar. De forma semelhante o PDI apresentou um incremento à medida que a concentração de polissacarídeo foi elevada, formando um sistema mais heterogêneo (LUO et al., 2011). Desta forma, foram selecionadas as concentrações de 0,025 %, 0,125, e  $2,5 \times 10^{-3}$  % (m/v) para a QAMM, QMMM e QBMM, respectivamente.

Através da análise por MET verifica-se uma redução da densidade eletrônica e manutenção das propriedades morfológicas das NZ-Quitosana e NZ<sub>K</sub>-Quitosana, independentemente da massa molar do polissacarídeo. No entanto, observa-se, para as amostras que interagiram com QAMM e QMMM, a formação de uma rede de polímeros ao redor das nanopartículas, enquanto as formulações preparadas com QBMM demonstraram a alteração da superfície das partículas, sem formação da rede de polissacarídeos, possivelmente devido a um menor raio hidrodinâmico, menor raio de giração e menor densidade catiônica do polímero de menor massa molar (BEKALE; AGUDELO; TAJMIR-RIABI, 2015).

Quando avaliadas por FT-IR, nenhuma interação pôde ser verificada entre os polissacarídeos e as NZ e NZ<sub>K</sub>, uma vez que existe sobreposição entre as bandas características da quitosana e da zeína. Por outro lado, através da análise por DS<sub>μ</sub>C, pôde-se verificar uma redução da temperatura do evento endotérmico principal das nanopartículas de zeína que interagiram com as quitosanas, NZ-Quitosana e NZ<sub>K</sub>-Quitosana. As interações entre a zeína e a quitosana podem ocorrer por interação eletrostática, ligação de hidrogênio ou interação hidrofóbica (BEKALE; AGUDELO; TAJMIR-RIahi, 2015; FARRIS et al., 2017; LUO et al., 2011). Bekale, Agudelo e Tajmir-Riahi (2015) demonstraram que a massa molar da quitosana apresenta influência sobre a interação com proteínas. Os autores avaliaram a interação dos polissacarídeos de alta, média e baixa massa molar com as proteínas albumina sérica bovina (BSA) e albumina sérica humana (HSA), e verificaram que a interação da quitosana com a BSA ocorre principalmente por interação hidrofóbica, enquanto a interação com a HSA é majoritariamente comandada por interações eletrostáticas. O aumento da massa molar da quitosana aprimorou a interação com a BSA enquanto a quitosana de média massa molar apresentou melhor interação com a HSA do que os polissacarídeos de alta e baixa massa molar. Assim, verifica-se que a influência da massa molar é dependente do tipo de proteína, que, paralelamente, interage através de diferentes mecanismos, dependendo da natureza proteica. Considerando o aumento da carga superficial e o deslocamento dos eventos endotérmicos das amostras NZ-Quitosana e NZ<sub>K</sub>-Quitosana, ao passo que nenhuma alteração foi verificada por FT-IR, as quitosanas de alta, média e baixa massa molar parecem interagir com as nanopartículas através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas.

A presença de tensoativo e/ou de polissacarídeos não apresentou influência estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) no teor de  $\gamma$ -orizanol e na eficiência de encapsulação das nanopartículas (EE%), que permaneceram em torno de 62,2  $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -orizanol.mL<sup>-1</sup> de formulação e 100 %, respectivamente. O  $\gamma$ -orizanol é uma mistura de ésteres do ácido ferúlico com álcoois triterpênicos, que devido a seus núcleos esteroidais, apresentam alta hidrofobicidade (MEUNIER; GOUPIL; LIENARD, 2017; MILLER; ENGEL, 2006; SHI et al., 2016; TAKEUCHI et al., 2017; XU; GODBER, 1999). Sendo assim, a alta interação hidrofóbica do  $\gamma$ -orizanol com a zeína resulta em elevadas eficiências de encapsulação, uma vez que existe uma pequena tendência à difusão dos fitoesteróis da matriz proteica para a fase aquosa, explicando a ausência

de concentração detectável do  $\gamma$ -orizanol na fase ultrafiltrada/centrifugada.

Os sistemas de liberação selecionados anteriormente foram avaliados quanto à estabilidade física acelerada. Dentre os sistemas avaliados na Figura 36, pode-se observar que o tensoativo Kolliphor P188 tende a elevar a estabilidade física das nanopartículas de zeína, apresentando menor oscilação da transmitância em função do espaço e do tempo, e a consequente redução significativa ( $P < 0,05$ ) do índice de instabilidade quando comparadas às formulações NZ e NZ<sub>K</sub>. Este aumento da estabilidade está relacionado diretamente ao aumento do potencial zeta das formulações, e principalmente ao efeito estérico exercido pelo polímero tribloco na superfície dos nanocarreadores, reduzindo a agregação induzida pela interação hidrofóbica da superfície das nanopartículas (HU; MCCLEMENTS, 2014; da ROSA et al., 2015; SANTANDER-ORTEGA et al., 2007). Por outro lado, com a adição de polissacarídeos às formulações, diferentes comportamentos foram observados. Quando os polissacarídeos alginato de sódio e goma arábica são utilizados, existe um aumento significativo do índice de instabilidade das formulações. O aumento do índice de instabilidade causado através da interação entre a NZ e a NZ<sub>K</sub> com o alginato de sódio está diretamente relacionado ao aumento do diâmetro hidrodinâmico e do PDI das nanopartículas. A polidispersão do sistema e o aumento do diâmetro das nanopartículas implicam em uma elevação da probabilidade de interação entre as partículas. O aumento do diâmetro das nanopartículas impacta diretamente na redução do movimento Browniano dos nanocarreadores, e a redução da mobilidade tende a promover a agregação e consequentemente a precipitação dos agregados formados (KOVALCHUK; STAROV, 2012). Porém, a interação das nanopartículas NZ e NZ<sub>K</sub> com a goma arábica proporcionou maior efeito sobre a redução da estabilidade do sistema, mesmo apresentando uma significativa redução do diâmetro hidrodinâmico e do PDI, quando comparados aos sistemas obtidos a partir da interação com o alginato de sódio. E este fator pode estar relacionado ao fato de que a goma arábica confere menor carga superficial às nanopartículas que o alginato de sódio, somado à significativa elevação da densidade das nanopartículas ( $P < 0,05$ ). Segundo a Lei de Stokes, a velocidade de sedimentação de uma partícula em suspensão é diretamente relacionada ao quadrado do diâmetro das partículas, à densidade das partículas, densidade do meio e à força gravitacional, enquanto apresenta relação inversamente proporcional à viscosidade do meio (LERCHE, 2002; LERCHE;



SOBISCH, 2014). Adicionalmente, quando avaliada por MET, as NZ-GA e NZ<sub>K</sub>-GA apresentam mais agregados, corroborando a hipótese de que a goma arábica promova maior agregação entre as nanopartículas, culminando no menor índice de instabilidade obtido. Chang e colaboradores (2017) observaram que a interação eletrostática da goma arábica com nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio promoveu agregação excessiva entre os nanocarreadores, formando precipitados e conseqüentemente reduzindo a estabilidade do sistema nanoparticulado, provavelmente devido à formação de uma estrutura, descrita pelos autores como tipo casca de nozes.

Por outro lado, a quitosana promoveu uma redução significativa do índice de instabilidade dos sistemas, apresentando relação diretamente proporcional entre o aumento da massa molar do polissacarídeo e a elevação da estabilidade física em condição acelerada das nanopartículas obtidas através da interação da quitosana com as amostras NZ e NZ<sub>K</sub>. Na Figura 36 verifica-se uma pequena variação do perfil de transmitância espaço e tempo dependente das nanopartículas estabilizadas com quitosana. Mesmo com o aumento da densidade das partículas após interação com as nanopartículas NZ e NZ<sub>K</sub>, a redução do índice de instabilidade dos sistemas contendo quitosana pode estar diretamente relacionada ao aumento da carga superficial das nanopartículas, entre +50 e +61 mV. Com o aumento da massa molar da quitosana, verifica-se um aumento da distribuição de grupamentos catiônicos por molécula de polissacarídeo ou da densidade elétrica do polímero, podendo colaborar com o aumento da repulsão elétrica entre as partículas (LIANG et al., 2017; LUO et al., 2011). Sendo assim, pode-se verificar que através da interação entre as nanopartículas e a quitosana, foi possível elevar a estabilidade física das nanopartículas, enquanto os polissacarídeos alginato de sódio e goma arábica reduziram significativamente a estabilidade das nanopartículas, que se tornaram mais susceptíveis à sedimentação. Assim como observado por Hou e colaboradores (2012), a quitosana de média massa molar parece adsorver de forma mais eficiente à superfície das nanopartículas, uma vez que promove maior efeito sobre o aumento da estabilidade física dos nanocarreadores proteicos.

O perfil de liberação do  $\gamma$ -orizanol a partir dos sistemas nanoestruturados foi avaliado por um período de 48 h, seguido do cálculo da eficiência de dissolução e a da verificação dos modelos matemáticos que melhor descrevem o mecanismo de liberação dos fitoesteróis. As nanopartículas de zeína foram capazes de controlar a liberação do  $\gamma$ -orizanol, principalmente devido às características

hidrofóbicas dos fitoesteróis e da matriz proteica, exercendo efeito direto na baixa difusão das moléculas do  $\gamma$ -orizanol através da matriz proteica para o meio de liberação. Chang e colaboradores (2017) observaram semelhante efeito da zeína no controle da liberação de curcumina, um polifenol hidrofóbico. A presença do tensoativo Kolliphor P188 na formulação não afetou de forma estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) a eficiência de dissolução do  $\gamma$ -orizanol que apresentou *plateau* de liberação após aproximadamente 12 horas, atingindo um máximo de liberação em torno de 76 e 78 % para NZ e NZ<sub>K</sub>, respectivamente. Chuacharoen e Sabliov (2016) observaram que a presença de tensoativos na superfície das nanopartículas de zeína reduziram, em cerca de 3 vezes, o percentual de luteína liberado nas primeiras horas quando comparado com as formulações preparadas na ausência de tensoativos. Tal fenômeno não foi observado no presente estudo, provavelmente devido à maior hidrofobicidade do  $\gamma$ -orizanol, em relação à luteína, proporcionando menor difusão dos fitoesteróis para o meio de liberação.

Adicionalmente, a provável formação de uma estrutura compacta durante o processo de nanoprecipitação (WANG; PADUA, 2012) restringe ainda mais a capacidade do  $\gamma$ -orizanol em se difundir das camadas mais internas da nanopartícula para o meio de liberação. Esta hipótese corrobora com o baixo coeficiente de correlação para o modelo de cinética de liberação de Higuchi, indicando que o mecanismo de difusão, por si só, não representa adequadamente o comportamento de liberação do  $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína (SIEPMANN; PEPPAS, 2001; SIEPMANN; PEPPAS, 2011; PAUL, 2011).

Por sua vez, quando as nanopartículas de zeína interagem com os polissacarídeos avaliados, uma alteração do perfil de liberação *in vitro* do  $\gamma$ -orizanol pode ser verificada na Figura 43A-B, bem como na Tabela 15. Observa-se que a interação das nanopartículas de zeína com os polissacarídeos impacta de forma distinta, variando de acordo com o polímero empregado. Quando as nanopartículas NZ e as NZ<sub>K</sub> interagem com o alginato de sódio, existe uma tendência a se obter um maior retardo na liberação *in vitro* do  $\gamma$ -orizanol, impactando de forma significativa na redução da eficiência de dissolução do fitoesterol ( $P < 0,05$ ). A goma arábica, por sua vez, apresentou pouca ou nenhuma influência sobre o perfil de dissolução, enquanto a quitosana proporcionou um aumento na taxa de liberação do  $\gamma$ -orizanol, elevando significativamente sua eficiência de dissolução ( $P < 0,05$ ). Adicionalmente, verificou-se uma tendência a uma relação inversamente

proporcional entre a massa molar da quitosana e o aumento da eficiência de dissolução do  $\gamma$ -orizanol. No entanto, esta tendência é mais evidente para as nanopartículas preparadas na ausência de Kolliphor P188 (Figura 43A e Tabela 15), sugerindo que a presença de Kolliphor P188 (Figura 43B) na formulação reduza o efeito da massa molar do polissacarídeo sobre o perfil de liberação *in vitro* dos ésteres do ácido ferúlico com os álcoois triterpênicos (KHAN, 1975).

Diferentes autores têm estudado o perfil de liberação de distintas moléculas hidrofóbicas a partir da matriz de zeína (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016; LUO et al., 2011; PATEL et al., 2010; PATEL et al., 2012; PATEL; VELIKOV, 2014; SUN et al., 2017), no entanto, a literatura carece de estudos que avaliam o mecanismo de liberação de moléculas bioativas a partir de nanopartículas de zeína.

Para seleção dos modelos matemáticos adequados para descrição da cinética de liberação *in vitro* do  $\gamma$ -orizanol a partir dos sistemas nanoestruturados, foram selecionados aqueles modelos que apresentaram coeficiente de correlação ( $r^2$ ) superiores a 0,970 (BALCERZAK; MUCHA, 2010; DASH et al., 2010). Neste sentido, na Tabela 20 observa-se que as nanopartículas de zeína, mesmo após interação com os diferentes polissacarídeos, apresentam coeficientes de correlação iguais ou superiores a 0,990 para o modelo de Hixson-Crowell, consistindo em um mecanismo de liberação de  $\gamma$ -orizanol caracterizado pela dissolução em função da alteração da área superficial das nanopartículas (HIXSON; CROWELL, 1931; SITTA et al., 2014). O coeficiente de Hixson-Crowell ( $K_{HC}$ ) é reduzido quando o polissacarídeo alginato de sódio é adicionado às nanopartículas, indicando uma tendência de redução da relação entre a dissolução do  $\gamma$ -orizanol e a variação da área superficial das nanopartículas. A goma arábica, por sua vez, apresenta pouca ou nenhuma interferência sobre o  $K_{HC}$ , enquanto a quitosana eleva consideravelmente o coeficiente. O efeito da quitosana sobre o  $K_{HC}$  é inversamente proporcional à massa molar do polissacarídeo, indicando que quanto menor a massa molar deste polímero catiônico, maior o coeficiente de Hixson-Crowell.

Mesmo que a matriz proteica apresente baixa solubilidade em meio aquoso, é possível que durante o ensaio de dissolução haja a difusão de moléculas de água nas região superficial das nanopartículas, onde durante o processo de formação das nanopartículas, se situam as regiões menos hidrofóbicas da zeína (NONTHANUM; LEE; PADUA, 2013; WANG; PADUA, 2012). Este processo pode ser facilitado devido à provável relaxação das cadeias proteicas em virtude da temperatura utilizada no ensaio de dissolução.

Concomitantemente, existe uma tendência das nanopartículas se adequarem também ao modelo de Peppas-Sahlin, indicando que, nas primeiras 3 horas, a liberação de  $\gamma$ -orizanol ocorre sob influência do mecanismo de difusão Fickiana ( $k_1$ ), seguido de um mecanismo regido pela erosão das nanopartículas ( $k_2$ ), indicando que, em um primeiro momento, a liberação do  $\gamma$ -orizanol está relacionada à difusão das moléculas, provavelmente, adsorvidas à superfície das nanopartículas, seguido de um mecanismo regido pela erosão da matriz ou relaxação das cadeias proteicas para posterior liberação dos fitoesteróis retidos no interior das nanopartículas (FU; KAO, 2010; PEPPAS; SAHLIN, 1989; SIEPMANN; PEPPAS, 2011; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008).

Adicionalmente, as nanopartículas de zeína preparadas apresentaram coeficientes de correlação adequados para o modelo de primeira ordem, indicando influência da concentração liberada sobre o taxa de liberação do  $\gamma$ -orizanol. Este fenômeno caracteriza um provável efeito da matriz polimérica sobre o perfil de liberação dos fitoesteróis (BALCERZAK; MUCHA, 2010; DASH et al., 2010). E quando avaliado o modelo de Korsmeyer-Peppas, observa-se que, apesar dos menores coeficientes de correlação, observa-se que as amostras NZ<sub>K</sub> e as nanopartículas estabilizadas com quitosana apresentam constante ( $n$ ) entre 0,45 e 0,89, indicando um mecanismo de transporte anômalo, não Fickiano, enquanto as formulações NZ e as nanopartículas adicionadas de alginato de sódio e de goma arábica, apresentam  $n$  superior a 0,89, sendo relacionado ao mecanismo de transporte de Caso II, não Fickiano (LAO et al., 2011; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). Desta formas sugere-se que, as nanopartículas preparadas com adição de alginato de sódio e goma arábica apresentam maior influência do mecanismo de relaxação das cadeias poliméricas para difusão do  $\gamma$ -orizanol através da matriz proteica/polissacarídica. Estes resultados corroboram com a aplicação do modelo de primeira ordem, salientando a importância do efeito da matriz sobre a liberação do  $\gamma$ -orizanol.

Por outro lado, as nanopartículas estabilizadas com quitosana apresentaram mecanismo relacionado à difusão e à modificação da área superficial das nanopartículas. Observa-se, ainda, que com a redução da massa molar da quitosana, houve um aumento da constante de Korsmeyer-Peppas ( $K_{KP}$ ), e que existe uma tendência à elevação da  $K_{KP}$  com o uso de Kolliphor P188 na formulação das nanopartículas, evidenciando que estes parâmetros elevam a característica anômala da cinética de liberação do  $\gamma$ -orizanol. Luo e colaboradores (2011) demonstraram que a incorporação de quitosana em nanopartículas de zeína proporcionou um aumento do percentual de liberação de  $\alpha$ -

tocoferol, seguido de uma constante redução da taxa de liberação à medida que a massa de quitosana é aumentada. Este fator pode estar relacionado ao fato de que a interação eletrostática entre a proteína e a quitosana, inicialmente promova alteração superficial suficiente para que a matriz proteica se torne mais permeável às moléculas encapsuladas e ao meio de dissolução. O aumento da concentração de polissacarídeo pode levar à formação de uma rede tridimensional de quitosana que envolve as nanopartículas, reduzindo a liberação de moléculas encapsuladas devido a uma menor solvatação/difusão de solvente e devido à capacidade da matriz polissacarídica em reter as moléculas bioativas, retardando ainda mais a liberação destes compostos no meio de liberação (LUO et al., 2011).

Desta forma, pode-se propor que o mecanismo de liberação do  $\gamma$ -orizanol a partir das nanopartículas de zeína é governado por diferentes mecanismos. Inicialmente através da difusão do fitoesterol adsorvido na superfície dos carreadores, seguido da difusão do meio de liberação nas camadas menos hidrofílicas da matriz proteica, causando relaxação das cadeias de zeína, promovendo a liberação do  $\gamma$ -orizanol, através de transporte do tipo Caso II ou Supercaso II. Neste sentido, as nanopartículas de zeína foram capazes de controlar a liberação do  $\gamma$ -orizanol, onde a eficiência de dissolução é reduzida à medida que as nanopartículas interagem com alginato de sódio, e elevadas ao passo que a quitosana é utilizada.

Na sequência, foram realizados os estudos de atividade antioxidante através do modelo do radical DPPH<sup>•</sup>, que consiste na avaliação da capacidade do analito em reduzir o radical 2,2-difenil-1-picrilhidazila (DPPH<sup>•</sup>) a 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH-H), convertido de uma solução roxa a uma solução amarelada quando reduzida (MASSAROLO et al., 2017). A atividade antioxidante do  $\gamma$ -orizanol foi avaliada através de soluções do fitoesterol livre e comparada diretamente com a atividade exercida pelo  $\gamma$ -orizanol contido nos sistemas nanoestruturados desenvolvidos. Também foi avaliada a atividade antioxidante dos nanocarreadores preparados na ausência do fitoesterol (nanopartículas brancas). Verificou-se que o  $\gamma$ -orizanol livre apresenta atividade antioxidante de  $33,7 \pm 0,7$  % do radical DPPH<sup>•</sup>, corroborando com ensaios realizados por diferentes autores (JHA; PANCHAL, 2017; JULIANO et al., 2005; MASSAROLO et al., 2017).

Para avaliar a atividade antioxidante do  $\gamma$ -orizanol nanoencapsulado, primeiramente foram avaliados os sistemas nanocarreadores brancos, e verificou-se que as nanopartículas NZ e NZ<sub>K</sub> apresentam atividade antioxidante de  $8,3 \pm 0,4$  e  $7,9 \pm 0,3$ ,

respectivamente. Tang e Zhuang (2014) estudaram a atividade antioxidante da zeína através dos modelos de atividade de redução de radical, quelação de íons metálicos, e inibição da lipoperoxidação. Para tanto, a zeína foi hidrolisada e as frações desta prolamina avaliadas quanto à atividade antioxidante. Os autores verificaram que a fração com tamanho inferior a 3 kDa, composta pelos peptídeos Prolina-Fenilalanina (263,13 Da) e Leucina-Prolina-Fenilalanina (375,46 Da) apresentaram os maiores índices de atividades antioxidantes quanto à redução de radicais e à inibição da lipoperoxidação. Outros autores ainda sugerem que a atividade antioxidante da zeína, esteja relacionada à presença de resíduo dos aminoácidos histidina, arginina, alanina, valina, metionina e leucina (WU; LUO; WANG, 2012; ZHANG; LUO; WANG, 2011). Deste modo, propõe-se que a pequena atividade antioxidante proveniente das nanopartículas brancas está relacionada à capacidade da prolamina zeína em reduzir o radical DPPH<sup>•</sup>. No entanto, por ser tratar da proteína na sua forma não hidrolisada e organizada na forma de nanopartículas compactas, existe, provavelmente, uma baixa exposição dos resíduos de aminoácido com maior potencial doador de hidrogênios, impactando na baixa capacidade antioxidante. Adicionalmente, a camada do tensoativo tribloco Kolliphor P188 na superfície das amostras NZ<sub>K</sub> tende a reduzir a atividade antioxidante da formulação branca, possivelmente devido a um efeito estérico causado pelo polímero, reduzindo a interação entre os resíduos antioxidantes da zeína e o radical DPPH<sup>•</sup> (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016).

Quando nanoencapsulado, o  $\gamma$ -orizanol apresentou um aumento estatisticamente significativo ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ , onde  $527,779 > 3,885$  para  $\alpha = 0,05$ ) na atividade antioxidante frente ao modelo de redução do radical DPPH<sup>•</sup>. No entanto, não se pode atribuir este aumento de atividade aos componentes dos sistemas nanoparticulados, uma vez que a atividade antioxidante permaneceu inferior a 8,5 % para todas as formulações brancas. Quando os polissacarídeos são empregados, observa-se uma redução da atividade antioxidante das nanopartículas brancas, provavelmente devido a uma redução da acessibilidade aos resíduos redutores do radical DPPH<sup>•</sup> devido a um impedimento estérico proveniente da interação zeína-polissacarídeos.

O alginato de sódio apresenta proeminente atividade antioxidante, onde a proporção dos resíduos de  $\beta$ -D-ácido manurônico (SELLIMI et al., 2015; ŞEN, 2011). Şen (2011) verificou que IC<sub>50</sub> de 25 mg.mL<sup>-1</sup> para o polissacarídeo, no entanto a baixa concentração do polissacarídeo, associada à reduzida mobilidade da cadeia devido interação com as nanopartículas tendem a minimizar o efeito do

polissacarídeo sobre o radical. Enquanto a goma arábica apresenta atividade antioxidante, provavelmente devido à grande quantidade de hidroxilas presentes neste polissacarídeo ramificado (ADDAI et al., 2013), poucos estudos têm demonstrado com clareza o impacto deste polissacarídeo sobre a atividade antioxidante, independentemente do modelo empregado. Por sua vez, García e colaboradores (2015) descrevem que a quitosana apresenta atividade antioxidante, provavelmente devido à doação de hidrogênio do grupamento amino para o radical DPPH<sup>•</sup>, e demonstram que a redução da massa molar do polissacarídeo não interfere significativamente ( $P > 0,05$ ) na atividade antioxidante do polímero.

Quando avaliada a Tabela 17, observou-se que existe uma redução da atividade antioxidante com o uso do alginato de sódio como polissacarídeo, que é aumentado com o emprego da goma arábica, atingindo níveis máximos quando a quitosana interage com as nanopartículas de zeína, sendo as amostras NZ-QBMM e NZ<sub>K</sub>-QBMM aquelas formulações que apresentam maior atividade antioxidante. Sendo assim, é possível inferir que os sistemas nanocarreadores foram capazes de aumentar significativamente a atividade antioxidante do  $\gamma$ -orizanol. Este resultado corrobora com dados da literatura acerca de distintas moléculas bioativas que apresentam um aumento da atividade antioxidante à medida que são carreadas em nanopartículas preparadas por diferentes biomateriais (HUANG et al., 2017; LIANG et al., 2017; da ROSA et al., 2015; ZHANG; ZHAO, 2017).





---

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---



- As nanopartículas de zeína foram satisfatoriamente preparadas pelo método do anti-solvente, onde o aumento da concentração de Kolliphor P188 até a concentração de 1,0 % (m/V) na fase aquosa possibilitou o aprimoramento das características físico-químicas dos nanocarreadores;
- A interação entre os polissacarídeos e as nanopartículas de zeína NZ e NZ<sub>K</sub> pode ser confirmada através da avaliação da variação do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas, bem como análise por microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia no infravermelho e microcalorimetria exploratória diferencial;
- Todos os nanocarreadores apresentaram eficiência de encapsulação de  $\gamma$ -orizanol próximas a 100 %, não havendo diferença significativa entre o emprego de tensoativo e/ou o tipo de polissacarídeo utilizado na formulação;
- Verificou-se que o tensoativo Kolliphor P188 elevou a estabilidade física das nanopartículas. No entanto, os polissacarídeos alginato de sódio e goma arábica reduziram significativamente a estabilidade física das nanopartículas, enquanto a quitosana elevou significativamente a estabilidade física das formulações;
- As nanopartículas de zeína foram capazes de controlar a liberação do  $\gamma$ -orizanol, onde a adição de tensoativo não alteram significativamente a eficiência de dissolução das nanopartículas de zeína;
- A interação das nanopartículas com alginato de sódio reduziu significativamente a eficiência de dissolução, enquanto a goma arábica não modificou as propriedades de liberação do  $\gamma$ -orizanol;
- Por outro lado, a quitosana apresentou um aumento da eficiência de dissolução, provavelmente devido maior relaxação das cadeias de zeína e maior difusão do meio de dissolução na matriz de proteica;
- O mecanismo de liberação do  $\gamma$ -orizanol parece estar relacionado à difusão inicial dos fitoesteróis adsorvidos na superfície das nanopartículas, seguido da difusão do meio de dissolução nas camadas mais hidrofílicas da matriz proteica, com consequente relaxação das cadeias de zeína, promovendo a liberação dos fitoesteróis através de transporte do tipo Caso II;

- As nanopartículas de zeína foram capazes de maximizar o efeito redutor do  $\gamma$ -orizanol sobre o radical DPPH<sup>•</sup>, quando comparado com o fitoesterol livre. No entanto, as nanopartículas brancas não apresentaram atividade antioxidante superior a 8,5 %;
- A interação com alginato de sódio reduziu a atividade antioxidante das nanopartículas de zeína, enquanto a quitosana elevou significativamente a capacidade redutora do radical DPPH<sup>•</sup>, onde as formulações NZ-QBMM e NZ<sub>K</sub>-QBMM apresentaram maiores índices de atividade antioxidante;
- Sendo assim, as formulações preparadas a partir da interação das nanopartículas com quitosana apresentaram menores índices de instabilidade, maior eficiência de dissolução e maior atividade antioxidante, ao passo que mantém PDI menor que 0,2 e elevado potencial zeta, com carga superficial positiva;
- Dentre as formulações preparadas com quitosana, se destacam àquelas provenientes da interação com a QMMM, que confere maior estabilidade física, em condição acelerada, que os demais sistemas;
- Não houve diferença significativa entre as formulações NZ-QMMM e NZ<sub>K</sub>-QMMM. Assim, as nanopartículas NZ-QMMM são consideradas o sistema mais promissor para liberação controlada de  $\gamma$ -orizanol;
- Para estudos posteriores, propõe-se a avaliação da capacidade das nanopartículas em proteger o  $\gamma$ -orizanol da degradação térmica, além da avaliação da incorporação das nanopartículas de zeína em diferentes matrizes alimentícias e verificar a estabilidade física das nanopartículas incorporada ao alimento, principalmente devido à composição iônica das matrizes e avaliar o potencial de aprimoramento da estabilidade do alimento frente ao estresse oxidativo.

---

**APÊNDICE**

---

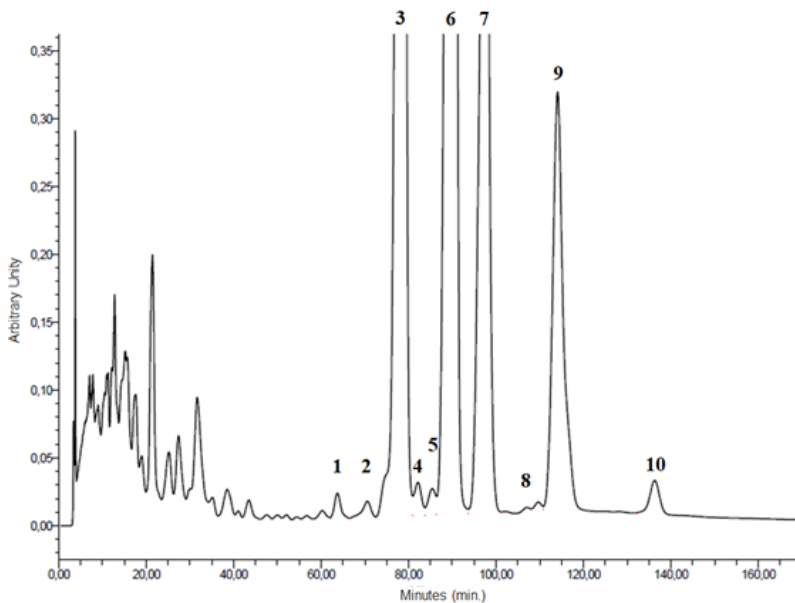


# 1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO $\gamma$ -ORIZANOL

## 1.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO

Para avaliação do perfil cromatográfico do  $\gamma$ -orizanol, foi preparada uma solução de concentração  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  utilizando as mesmas fases móvel e estacionária descritas no item 4.2, porém com o ajuste do fluxo para  $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$ . Esta condição permitiu detectar e separar adequadamente os diferentes ésteres de ácido ferúlico e álcoois triterpênicos.

O perfil cromatográfico da solução de  $\gamma$ -orizanol (Figura 45) apresenta, nos primeiros 12 min., uma sequência de picos menos intensos e com baixa resolução, característicos de substâncias mais polares presentes na matriz vegetal. Na sequência, a eluição de quatro substâncias que resultam em quatro picos mais intensos. Xu e Godber (1999) descrevem o  $\gamma$ -orizanol oriundo da *Oryza sativa* L. como uma mistura majoritariamente constituída por ferulato de cicloartenol, ferulato de 24-metilenocicloartanol, e ferulato campesterol, e menores concentrações de ferulato de  $\Delta^7$ -estigmastenol, ferulato de estigmasterol, ferulato de  $\Delta^7$ -campestenol, ferulato de  $\Delta^7$ -sitostenol, ferulato de sitosterol, ferulato de campestanol, e ferulato de sitostanol. De acordo com os estudos realizados por Rogers e colaboradores (1993), Xu e Godber (1999), Miller e Engel (2006), Kim e colaboradores (2013), e Sakunpak e colaboradores (2014), além das características físico-químicas dos ésteres de ácido ferúlico com álcoois triterpênicos, estima-se que os picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10 correspondam ao ferulato de  $\Delta^7$ -estigmastenol, ferulato de estigmasterol, ferulato de cicloartenol, ferulato de  $\Delta^7$ -campestenol, ferulato de  $\Delta^7$ -sitostenol, ferulato de 24-metilenocicloartanol, ferulato de campesterol, ferulato de campestanol, ferulato de sitosterol, e ferulato de sitostanol, respectivamente, conforme indicado por Rogers e colaboradores (1993), Kim e colaboradores (2013) e por Xu e Godber (1999).

**Figura 45** – Perfil cromatográfico da solução de  $\gamma$ -orizanol.

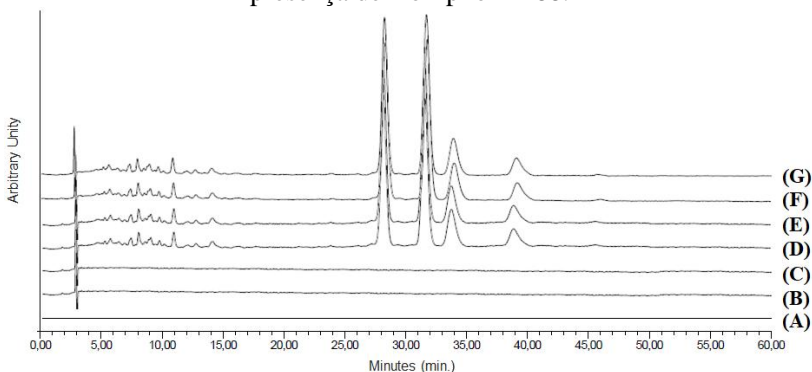
## 1.2 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

### 1.2.1 Especificidade

Para determinar a especificidade do método, foram avaliados cromatograficamente o diluente, nanopartículas preparadas sem a adição de  $\gamma$ -orizanol (nanopartículas brancas), solução de  $\gamma$ -orizanol, solução de NP<sub>Branca</sub> contaminada com  $\gamma$ -orizanol, e solução oriunda da extração do  $\gamma$ -orizanol a partir da nanopartícula de zeína. Os cromatogramas foram sobrepostos na Figura 46 a fim de verificar que não há interferência próximo ao tempo de retenção do  $\gamma$ -orizanol quando avaliados o diluente (Fig. 46A) e as nanopartículas brancas (Fig. 46B–C), indicando que os constituintes da formulação das nanopartículas não interferem na avaliação cromatográfica dos fitoesteróis quando o método desenvolvido foi empregado.



**Figura 46** – Sobreposição dos cromatogramas das soluções preparadas a partir: (A) do diluente; (B) das nanopartículas brancas preparadas na ausência de Kolliphor P188; (C) das nanopartículas brancas preparadas na presença de Kolliphor P188; (D) da solução de  $\gamma$ -orizanol; (E) da solução obtida a partir das nanopartículas brancas preparadas na presença de Kolliphor P188 e contaminadas com  $\gamma$ -orizanol; (F) das nanopartículas contendo  $\gamma$ -orizanol, preparadas na ausência de Kolliphor P188; e (G) das nanopartículas contendo  $\gamma$ -orizanol, preparadas na presença de Kolliphor P188.



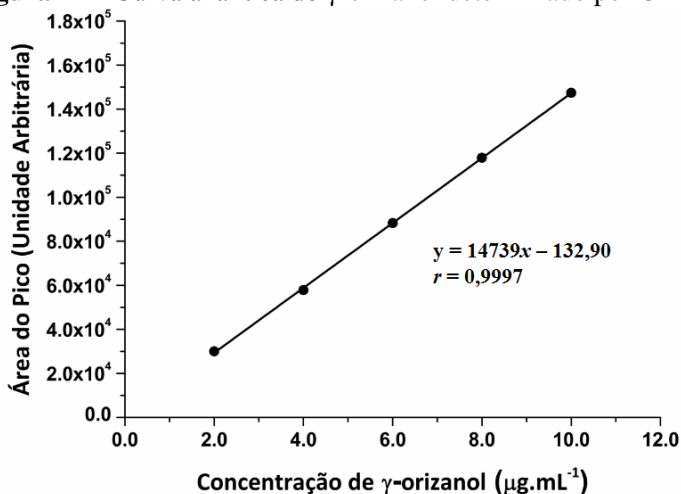
Adicionalmente, observa-se que a solução de  $\gamma$ -orizanol (Figura 46D) apresenta um perfil cromatográfico complexo, principalmente devido à variedade na composição dos ésteres do ácido trans-ferúlico (ácido trans-hidroxicinâmico) com álcoois triterpênicos. As demais soluções contendo  $\gamma$ -orizanol (Fig. 46E–G) apresentam perfil cromatográfico similar à solução padrão, indicando que há ausência de interferência oriunda da matriz proteica sobre identificação dos fitoesteróis, bem como a conservação do perfil após o processo de nanoencapsulação.

### 1.2.2 Linearidade e limites de quantificação e de detecção

Para avaliação da linearidade foram preparadas curvas analíticas para os cinco picos majoritários. As curvas foram plotadas em função da soma das áreas dos picos cromatográficos, expressos como  $\gamma$ -orizanol, uma vez que não foram obtidos padrões devidamente caracterizados para realização de curvas analíticas individuais para os fitoesteróis (Figura 47).

A Figura 47 apresenta a curva analítica obtida para o  $\gamma$ -orizanol, cuja equação da reta média é  $y = 14739x - 132,90$ . Pode-se observar que o intervalo entre as concentrações de 2,0 a 10,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresenta linearidade, uma vez que o valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) é superior a 0,990. Verificou-se, ainda, através da análise de regressão linear, que existe significância da correlação, onde  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$  ( $20826 > 4,667$ ), e que os resíduos se distribuem aleatoriamente. Através do teste de Cochran, pôde-se observar que  $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$  ( $0,4570 < 0,6838$ ), indicando homocedasticidade dos resíduos. Os limites de quantificação e de detecção também foram calculados, correspondendo a 0,286 e 0,095  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Figura 47** – Curva analítica do  $\gamma$ -orizanol determinado por CLAE.



### 1.2.3 Precisão

Nas Tabelas 18 e 19, pode-se observar que o método se mostrou preciso tanto para a quantificação do teor das amostras de nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188 (Teor) quanto para a determinação da concentração de  $\gamma$ -orizanol liberado a partir das nanopartículas de zeína preparadas na presença de Kolliphor P188 (Dissolução), apresentando desvio padrão relativo (DPR%) inferior a 5,0 % para os ensaios de repetibilidade e precisão inter-dia.

**Tabela 18.** Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade do método cromatográfico para determinação do  $\gamma$ -orizanol.

Repetições	Teor	Dissolução
	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
1	6,23	6,04
2	6,19	6,05
3	6,24	6,06
4	6,26	6,04
5	6,23	6,04
6	6,18	6,05
Média	6,22	6,05
DPR (%)	0,49	0,14

**Tabela 19.** Resultados obtidos na avaliação da precisão inter-dia do método cromatográfico para determinação do  $\gamma$ -orizanol.

Dia	Teor		Dissolução	
	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	DPR (%)	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	DPR (%)
1	6,22 $\pm$ 0,03	0,49	6,04 $\pm$ 0,01	0,14
2	6,24 $\pm$ 0,02	0,32	6,05 $\pm$ 0,01	0,17
3	6,21 $\pm$ 0,01	0,16	6,04 $\pm$ 0,01	0,16

### 1.2.4 Exatidão

A Tabela 20 apresenta os valores de recuperação do  $\gamma$ -orizanol adicionado à amostra branca de nanopartículas de zeína e ao meio de dissolução. Todos os valores permaneceram na faixa de 95 a 105%, evidenciando a exatidão do método.

**Tabela 20.** Recuperação do  $\gamma$ -orizanol após contaminação da amostra branca de nanopartículas de zeína e meio de dissolução.

	Concentração teórica de $\gamma$ -orizanol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração experimental de $\gamma$ -orizanol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Recuperação Média (%)
<b>Teor</b>	2,00	1,99	99,50
	6,00	6,01	100,17
	10,00	10,03	100,30
<b>Dissolução</b>	2,00	2,01	100,50
	6,00	6,00	100,00
	10,00	9,98	99,83

### 1.2.5 Robustez

Para avaliação da robustez do método analítico, três parâmetros de análise foram variados: proporção volumétrica entre os componentes da fase móvel, fluxo da fase móvel e comprimento de onda. Como observado na Tabela 21, verifica-se que o método analítico é robusto para quantificação do teor de  $\gamma$ -orizanol nas nanopartículas de zeína e da concentração dos fitoesteróis no meio de dissolução, apresentando DPR inferior a 5%.

## 1.4 CONCLUSÃO

A partir do exposto, verifica-se que o método proposto por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado, demonstrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto, se mostrando adequado para quantificar o  $\gamma$ -orizanol contido nas nanopartículas de zeína, e concentração liberada no meio de dissolução a partir das nanopartículas de zeína.

**Tabela 21.** Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação do  $\gamma$ -orizanol por CLAE.

Variação	Teor		Dissolução		
	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	DPR (%)	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	DPR (%)	
Metanol: Acetonitrila (v/v)	55:45	6,26	0,16	6,03	0,29
	60:40	6,24	0,62	6,04	0,17
	65:35	6,21	0,81	5,97	0,91
Fluxo da Fase Móvel ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )	1,8	6,23	0,11	6,03	0,48
	2,0	6,24	0,62	6,04	0,17
	2,2	6,17	0,67	6,01	0,99
Comprimento de onda (nm)	320	6,23	1,01	6,02	0,38
	330	6,24	0,62	6,04	0,17
	340	6,22	1,12	6,06	1,34



---

## **REFERÊNCIAS**

---





ADDAI, Z. R.; ABDULLAH, A.; MUTALIB, S. A.; MUSA, K. H. Effect of gum arabic on quality and antioxidante properties of papaya fruit during cold storage. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n. 6, p. 2854-2862, 2013.

AKIHISAM T.; YASUKAWA, K.; YAMAURA, M.; UKIYA, M.; KIMURA, Y.; SHIMIZO, N.; ARAI, K. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2313-2319, 2000.

AMORATI, R.; FOTI, R.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.

ARGOS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M. D.; LARKINS, B. A. A structural model for maize zein proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 17, p. 9984-9990, 1982.

AUGUSTIN, M. A.; OLIVER, C. M. An overview of the development and applications of nanoscale materials in the food industry. In: HUANG, Q. **Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries**. Woodhead Publishing: Philadelphia, 2012. 3-39 p.

AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, P. Nanostructured materials in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 58, n. 1, p. 183-212, 2009.

BALCERZAK, J.; MUCHA, M. Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosan. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives**, v. 15, p. 117-126, 2010.

BAZYLIŃSKA, U.; LEWIŃSKA, A.; LAMCH, Ł.; WILK, K. A. Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, n. 1, p. 42-49, 2014.

BEKALE, L.; AGUDELO, D.; TAJMIR-RIAHI, H. A. Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 125, p. 309-317, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Órgão emissor: MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf/view> =>. Acesso em: 30 de setembro de 2016.

BRITZ, S. J.; PRASAD, P. V. V.; MOREAU, R. A.; ALLEN, L. H.; KREMER, D. F.; BOOTE, K. J. Influence of growth temperature on the amounts of tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol in brown rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7559-7565, 2007.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; CIRIC, A.; BARREIRA, J. C. M.; SOKOVIC, M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of a functional dairy food: Exploring bioactive and preservation effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 16, n. 1, p. 114-124, 2015.

CAPELLINI, M. C.; GIACOMINI, V.; CUEVAS, M. S.; RODRIGUES, C. E. C. Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical characterization of oil and protein fraction functionality. **Industrial Crops & Products**, v. 104, n. 1, p. 133-143, 2017.

CHANG, C.; WANG, T.; HU, Q.; LUO, Y. Caseinate-zein-polysaccharide complex nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin: Effect of polysaccharide type and chemical cross-linking. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 254-262, 2017.

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

CHEN, Z.-Y.; MA, K. Y.; LIANG, Y.; PENG, C.; ZUO, Y. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 2, p. 61-69, 2011.

CHEN, J.; ZHENG, J.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Tangeretin-led protein nanoparticles fabricated from zein/ $\beta$ -lactoglobulin: Preparation, characterization, and functional performance. **Food Chemistry**, v. 158, n. 1, p. 466-472, 2014.

CHEN, H.; ZHONG, Q. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. **Food Hydrocolloids**, v. 43, n. 1, p. 593-602, 2015.

CHEN, H.; JIN, X.; LI, Y.; TIAN, J. Investigation into the physical stability of a eugenol nanoemulsion in the presence of a high content of triglyceride. **RSC Advances**, v. 93, n. 6, p. 91060-91067, 2016.

CHEN, Y.; YE, R.; LIU, J. Understanding of dispersion and aggregation of suspensions of zein nanoparticles in aqueous alcohol solutions after thermal treatment. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 764-770, 2013.

CHENG, C. J.; JONES, O. G. Stabilizing zein nanoparticle dispersion with  $\kappa$ -carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 28-35, 2017.

CHOTIMARKORN, C.; USHIO, H. The effect of *trans*-ferulic acid and gamma-oryzanol on ethanol-induced liver injury in C57BL mouse. **Phytomedicine**, v. 15, n. 11, p. 951-958, 2008.

CHUACHAROEN, T.; SABLIOV, C. M. Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 503, n. 1, p. 11-18, 2016.

CORNELSEN, P. A.; QUINTANILHA, R. C.; VIDOTTI, M. V.; GORIN, P. A. J.; SIMAS-TOSIN, F. F.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Native and structurally modified gum Arabic: Exploring the effect of gum's microstructure in obtaining electroactive nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 35-43, 2015.

DAEMI, H.; BARIKANI, M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, dosium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. **Scientia Iranica**, v. 19, n. 6, p. 2023-2028, dez., 2012.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.

DAVIDOV-PARDO, G.; JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade protein-based nanoparticles and microparticles for bioactive delivery: Fabrication, characterization and utilization. In: DONEV, R. **Protein and peptide nanoparticles for drug delivery**. Watham: Elsevier Inc., 2015. 294-325 p.

DIARRASSOUBA, F.; GARRAIT, G.; REMONDETTO, G.; ALVAREZ, P.; BEYSSAC, E.; SUBIRADE, M. Improved bioavailability of vitamin D<sub>3</sub> using a  $\beta$ -lactoglobulin-based coagulum. **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 361-367, 2015.

EL-GHAFFAR, M. A. A.; HASHEM, M. S.; EL-AWADY, M. K.; RABIE, A. M. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 667-675, 2012.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 1, p. 38-49, 2012.

ESPINOSA-ANDREWS, H.; SANDOVAL-CASTILLA, O.; VÁZQUEZ-TORRES, H.; VERNON-CARTER, E. J.; LOBATO-CALLEROS, C. Determination of the gum Arabic-chitosan interactions by fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 541-546, fev., 2010.

FARRIS, E.; BROWN, D. M.; REMER-TAIT, A. E.; PANNIER, A. K. Chitosan-zein nano-in-microparticles capable of mediating *in vivo*

transgene expression following oral delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 249, p. 15-161, 2017.

FERTAH, M.; BELFKIRA, A.; DAHMANE, EL M., TAOURIRTE, M.; BROUILLETTE, F. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3707-S3714, 2017.

FIORAMONTI, S. A.; PEREZ, A. A.; ARINGOLI, E. E.; ROBIOLO, A. C.; SANTIAGO, L. G. Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and Sodium alginate. **Food Hydrocolloids**, v. 35, n. 1, p. 129-136, 2014.

FU, Y.; KAO, W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429-444, 2010.

FUJIMA, S.; SAKURAI, S.; SUGIMOTO, I.; AWATA, N. Absorption and metabolism of  $\gamma$ -oryzanol in rats. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 645-652, 1983.

GARCÍA, M. A.; DE LA PAZ, N.; CASTRO, C.; RODRÍGUEZ, J. L.; RAPADO, M.; ZULUAGA, R.; GAÑÁN, P.; CASARIEGO, A. Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on the antioxidant capacity of chitosan from lobster shells. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 190-200, 2015.

GASHUA, I. B.; WILLIAMS, P. A.; BALDWIN, T. C. Molecular characteristics, association and interfacial properties of gum Arabic harvested from both *Acacia senegal* and *Acacia seyal*. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 514-533, 2016.

GAUCHE, C.; SOLDI, V.; FORT, S.; BORSALI, R.; HALILA, S. Xyloglucan-based diblock co-oligomer: Synthesis, self-assembly and steric stabilization of proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1272-1280, 2013.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSON, B. J. F. **Food antioxidants**, Elsevier: Londres, 1990. 1-15 p.

GUNSTONE, F. D. **The chemistry of oils and fats; Sources, Composition, Properties and Uses.** Blackwell Publishing Ltd: Oxford, 2004. 288 p.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 665-671, 2005.

HAKALA, P.; LAMPI, A.-M.; OLLILAINEN, V.; WERNER, U.; MURKOVIC, M.; WAHALA, K.; KARKOLA, S.; PIIRONEN, V. Steryl phenolic acid esters in cereals and their milling fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5300-5307, 2002.

HARNSILAWAT, T.; PONGSAWATMANIT, R.; MCCLEMENTS, D. J. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 577-585, 2006.

HEINEMANN, R. J. B.; XU, Z.; GODBER, S.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol contents in *japonica* and *indica* subspecies of rice (*Oryza sativa* L.) cultivated in Brazil. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 243-247, 2008.

HIXSON, A. W.; COWELL, J. H. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. III – Experimental procedure in study of agitation. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1160-1168, 1931.

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

HU, K.; HUANG, X.; GAO, Y.; HUANG, X.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 182, n. 1, p. 275-281, 2015.

HU, D.; LIN, C.; LIU, L.; LI, S.; ZHAO, Y. Preparation, characterization, and *in vitro* release investigation of lutein/zein

nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 545-552, 2012.

HU, K.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles : A pH modulated antisolvent precipitation method. **Food Research International**, v. 64, n. 1, p. 329-335, 2014.

HU, K.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 44, n. 1, p. 101-108, 2015.

HUANG, X.; DAI, Y.; CAI, J.; ZHONG, N.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Resveratrol encapsulation in core-shell biopolymer nanoparticles : Impact on antioxidant and anticancer activities. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 157-165, 2017.

ICH, International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: Texte and methodology Q2(R1). **ICH Harmonised Tripartite Guideline**, 2005.

ISLAM, S.; YOSHIDA, H.; MATSUKI, N.; ONO, K.; NAGASAKA, R.; USHIO, H.; GUO, Y.; HIRAMATSU, T.; HOSOYA, T.; MURATA, T.; HORI, M.; OZAKI, H. Antioxidant, free radical-scavenging, and NF- $\kappa$ B-inhibitory activities of phytosteryl ferulates: Structure-activity studies. **Journal of Pharmacological Science**, v. 111, n. 4, p. 328-337, 2009.

JHA, A. B.; PANCHAL, S. S. Neuroprotection and cognitive enhancement by treatment with  $\gamma$ -oryzanol in sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Applied Biomedicine**, *in press*, 2017.

JOYE, I. J.; DAVIDOV-PARDO, G.; LUDESCHER, R. D.; MCCLEMENTS, D. J. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins. **Food Chemistry**, v. 185, n. 1, p. 261-267, 2015.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles : Fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 417-427, 2014.

JOYE, I. J.; NELIS, V. A.; MCCLEMENTS, D. J. Gliadin-based nanoparticles : Fabrication and stability of food-grade colloidal delivery systems. **Food Hydrocolloids**, v. 44, n. 1, p. 86-93, 2015.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, n. 1-2, p. 146-154, 2005.

KARTHIKEYAN, S.; PRASAD, N. R.; GANAMANI, A.; BALAMURUGAN, E. Anticancer activity of resveratrol-loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 64-73, 2013.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p. 48-49, 1975.

KHUWIJTJARU, P.; TAENGTIENG, N.; CHANGPRASIT, S. Degradation of gamma-oryzanol in rice bran oil during heating: An analysis using derivative UV-spectrophotometry. **Silpakorn University Journal of Social Sciences, Humanities and Arts**, v. 4, n. 1-2, p. 154-165, 2004.

KIM, H. W.; KIM, J. B.; SHANMUGAVELAN, P.; KIM, S. N.; CHO, Y. S.; KIM, H. R.; LEE, J.-T.; JEON, W.-T.; LEE, D. J. Evaluation of  $\gamma$ -oryzanol content and composition from the grains of pigmented rice-germplasms by LC-DAD-ESI/MS. **BioMed Central Research Notes**, v. 6, n. 149, p. 1-11, 2013.

KIM, J. S.; GODBER, J. S.; KING, J. M.; PRINYAWIWATKUL, W. Inhibition of cholesterol autoxidation by the nonsaponifiable fraction in rice bran in an aqueous model system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 7, p. 685-689, 2001.

KIM, J. S.; LEE, J.-S.; CHANG, P.-S.; LEE, H. G. Optimization, *in vitro* release and bioavailability of  $\gamma$ -oryzanol-loaded calcium pectinate microparticles reinforced with chitosan. **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 368-373, 2010.



KOVALCHUK, N. M.; STAROV, V. M. Aggregation in colloidal suspensions: Effect of colloidal forces and hydrodynamic interactions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 179-182, p. 99-106, 2012.

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

LAO, L. L.; PEPPAS, N. A.; BOEY, F. Y. C.; VENKATRAMAN, S. S. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 28-41, 2011.

LEE, J.-S.; KIM, J. S.; LEE, H. G.  $\gamma$ -Oryzanol-loaded calcium pectinate microparticles reinforced with chitosan: Optimization and release characteristics. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 70, n. 2, p. 213-217, 2009.

LERCHE, D. Dispersion stability and particle characterization by sedimentation kinetics in a centrifugal field. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 23, n. 5, p. 699-709, 2002.

LERCHE, D.; SOBISCH, T. Evaluation of particle interactions by *in situ* visualization of separation behavior. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 440, n. 1, p. 122-130, 2015.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 1, p. 725-734, 2002.

LI, K.-K.; YIN, S.-W.; YIN, Y.-C.; TANG, C.-H.; YANG, X.-Q.; WEN, S.-H. Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 2, p. 343-352, 2013.

LIANG, J.; YAN, H.; WANG, X.; ZHOU, Y.; GAO, X.; PULIGUNDLA, P.; WAN, X. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. **Food Chemistry**, v. 231, p. 19-24, 2017.

LIAO, J.-B.; LIANG, Y.-Z.; CHEN, Y.-L.; XIE, J.-H.; LIU, W.-H.; CHEN, J. N.; LAI, X.-P.; SU, Z.-R. Novel patchouli alcohol ternary solid dispersion pellets prepared by Poloxamers. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 1, p. 15-26, 2015.

LIN, H.-R.; YEH, Y.-J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and *in vitro* studies. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 71B, n. 1, p. 52-65, 2004.

LIU, F.; WANG, D.; SUN, C.; GAO, Y. Influence of polysaccharides on the physicochemical properties of lactoferrin-polyphenol conjugates coated  $\beta$ -carotene emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 52, n. 1, p. 661-669, 2016.

LIU, S.; SUN, C.; XUE, Y.; GAO, Y. Impact of pH, freeze-thaw and thermal sterilization on physicochemical stability of walnut beverage emulsion. **Food Chemistry**, v. 196, n. 1, p. 475-485, 2016.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LÖWIK, D. W.; van HEST, J. C. Peptide based amphiphiles. **Chemical Society Reviews**, v. 33, n. 4, p. 234-245, 2004.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D<sub>3</sub>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 836-843, 2012.

LUO, Y.; ZHANG, B.; WHEAT, M.; YU, L.; WANG, Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its *in vitro* controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145-152, 2011.

MADELEINE-PERDRILLAT, C.; KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; DELMOTTE, L.; VAULOT, C.; CHAMPION, D. Effect of hydration on molecular dynamics and structure in chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 57-65, 2016.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1409-1418, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MARANGONI, F.; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 193-199, 2010.

MASSAROLO, K. C.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. de S. Effect of particle size of rice bran oil gamma-oryzanol content and compounds. **Journal of Cereal Science**, v. 75, n. 1, p. 54-60, 2017.

MATSUSHIMA, N.; DANNO, G.; TAKEZAWA, H.; IZUMI, Y. Three-dimensional structure of maize alpha-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1339, n. 1, p. 14-22, 1997.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, n. 1, p. 27-53, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems. In: GARTI, N.; MCCLEMENTS, D. J. **Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. Woodhead Publishing: Philadelphia, 2012. 4-18 p.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 181-188, 2003.

MEUNIER, M.; GOUPIL, A.; LIENARD, P. Predicting drug loading in PLA-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1-2, p. 157-166, 2017.

MILLER, A.; ENGEL, K.-H. Content of  $\gamma$ -oryzanol and composition of steryl ferulates in brown rice (*Oryza sativa* L.) of European origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8127-8133, 2006.

MOTHÉ, C. G.; RAO, M. A. Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum. **Thermochimica Acta**, v. 357-358, p. 9-13, 2000.

NAGASAKA, R.; CHOTIMARKORN, C.; ISLAM, S. Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 2, p. 615-619, 2007.

NAGPAL, M.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. Synthesis characterization and *in vitro* drug release from acrylamide and sodium alginate based superporous hydrogel devices. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 3, n. 3, p. 131-140, 2013.

NIE, S.-P.; WANG, C.; CUI, S. W.; WANG, Q.; XIE, M.-Y.; PHILLIPS, G. O. A further amendment to the classical core structure of gum Arabic (*Acacia Senegal*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 42-48, 2013.

NONTHANUM, P.; LEE, Y.; PADUA, G. W. Effect of pH and ethanol content of solvent on rheology of zein solutions. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 76-81, 2013.

NYSTRÖM, L.; ACHRENIUS, T.; LAMPI, A.-M.; MOREAU, R. A.; PIIRONEN, V. A comparison of the antioxidant properties of steryl ferulates with tocopherol at high temperatures. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 947-954, 2007.

OKA, T.; FUJIMOTO, M.; NAGASAKA, R.; USHIO, H.; HORI, M.; OZAKI, H. Cycloartenyl ferulate, a component of rice bran oil-derived  $\gamma$ -oryzanol, attenuates mast cell degranulation. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 152-156, 2010.

PARRIS, N.; COOKE, P. H.; HICKS, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4788-4792, 2005.

PATEL, A. R.; HEUSSEN, P. C. M.; HAZEKAMP, J.; DROST, E.; VELIKOV, K. P. Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 423-429, 2012.

PATEL, A.; HU, Y.; TIWARI, J. K.; VELIKOV, K. P. Synthesis and characterization of zein-curcumin colloidal particles. **Soft Matter**, v. 6, p. 6192-6199, 2010.

PATEL, H. R.; PATEL, R. P.; PATEL, M. M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 2, p. 299-303, 2009.

PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1958-1964, 2011.

PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 450-458, 2014.

PAUL, D. R. Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 13-17, 2011.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169-172, 1989.

PODARALLA, S.; PERUMAL, O. Influence of formulation factors on the preparation of zein nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 3, p. 919-927, 2012.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. Antioxidante in food: Practical application. 1. Ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 389p.

POMES, A. F. Zein. In: MARK, H. **Encyclopedia of polymer science and technology**. 15. Vol. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1971. p. 125-132

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

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

ROGERS, E. J.; RICE, S. M.; NICOLOSI, R. J.; CARPENTER, D. R.; MCCLELLAND, C. A.; ROMANCZYK JR, L. J. Identification and quantitation of  $\gamma$ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 3, p. 301-307, 1993.

RONG, N.; AUSMAN, L. M.; NICOLOSI, R. J. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. **Lipids**, v. 32, n. 3, p. 303-309, 1997.

da ROSA, C. G.; MACIEL, M. V. O. B.; de CARVALHO, S. M.; de MELO, A. P. Z.; JUMMES, B.; da SILVA, T.; MARTINELLI, S. M.; VILLETTI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolic monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, n. 1, p. 337-344, 2015.

SAKUNPAK, A.; SUKSAEREE, J.; PATHOMPAK, P.; CHAROONRATANA, T.; SERMKAEW, N. Antioxidant individual  $\gamma$ -oryzanol screening in cold pressed rice bran oil of different Thai rice varieties by HPLC-DPPH method. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 592-597, 2014.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 10, p. 547-556, 2006.

SANTANDER-ORTEGA, M. J.; CSABA, N.; ALONSO, M. J.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D. Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA:poloxamer and

PLGA:poloxamine blend nanoparticles: A comparative study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 296, n. 1-3, p. 132-140, 2007.

SEETHARAMAIAH, G. S.; CHANDRASEKHARA, N. Hypocholesterolemic activity of oryzanol in rats. **Nutritional Report International**, v. 38, p. 927-935, 1988 *apud* WILSON, T. A.; NICOLOSI, R. J.; WOOLFREY, B. ; KRITCHEVSKY, D. Rice bran oil oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 105-112, 2007.

SELLIMI, S.; YOUNES, I.; AYED, H. B.; MAALEI, H.; MONTERO, V.; RINAUDO, M.; DAHIA, M.; MECHICHI, T.; HAJI, M.; NASTI, M. Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolate drom a Tunisian brown seaweed. **International journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1358-1367, 2015.

ŞEN, M. Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 69, p. 126-129, 2011.

SHI, C.; SUN, Y.; WU, H.; ZHU, C.; WET, G.; LI, J.; CHAN, T.; OUYANG, D.; MAO, S. Exploring the effect of hydrophilic and hydrophobic structure of grafted polymeric micelles on drug loading. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 282-291, 2016.

SHOPOVA, N.; MILKOVA, T. Thermal decomposition of cholesteryl esters of cynamnic acid derivatives and their effect on the  $\alpha$ -tetralylhydroperoxyde free-radical-induced decomposition. **Thermochemica Acta**, v. 356, n. 1-2, p. 101-107, 2000.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: The industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, application, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6-12, 2011.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 328-343, 2008.

SITNIKOVA, N. L.; SPRIK, R.; WEGDAM, G. Spontaneously formed *trans*-anethol/water/alcohol emulsions: Mechanism of formation and stability. **Langmuir**, v. 21, n. 16, p. 7083-7089, 2005.

SITTA, D. L. A.; GUILHERME, M. R.; da SILVA, E. P.; VALENTE, A. J. M.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Drug release mechanisms of chemically cross-linked albumin microparticles: Effect of the matrix erosion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 404-413, 2014.

SOBISCH, T.; LERCHE, D. Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 331, n. 1, p. 114-118, 2008.

SUH, M.-H.; YOO, S.-H.; LEE, H. G. Antioxidative activity and structural stability of microencapsulated  $\gamma$ -oryzanol in heat-treated lards. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1065-1070, 2007.

SUN, C.; XU, C.; MAO, L.; WANG, D.; YANG, J.; GAO, Y. Preparation, characterization and stability of curcumin-loaded zein-shellac composite colloidal particles. **Food Chemistry**, v. 228, p. 656-667, 2017.

SZE, A.; ERICKSON, D.; REN, L.; LI, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 261, n. 1, p. 402-410, 2003.

TAJIMA, K.; SAKAMOTO, M.; OKADA, K.; MUKAI, K.; ISHIZU, K.; SAKURAI, H.; MORI, H. Reaction of biological phenolic antioxidants with superoxide generated by cytochrome P-450 model



system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 115, n. 3, p. 1002-1008, 1983.

TAKEUCHI, I.; YAMAGUCHI, S.; GOTO, S.; MAKINO, K. Drug release behavior of hydrophobic drug-loaded poly(lactide-*co*-glycolide) nanoparticles: Effects of glass transition temperature. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 529, n. 1, p. 328-333, 2017.

TAN, C.; XIE, J.; ZHANG, X.; CAI, J.; XIA, S. Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum Arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 236-245, jun., 2016.

TANG, N.; ZHUANG, H. evaluation of antioxidant activities of zein protein fractions. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 11, p. C2174-C2184, 2014.

THOMPSON, G. A.; LARKINS, B. A. Structural elements regulating zein gene expression. **BioEssays**, v. 10, n. 4, p. 108-113, 1989.

TSAI, F.-H.; KITAMURA, Y.; KOKAWA, M. Effect of gum Arabic-modified alginate on physicochemical properties, release kinetics, and storage stability of liquid core hydrogel beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1069-1077, 2017.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KIMURA, Y.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 10, p. 1072-1076, 1998.

XU, Z.; GODBER, S. Purification and identification of components of  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2724-2728, 1999.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; JUNIOR OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WANG, Q.; WANG, J.-F.; GEIL, P. H.; PADUA, G. W. Zein adsorption to hydrophilic and hydrophobic surfaces investigated by surface plasmon resonance. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 4, p. 1356-1361, 2004.

WANG, Y.; PADUA, G. W. Formation of zein micophases in ethanol-water. **Langmuir**, v. 26, n. 15, p. 12897-12901, 2010.

WANG, Y.; PADUA, G. W. Nanoscale characterization of zein self-assembly. **Langmuir**, v. 28, p. 2429-2435, 2012.

WEI, Y.; LI, L.; XI, Y.; QIAN, S.; GAO, Y.; ZHANG, J. Sustained release and enhanced bioavailability of injectable scutellarin-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, n. 1-2, p. 142-148, 2014.

WEI, Z.; GAO, Y. Physicochemical properties of  $\beta$ -carotene bilayer emulsions coated by milk proteins and chitosan-EGCG conjugates. **Food Hydrocolloids**, v. 52, n. 1, p. 590-599, 2016.

WESTSTRATE, J. A.; MEIJER, G. W. Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, n. 5, p. 334-343, 1998.

WILSON, C. M. Multiple zeins from maize endosperms characterized by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Plant Physiology**, v. 95, n. 3, p. 777-786, 1991.

WILSON, T. A.; NICOLosi, R. J.; WOOLFREY, B.; KRITCHEVSKY, D. Rice bran oil oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 105-112, 2007.

WINKLER-MOSER, J. K.; HWANG, H.-S.; BAKOTA, E. L.; PALMQUIST, D. A. Synthesis of steryl ferulates with various sterol structures and comparison of their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 169, n. 1, p. 92-101, 2015.

WONG, A. Chemical and microbiological considerations of phytosterols and their relative efficacies in functional foods for the lowering of serum cholesterol levels in humans: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 1, p. 60-72, 2014.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT – Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 2012.

WULFF-PÉREZ, M.; TORCELLO-GÓMEZ, A.; GÁLVEZ-RUIZ, M. J.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic F68 as surfactant. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1096-1102, 2009.

ZHANG, B.; LUO, Y.; WANG, Q. Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidant properties of  $\alpha$ -zein. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 210-220, 2011.

ZHANG, S.; ZHAO, H. Preparation and properties of zein-rutin composite nanoparticle/corn starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 385-392, 2017.

ZHANG, Y.; NIU, Y., LUO, Y.; GE, M. ; YANG, T. ; YU, L. ; WANG, Q. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, n. 1, p. 269-275, 2014.

ZHONG, Q.; JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2380-2387, 2009.

ZHU, F.; KALE, A. V.; CHERYAN, M. Fractionation of zein by size exclusion chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3843-3849, 2007.