

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF
Programa de Pós-Graduação



Dissertação de Mestrado Profissional:

**Preparo e caracterização de um sistema nanoemulsionado
contendo dois carotenoides: β -caroteno e licopeno**

Maria Aparecida de Oliveira

Orientadores: Prof. Luiz Eurico Nasciutti
Prof.^a Celia Yelimar Palmero
Co-orientadora: Prof.^a Leticia Louvise Coli

Rio de Janeiro

2019

MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA

**Preparo e caracterização de um sistema nanoemulsionado
contendo dois carotenoides: β -caroteno e licopeno**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Formação para Pesquisa Biomédica

Orientadores: Prof. Luiz Eurico Nasciutti
Prof.^a Celia Yelimar Palmero
Co-orientadora: Prof.^a Leticia Louvisse Coli

Rio de Janeiro

2019

Ficha Catalográfica

Oliveira, Maria Aparecida de.

Preparo e caracterização de um sistema nanoemulsionado contendo dois carotenoides: β -caroteno e licopeno./ Maria Aparecida de Oliveira – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2019. xix, 90 f.: 31 cm.

Orientadores: Luiz Eurico Nasciutti e Celia Yelimar Palmero.

Coorientadora: Leticia Louvisse Coli.

Dissertação (mestrado profissional) -- UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica, 2019.

Referências: f. 88-99.

1. beta Caroteno-química. 2. Licopeno-química. 3. Disponibilidade Biológica. 4. Técnicas In Vitro. 5. Emulsões. 6. Pesquisa Biomédica-tese. I. Nasciutti, Luiz Eurico. II. Palmero, Celia Yelimar. III. Coli, Leticia Louvisse. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. V. Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica. VI. Título.

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA NANOEMULSIONADO
CONTENDO DOIS CAROTENOIDES: B-CAROTENO E LICOPENO*

MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 24 de Junho de 2019.



DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



DR. LUIZ EURICO NASCIUTTI (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR



DRA. CELIA YELIMAR PALMERO QUINTANA (DOUTOR – UFRJ) – 2º ORIENTADOR



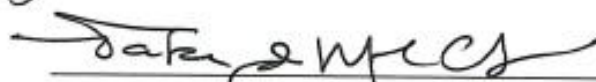
DRA. LETÍCIA COLI LOUVISSE DE ABREU (DOUTOR – IFRJ) – COORIENTADOR



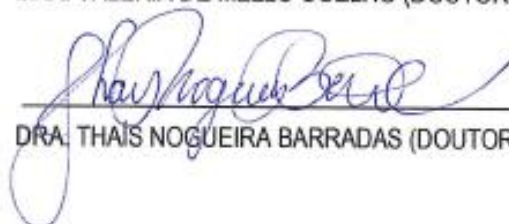
DRA. BARTIRA ROSSI BERGMANN (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR



DR. LEANDRO MIRANDA ALVES (DOUTOR – UFRJ)



DRA. VALERIA DE MELLO COELHO (DOUTOR – UFRJ)



DRA. THAIS NOGUEIRA BARRADAS (DOUTOR – IFRJ)

Dedico este trabalho à minha querida mãe “Palmirinha” (*in memoriam*), minha filha Luana, meu genro Carlos Moraes, minhas irmãs e meus irmãos, minhas sobrinhas e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela constante proteção e por sempre estar ao meu lado, provendo sempre o necessário e me permitindo chegar até este momento.

À minha amada mãe, Palmira, por todo amor e por toda a dedicação a mim e à minha filha, fazendo sempre o seu melhor e contribuindo durante todos os momentos da minha vida para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha filha, Luana, por ter me transformado com a sua chegada, fazendo a minha vida ganhar um sentido muito mais bonito e valioso.

Ao meu genro, Carlinhos, pela chegada em nossas vidas e pela contribuição pessoal para que eu pudesse conduzir este trabalho.

Ao meu chefe e orientador, Prof. Dr. Luiz Eurico, pela cumplicidade em todos os anos de trabalho, pelo seu apoio e incentivo, por acreditar no meu profissionalismo e me dar esta grande oportunidade. Obrigada pela compreensão nos momentos nos quais eu precisei me ausentar das minhas responsabilidades profissionais em virtude da construção deste estudo.

À minha orientadora e amiga de longa data, Prof.^a Dr.^a Celia Palmero, pela dedicada orientação e pelo tempo disponibilizado a mim durante a realização deste Mestrado. Muito obrigada pelo grande exemplo profissional, pela paciência e pela confiança dispensada a mim em todos os anos de trabalho e amizade. Sem suas “broncas”, força e apoio, jamais teria conseguido.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Leticia Coli, pela dedicação e fundamental suporte na realização deste trabalho. Muito obrigada pela paciência e pelos ensinamentos que me proporcionou ao longo deste estudo.

Ao chefe do Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral. Obrigada por disponibilizar seu laboratório, essencial à realização de processos fundamentais deste estudo.

Ao querido amigo e “anjo da guarda” João Freire, pelo companheirismo, paciência, dedicação, compreensão, carinho, persistência, fé no trabalho e apoio incondicional; mesmo nos momentos de desânimo. Obrigada pelos vários cafés e pela parceria no desenvolvimento deste Mestrado. Sem sua insistência e atenção prestada, jamais teria conseguido.

À minha querida e terna companheira Julianna Henriques, pelas inúmeras horas de reuniões e discussões que foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação. Obrigada por todo carinho e atenção!

À amiga Eliane Gouvêa, por estar sempre disposta a me ajudar. Obrigada pelas sugestões dadas e por todo o aprendizado vivido. Serei eternamente grata.

À grande amiga Luiza Castello Branco pela sua ajuda na didática da apresentação, e pela contagiante alegria cotidiana. Obrigada!

À “*myteacher*” Maria Luísa Barambo pela ajuda no Inglês, muito obrigada!

Ao amigo Matheus Lohan por toda a ajuda gramatical dada e também pela grande ajuda prestada na rotina do laboratório nos momentos em que tive que me ausentar. Muito obrigada, jamais esquecerei. Obrigada pelo repertório musical ao vivo!

Aos amigos de trabalho e estudo do Laboratório de Interações Celulares, pela convivência, pelos momentos de descontração, por toda a ajuda nos momentos de dúvidas e pela contribuição para a realização deste trabalho. Antônio, Rômulo, Jéssica, Priscila e Bianca, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos e colaboradores John e Ivone, do Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto, por toda ajuda e suporte dado. Muito obrigada!

À Prof.^a Dr.^a Helen e à Prof.^a Dr.^a Mariana, do Instituto de Nutrição. À Prof.^a Dr.^a Alice, da Faculdade de Farmácia, obrigada pela troca de conhecimento e pela ajuda a mim ofertada.

À minha grande amiga Natalia Haddad, por toda a ajuda dada, pelos anos de amizade e pelo apoio nos momentos de desânimo. Você foi parte essencial deste trabalho.

À querida amiga Laína, pelo carinho e por todos os momentos de descontração ao longo dos anos de amizade.

À Prof.^a Dr.^a Elenice Gillieron e à Prof.^a Dr.^a Sônia Costa, pela atenção, pelo apoio e pela disposição constante em ajudar. Muito obrigada!

À equipe de Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, pelo auxílio nos processos administrativos.

A todos os colegas da Pós-Graduação, turma MPT-2016, em especial ao Eduardo pelo incentivo e por não me deixar desistir. Muito obrigada!

Aos integrantes da Banca de Prévia, pelo olhar crítico a este trabalho.

Aos integrantes da Banca Examinadora, muito obrigada por aceitarem o convite, pelo tempo ofertado e pelo olhar crítico a este trabalho.

À revisora, Prof.^a Dr.^a Bartira Rossi-Bergmann. Muito obrigada por aceitar e contribuir ao aprimoramento deste trabalho através de seu olhar crítico.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não algo, só depende de nossa vontade e perseverança” (Anônimo).

RESUMO

DE OLIVEIRA, Maria Aparecida. **Preparo e caracterização de um sistema nanoemulsionado contendo dois carotenoides: β -caroteno e licopeno.** Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pela coloração de frutas e vegetais. São compostos bioativos que possuem propriedades antioxidantes diversas, incluindo atividade pró-vitamina A (β -caroteno) e capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (licopeno), entre várias outras propriedades que fazem com que tenham se tornado alvo de diferentes estudos. Uma das preocupações atuais a respeito dos carotenoides é a procura por um sistema de liberação que seja capaz de protegê-los contra os efeitos deletérios de fatores ambientais (como pH, temperatura e exposição à luz), capazes de acelerar a degradação dos mesmos, diminuindo sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, seus benefícios para a saúde. Nessa mesma direção, o objetivo do presente trabalho consistiu em preparar e caracterizar um sistema nanoemulsionado múltiplo, carreador de β -caroteno e de licopeno, dois carotenoides funcionais, bem como a avaliação *in vitro* dos seus possíveis efeitos citotóxicos, utilizando várias linhagens celulares de diferentes origens. Para o desenvolvimento da nanoemulsão, foram selecionados os componentes da fase oleosa (miristato de isopropila), fase aquosa (água e propilenoglicol) e tensoativos (Tween 80 e Span 80). Após o desenvolvimento da formulação pelo método de baixa energia e a incorporação dos carotenoides, seguiu-se com a caracterização físico-química, onde foi demonstrado que a formulação desenvolvida trata-se de uma microemulsão de água em óleo, termodinamicamente estável, com gotículas tendo cerca de 1000nm de diâmetro, com alta eficiência de encapsulação (β -caroteno= 81% e licopeno = 77%). Com base no pH, nos ensaios reológicos e na natureza dos seus componentes, pode-se sugerir que a microemulsão desenvolvida é adequada para o uso oral, tópico e parenteral. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* demonstraram que as células SHSY5Y (neuroblastoma humano), tratadas por 24h e 48h com e sem os carotenoides, resistiram até as concentrações de 0,075% e 0,125%, respectivamente; enquanto as células 8505 (carcinoma de tireoide humano) resistiram até a concentração de 0,125% nas duas janelas de tempo. As células Vero (renal primata), por sua vez, foram sensíveis aos componentes da formulação, com e sem os carotenoides, na concentração de 0,05%. Apesar de tornar a microemulsão bastante estável, a grande quantidade de surfactantes contida na formulação, por si, gera efeitos citotóxicos, justificando a necessidade de aprimoramento do sistema proposto. No entanto, deve-se ressaltar que esta é a primeira microemulsão múltipla de β -caroteno e de licopeno da qual se tem conhecimento na literatura, o que levanta a possibilidade de uso do sistema emulsionado como carreador destes carotenoides em conjunto.

Palavras chave: Microemulsão – β -caroteno – Licopeno – Baixa energia – Citotoxicidade.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Maria Aparecida. **Preparation and characterization of a nanoemulsified system containing two carotenoids: β -carotene and lycopene.** Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

Carotenoids are natural pigments responsible for the coloring of fruits and vegetables. They are bioactive compounds that have several antioxidant properties, including pro-vitamin A (β -carotene) activity and the ability to sequester reactive oxygen species (lycopene), among several other properties that cause them to become the target of different studies. One of the current concerns about carotenoids is the search for a release system that is able to protect them against the deleterious effects of environmental factors (such as pH, temperature and exposure to light), which can accelerate their degradation, its bioavailability and, consequently, its health benefits. In the same direction, the objective of the present work was to prepare and characterize a multiple nanoemulsified system, carrier of β -carotene and lycopene, two functional carotenoids, as well as the *in vitro* evaluation of its possible cytotoxic effects, using several cell lines of different origins. For the development of the nanoemulsion, the oil phase components (isopropyl myristate), aqueous phase (water and propylene glycol) and surfactants (Tween 80 and Span 80) were selected. After the development of the formulation by a low energy method and the incorporation of the carotenoids, the physicochemical characterization was made, where was demonstrated that the formulation developed is a thermodynamically stable water-in-oil (w/o) microemulsion with droplets having on average 1000nm of diameter, with high encapsulation capacity (β -carotene = 81% and lycopene = 77%). Based on pH, rheological tests and the nature of its components, it can be suggested that the developed microemulsion is suitable for oral, topical and parenteral use. *In vitro* cytotoxicity assays demonstrated that SHSY5Y (human neuroblastoma) cells, treated for 24h and 48h with and without carotenoids, resisted to concentrations of 0.075% and 0.125%, respectively; while human 8505 cells (human thyroid carcinoma) resisted to the 0.125% concentration in the two-time period. Vero (primate renal) cells, in turn, were sensitive to the components of the formulation, with and without carotenoids, at the concentration of 0.05%. Despite making the microemulsion quite stable, the high quantity of surfactants contained in the formulation, in itself, generates cytotoxic effects, justifying the need to improve the proposed system. However, it should be noted that this is the first multiple microemulsion of β -carotene and lycopene known in the literature, which raises the possibility of using the emulsified system as carrier of these carotenoids together.

Keywords: Microemulsion – β -carotene – Lycopene – Low energy – Cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estrutura química do β -caroteno.	23
Figura 2	Estrutura química do licopeno.	25
Figura 3	Esquema representando moléculas tensoativas situadas no limite entre duas fases imiscíveis para formar uma fina película interfacial.	32
Figura 4	Gráfico mostrando as curvas dos fluidos newtonianos e não-newtonianos.	47
Figura 5	Extração dos carotenoides da nano/microemulsão e da curvapadrão.	49
Figura 6	Formulações preparadas a partir da combinação de proporções diferentes dos componentes: água, cossolventes e tensoativos.	52
Figura 7	Solubilidade dos carotenoides (β -caroteno e licopeno) nas formulações 1 e 2 avaliada na concentração de 0,05%.	54
Figura 8	Representação gráfica do teste de estabilidade termodinâmica das formulações submetidas a variações extremas na temperatura de armazenamento.	58
Figura 9	Diagrama pseudoternário de fases óleo/surfactante/água, adaptado para a emulsão 2, a partir do modelo proposto por Constantinides.	59
Figura 10	Curva da distribuição do tamanho das gotículas da formulação contendo os carotenoides.	61
Figura 11	Escala comparativa das dimensões de diferentes elementos, para situar o tamanho das gotículas da microemulsão.	61
Figura 12	Curva padrão obtida a partir da extração dos padrões comerciais do β -caroteno (gráfico superior) e do licopeno (gráfico inferior)	68
Figura 13	Esquema ilustrando uma configuração hipotética da microemulsão carreadora de β -caroteno e licopeno proposta no presente estudo.	70
Figura 14	Análise da viabilidade celular das células SH-SY5Y, 8505 e Vero tratadas com diferentes concentrações da microemulsão contendo β -caroteno e licopeno.	72

Figura 15	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células SH-SY5Y tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da microemulsão enriquecida com os carotenoides.	75
Figura 16	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células SH-SY5Y tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides.	76
Figura 17	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células SH-SY5Y tratadas por 48 horas com diferentes concentrações da microemulsão enriquecida com os carotenoides.	77
Figura 18	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células SH-SY5Y tratadas por 48 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides.	78
Figura 19	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células 8505 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da microemulsão veiculando os carotenoides.	79
Figura 20	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células 8505 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides.	80
Figura 21	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células 8505 tratadas por 48 horas com diferentes concentrações da microemulsão, contendo os carotenoides.	81
Figura 22	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células 8505 tratadas por 48 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides.	82
Figura 23	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células Vero tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da microemulsão enriquecida com os carotenoides.	83
Figura 24	Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células Vero tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides.	84

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1	Avaliação do comportamento reológico da microemulsão carreadora dos carotenoides. Análise da viscosidade.
	66

LISTA DE QUADROS

	Página	
Quadro 1	Formulações classificadas de 1 a 4.	42
Quadro 2	Proporções utilizadas na construção do diagrama pseudoternário defases.	43
Quadro 3	Composição das formulações 1 e 2.	53
Quadro 4	Resultado da estabilidade dinâmica das duas formulações em condições extremas de temperatura.	58
Quadro 5	Valores da condutividade elétrica, do índice de refração, e do pH da formulação 2.	64
Quadro 6	Eficiência de encapsulação do β -caroteno e do licopeno pela microemulsão.	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EROS	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ADN	Ácido desoxirribonucléico
U937	Linhagem celular de leucemia monocítica crônica
HL-60	Linhagem celular de leucemia
C ₄₀ H ₅₆	Fórmula molecular dos carotenoides
ROO	Radical peroxil
¹ O ₂	Oxigênio singleto
LDH	Lactato desidrogenase
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
SH-SY5Y	Linhagem celular de neuroblastoma humano
Bax	<i>BCL2-Associated X Protein</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma2</i>
AIF	Fator indutor de apoptose
AKT	Serine/ThreonineKinase 2
PC3	Linhagem tumoral prostática andrógeno-independente derivada de lesão metastática óssea
miR-let-7f-1	MicroRNA-let-7f-1
NF-κβ	Fator nuclear kappa- β
CNTs	Nanotubos de carbono
LCT	<i>Long chain triglycerides</i>

MCT	<i>Short chain triglycerides</i>
PEG	Polietilenoglicol
UV	Raios ultravioleta
MI	Microlitros
PLA	Ácido poli D-L láctico (<i>Poly (D, L-lactic acid)</i>)
PLGA	Ácido láctico-co- glicólico (poly (D,L-lactic-co-glycolic acid))
WPI	<i>Wheyproteinisolate</i>
HT-29	Linhagem celular de câncer de cólon
ETOH	Etanol
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2y]-2,5-difeniltetrazolium

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	20
2. Carotenoides	21
2.1. β -caroteno	23
2.1.2. Licopeno	24
2.2. Nanoemulsões	27
2.2.1. Componentes de uma nanoemulsão	28
- Óleos/lipídios	28
- Surfactantes e cosurfactantes	29
- Conservantes, antioxidantes e quimioprotetores	30
2.2.2. Formação da nanoemulsão	31
2.2.3. Estudos prévios envolvendo nanoemulsões carreadores de carotenoides	34
2.3. Microemulsões	36
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. Equipamentos	40
4.2. Matérias-primas e reagentes	40
4.3. Métodos	41
4.3.1. Seleção dos componentes	41

4.3.2. Preparo das formulações	41
4.3.3. Construção dos diagramas de fases	43
4.3.4. Incorporação dos carotenoides nas formulações obtidas	44
4.4 Caracterização das formulações	45
4.4.1. Teste de estabilidade dinâmica das formulações 1 e 2 sob condições extremas de temperatura	45
4.4.2 Avaliação da distribuição do tamanho das gotículas	45
4.4.3. Medida da viscosidade da nanoemulsão de carotenoides através do método de Reologia	46
4.4.4. Medida da condutividade elétrica	47
4.4.5 Medida do índice de refração e do pH da formulação 2	48
4.5. Medida da capacidade de encapsulamento dos carotenoides pela formulação 2	48
• Extração dos padrões de β -caroteno e licopeno	49
4.6. Análise <i>in vitro</i> dos possíveis efeitos citotóxicos da formulação 2 sobre três modelos celulares	50
4.6.1. Cultura das linhagens celulares	50
4.6.2. Ensaio de viabilidade celular	51
4.6.3. Análise da morfologia celular	51
4.7. Análise estatística	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Preparo das formulações	52
5.2 Incorporação do β -caroteno e do licopeno nas formulações obtidas	53

5.3. Caracterização da formulação carregada com os carotenoides	55
5.3.1 Teste de estabilidade termodinâmica	56
5.3.2. Diagrama pseudoternário de fases	58
5.3.3. Avaliação da distribuição do tamanho das gotículas	59
5.4. Análise físico-química da microemulsão	63
• Medida da condutividade elétrica	64
• Medida do índice de refração	64
• Teste do pH	65
5.5. Teste de viscosidade da microemulsão pelo método da Reologia	65
5.6. Capacidade de encapsulamento dos carotenoides pela microemulsão	66
5.7. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> da microemulsão carreadora de β -caroteno e licopeno	71
5.7.1 Ensaio de viabilidade celular das linhagens celulares tumorais tratadas com a microemulsão carreadora de β -caroteno e licopeno	71
5.7.2 Análise da morfologia celular das linhagens celulares tumorais tratadas com a microemulsão carreadora de β -caroteno e licopeno	73
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são definidos como nutrientes funcionais, devido ao seu papel na prevenção de doenças cardiovasculares, na melhora do sistema imune, por sua atividade antitumoral, entre outros. Por serem moléculas altamente apolares, os carotenoides são compostos lipofílicos, sendo pouco solúveis em meio aquoso, diminuindo a sua absorção a nível intestinal. Molecularmente, os carotenoides são constituídos de uma longa cadeia contendo ligações duplas carbono-carbono, sendo sensíveis a variações no pH e na temperatura, bem como à exposição à luz (Chen *et al.*, 2014). Esses fatores ambientais podem induzir a degradação dos carotenoides e diminuir a sua biodisponibilidade, comprometendo assim os seus efeitos benéficos para a saúde. Nos últimos anos tem havido um crescente interesse por desenvolver sistemas de liberação que permitam preservar as propriedades fisiológicas desses compostos, a fim de aumentar a sua biodisponibilidade e eficácia na cura e prevenção de diferentes patologias. Assim, foi visto que nanoemulsões carregadas com nutracêuticos, especialmente aquelas produzidas a partir de extrato de tomate fresco, enriquecidos com licopeno, protegem cardiomioblastos H9c2, contra a cardiotoxicidade, por reduzir a inflamação e o estresse oxidativo lipídico (Hsu *et al.*, 2017). Nanopartículas contendo β -caroteno foram produzidas por deposição interfacial de um polímero biodegradável, devido ao deslocamento da acetona a partir da fase dispersa. A gelatina ou o Tween 20 foram usados como hidrocoloides estabilizantes, na fase contínua. Nessas partículas, o β - caroteno foi encapsulado na matriz polimérica, na ausência de qualquer material oleoso, onde os polímeros assumiram a função protetora do carotenoide e, provavelmente, melhoraram a sua estabilidade (Ribeiro *et al.*, 2008).

Assim, pode ser visto, a partir desses dados e de outros relatados por diferentes autores, que tanto o licopeno quanto o β -caroteno têm sido utilizados no desenvolvimento de diferentes sistemas de distribuição de fármacos e, entre esses, as nanoemulsões têm fornecido maior estabilidade físico-química e maior biodisponibilidade para ambos os compostos (Quian *et al.*, 2012; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2016; Ha *et al.*, 2014). As nanoemulsões podem ser definidas como emulsões, cujo tamanho das gotículas varia em um faixa de 20 a 1000nm, existindo ainda hoje muita discussão a respeito desta característica (Solans *et al.*, 2005; Bouchemal *et al.*, 2004; Jaiswal *et al.*, 2015). As nanoemulsões podem contribuir para melhorar a solubilidade de compostos lipofílicos em água, bem como a sua

biodisponibilidade durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal (Bilbao-Sáinz *et al.*, 2010). Além disso, este tipo de formulação tem a capacidade de direcionar os bioativos para os sítios-alvo onde deverão exercer o efeito farmacológico, controlando, ademais, a velocidade de liberação, sem que a estrutura química da molécula seja alterada (Oliveira *et al.*, 2004), tornando-se assim uma alternativa farmacológica idônea. Uma vantagem adicional das nanoemulsões é a sua capacidade de veicular mais de um composto, permitindo o desenvolvimento de nanoemulsões múltiplas, com o propósito de distribuir aos locais-alvo dois ou mais compostos ao mesmo tempo. Como mencionado anteriormente, sistemas nanoemulsionados carregados com um único carotenoide já foram relatados na literatura, mas não há relatos acerca de nanoemulsões combinando dois ou mais desses compostos. Diante desse fato, o objetivo geral do presente estudo consiste em elaborar e caracterizar uma nanoemulsão capaz de entregar β -caroteno e licopeno, bem como avaliar os seus possíveis efeitos sobre três linhagens celulares de origem diferente. Com este tipo de formulação, espera-se otimizar não somente a biodisponibilidade, mas também a estabilidade e a cinética de ambos os carotenoides.

2. Carotenoides

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais sintetizados por plantas e micro-organismos, sendo componentes essenciais dos alimentos. Esses compostos são capazes de absorver a luz durante a fotossíntese, em plantas, e de fornecer fotoproteção aos micro-organismos (Shami & Moreira, 2004; Augusti, 2007). Mais de 750 carotenoides foram isolados de fontes naturais, mas poucos são utilizados na indústria (Sakagami *et al.*, 2010), sendo responsáveis pela cor de muitas frutas, flores, pássaros, insetos e animais marinhos, variando as cores de amarelo a vermelho (Fontana *et al.*, 1977).

Os carotenoides são moléculas hidrofóbicas, localizando-se em sítios celulares lipofílicos, como a bicamada lipídica. São insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos; como acetona, etanol, éter etílico, clorofórmio e acetato de etila. Sendo solúveis também em éter de petróleo, hexano e tolueno (Rodrigues- Amaya, 1999). Do ponto de vista químico, os carotenoides são caracterizados por uma estrutura que apresenta ligações duplas conjugadas, determinando sua

natureza insaturada e, portanto, podem sofrer reações de oxidação e auto-oxidação (ao ar livre), podendo também absorver a radiação luminosa (Butnariu, 2016). A presença de ligações duplas nas moléculas de carotenoides leva ao isomerismo cis-trans, fato que determina a presença de muitos isômeros geométricos. A maioria dos carotenoides tem uma configuração trans. A cadeia de carbonos é constituída por oito unidades de isopreno, dando aos carotenoides a solubilidade em gorduras (também chamadas de substâncias lipocromas). Todos os carotenoides absorvem a luz na região azul e ultravioleta do espectro (Butnariu, 2016). As extremidades da cadeia de isopreno dos carotenoides podem exibir dois anéis, denominados de ionona; um deles pode apresentar a estrutura de α -ionona, e o outro, normalmente, é um anel de β -ionona. O anel β -ionona é fundamental para os carotenos atuarem como pró-vitamina A (Butnariu, 2016). Os carotenoides podem ainda ser divididos em carotenoides hidrocarbonetos e em derivados oxigenados desses carotenoides hidrocarbonetos. Os carotenoides de hidrocarbonetos são carotenoides com 40 átomos de carbono, com fórmula química $C_{40}H_{56}$. Os mais importantes são: o licopeno, o α -caroteno, o β -caroteno, e o γ -caroteno (Butnariu,2016).

A importância dos carotenoides de origem alimentar é bem conhecida, especialmente devido aos componentes do grupo caracterizados como precursores da vitamina A. A vitamina A (retinol) e seus derivados são conhecidos por ter uma ampla gama de funções incluindo o seu papel no desenvolvimento embrionário e na prevenção do câncer. A forma ativa da vitamina A, o ácido retinoico, afeta muitos genes, alguns dos quais encontram-se regulados positivamente em cânceres (Shaffe, *et al.*, 2010). Além das propriedades específicas observadas para os carotenoides, relacionadas com sua atividade pró-vitamina A tradicional, atualmente, estudos vêm sendo desenvolvidos em relação a suas propriedades antioxidantes (Briton, 1995; Olson, 1999; Martí *et al.*,2016).

Além de carotenoides com propriedades pró-vitamina A, muitos membros desse grupo funcional de nutrientes exibem propriedades antioxidantes por serem capazes de reagir com o oxigênio singlete, uma forma altamente reativa do oxigênio molecular que apresenta dois elétrons de *spins* opostos, ocupando orbitais diferentes ou não. Dessa maneira, os carotenoides protegem as células de danos oxidativos provocados por radicais livres, átomos ou moléculas altamente reativas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais externos, formando um campo magnético que atrai qualquer composto situado

próximo à sua órbita externa. Os carotenoides também protegem as células de espécies reativas de oxigênio (EROS), que consistem em moléculas não-radicalares derivadas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem ser geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e o ácido desoxirribonucleico (ADN) (Shami & Moreira, 2004).

2.1 β -caroteno

O β -caroteno é um carotenoide precursor ativo da vitamina A, encontrado nas frutas e nos vegetais verde escuros ou de cor laranja (Fillmore *et al.*, 2001), como cenoura, abóbora, beterraba, mamão, manga e a batata doce. Em quantidades menores, pode ser encontrado em vegetais folhosos incluindo: couve, repolho, espinafre, agrião e brócolis. Esses alimentos contribuem com a quantidade necessária de carotenoides para o organismo, como antioxidantes ou compostos pró-vitamina A. A conversão metabólica do β -caroteno em vitamina A é quimicamente possível devido à sua estrutura molecular que contém dois anéis β -ionona (Figura 1) não substituídos ligados à cadeia lateral poliênica, que é rica em ligações duplas conjugadas. Sendo assim, o β -caroteno é capaz de gerar duas moléculas de vitamina A (Rodríguez-Amaya, 1997). As funções biológicas do β -caroteno incluem transferência de energia na fotossíntese, transferência de energia para fotoproteção e a conversão metabólica em retinoides (Krinsky, 1994). Esta última constitui, até o momento, a única função biológica comprovada do β -caroteno em humanos (Olson, 1994).

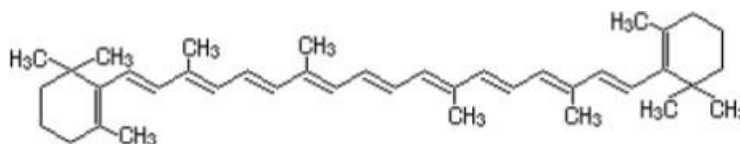


Figura 1. Estrutura química do β -caroteno. O β -caroteno consiste em uma cadeia de hidrocarboneto tetraterpeno, formado por 40 átomos de carbono e 56 de hidrogênio ($C_{40}H_{56}$). Observe na figura a localização da dupla ligação nos anéis de ambos os carotenoides. Modificado de Butnariu, 2016.

A maior parte do β -caroteno absorvido pela mucosa duodenal é convertida a retinol (60-70%) que, em seguida, é metabolizado a ésteres de retinila no enterócito

por mecanismos de difusão passiva. A conversão metabólica deste carotenoide a retinoides pode ocorrer também em outros órgãos, tais como o fígado, pulmão e rins (Olson, 1994; Van Vliet, 1996). Tem sido demonstrado que maiores níveis circulantes desses carotenoides em mulheres podem reduzir o risco de câncer de mama (Eliassen *et al.*, 2012). Além disso, em estudos observacionais, uma alta ingestão dietética de frutas e vegetais ricos em β -caroteno tem sido associada a um risco reduzido de câncer em vários órgãos, especialmente no pulmão (Van Poppel & Goldbohm, 1995; Ziegler, 1989). Estudos *in vitro* também sugerem que β -caroteno regula a proliferação e a apoptose celular em várias linhagens de células cancerígenas, incluindo pulmão, melanoma, cólon e leucemia (Bogenmann 1996; Hazuka *et al.*, 1990).

A concentração do β -caroteno constitui uma variável importante no seu modo de ação, conforme estudos descritos na literatura. Dessa maneira, foi observado no tratamento de linhagens de leucemia monocítica crônica (U937), e de leucemia mieloide humana, que o β -caroteno em baixas concentrações (até 20 μ M durante 24h) atua como antioxidante; no entanto, no mesmo estudo foi demonstrado que, em concentrações mais elevadas, o β -caroteno mostrou ser pró-oxidante (Upadhyaya *et al.*, 2007). Além disso, o β -caroteno induziu retenção das células de leucemia HL-60 na fase G1 (~39,4%) e reduziu significativamente a sua viabilidade na concentração de 20 μ M. De fato, o número de corpos apoptóticos aumentou com a concentração crescente de β -caroteno (Upadhyaya *et al.*, 2007, Niranjana *et al.*, 2015).

2.1.1. Licopeno

O licopeno é um dos mais de 600 pigmentos carotenoides sintetizados por plantas e micro-organismos fotossintéticos (Olson & Krinsky, 1995), e um dos 25 encontrados no plasma e tecidos humanos (Mortz & Tramonte, 2006). Esse carotenoide está presente em pequena quantidade na melancia, goiaba e no damasco; e em grande quantidade no tomate. A estrutura química trans do licopeno é a principal forma encontrada nos alimentos, com concentrações que variam de 0,9-4,2mg/100g. As cores das espécies de tomate diferem do amarelo para o vermelho alaranjado, dependendo da razão licopeno/ β -caroteno da fruta, que também está

associada com a presença da enzima beta-ciclase, a qual participa da transformação do licopeno em β -caroteno (Gartner *et al.*,1997).

O licopeno é um carotenoide lipossolúvel, sem atividade pró-vitamina A, caracterizado por ser acíclico e simétrico, contendo 40 carbonos ($C_{40}H_{56}$), sendo composto por onze ligações lineares e duas ligações duplas não-conjugadas (Figura 2), com propriedades antioxidante e anticancerígena. Esse carotenoide é capaz de sequestrar espécies reativas de oxigênio, como o radical peroxil (ROO) e o oxigênio singlete (1O_2), estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância (Foot *et al.*,1970).

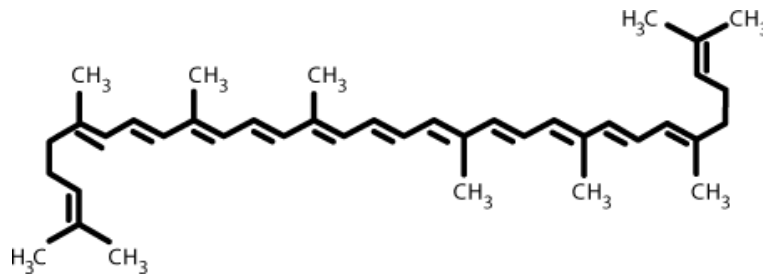


Figura 2. Estrutura química do licopeno. O licopeno é um hidrocarboneto tetraterpeno acíclico (adaptado do Merck Index O

nline, link: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m6951/lycopene?q=unauthorize>).

O processo de absorção do licopeno ocorre de forma passiva, ou seja, sem gasto de energia, mas pouco se sabe sobre o aproveitamento do licopeno no interior da mucosa. Boileau *et al.* (2002) sugerem que o licopeno talvez seja transportado entre as células, por proteínas específicas, ou agregado a gotas lipídicas. No enterócito, o licopeno não é transformado em vitamina A, como ocorre com outros carotenoides, mas têm sido encontrados níveis séricos de metabólitos oxidativos do licopeno, embora pouco se saiba sobre os locais e mecanismos envolvidos em sua formação. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o licopeno e outros carotenoides são capazes de inibir o processo de oxidação da lactato desidrogenase (LDH) (Esterbauer, *et al.*, 1992). Além disso, o licopeno foi capaz de proteger linfócitos contra danos da membrana induzidos por dióxido de nitrogênio (NO_2), chegando a ser duas vezes mais eficiente do que o β -caroteno na redução da morte celular (Tinkler, *et al.*, 1994; Bohm *et al.*, 1995). Em um estudo *in vitro* mais recente, demonstrou-se que o licopeno foi capaz de manter ativas enzimas antioxidantes,

como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, culminando na inibição da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) induzida por H₂O₂ em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Feng *et al.*, 2016). Nesse mesmo trabalho foi observado que o licopeno apresentou um papel protetor contra a disfunção mitocondrial, neutralizando o aumento da expressão do Bax e a regulação negativa da expressão de Bcl-2 induzidas por H₂O₂. Além disso, o licopeno suprimiu a ativação induzida por H₂O₂ das vias apoptóticas de caspase-3 e do fator indutor de apoptose (AIF). Diante desses resultados, os autores consideraram o licopeno como um potente agente protetor contra o estresse oxidativo, contra a disfunção mitocondrial e a apoptose, podendo funcionar como uma estratégia terapêutica para prevenir a lesão ou morte neuronal (Feng *et al.*, 2016).

Além do seu papel citoprotetor, diversos estudos vêm avaliando a influência do licopeno no ciclo celular e na apoptose. Estudos *in vitro* utilizando células tumorais prostáticas humanas e linhagens celulares derivadas de outros tecidos indicaram que o licopeno foi capaz de promover a apoptose nestas células, apresentando uma potente capacidade antitumoral (Ivanov *et al.*, 2007). O licopeno tem recebido destaque como um agente quimiopreventivo, devido a sua alta eficiência em remover radicais livres. Outros mecanismos de quimioprevenção induzidos pelo licopeno incluem o aumento da regulação da resposta antioxidante que conduz à síntese de enzimas citoprotetoras; reforço da comunicação intercelular, modificações de vias metabólicas e hormonais, bem como um aumento da resposta inflamatória (Palozza *et al.*, 2011). Para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos anticancerígenos do licopeno, Li *et al.* (2016) avaliaram os níveis de expressão gênica e proteica da proteína quinase B (AKT2), bem como os níveis de expressão do microRNA (miR)-let-7f-1 nas células PC3, uma linhagem tumoral prostática andrógeno-independente derivada de lesão metastática óssea. Nesse estudo, as células PC3 foram tratadas com diferentes concentrações de licopeno por 24 e 48h. Após o tratamento, os autores observaram uma diminuição na expressão de AKT2 e um aumento na expressão do miR-let-7f-1. Além disso, a transfecção das células PC3 com esse microRNA, induziu uma inibição da proliferação celular e um aumento da apoptose. Dessa maneira, possivelmente o miR-let-7f-1 estaria envolvido nos efeitos antitumorais do licopeno e desempenharia um papel importante na inibição da progressão do câncer de próstata através da diminuição da expressão de AKT2. Da mesma forma, Assar *et*

al.(2016) demonstraram que o licopeno inibe o crescimento celular de células de câncer de próstata e de mama, através da diminuição da expressão da via de sinalização do Fator nuclear kappa- β (NF- $\kappa\beta$) a nível gênico e proteico. A partir desses dados, sugere-se a possibilidade de que níveis fisiologicamente relevantes de licopeno plasmático, adquiridos através da suplementação dietética, poderiam atuar na supressão da via de NF- $\kappa\beta$ em pacientes com tumores de próstata e de mama (Assar *et al.*,2016).

2.2. Nanoemulsões

A biodisponibilidade da maioria dos carotenoides, especialmente quando em sua forma cristalina, é muito baixa, e a sua estabilidade oxidativa diminui drasticamente independentemente do método de processamento. Nesse sentido, a nanotecnologia vem sendo explorada como uma alternativa para a formulação de sistemas nanométricos que funcionem como carreadores de carotenoides, a fim de otimizar a biodisponibilidade desses nutrientes funcionais. A nanotecnologia envolve várias abordagens para o encapsulamento de antibióticos, agentes quimioterápicos, vacinas, proteínas, anticorpos, genes, entre outros. Os diferentes sistemas nanométricos de encapsulação de moléculas incluem dendrímeros, nanopartículas de lipídios sólidos, nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas, lipossomas, nanosuspensões, nanoemulsões e nanocristais de cerâmicas, nanopartículas, nanotubos de carbono (CNTs), pontos quânticos, nanopartículas de ouro, e “*polymersomes*” (Nayak&Dhara, 2010).

As nanoemulsões podem ser definidas como emulsões óleo-em-água (O/A) ou água em óleo(A/O) formadas por gotas com um diâmetro médio que varia entre 20 e 500nm (Wang *et al.*, 2007).O tamanho das gotas confere às nanoemulsões propriedades, comportamentos e estabilidade diferentes (McClements & Rao, 2011). As nanoemulsões geralmente apresentam-se como líquidos homogêneos translúcidos ou pouco turvos, visto que as gotículas exibem um tamanho inferior ao comprimento de onda da luz visível (McClements & Rao, 2011). Vale mencionar que as nanoemulsões podem ser formuladas em várias formas farmacêuticas, além de líquidos, como cremes, pulverizadores, géis, aerossóis e espumas; podendo ser administradas por vias igualmente variáveis, como a tópica, oral, intravenosa, intranasal, pulmonar e ocular (revisado em Singh *et al.*,2017). Na

atualidade, as nanoemulsões se revelam como uma forte alternativa às emulsões convencionais para proteger e entregar componentes funcionais lipofílicos, uma vez que apresentam estabilidade física melhorada, clareza óptica aprimorada, tensão interfacial muito baixa e aumento da liberação (McClements & Rao, 2011). Quando moléculas hidrossolúveis estão localizadas no interior de pequenos glóbulos ou gotículas esféricas de água, envolvidas por moléculas de tensoativos em um meio contínuo de óleo, a fase aquosa é a interna, dispersa ou descontínua; enquanto o óleo forma a fase externa, dispersante ou contínua. Nesses casos, o sistema é conhecido como sendo do tipo A/O. Inversamente, quando moléculas lipossolúveis estão localizadas no interior de reduzidas gotículas esféricas de óleo, e envolvidas por moléculas de tensoativos em um meio contínuo de água, esse sistema é conhecido como sendo do tipo O/A (revisado em Damasceno *et al.*, 2011). As nanoemulsões óleo/água proporcionam diversas vantagens, como aumentar a solubilidade de moléculas (fármacos, por exemplo) pouco solúveis em água, dissolvendo-as na fase oleosa e aumentando o direcionamento dessas moléculas para a linfa, evitando o metabolismo hepático de primeira passagem; dependendo do tipo de óleo utilizado. Já as nanoemulsões água/óleo proporcionam proteção aos compostos hidrossolúveis que são suscetíveis à degradação no lúmen intestinal, melhorando, dessa forma, a baixa permeabilidade intestinal desses compostos (Rajpoot *et al.*, 2011).

2.2.1. Componentes da nanoemulsão

- Óleos/lipídios:

As nanoemulsões O/A contêm geralmente de 5 a 20% de gotas de óleo, embora em determinadas formulações essa porcentagem possa ser significativamente maior (até 70%). As frações reesterificadas derivadas de óleo de soja, óleo de sésamo, óleo de semente de algodão, óleo de cártamo, óleo de coco e óleo de arroz, identificadas como triglicerídeos de cadeia longa (LCT), triglicerídeos de cadeia média (MCT) ou triglicerídeos de cadeia curta, são utilizadas sozinhas ou em combinação para formular nanoemulsões. Os principais lipídios utilizados no preparo das nanoformulações são os triglicerídeos de cadeia longa (LCT), média (MCT) ou curta que correspondem às frações reesterificadas derivadas de óleos vegetais. Esses triglicerídeos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação para

formular as nanoemulsões. A família de D- α -tocoferol (vitamina E), bem como o ácido oleico e o oleato de etila, também tem sido utilizado em nanoemulsões orais, tópicas e parenterais (revisado em Singh *et al.*,2017).

- **Surfactantes e cosurfactantes:**

Os surfactantes são moléculas anfifílicas superficiais nas quais uma parte lipofílica tem afinidade por meios não polares, e a parte hidrofílica tem afinidade por meios polares (Figura 3). Eles são capazes de se adsorver na interface óleo-água, proporcionando estabilização estérica ou eletrostática, ou dupla estabilização eletroestérica das superfícies das gotículas durante a emulsificação (Singh *et al.*, 2017). Dessa maneira, os surfactantes protegem as gotículas contra a recoalescência ou agregação (revisado em Odriozola-Serrano *et al.*, 2014).Um surfactante comum utilizado no preparo das nanoemulsões é a lecitina (fosfatidilcolina), derivada da gema de ovo ou da soja. Tensoativos como o desoxicolato de sódio (sal biliar) e cremophor EL (óleo de rícino polioxil-35) têm sido utilizados em produtos parenterais comercializados. Também são utilizados regularmente Tween 20, 40, 60 e 80 (monolaurato de polioxietilenosorbitano); Span20, 40, 60 e 80 (monolaurato de sorbitano); Solutol HS-15 (polioxietileno-660- hidroxistearato). Outros tensoativos comuns incluem os que pertencem à família poloxamer, dodecilsulfato de sódio; proteínas anfifílicas como caseína, β -lactoglobulina, polissacáridos (por exemplo, gomas, derivados de amido) e copolímeros em bloco contendo polietilenoglicol (PEG). A seleção de uma mistura tensoativa/tensoativa não somente influencia no tamanho e na estabilidade da nanoemulsão, mas também determina, por vezes, a sua toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica. Por exemplo, a concentração desejável dos surfactantes em nanoemulsões parenterais é bastante estreita. Concentrações acima de 0,5% do poloxamer 188 nessas nanoemulsões apresentam elevada toxicidade renal (revisado em Singh *et al.*,2017).

Os cosurfactantes são utilizados para complementar a ação dos surfactantes e se encaixam adequadamente entre áreas estruturalmente fracas, fortalecendo o filme interfacial. Os cotensoativos que são comumente utilizados incluem propilenoglicol, polietilenoglicol, etanol, transcitol IP, glicerina, etilenoglicol e propanol (revisado em Singh *et al.*, 2017).

- Conservantes, antioxidantes e quimioprotetores

Os conservantes empregados em nanoemulsões devem exibir uma baixa toxicidade, ser estáveis ao calor e ao armazenamento, possuir compatibilidade física e química, custo razoável, ser de fácil acesso, apresentar características organolépticas aceitáveis, bem como exibir um amplo espectro antimicrobiano. Os micro-organismos proliferam tanto no óleo como na água e, conseqüentemente, o conservante escolhido deve atingir uma concentração eficaz em ambas as fases. Os ácidos e seus derivados, tais como o ácido benzoico, ácido sórbico, ácido propiónico, e o ácido desidroacético podem ser utilizados como agentes antifúngicos na formulação. Álcoois, como clorobutanol e fenóxi-2-etanol, são rotineiramente utilizados em preparações oftalmológicas. Os compostos fenólicos e derivados de amônio quaternário servem como conservantes de amplo espectro (revisado em Singh *et al.*, 2017).

O óleo e os lipídios emulsionados estão sujeitos à auto-oxidação por exposição ao ar; e muitos fármacos utilizados na nanoemulsão são também altamente suscetíveis à degradação oxidativa. Dessa forma, substâncias antioxidantes são adicionadas às nanoformulações. Os antioxidantes oferecem estabilidade oxidativa à formulação por atuarem como agentes redutores, como o ácido ascórbico, bissulfeto de sódio, metabissulfito, tioureia e formaldeído de sódio; ou como **agentes de bloqueio**, como ésteres de ácido ascórbico, butil-hidroxitolueno e tocoferol; ou finalmente, como agentes sinérgicos, como o ácido ascórbico, ácido citrânico, ácido fosfórico, ácido cítrico e o ácido tartárico (revisado em Singh *et al.*, 2017).

As nanoemulsões são geralmente transparentes, o que implica que todo o espectro de radiação, incluindo raios visíveis e UV, pode penetrar facilmente nas camadas de óleo e catalisar a fotodegradação do fármaco. A inclusão de agentes quelantes, estabilizadores de pH, protetores contra UV e outros é, por vezes, necessária para evitar a degradação ambiental (revisado em Singh *et al.*, 2017).

2.2.2. Formação da nanoemulsão

A nanoemulsão é formada quando há a mistura de pelo menos três componentes: a fase oleosa, a fase aquosa e um estabilizador. A fase lipídica das nanoemulsões óleo/água geralmente funciona como um veículo de compostos ativos lipofílicos, constituindo a fase dispersa na fase contínua. Comumente, os ingredientes lipofílicos ativos são solubilizados na fase oleosa antes da formação das emulsões propriamente ditas. A fase oleosa pode ser constituída por diferentes compostos não-polares, incluindo triglicerídeos, óleos minerais ou óleos essenciais. Por outro lado, a fase aquosa da nanoemulsão pode conter uma variedade de constituintes hidrossolúveis, incluindo ácidos, bases, conservantes, vitaminas, açúcares, surfactantes e proteínas ou polissacarídeos (Odriozola-Serrano *et al.*, 2014). Inicialmente, quando ambas as fases são agitadas mecanicamente, uma delas é dispersa no interior da outra. A adição de um tensoativo tende a estabilizar o sistema, tornando-o homogêneo, em que podem ser observadas duas fases distintas, uma fase interna, dispersa ou descontínua; e uma fase externa, dispersante (Figura 3). Sem a adição do tensoativo, as fases tendem a se separar, tornando o sistema heterogêneo, em que será possível visualizar novamente os dois líquidos separados (revisado em Damasceno *et al.*, 2011). Por essa razão, estabilizadores como os emulsionantes e hidrocoloides são extremamente essenciais para evitar a desorganização da nanoemulsão formada (Rajpoot *et al.*, 2011).

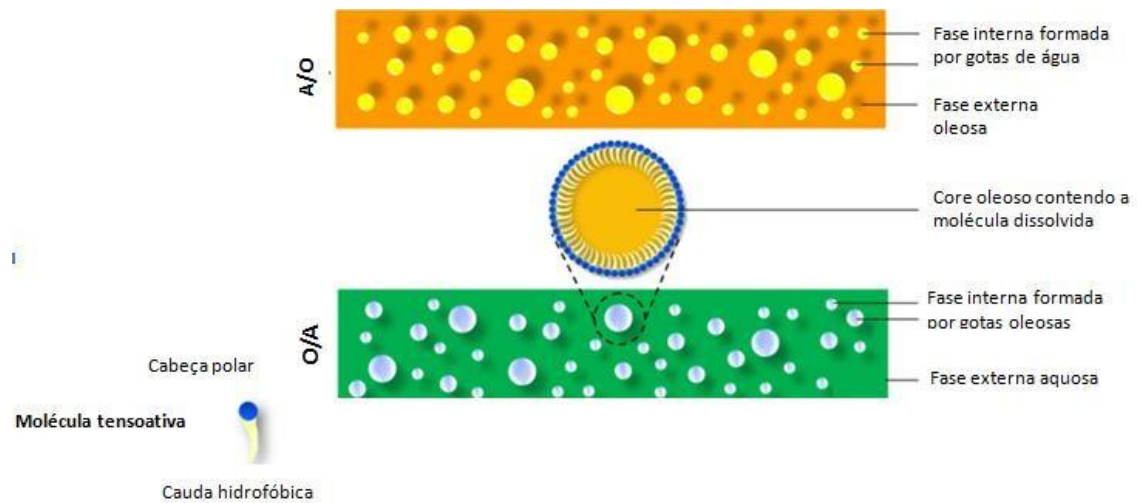


Figura 3. Esquema representando moléculas tensoativas situadas no limite entre duas fases imiscíveis para formar uma fina película interfacial(observada ao redor da gotícula oleosa representada em um tamanho maior) a fim de evitar a separação das fases. (Modificado de Singh *et al.*, 2017).

As nanoemulsões podem ser preparadas através de métodos de alta energia ou de baixa energia. Os métodos de alta energia consistem na aplicação de forças de alta energia disruptiva com dispositivos mecânicos, capazes de causar o rompimento de gotículas de óleo e de dispersá-las na fase aquosa (revisado em Odriozola-Serrano *et al.*, 2014). Em geral, o processo de alta energia é seguido por dois passos: em primeiro lugar, ocorre a deformação e ruptura de gotículas macrométricas em gotículas menores, seguido da adsorção do surfactante na sua interface, objetivando garantir a estabilização estérica. Em uma revisão de Yukuyama *et al.* (2016), os métodos de alta energia foram classificados em quatro grupos:(1) Agitação em alto cisalhamento utilizando um sistema rotor/estator; (2) Ultrassom;(3) Homogeneização a alta pressão e, finalmente, (4) Microfluidização e emulsificação de membrana.

Com relação aos métodos de baixa energia, estes consistem na formação espontânea (*self-assembled nanoemulsions*) de pequenas gotas oleosas dentro do sistema óleo-água-emulsificante, quando a solução ou as condições do meio ambiente são alteradas na sua composição ou na temperatura (revisado em Odriozola-Serrano *et al.*, 2014). Estes métodos dependem das propriedades físico-químicas dos surfactantes, cosurfactantes e excipientes que compõem a formulação (Yukuyama *et al.*, 2016). Os métodos de baixa energia são particularmente

vantajosos devido às condições de processamento relativamente simples e aos baixos requisitos de energia, em comparação com os métodos de emulsificação de alta energia (Ganta *et al.*, 2010).

Entre esses métodos, destaca-se a **temperatura de inversão de fase**, a **composição de inversão de fase** e a **difusão do solvente** (autoemulsificação, ou mesmo a emulsificação espontânea em não-equilíbrio) (revisado em Yukuyama *et al.*, 2016). O **método de temperatura ou composição de inversão de fase** é baseado na mudança espontânea do raio de curvatura da camada surfactante interfacial, devido a mudanças na temperatura ou na composição do sistema. A uma temperatura ou composição dada, a camada de surfactante adsorvida atinge o estado caracterizado por curvatura zero da monocamada do surfactante, e uma baixa tensão interfacial, induzindo a formação espontânea de emulsões finas, como microemulsões bicontínuas (revisado em Yukuyama *et al.*, 2016).

Já o mecanismo da difusão do solvente (**emulsificação espontânea**) ocorre ao verter um solvente miscível em água, contendo uma pequena concentração de fase oleosa, sem a presença do surfactante em água. Nesse método, ocorre o efeito de *Ouzo* (ou método de deslocamento de solvente), no qual a nanoemulsão é gerada devido à difusão específica e muito rápida de um solvente orgânico (como acetona e etanol) da fase oleosa para a aquosa. Contudo, as gotas recentemente formadas são instáveis e altamente sujeitas à desestabilização; portanto, as interfaces recém-formadas têm de ser estabilizadas por adsorção de surfactante (revisado em Yukuyama *et al.*, 2016).

Algumas teorias foram propostas para explicar a formação das nanoemulsões, incluindo a **teoria da tensão interfacial**, a **teoria da solubilização** e a **teoria termodinâmica** (revisado em Rajpoot *et al.*, 2011). Segundo a **teoria da tensão interfacial**, a formação espontânea de gotículas da nanoemulsão é explicada pela formação de uma película complexa na interface óleo-água pelo emulsionante, resultando na redução da tensão interfacial entre o óleo e a água para valores muito baixos (de quase zero a negativo). A **teoria da solubilização** considera as nanoemulsões como soluções monofásicas termodinamicamente estáveis de micelas esféricas intumescidas com água (água/óleo) ou com óleo (óleo/água). Segundo a **teoria termodinâmica**, a energia livre de Gibbs (G) deve se tornar negativa para a formação espontânea de uma nanoemulsão e para que

o sistema resultante seja termodinamicamente estável (revisado em Rajpoot *et al.*, 2011).

2.2.3. Estudos prévios envolvendo nanoemulsões carreadoras de carotenoides

Uma das características inerentes aos carotenoides é a sua suscetibilidade ao pH, temperatura e à exposição à luz, cujas variações induzem a sua oxidação. Dessa maneira, a encapsulação dos carotenoides poderia constituir um meio apropriado para preservar suas propriedades, evitando sua oxidação e melhorando sua eficácia (Gonnet *et al.*, 2010). Diversos estudos mostraram que as nanoemulsões podem melhorar a biodisponibilidade de compostos bioativos lipofílicos como os carotenoides. Liang *et al.* (2013) demonstraram que a biodisponibilidade do β -caroteno em nanoemulsões se elevou significativamente, utilizando como veículo triglicerídeos de cadeia média. Nesse mesmo sentido, Quian *et al.* (2012) demonstraram que o tipo de óleo utilizado na formação da nanoemulsão influencia diretamente na biodisponibilidade do β -caroteno. Dessa maneira, a biodisponibilidade desse carotenoide diminuiu na seguinte ordem: óleo de milho > triglicerídeos de cadeia média > óleo de laranja. Por outro lado, Salvia-Trujillo *et al.* (2013) demonstraram que em nanoemulsões com baixo teor de gordura (1%), a bioacessibilidade do β -caroteno aumenta com o comprimento da cadeia de ácidos graxos. Outro fator que afeta a biodisponibilidade de compostos lipofílicos, também observado por esses autores, é o tamanho da gota lipídica; de maneira que quanto menor o tamanho da gota das nanoemulsões, maior a disponibilidade dos compostos bioativos encapsulados. Provavelmente, essa maior disponibilidade dos carotenoides formulados em nanoemulsões com gotas lipídicas de menor tamanho está associada à maior área de superfície das pequenas gotas lipídicas expostas aos sucos intestinais. Dessa forma, a digestão desses lipídios é intensificada, disponibilizando o seu conteúdo mais rapidamente (revisado por Odriozola-Serrano *et al.*, 2014).

Opolilático (PLA) e poli ácido láctico-co-glicólico (poly (D,L-lactic-co- glycolic acid), PLGA) são polímeros sintéticos biodegradáveis e biocompatíveis amplamente utilizados no desenvolvimento de nanoformulações. Ribeiro *et al.* (2008) fabricaram nanodispersões carregadas de β -caroteno contendo PLA e PLGA. Nesse estudo, nanopartículas menores de 80nm contendo β -caroteno

foram produzidas pelo método de deslocamento do solvente, no qual foi utilizada a acetona na fase dispersa. Por outro lado, a gelatina ou Tween 20 foram utilizados como hidrocoloides estabilizantes na fase contínua. Nessa nanoformulação, o β -caroteno foi aprisionado na matriz polimérica, na ausência de qualquer material de núcleo oleoso, de maneira que os polímeros assumiram a função de coloides protetores e possivelmente permitiram também a estabilização química da fase nanodispersa. Entre as vantagens mostradas pelo método do deslocamento do solvente, podem ser mencionadas: baixo gasto de energia, alta eficiência de aprisionamento e alta reprodutibilidade (Ribeiro *et al.*, 2008).

Luo *et al.* (2016) compararam a estabilidade física e química de nanoemulsões carregadas com β -caroteno fabricadas por microfluidização de canal duplo, usando dois tipos de emulsificantes naturais: saponinas de quilaia (Q-Naturale) - uma árvore perenifólia originária do Chile, cuja casca do tronco é rica em saponinas- e isolado de proteína de soro de leite (*wheyprotein isolate*, WPI). Nesse estudo, os autores observaram que a taxa de degradação química e o desvanecimento da cor aumentaram com o aumento da temperatura, com a mudança mais rápida acontecendo entre 25 e 55°C. Por outro lado, o tipo de emulsionante natural utilizado não teve grande impacto na taxa de degradação do carotenoide, nem no desvanecimento da cor (Luo *et al.*, 2016). Além disso, segundo os mesmos autores, esse seria o primeiro estudo a demonstrar que a microfluidização de canal duplo é um método eficiente de produção contínua de nanoemulsões carregadas com carotenoides a partir de emulsionantes naturais, sem a necessidade de preparar uma pré-emulsão, como acontece com homogeneizadores de válvulas de alta pressão convencionais e microfluidizadores de canal único.

Evidências provenientes de diferentes estudos mostram que nanoemulsões contendo licopeno, um carotenoide caracterizado por exibir alta instabilidade e baixa disponibilidade, melhoraram substancialmente a sua biodisponibilidade. Nanoemulsões preparadas por um método de emulsificação- evaporação foram capazes de promover o aumento da biodisponibilidade do licopeno presente em um extrato de tomate enriquecido com esse carotenoide (contendo 6% de licopeno), no que diz respeito à velocidade de liberação e ao teor desse carotenoide. Interessantemente, as nanoemulsões com gotas menores do que 100nm mostraram

uma maior disponibilidade *in vitro*, sugerindo que a nanoemulsificação aumenta a biodisponibilidade *in vitro* do licopeno (Ha *et al.*, 2015).

Huang *et al.* (2015) desenvolveram uma nanoemulsão múltipla contendo licopeno juntamente com partículas de ouro, elaborada mediante um processo de sonicação e contendo Tween 80 como emulsificante. Além disso, eles avaliaram a atividade antitumoral dessa nanoemulsão na linhagem celular de câncer de cólon HT-29 e observaram que ambos os compostos mostraram umefeito sinérgico na inibição do crescimento celular destas culturas celulares. Em outro estudo, foram avaliados diferentes fatores que poderiam otimizar o método de homogeneização-evaporação utilizado para o desenvolvimento de uma nanoemulsão de licopeno, bem como suas aplicações em bebidas. Os autores analisaram os possíveis efeitos da concentração do licopeno (0,3 a 0,7mg/mL), do emulsificante (0,3 a 0,7mg/mL), e do número de ciclos de homogeneização (2 a 4) sobre o tamanho das gotas, a eficiência da emulsificação e a estabilidade da nanoemulsão. A análise de variância mostrou que a concentração de extrato de licopeno teve o efeito mais significativo em todas as variáveis analisadas. Dessa maneira, uma formulação contendo 0,085mg/mL de extrato de licopeno e 0,7mg/mL de emulsionante, submetida a 3 ciclos de homogeneização, foi a mais adequada para obter o menor tamanho das gotículas, a maior estabilidade de emulsão e uma eficiência de emulsificação aceitável (Kim *et al.*,2014).

2.3 Microemulsões

As microemulsões são definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes formados a partir da solubilização espontânea de 2 líquidos imiscíveis entre si, geralmente água e óleo, que são estabilizados por moléculas tensoativas capazes de se localizar na interface desses dois líquidos e de impedir que as duas fases se separem(Guimarães, 2013; Fanun, 2012; Li *et al.*, 2012; Damasceno *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2007; Formariz *et al.*, 2005). As microemulsões apresentam vantagens relacionadas às suas características únicas, tais como estabilidade termodinâmica, facilidade na preparação, viscosidade adequada, transparência e capacidade de solubilizar uma grande gama de fármacos hidrofóbicos, hidrofílicos e anfifílicos (Damasceno *et al.*, 2011), o que influencia na biodisponibilidade dos mesmos, além de possibilitar sua administração por via oral, tópica e parenteral (Gupta & Moulik, 2008).

Em 1940, Hoar e Schulman introduziram o termo microemulsão para tentar definir um sistema fluido e translúcido obtido pela titulação, até o ponto de

clarificação da emulsão simples, com um álcool de cadeia média, como o hexano. Para a formação da microemulsão, não foi necessária nenhuma agitação, pois a dispersão transparente logo se formou de maneira espontânea. Os autores viram, por microscopia eletrônica, que as dispersões formadas se constituíam por gotículas de óleo em água (O/A) ou de água em óleo (A/O) envoltas por um filme de tensoativos e cotensoativos presente na interfase. O tamanho das gotículas variava de 100 a 600nm, bem menores que os da emulsão inicial mais simples, o que justificou seu aspecto transparente e o uso do termo microemulsão, pois as fases foram capazes de se misturar. Ao longo do tempo, o termo microemulsão foi revisado por diversos autores. Em 1981, Danielsson e Lindman descreveram que as microemulsões são soluções líquidas, opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis, compostas por água e óleo estabilizados por tensoativos. A estrutura do sistema formado será sempre influenciada pelas propriedades físico-químicas e a proporção dos componentes utilizados na formulação (FANUN, 2012), podendo variar o tamanho da gotícula e também a estabilidade termodinâmica da formulação de acordo com a quantidade de tensoativo empregada na formação da formulação. Quantidades maiores de tensoativos permitem a formação de sistemas termodinamicamente mais estáveis e com maiores concentrações de óleo, entretanto, alguns tensoativos podem ser tóxicos para células em maiores concentrações. Por esses motivos, os tensoativos e cotensoativos empregados na formulação das microemulsões, além de permitir a formação do sistema, devem também ser atóxicos e ter a permissão para o emprego dos mesmo em produtos farmacêuticos (McClements, 2012, 2015; Tong et al., 2015; Fast e Mecozzi, 2009; Ngan et al., 2014; Lawrence e Warisnoicharoen, 2006).

Em muitos casos, ao contrário das nanoemulsões, as microemulsões não necessitam de energia externa para a sua formação, o que resulta em uma natureza mais estável e menos agressiva para os fármacos que serão incorporados; além de possuir um custo baixo para a sua produção. Com base em sua natureza estável e seu processo de formação menos agressivo, Pepe e colaboradores (2012) conseguiram incorporar com sucesso o carotenoide licopeno em conjunto com seu estabilizador, o ácido ascórbico. Como foi mencionado anteriormente, o licopeno é um agente antioxidante sem atividade pró-vitamina A, altamente lipofílico; enquanto o ácido ascórbico é hidrofílico. A incorporação simultânea desses dois compostos só foi possível devido ao caráter anfipático das microemulsões. Esta característica apresentada pelas microemulsões é uma grande vantagem para esse sistema, uma vez que mais de 40% dos fármacos em fase de desenvolvimento não são capazes de atingir o mercado devido a problemas relacionados com a baixa solubilidade em

água, o que dificulta muito a administração *in vivo*, limitando a taxa de absorção (Dahan e Hoffman, 2011; Gullapalli, 2010; Jambhekar e Breen, 2013).

Diversos estudos têm focado no desenvolvimento de nanoemulsões e microemulsões estáveis carreadoras de carotenoides. Nessa mesma direção, o objetivo do presente trabalho consistiu no preparo e caracterização de um sistema nanoemulsionado múltiplo, carreador de β -caroteno e de licopeno, dois carotenoides funcionais, bem como a avaliação *in vitro* dos possíveis efeitos citotóxicos dela; utilizando como modelo de estudo linhagens celulares de diferentes origens.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar um sistema emulsionado (nanoemulsionado) capaz de veicular dois carotenoides, β -caroteno e licopeno.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver uma emulsão contendo β -caroteno e licopeno pelo método empírico;
- Caracterizar o sistema emulsionado de carotenoides desenvolvido, quanto a distribuição do tamanho de gotículas, o índice de refração, a condutividade, o pH, a estabilidade, a viscosidade e o teor de cada carotenoide;
- Avaliar a capacidade de encapsulação dos carotenoides pela emulsão pelo método de espectrometria;
- Analisar o comportamento *in vitro* de três linhagens celulares de diferentes origens, quando tratadas em diferentes intervalos de tempo com diferentes concentrações da emulsão de carotenoides, avaliando nas culturas celulares tratadas a morfologia celular, através da microscopia de contraste de fase, bem como a viabilidade celular, utilizando o ensaio colorimétrico de brometo de 3-[4,5- dimetiliazol-2y]-2,5-difeniltetrazolium)(MTT).

4. MATERIAIS EMÉTODOS

4.1. Equipamentos

- Analisador de tamanho de gotícula (Zetasizer, Nano Séries – Malven);
- Balança analítica de alta precisão (AdventurerOHAUS);
- Câmara climática (Nova Ética 420/LCD150);
- Fluxo laminar(Pachane);
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf54530R);
- Condutivímetro (Quimis);
- Estufa(Thermo Fisher Scientific);
- Micropipeta automática(Eppendorf);
- Placa aquecedora com agitação (Corning PC230);
- Placa magnética multi-pontos IKA (modelo RT15);
- Refratômetro de Abbe(Analikje);
- Software Chemix®, Software Prisma5.0;
- Reômetro HAAKER MARS II (Thermo FisherScientific).

4.2. Matérias primas e reagentes

- β -caroteno(Sigma-Aldrich);
- Licopeno(Sigma-Aldrich);
- Metanol(Sigma-Aldrich);
- Dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich);
- Etanol P.A.(Vetec);
- Miristato de Isopropila P.A.(Vetec);

- Óleo demilho;
- Meio de cultura *Dulbecco's Medium Eagle modified* (DMEM, Sigma);
- Meio de cultura RPMI – 1640 (Sigma);
- Soro Fetal Bovino (Gibco);
- Tween 80 (Vetec) (Sigma-Aldrich);
- Span 80 Extra Pure (Loba Chemie);
- Propilenoglicol (VETEC);
- Reômetro HAAKE MARS II (Thermo Fisher Scientific).

4.3. Método

4.3.1. Seleção dos componentes

Os componentes utilizados para o preparo das formulações foram selecionados com base na metodologia atualizada por Mota Monteiro (2011), fundamentada na revisão da literatura científica (LAWRENCE & REES, 2000; REGE, KAO & POLLI, 2002; NANDI, BARI & JOSHI, 2003; YUAN *et al.*, 2006; PADULA, NICOLI & SANTI, 2009; BADAWI *et al.*, 2009). O Miristato de Isopropila foi utilizado como fase oleosa, e o Propilenoglicol como cossolvente. Os tensoativos Monooleato de polioxietilenosorbitano (Tween 80) e Monooleato de Sorbitano (Span 80) foram empregados como tensoativos das formulações.

4.3.2. Preparo das formulações

As nanoemulsões foram desenvolvidas pelo método empírico, onde propuseram-se modificações nas combinações dos tensoativos – Tween® 80 e Span® 80 – bem como nos cossolventes – ETOH e Propilenoglicol – a partir da formulação de referência descrita por Nandi e colaboradores (2003).

As formulações foram preparadas de acordo com Nandi e colaboradores (2003). Para isso, foi utilizada uma placa de multi-pontos, agitadora e aquecedora.

Primeiramente, foram misturados a água e o cossolvente, sob agitação magnética, por 10 minutos. Os tensoativos foram misturados separadamente, também por 10 minutos sob agitação magnética. Em seguida, os tensoativos foram incorporados à mistura do cossolvente e o óleo, sob agitação magnética até que diluíssem completamente. Posteriormente, quatro formulações foram preparadas e foram classificadas de 1 a 4, nas quais as proporções dos componentes foram como segue: proporção dos tensoativos, 30%, 25%, 20%; ETOH 10%; Miristato 30%; Óleo de Milho 30%; e água 50%, 20% e 10% (Quadro 1). Todas as formulações foram preparadas para uma massa final de 5 gramas, utilizando uma balança analítica de alta precisão. Após a adição de todos os componentes, as formulações foram mantidas sob agitação constante, na placa agitadora magnética, por 24h.

Em um béquer, foram adicionados os componentes, na seguinte ordem, para as quatro formulações:

- Formulação número 1: 20 partes de água, 10 partes de álcool etílico, 20 partes de propilenoglicol, 20 partes de Span 80 e, por fim, 30 partes de Tween 80.
- Formulação número 2: 10 partes de água, 10 partes de propilenoglicol, 30 partes de Miristato de Isopropila, 25 partes de Span 80 e, por fim, 25 partes de Tween80.
- Formulação número 3: 50 partes de água, 20 partes de Tween 80 e 30 partes de óleo demilho.
- Formulação número 4: 10 partes de água, 10 partes de propilenoglicol, 30 partes de óleo de milho, 25 partes de Span 80 e 25 partes de Tween80.

Quadro 1: Formulações classificadas de 1 a 4.

Formulação	T80	S80	ETOH	PPG	OM	MI	ÁGUA
1	30%	20%	10%	20%	—	—	20%
2	25%	25%	—	10%	—	30%	10%
3	20%	—	—	—	30%	—	50%
4	25%	25%	—	10%	30%	—	

T80=Tween80®;S80=Span80®;PPG=Propilenoglicol;OM=Óleo de Milho;MI=Miristato de Isopropila(p/p);ETOH=etanol.Fonte:DeOliveira,M.A.(2019).

de

4.3.3. Construção do diagrama defase

O diagrama de fases foi empregado a fim de avaliar a quantidade de água a ser adicionada na formulação e, então, comparar a eficiência dos diferentes componentes utilizados, em termos de incorporação (Nornoo *et al.*, 2009, revisado por Mota Monteiro, 2011). O tipo de diagrama utilizado no desenvolvimento das emulsões de β -caroteno e licopeno foi o pseudoternário de fases, denominado assim, por ele possuir quatro componentes, além da água, os quais se agrupam de dois em dois. Um vértice do triângulo representa a mistura de dois tensoativos, na proporção fixa de 1:1. O segundo vértice representa a proporção 8:1 de óleo e cossolvente, respectivamente e, por fim, o terceiro vértice representa a água (Nandi, Bari & Joshi, 2003). Entre as formulações propostas empiricamente, duas foram escolhidas: as formulações 1 e 2. A construção dos diagramas de fases de ambas as formulações foi realizada, para determinar a partir dele as proporções exatas de cada componente da formulação para a obtenção da nanoemulsão desejada (Nornoo *et al.*, 2009, revisado por Mota Monteiro, 2011).

A construção do diagrama pseudoternário de fases foi realizada ao utilizar proporções da fase oleosa e cossolvente (B) e da mistura de tensoativos (A) iguais a 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90 (Quadro 2). Para isso, inicialmente, foram preparadas duas soluções dos tensoativos (Fase A) e do óleo e dos cossolventes (Fase B), por separado. Seguidamente, foram numerados nove béqueres de 10 mL, onde foram realizadas as misturas das duas fases (sob agitação) nas proporções mencionadas anteriormente, utilizando uma balança analítica de alta precisão.

Quadro 2: Proporções utilizadas na construção do diagrama pseudoternário de fases.

A	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
B	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%

A = proporções de fase oleosa e cossolvente (8:1); B = proporções de tensoativos (1:1). Fonte: De Oliveira, M. A. (2019).

O próximo passo consistiu em avaliar a quantidade de água a ser adicionada no sistema contendo a mistura de tensoativos, o óleo e o co-solvente. A água foi titulada de 50 em 50 μL , com o auxílio de uma micropipeta automática de 100 μL . A quantidade máxima de água adicionada mantém o sistema límpido e pouco viscoso, características essenciais das emulsões (ROSSI *et al.*, 2007). Considerou-se como a melhor aquela capaz de incorporar maior quantidade de água. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. O diagrama de fase pseudoternário foi obtido utilizando o método de titulação aquosa à temperatura ambiente. A partir dos dados obtidos com o diagrama pseudoternário de fases, os gráficos foram construídos com o auxílio do software Chemix®.

4.3.4. Incorporação dos carotenoides nas formulações obtidas

Uma vez selecionadas as formulações 1 e 2, o próximo passo consistiu em avaliar a solubilidade dos carotenoides em ambas as formulações e, para isso, baseado em dados da literatura, foi testada a concentração de 0,05% para cada carotenoide. Assim sendo, foram pesados 0,0025 gramas de β -caroteno e 0,0025 gramas de licopeno. Em seguida, ambos os carotenoides foram incorporados nas formulações. Inicialmente, para a incorporação dos carotenoides na formulação 1, foram colocados 10mL de água em um béquer, na placa agitadora magnética a 37°C por 10 minutos. Logo depois, foram acrescentados os componentes da formulação na seguinte ordem: álcool etílico, sob agitação; β -caroteno, agitando por 10 minutos; licopeno, agitando por 10 minutos, propilenoglicol, em agitação constante, e por fim, os tensoativos, agitando por 20 minutos. Para a incorporação dos carotenoides na formulação 2, foram colocados 10mL de água em um béquer, na placa agitadora magnética a 37°C por 10 minutos. Logo após, foram acrescentados os componentes da formulação: água, sob agitação; β -caroteno, agitando por 10 minutos; licopeno, agitando por 10 minutos, propilenoglicol, agitação por 10 minutos, o óleo miristato de isopropílico em agitação constante, e por fim, os tensoativos, agitando por 20 minutos. Vale mencionar que todo o processo foi feito em abrigo da luz.

4.4 Caracterização das formulações

4.4.1. Teste de estabilidade dinâmica das formulações 1 e 2 sob condições extremas de temperatura

De acordo com a RE número 1, de 29 de julho de 2005 da ANVISA, o teste de estabilidade acelerada é realizado em condições forçadas de armazenamento, e tem como objetivo acelerar o processo de degradação química e as mudanças físicas do produto farmacêutico. As formulações contendo os carotenoides foram armazenadas cobertas com papel alumínio, para protegê-las do efeito deletério da luz, e colocadas em condições forçadas de temperatura e umidade – na câmara climática a 40°C, no freezer a -20°C, na geladeira a 4°C e a temperatura ambiente. O teste foi realizado por um período de duas semanas, e as amostras foram recolhidas em intervalos de 48 horas, para cada situação, de acordo com o seguinte esquema:

1. Freezer (-20°C) (48h) - Bancada (Temp. ambiente) (48h) - Freezer (-20°C) (48h). Duração do ciclo: 2semanas.
2. Geladeira (4°C) (48h) - Câmara climática (40°C) (48h) – Geladeira (-4°C) (48h). Duração do ciclo: 2semanas.

Após o processo de armazenamento forçado, as formulações foram centrifugadas por 10 minutos a 3500rpm, em uma centrifuga refrigerada (Eppendorf).

Também foram colocadas amostras de cada formulação sobre a bancada, para o controle de temperatura e umidade. Essas amostras, são denominadas formulações de prateleira e foram comparadas com as formulações em condições forçadas de temperatura e umidade.

4.4.2 Avaliação da distribuição do tamanho das gotículas

A determinação do diâmetro médio e da distribuição de tamanho das gotículas formadas nas formulações foi realizada pela técnica de espalhamento de luz, utilizando o equipamento Analisador de Tamanho de Partículas, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Limited, UK). Desse modo, foram utilizados aproximadamente 10 µL das dispersões diluídos em 1 mL de álcool isopropílico e

hexano. As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente (25°C), utilizando um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 173°, com cubetas de quartzo de 5 mL. Os valores obtidos correspondem à média \pm desvio-padrão de três medidas de cada formulação. O índice de polidispersão (Pdl), calculado pelo equipamento, reflete o perfil de homogeneidade no diâmetro das gotas da amostra. Resultados com índice de polidispersão inferiores a 0,3 foram considerados satisfatórios.

4.4.3. Medida da viscosidade da formulação com os carotenoides através do método de Reologia

O estudo da reologia traduz-se na observação do fluxo do material de análise submetido à determinada tensão (Scott, 2000). Por definição, os fluidos são substâncias que se deformam de modo contínuo quando submetidos a um estímulo permanente, não importando a magnitude do estímulo, seja ele grande ou pequeno (Scott, 2000). Entre todas as propriedades dos fluidos, a viscosidade é a que necessita de maior cautela quanto ao estudo do fluxo. A viscosidade é a propriedade física do fluido que descreve a magnitude da resistência do fluido ao escoamento, devido às forças cisalhantes dentro dele. Em outras palavras, a propriedade associada à resistência que um fluido oferece à deformação por cisalhamento, que consiste em um tipo de tensão gerado por forças aplicadas em sentidos opostos, porém, em direções semelhantes no material analisado (<http://www.prolab.com.br/blog/curiosidades/o-que-e-viscosidade-de-um-fluido/>). Os Fluidos Newtonianos ostentam uma viscosidade progressiva com o aumento da tensão cisalhante ou taxa de cisalhamento, sendo definida como viscosidade absoluta (Schramm, 2002). O comportamento pseudoplástico é relativo a fluidos caracterizados como não-newtonianos que exibem atenuação da viscosidade na companhia do incremento da taxa de cisalhamento aplicada (Figura 4), acontecimento designado de *shear-thinning* (I-chung, 1994; Chassenieuet *al.*; 2011).

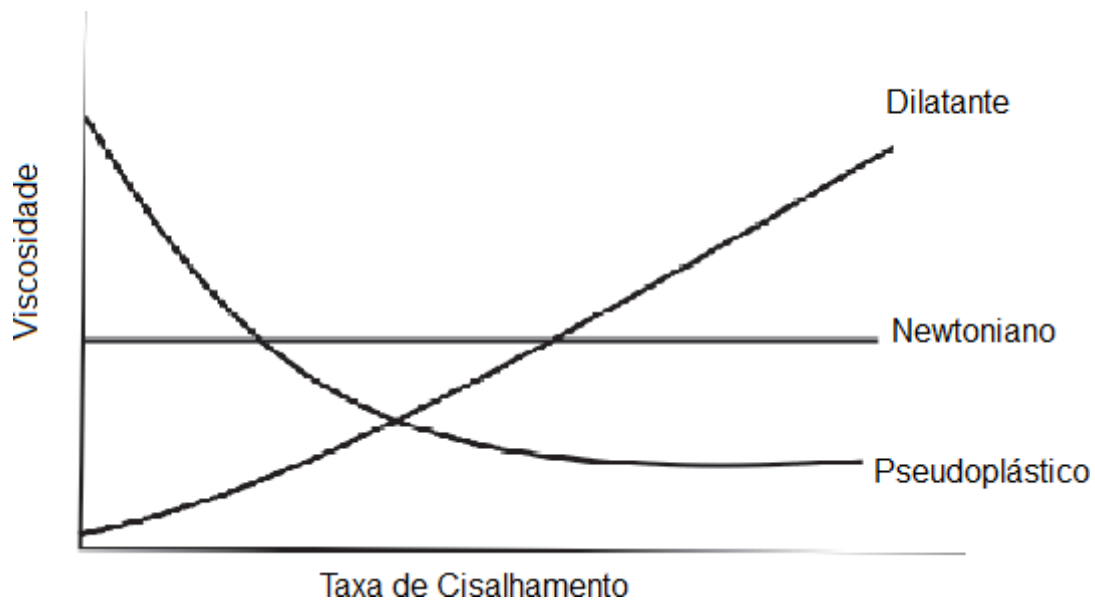


Figura 4: Gráfico mostrando as curvas dos fluidos newtonianos e não newtonianos. Nos fluidos dilatantes, como na água com amido de milho, a viscosidade aumenta conforme aumenta a pressão. Já no fluido pseudoplástico, a viscosidade diminui conforme aumenta a pressão. A propriedade pseudoplástica torna-se evidente na agitação de molho de tomate, onde há uma diminuição da viscosidade. Nos fluidos Newtonianos, a viscosidade é constante, independente da taxa de cisalhamento. Exemplos de fluidos Newtonianos: água, leite, soluções de sacarose, óleos vegetais etc. (Anselet *al.*; 2000).

No presente estudo, a viscosidade do sistema emulsionado de carotenoides foi mensurada pelo uso de um reômetro Haake modelo Mars II. A geometria do sistema de medida usada foi a cone-placa. Os ensaios foram realizados a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, controlada por um banho termostatzado de resfriamento e aquecimento. As curvas de escoamento foram determinadas por duas rampas contínuas consecutivas de varredura de taxa de cisalhamento de 0,01 a 150 s^{-1} , com ciclo ascendente e descendente. A reprodutibilidade de todas as medidas foi garantida obtendo-se os reogramas em triplicata.

4.4.4 Medida da condutividade elétrica

A condutividade elétrica é uma ferramenta muito utilizada na determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos da formulação. A condutividade das formulações foi medida, em triplicata, mediante o uso do condutímetro. O condutímetro foi previamente calibrado pelo uso de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) de concentração igual a $5,0 \text{ mg/L}$, que apresenta a condutividade igual a $10,0 \mu\text{S/cm}$ (microsiemens/centímetro). Para determinar o tipo do sistema O/A ou A/O, avaliou-se, primeiramente, a condutividade do solvente aquoso e do solvente oleoso. Em seguida, realizou-se a medida de condutividade da amostra. Esses valores foram comparados com os da água e do óleo. Quando a condutividade da

amostra é próxima da condutividade da água, a formulação é designada O/A, se for próxima à do óleo, ela é caracterizada como A/O (Lawrence & Rees, 2000; Aulton, 2005).

4.4.5 Medida do índice de refração e do pH da formulação 2

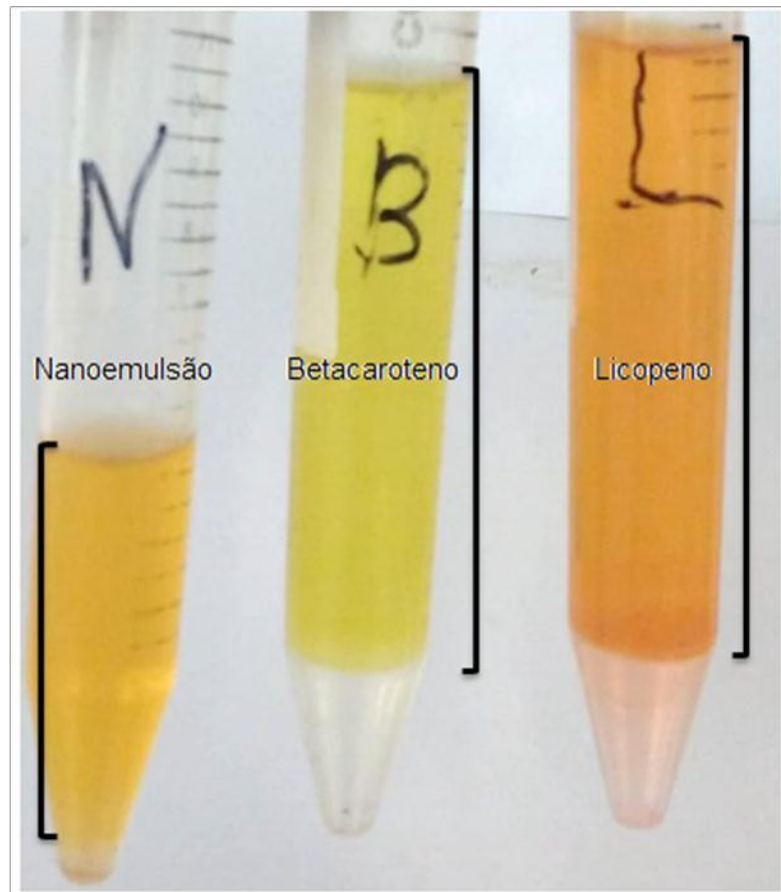
A determinação do índice de refração (nD) permite avaliar a estabilidade das emulsões, uma vez que ela está relacionada à clareza óptica desses sistemas; além de auxiliar na determinação do tipo de emulsão (A/O ou O/A) (Kamila *et al.*, 2009). O nD das formulações foi calculado, segundo a metodologia utilizada por Mota Monteiro (2011), utilizando o refratômetro de Abbe (Farmacopeia Brasileira, 1988). As medidas do nD foram feitas em triplicata à temperatura ambiente. As formulações foram comparadas ao nD da fase oleosa e da água, sem os carotenoides. O pH foi medido com o auxílio do papel indicador de pH universal escala 0-14 graduação 1/1 (MERK).

4.5. Medida da capacidade de encapsulamento dos carotenoides pela formulação 2

A determinação do teor de β -caroteno e licopeno nas formulações foi realizada através de uma metodologia analítica de separação e extração dos compostos com solventes orgânicos, seguida da leitura no comprimento de onda referente a cada carotenoide; por meio de um espectrofotômetro de UV-Vis- FEMTO (modelo SPECTRUMSP-1105).

Desse modo, a extração dos carotenóides foi realizada segundo adaptação do protocolo utilizado por Rodriguez- Amaya (2001). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e ao abrigo da luz, a fim de evitar a degradação dos compostos. Para realizar a quantificação, houve a necessidade inicial de extrair o β -caroteno e o licopeno da formulação, utilizando como solventes: álcool isopropílico/hexano, em uma proporção de 1:9. Para isso, em um balão volumétrico de 10mL, foi adicionado 0,2g da formulação, à qual adicionou-se 1,002g de álcool isopropílico e avolumou-se com hexano para um volume final de 10mL. A solução assim obtida foi submetida a vários ciclos de vortex e sonicação. Por fim, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. Ao final desse procedimento, verificou-se a separação de duas fases: uma fase superior,

hidrofóbica, contendo os extratos (β -caroteno e licopeno); e uma inferior, contendo apenas água, límpida, transparente e livre dos compostos (Figura 5). Após esses procedimentos, o sobrenadante contendo os carotenoides, foi retirado cuidadosamente e transferido para um frasco âmbar. Com a finalidade de estabelecer a relação entre os valores de absorvância e de concentração, realizou-se uma curva padrão utilizando os padrões comerciais de β -caroteno e licopeno (SIGMA) (Figura 6).



- **Figura 5: Extração dos carotenoides da nano/microemulsão e da curva padrão.** Os carotenoides foram extraídos da nanoemulsão, formando a fase superior (delimitada por um colchete no tubo esquerdo). Além disso, foi realizada a separação dos padrões comerciais dos carotenoides, por separado (o tubo do meio contém o β -caroteno e o da extremidade direita, o licopeno) para a obtenção da curva-padrão.

- **Extração dos padrões de licopeno e β -caroteno**

Os padrões comerciais do β -caroteno (Sigma) e do licopeno (Roche) sofreram alguma modificação durante sua obtenção, de maneira que ambos os carotenoides possuem um teor de água, sendo parcialmente solúveis na mesma. Para

a remoção de toda a água dos padrões dos carotenoides, procedeu-se de maneira similar à extração dos carotenoides da nanoemulsão:

- Em um balão volumétrico de 10mL, pesou-se 2,9mg de β -caroteno, 1,004g de água e 2,200g de álcool isopropílico, avolumando com hexano.
- Em um balão volumétrico de 10mL, pesou-se 2,8mg de licopeno, 1,005g de água e 1,006g de álcool isopropílico, avolumando com hexano.

As duas soluções foram agitadas por 5vezes com o auxílio do vortex, expostas por 10 minutos no sonicador e logo centrifugadas por 10 minutos. Após esses procedimentos, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e transferido para um frasco âmbar.

4.6. Análise *in vitro* dos possíveis efeitos citotóxicos da formulação 2 sobres três modelos celulares

A eficácia da emulsão múltipla contendo β -caroteno e licopeno foi avaliada *in vitro* utilizando linhagens celulares de diferentes origens: as células SH-SY5Y, uma linhagem de neuroblastoma humano; as células 8505, linhagem celular humana de carcinoma anaplásico da tireoide; e as células VERO, uma linhagem celular renal de macaco. As três linhagens celulares são aderentes. As células SH-SY5Y apresentam uma morfologia epitelial, segundo descrição da *American Type Culture Collection* (ATCC). As células 8505, isoladas a partir do carcinoma indiferenciado da tireoide de paciente de sexo feminino de 78 anos de idade, exibem uma morfologia epitelial quando mantidas em cultura (ATCC), enquanto as células Vero exibem um formato fibroblastoide.

4.6.1 Cultura das linhagens celulares

As três linhagens celulares foram mantidas em cultura em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em um ambiente úmido a 37°C e 5% de CO₂. Para o tratamento, foram lançadas 10³, 2x10³ e 3x10⁴ células/poço das células VERO, 8505 e SHSY-5Y, respectivamente, em placas de cultura de 96 poços durante 72h. Após esse período as células foram tratadas com diferentes concentrações (0,05%,0,75%,

0,10%, 0,125%, 0,25% e 0,50%) da nanoemulsão múltipla de carotenoides, por 24 e 48h.

4.6.2. Ensaio de viabilidade celular

Os possíveis efeitos citotóxicos da emulsão múltipla sobre as três linhagens celulares citadas foram analisados através do ensaio colorimétrico do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2y]-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Para isso, após o tratamento das células pelo período mencionado, o meio de cultura foi removido, e as células foram incubadas com uma solução de MTT (5mg/mL) durante 3h a 37°C. Após o período de incubação, o MTT não absorvido pelas células foi removido, e seguidamente foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de solubilizar o cristal de formazan gerado pela metabolização mitocondrial do MTT. A leitura do formazan eluído foi realizada em um espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 570nm.

4.6.3. Análise da morfologia celular

Os possíveis efeitos da emulsão sobre a morfologia celular das três linhagens celulares foram avaliados por microscopia de contraste de fase, também por 24 e 48 horas de tratamento com diferentes concentrações da microemulsão 2 e do veículo, sem os carotenoides. A morfologia celular foi monitorada após cada período de tratamento, utilizando um microscópio invertido de contraste de fase AXIOVERT 100 acoplado com uma câmera fotográfica Olympus DP 71, com a ajuda do programa de computador Argus. Lente objetiva utilizada: 20X.

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores de três experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA *One-way*, seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo das formulações

Em um primeiro momento, foram preparadas quatro formulações pelo método de emulsificação de baixa-energia, que permite a formação espontânea de emulsões mediante a combinação dos diferentes componentes: água, cossolventes e os tensoativos em diferentes proporções. Após 24 horas sob agitação constante, para garantir a dispersão e dissolução dos diferentes componentes, pode ser constatado que as formulações 1 e 2 solubilizaram completamente, mostrando-se líquidas e transparentes; enquanto as formulações 3 e 4 precipitaram, dissolvendo-se parcialmente e adquirindo um aspecto de gel bastante espesso, turvo e opaco (Figura 6). Dessa maneira, as formulações 1 e 2 (Quadro 3) foram selecionadas como formulações-base para o preparo das emulsões, mediante a incorporação dos carotenoides nas mesmas.

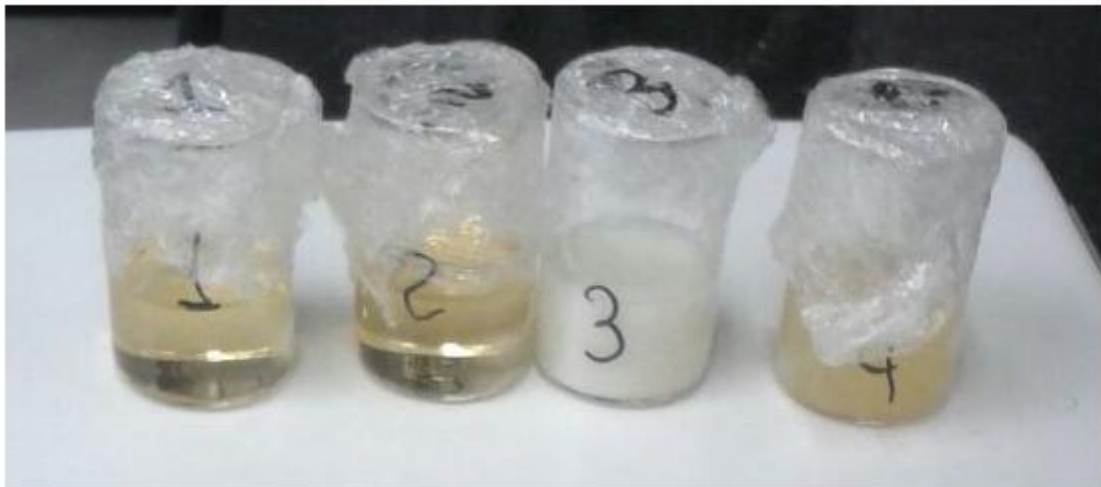


Figura 6. Formulações preparadas a partir da combinação de proporções diferentes dos componentes: água, cossolventes e tensoativos. As formulações 1 e 2 foram totalmente solúveis, mostrando-se límpidas e transparentes. Já as formulações 3 e 4 exibiram um aspecto turvo, indicativo de não ter solubilizado completamente.

Quadro 3. Composição das formulações 1 e 2. (ETOH= Etanol, PPg= Propilenoglicol).

Formulação	Fase oleosa	Cossolventes			Tensoativos	
		ETOH	PPg	água	Tween 80	Span 80
	Miristato de isopropila					
1	-	10%	20%	20%	30%	20%
2	30%	-	10%	10%	25%	25%

5.2 Incorporação do β -caroteno e do licopeno nas formulações obtidas

Uma vez escolhidas as formulações, procedeu-se a adição dos carotenoides para a obtenção da emulsão. Para isso, o β -caroteno e o licopeno foram acrescentados em ambas as formulações para uma concentração final de 0,05%. Quando os carotenoides foram adicionados às formulações, a formulação 1 adquiriu uma coloração âmbar, enquanto a formulação 2 assumiu uma coloração alaranjada, mas ambas as preparações continuaram sendo homogêneas, límpidas e transparentes (Figura 7), sugerindo a solubilidade dos carotenoides nas mesmas. Como foi mencionado anteriormente, o objetivo do estudo foi preparar uma emulsão múltipla enriquecida com β -caroteno e licopeno, a fim de preservar e potencializar as propriedades fisiológicas de ambos os carotenoides, sendo importante destacar que não há registros na literatura de emulsões múltiplas veiculando ambos os compostos. No entanto, nanoemulsões simples contendo um único carotenoide foram preparadas em estudos anteriores, utilizando diferentes componentes e métodos de emulsificação. Quian *et al.* (2012) avaliaram o impacto do óleo carreador sobre a bioacessibilidade do β -caroteno em nanoemulsões elaboradas com três tipos diferentes de óleo. Nesse estudo, nanoemulsões O/A ($d < 200\text{nm}$) foram preparadas usando um surfactante não-iônico (Tween 20) como emulsificante, e triglicerídeos de cadeia longa (LCT), triglicerídeos de cadeia média (MCT) ou óleo de laranja como óleos carreadores. As nanoemulsões O/A foram preparadas por microfluidificação de alta pressão, homogeneizando 4% da fase oleosa (w/w - 0,5% de β -caroteno cristalino diluído no carreador lipídico) e 96% da fase aquosa (w/w - diluindo 1,5% de Tween 20 em uma solução tampão). Além disso, os autores simularam *in vitro* a mucosa oral, gástrica e

intestinal para avaliar a biodisponibilidade do β -caroteno presente na nanoemulsão. Foi visto que a liberação do β -caroteno foi altamente dependente do óleo carreador, sendo mais alta no LCT, média no MCT, e mais baixa no óleo de laranja. Além disso, os autores observaram que as nanoemulsões enriquecidas com β -caroteno foram resistentes à degradação química no ambiente gastrointestinal simulado (Quian *et al.*, 2012). Em um outro estudo de natureza similar, o mesmo grupo (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013) analisou o possível destino biológico de nanoemulsões carregadas com β -caroteno utilizando também um modelo de digestão *in vitro*, com foco na influência da concentração e do tipo de óleo carreador, na digestibilidade dos triglicérides e na biodisponibilidade do β -caroteno. Da mesma maneira, Luo *et al.* (2016) compararam a estabilidade física e química de nanoemulsões contendo β -caroteno produzidas por microfluidização de canal duplo, usando dois emulsificantes: o isolado de proteínas de soro (WPI, por suas siglas em inglês, purificado a partir do leite de ovelha) e saponina de quilaia(Q-Naturale).

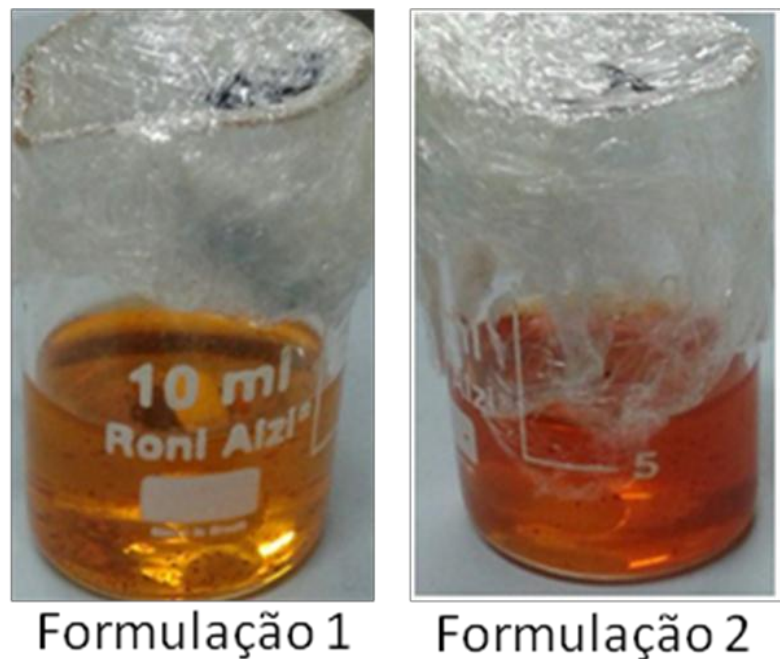


Figura 7. Solubilidade dos carotenoides (β -caroteno e licopeno) nas formulações 1 e 2 avaliada na concentração de 0,05%. Com a adição dos carotenoides, ambas as formulações continuaram sendo homogêneas e transparentes.

Nanoemulsões obtidas por esse método tiveram uma distribuição do tamanho de gotículas monomodal, com uma tendência geral similar para ambos os tipos de emulsificantes. Os autores observaram também que uma maior concentração dos emulsificantes gerou nanoemulsões de tamanhos menores ($d < 200\text{nm}$) (Luo *et al.*, 2016). Entretanto, o Q-Natural e foi mais eficaz em reduzir o

tamanho da gota quando usado em concentrações mais baixas (0,1%) (Luo *et al.*, 2016). Além de carotenoides comerciais, carotenoides extraídos diretamente de espécies vegetais podem ser utilizados no preparo de nanoemulsões. Hsuet *al.* (2017) elaboraram uma nanoemulsão com um extrato de carotenoides obtido a partir da *Lycium barbarum L.*, uma planta medicinal chinesa, e testaram seus efeitos sobre o crescimento das células de câncer de colon HT-29. Segundo os autores, o extrato de carotenoides dessa planta continha nove carotenoides diferentes, sendo a *all-trans* zeaxantina e seus isômeros o carotenoide em maior quantidade. A nanoemulsão foi produzida pela técnica de sonicação e estava formada por 2% de Capryol TM90, 4% de Transcutol®HP, 10% de Tween 80 e 84% de água deionizada. O tamanho médio das partículas foi de 15,1nm, A nanoemulsão com essa composição demonstrou ser estável após 90 dias de armazenamento, e foi capaz de inibir o crescimento das células tumorais HT-20 (Hsuet *al.*, 2017). Além de nanoemulsões com β -caroteno, nanoemulsões de diferentes tamanhos foram preparadas para preservar a atividade antioxidante e melhorar a biodisponibilidade de licopeno presente no extrato de tomate, contendo 6% de licopeno. Dessa maneira, foi constatado por Ha *et al.* (2014) que nanoemulsões de gotículas com tamanho entre 100 e 200nm exibiram maior atividade antioxidante do que as gotículas menores de 100nm. Interessantemente, eles perceberam que as nanoemulsões com gotículas menores do que 100nm exibiram uma maior bioacessibilidade do licopeno *invitro*.

5. 3. Caracterização da formulação carregada com os carotenoides

Uma vez solubilizados os carotenoides nas formulações 1 e 2, foi realizada a caracterização dos sistemas obtidos, a fim de verificar se as formulações desenvolvidas reuniam as características próprias de uma nanoemulsão ou microemulsão; quanto ao tamanho das gotículas e solubilidade dos ativos nelas incorporados. Por essa razão, foram realizados vários testes visando a caracterização físico-química do sistema de entrega produzido. Tais testes incluíram: análise da distribuição do tamanho das gotículas, teste de estabilidade dinâmica da emulsão em condições extremas de temperatura, índice de refração, pH, condutividade elétrica, viscosidade e a capacidade de encapsulação da formulação.

5.3.1 Teste de estabilidade termodinâmica

Do ponto de vista comercial, os sistemas de administração nutracêuticos podem ser expostos a variações de temperatura durante o seu armazenamento e transporte (Luo *et al.*, 2016). Desse modo, é importante avaliar o possível efeito da temperatura de armazenamento sobre a estabilidade física das emulsões enriquecidas com β -caroteno e licopeno. Para esse fim, as emulsões foram submetidas a diferentes condições de estresse, incluindo: aquecimento/refrigeração (40°C e 4°C) e ciclo de degelo (-20°C e 25°C), com a estocagem da formulação por pelo menos 48h em cada temperatura e estresse por centrifugação (Ultracentrifuga HITACHI). Assim, as formulações que passaram pelo teste de estresse por temperatura foram centrifugadas a 3000rpm por 30 min, verificando-se posteriormente se houve separação de fase e/ou precipitação em todos os casos (Abreu, 2018). O teste foi realizado por um período de duas semanas e, no diagrama da figura 8, podem ser visualizadas as condições de armazenamento às quais foram submetidas as duas formulações.



Figura 8. Representação gráfica do teste de estabilidade dinâmica das formulações submetidas a condições extremas na temperatura de armazenamento. Na linha superior, o ciclo de armazenamento foi congelamento-temperatura ambiente-congelamento; e na inferior, resfriamento-aquecimento moderado-resfriamento. A troca de uma temperatura para outra foi realizada a cada 48 horas, em um período de duas semanas (armazenamento forçado de curta duração).

Após esse período, as formulações foram centrifugadas e avaliadas visualmente, a fim de verificar possíveis mudanças nas suas propriedades físicas. Foi visto, então, que a formulação 1, após a etapa de centrifugação, precipitou; enquanto a formulação 2 manteve-se homogênea, límpida e transparente no mesmo

período de análise. O fato de não ter sido observada nenhuma evidência de formação de creme na formulação 2 durante os 15 dias de armazenamento forçado sugere que as gotículas permaneceram relativamente pequenas durante o armazenamento, o que é um indicativo da estabilidade termodinâmica da formulação carreadora dos carotenoides, como apontado por Luo e *et al.* (2016). A partir desse resultado, pode-se sugerir que a formulação enriquecida com os carotenoides, contendo miristato como fase oleosa, é estável ao armazenamento a longo prazo em temperatura alta, ambiente e baixa. Dessa maneira, a formulação 1 foi descartada, e a formulação 2 escolhida para a realização dos próximos testes. O quadro 4 resume os resultados de estabilidade dinâmica no tempo inicial e após 2 semanas, em condições forçadas de armazenamento.

As formulações armazenadas em condições normais de temperatura e umidade, chamadas de “formulações de prateleira”, foram comparadas com as respectivas amostras que estavam em condições forçadas de temperatura após o período de 2 semanas. Essas formulações foram examinadas visualmente e se mantiveram límpidas, homogêneas e com as mesmas cores, sem nenhum indício de precipitação dos carotenoides ou separação de fases. Vale lembrar que essas amostras se encontram há mais de 180 dias em prateleira, mantendo as mesmas características.

Quadro 4. Resultado da estabilidade dinâmica das duas formulações em condições extremas de temperatura.

Formulação	Aspecto	
	Análise inicial	2 semanas
1	Cor âmbar, homogênea, límpida e transparente	Precipitou, formando pequenos grânulos
2	Cor alaranjada, homogênea, límpida e transparente	Manteve o mesmo aspecto

A formulação 2 foi escolhida como formulação-base para a realização dos próximos testes, visto que, além de solubilizar os compostos bioativos, apresentou uma ótima estabilidade preliminar frente à força física ou a alterações extremas de temperatura, o que fortalece a hipótese de estabilidade termodinâmica da formulação desenvolvida.

5.3.2. Diagrama pseudoternário de fases

Com o intuito de prever a capacidade espontânea da formulação de conceber nano/microemulsões no interior e nas condições do sistema gastrointestinal, a composição do diagrama de fases é julgada indispensável. Este é empregado para conseguir uma boa relação dos componentes nas áreas onde as nano/microemulsões são formadas. A formulação 2 forma uma fina emulsão de água em óleo sob agitação suave, após esta ser inserida no meio aquoso, em razão da energia livre essencial para produzir uma emulsão ser muito baixa, sendo então a formação da emulsão termodinamicamente espontânea (AGRAWAL *et al.*, 2015).

O diagrama pseudoternário de fases da formulação foi preparado pela variação da concentração do óleo miristato de Isopropila e dos tensoativos Tween® 80 e SPAN® 80. A água purificada foi usada como titulante. A área demarcada no diagrama em vermelho representa a região estável para a nanoemulsão (Figura 9). As proporções dos componentes utilizadas para a elaboração do presente sistema de entrega estão representadas pelo ponto verde (Figura 9), podendo ser localizada na região de microemulsão A/O, muito próxima; porém fora da região caracterizada para nanoemulsões. Tais regiões delimitadas no gráfico são compatíveis com a área correspondente a sistemas emulsionados do tipo água em

óleo em escala micrométrica, apresentadas no diagrama pseudoternário de fases hipotético proposto por Constantinides em 1995 (Figura 10).

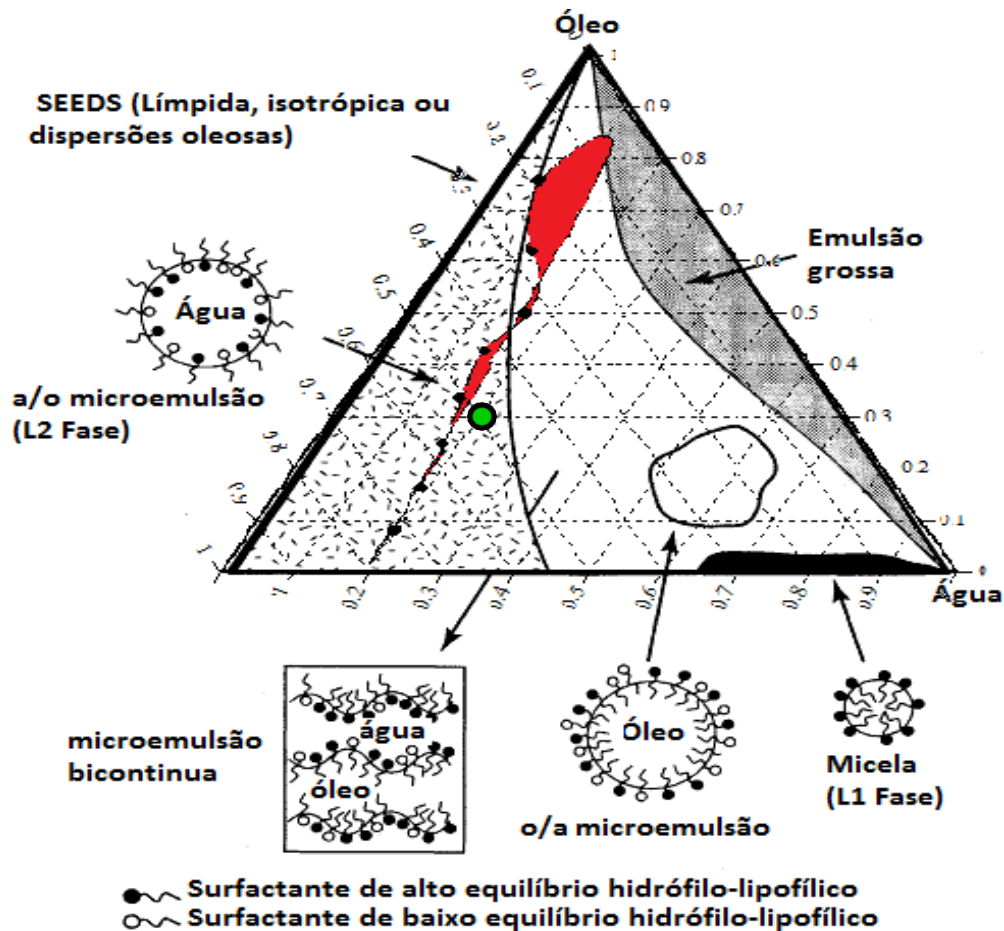


Figura 9: Diagrama pseudoternário de fases óleo/surfactante/água, adaptado para a emulsão 2, a partir do modelo proposto por Constantinides. De acordo com a interpretação proposta, a área obtida pela titulação da água (área demarcada em vermelho) sugere que a emulsão em questão se enquadra na região nano/microemulsão do tipo água em óleo, mostrando a proporção dos componentes utilizados (ponto verde). Tensioativos= Tween 80: Span 80 (1:1), fase Oleosa = Miristato de Isopropila (MI): Propilenoglicol (PPG) (3:1). Figura adaptada de Constantinides, 1995.

5.3.3. Avaliação da distribuição do tamanho das gotículas

Um aspecto que gera discussões, ainda hoje, refere-se às características que determinam o que é uma nanoemulsão e o que uma microemulsão. Alguns autores definem nanoemulsão como uma emulsão que contém gotas relativamente pequenas, com um diâmetro menor do que 100nm (Solans, *et al.*, 2005); enquanto a microemulsão possui gotículas maiores. Nesse sentido, Rao e McClements (2011), após revisarem vários trabalhos, apontaram que a principal distinção entre ambos os

Sistemas deveria ser a sua estabilidade termodinâmica, com as microemulsões sendo estáveis, e as nanoemulsões sendo instáveis.

A análise do diagrama de fases permitiu prever que a formulação preparada no presente estudo é do tipo A/O sendo classificada como uma microemulsão. Com o propósito de verificar essa informação, o próximo passo foi analisar a distribuição do tamanho das gotículas da preparação contendo β -caroteno e licopeno a 0,05%. Pelo método do espalhamento dinâmico da luz, foi verificado que o tamanho médio das gotículas na formulação variou de 400 a 1200nm (Figura 10A). De acordo com esses dados, e com base nos dados da literatura, de fato pode-se considerar a formulação como uma microemulsão. A avaliação foi realizada em triplicata, e os resultados são apresentados como uma curva da média \pm desvio padrão da distribuição do tamanho das gotículas das 3 análises (Figura 10B).

O índice de polidispersão calculado pelo equipamento reflete o perfil de homogeneidade no diâmetro das gotas da amostra. Resultados com índice de polidispersão inferior a 0,3 foram considerados satisfatórios. Como apontado acima, existem divergências a respeito da definição de nanoemulsões e microemulsões baseada somente no tamanho das gotículas. Solans *et al.* (2005) caracterizaram as nanoemulsões como sistemas inconstantes, que não se constituem prontamente, ostentando gotículas de tamanhos que variam de 20 a 200nm. Sob outra perspectiva, Bouchemal *et al.* (2004) definem nanoemulsão como emulsões cineticamente estáveis, formadas por gotículas com tamanho variando de 100 a 600nm. Por outro lado, Jaiswal *et al.* (2015) assumiram como nanoemulsão sistemas que apresentam gotículas de tamanhos entre 10nm e 1000nm.

A microemulsão do presente estudo foi preparada pelo método de emulsificação espontânea, exibindo uma aparência límpida e transparente, mesmo em condições extremas de temperatura. Independente da observação de variação no tamanho das gotículas, não houve separação de fases e formação de grumos ou precipitados na formulação mesmo após 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente, mantendo-se com um aspecto homogêneo na avaliação visual; sugerindo a estabilidade física do sistema. No esquema da figura 11 é possível observar uma comparação da presente formulação com vários objetos e micro-organismos, na escala nanométrica.

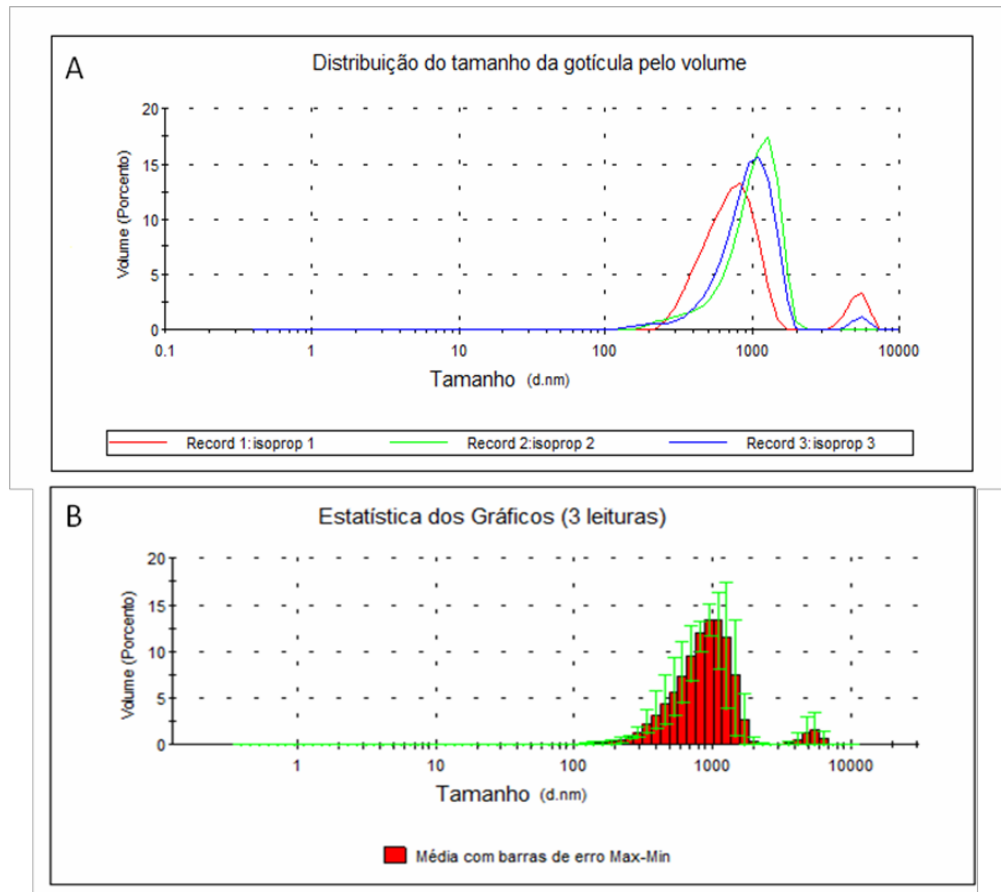


Figura 10. Curva da distribuição do tamanho das gotículas da formulação contendo os carotenoides. A) Distribuição em triplicata B) Média dos gráficos acima com barras de erro.

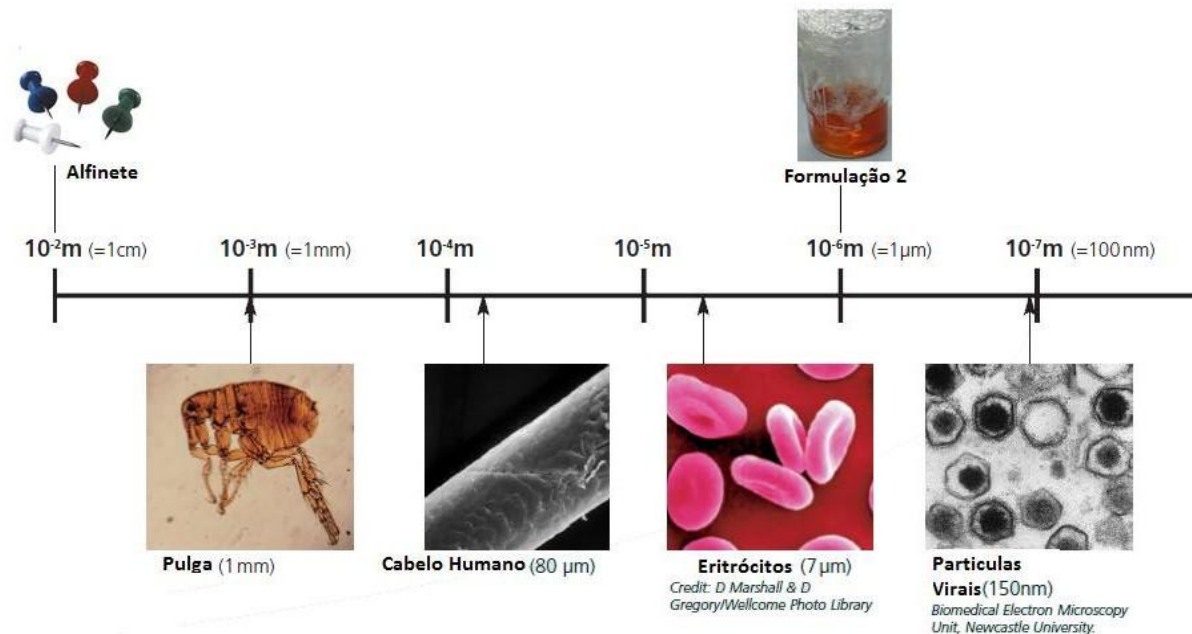


Figura 11: Escala comparativa das dimensões de diferentes elementos, para situar o tamanho das gotículas da microemulsão. As emulsões são consideradas, pela maior parte dos autores, em escala nano quando apresentam um tamanho de até 200nm. No esquema, pode ser observado que a formulação obteve um tamanho das gotículas de majoritariamente 1 micrometro, sendo, então, classificada como uma microemulsão (Adaptado de The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004).

O tamanho das gotículas das nanoemulsões pode ser afetado por diferentes fatores, entre eles: a composição da formulação, bem como pelo método de emulsificação. Conforme Guanet *et al.* (2016), a combinação de surfactantes anfipáticos, como os usados nesse trabalho, reduz a tensão interfacial do sistema e, por consequência, o tamanho das gotículas. Segundo Borba e seus colaboradores (2017), que avaliaram a estabilidade física de nanoemulsões de β -caroteno formuladas com óleo de arroz, milho e soja, estas não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros: tamanho das gotículas, potencial Zeta e índice de polidispersão durante 90 dias de armazenamento a 4°C, provavelmente pela similaridade da composição química dos óleos utilizados, sendo os três provenientes de fontes vegetais e ricos em ácidos graxos de cadeia longa, entre eles o ácido oléico; presente também no surfactante Span 80 que foi utilizado no presente trabalho como tensoativo. Segundo Gomes *et al.* (2017), essa semelhança na composição das cadeias de ácidos graxos dos óleos e do surfactante auxilia a interpenetração da porção hidrofóbica do surfactante nas cadeias de triglicerídeos, permitindo a formação de interfaces fechadas, com menor tendência para a desestabilização.

Fundamentado no método empregado para o desenvolvimento da formulação proposta, era de se esperar que o produto obtido no estudo esteja de fato na escala micrométrica. Diferentemente das microemulsões, as nanoemulsões não são termodinamicamente estáveis, logo, não se formam de maneira espontânea. Para desenvolver uma nanoemulsão, como foi mencionado acima, é necessário o uso de uma força externa, característica do método de alta energia, que quebra as gotículas existentes no produto proveniente da autoemulsificação (microemulsão) em gotículas menores, diminuindo seu tamanho até a escala nanométrica. Historicamente, a escolha do termo microemulsão para descrever sistemas autoemulsionados e termodinamicamente estáveis não é muito adequada, pois a partir desse método, variando os componentes (óleo, água e surfactantes), é possível obter fases com estruturas em escala manométricas de 1 a 200nm que muitos autores consideram como microemulsão. É importante destacar, mais uma vez, que, por definição, a microemulsão é formada de maneira espontânea, enquanto a nanoemulsão necessita, na maioria das vezes, de uma força externa aplicada, apesar de ambos os sistemas de entrega apresentarem os mesmos componentes básicos (óleo, água e surfactantes).

5.4. Análise físico-química da microemulsão

A análise dos parâmetros físico-químicos de sistemas emulsionados é de fundamental importância na caracterização completa do sistema. Além de confirmar a formação dos sistemas, esses dados podem ser utilizados como parâmetros para modificar o comportamento dos mesmos para uma finalidade específica (Rossi *et al.*, 2007). As características físico-químicas avaliadas no sistema emulsionado obtido no presente estudo incluem: medida da condutividade elétrica, o índice de refração, e a quantificação do pH. No quadro 5 estão resumidos os valores correspondentes a essas variáveis.

Quadro 5. Valores da condutividade elétrica, do índice de refração, e do pH da formulação 2.

Formulação	Condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$)	Índice de refração (nD)	pH
Veículo	0,21	1,447	5,5
Fase oleosa: miristato de isopropila	0,07	1,432	5,0
Água	2,89	1,333	7,0
Microemulsão	0,10	1,447	5,5

As análises foram realizadas na ausência dos ativos (veículo), na fase oleosa (miristato de etila), na água pura e na presença dos ativos (microemulsão completa). Fonte: De Oliveira, M. A. (2019).

• **Medida da Condutividade elétrica**

A fim de analisar a condutividade elétrica das amostras, foi utilizado um condutímetro (Metter Toledo MPC 227). Os resultados foram expressos em micro Siemens por centímetros ($\mu\text{S/cm}$). A medida da condutividade confere à definição do tipo de emulsão estabelecida. A análise das propriedades físico-químicas de sistemas microemulsionados é de total relevância para a determinação integral da sua conformação. Os valores obtidos para a microemulsão foram comparados com os valores da água e do óleo. No momento em que a condutividade da amostra é próxima à da água, a formulação é denominada O/A; caso a condutividade seja próxima à do óleo, esta é descrita como A/O (LAWRENCE & REES, 2000; AULTON, 2005). É possível observar que, conforme demonstrado na tabela acima, o resultado do valor da condutividade foi aproximado ao valor da fase oleosa. Logo, a formulação obtida pode ser caracterizada como A/O. Zhang e Michniak-khon (2011) demonstraram que, em nano/microemulsões A/O, a condutividade é baixa em consequência das gotículas de água encontraram-se isoladas pelo filme proveniente dos tensoativos. Esses resultados estão em concordância aos apresentados na literatura (Nandi *et al.*, 2003).

• **Índice de refração**

Consiste na definição física que retrata o desvio da luz quando esta passa de um meio para outro, mediante transmissão e reflexão, com o intuito de avaliar a

estabilidade das microemulsões, uma vez que ela está relacionada com a clareza óptica desses sistemas. Ademais, também contribui na identificação do tipo de emulsão, A/O ou O/A (KAMILA *et al.*, 2019).

Com o objetivo de medir o índice de refração (nD) da amostra, foi empregado um refratômetro (Abbé, Analitik jena) por indicação direta em escala graduada, atendendo um sistema óptico na temperatura de 25°C. A faixa de medição do nD do aparelho varia de 1,300nD a 1,700nD. Todas as análises mantiveram-se dentro dos valores normais, podendo ser observadas no quadro5 .

- **Teste do pH**

O pH da microemulsão e de seus componentes foi aferido com o auxílio do papel indicador de pH universal escala 0-14 graduação 1/1 (MERK), dando os seguintes valores: pH veículo = 5.5; fase oleosa = 5.0; água= 7.0; e microemulsão = 5.5 (Tabela 5). O pH do meio é capaz de inferir acerca do grau de ionização e da solubilidade de lipídios do fármaco. O pH varia ao longo do trato gastrointestinal, podendo ir de 1, no estômago, até próximo a 7 ou 8 no intestino, sendo um fator significativo para a absorção do fármaco. Especificamente no intestino delgado, onde a superfície de absorção é a maior de todo o trato gastrointestinal, o pH é de 6,5, sendo ideal para a absorção de ácidos fracos e bases fracas (Aulton, 2005). Em aplicações tópicas, o pH ideal de uma formulação é geralmente normalizado conforme a estabilidade dos componentes ativos empregados e os de tolerância biológica, entendendo valores de pH que variam de 5,5 até 8,0 (Silva *et al.*, 2009). A formulação desenvolvida no presente trabalho possui um pH conciliável com a administração oral e tópica. Os valores obtidos também são compatíveis com uma melhor estabilidade físico-química da formulação (pH 5,5 a 8,0) (Fronza *et al.*,2004).

5.5. Teste de viscosidade da microemulsão pelo método da Reologia

A viscosidade da microemulsão elaborada no presente estudo foi determinada pelo método de fluxo contínuo. No gráfico 1, pode ser visto o comportamento reológico da microemulsão; onde no eixo Y está representada a viscosidade, expressa em micropascal. segundo $-\eta$ (mPa.s), e no eixo X, a taxa de cisalhamento, expressa em $\gamma(1/s)$. Nesse gráfico, pode ser observado um aumento não linear da taxa da viscosidade, frente à taxa de cisalhamento, exibindo um comportamento não newtoniano, verificando-se uma redução da viscosidade como aumento da taxa de deformação. Assim, podemos caracterizar a microemulsão desenvolvida

como um material pseudoplástico, com um decréscimo na viscosidade associado ao aumento da tensão de cisalhamento, comportamento típico de uma formulação A/O(Lawrence & Rees, 2000; Aulton,2005).

Comportamento reológico da microemulsão

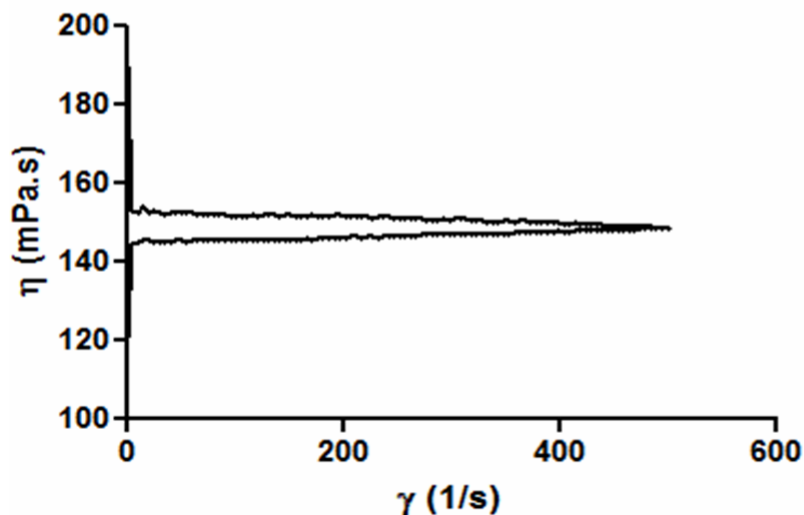


Gráfico 1. Avaliação do comportamento reológico da microemulsão carreadora dos carotenoides. Análise da viscosidade. A curva é representativa de três ensaios independentes.

5.6. Capacidade de encapsulamento dos carotenoides pela microemulsão

Como já foi mencionado, as microemulsões são compostas por uma fase aquosa e uma fase oleosa. Pela sua natureza lipofílica, os carotenoides possuem mais afinidade pela fase oleosa, apesar dos padrões comerciais utilizados serem solúveis numa concentração mínima em água. Por essa razão, uma vez na microemulsão, os carotenoides migram para a fase oleosa, sendo necessário a separação da microemulsão em suas duas fases, com o auxílio de solventes orgânicos altamente apolares, como o hexano. Pelo fato de o hexano ser muito apolar, ele não consegue ultrapassar a interfase aquosa retida pela parte polar dos surfactantes que envolvem as emulsões. Por esta razão, utilizou-se o álcool isopropílico para auxiliar na separação de ambas as fases. O álcool isopropílico é um dos poucos solventes miscíveis em hexano que tolera alguma porcentagem de água (em torno de 1%), conseguindo ultrapassar a interfase aquosa que envolve as emulsões e se misturar com a fase oleosa dentro das gotículas; permitindo a

separação das fases (Rodríguez-Amaya, 2001; Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Após da extração dos carotenoides, procedeu-se a leitura das amostras no comprimento de onda de 450 e 470nm, para o β -caroteno e o licopeno, respectivamente. Para a determinação da concentração dos carotenoides, as leituras obtidas das amostras foram comparadas com os valores da curva-padrão realizada a partir da diluição dos padrões comerciais de β -caroteno e licopeno. Dessa maneira, a curva-padrão para o β -caroteno foi montada a partir de nove concentrações em ordem crescente, nos seguintes valores: 0.065, 0.03287, 0.02630, 0.0219, 0.0187, 0.0164, 0.1315 e 0.01095 mg/mL. Para a curva-padrão do licopeno, os valores utilizados foram: 0.0592, 0.0296, 0.0237, 0.0197, 0.0169, 0,0148, 0.0118, e 0.010 mg/mL (Figura 12). Cada concentração equivalendo às diluições dos padrões comerciais diluídos nos solventes (álcool isopropílico/hexano/água) foi de 5 / 10 / 12,5 / 15 / 17,5 / 20 / 22,5 / 25 /30x.

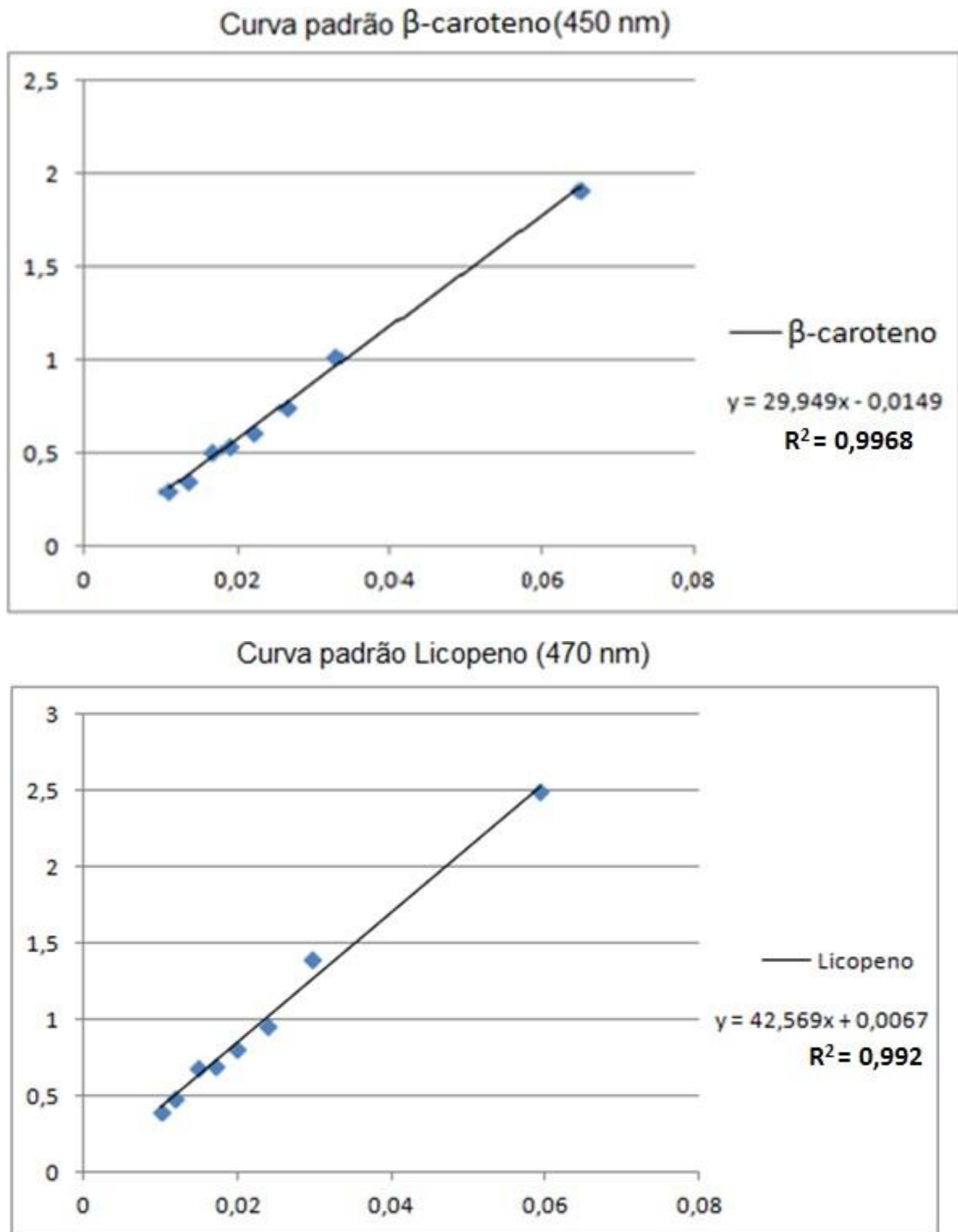


Figura 12: curva padrão obtida a partir da extração dos padrões comerciais do β -caroteno (gráfico superior) e do licopeno (gráfico inferior).

Para a análise e interpretação dos resultados, foi utilizada a equação da reta: $y = ax + b$, onde y é a absorbância da solução no comprimento de onda de 450nm para β -caroteno e 470nm para licopeno; x é a concentração; a é o *slope* da

curva e b é o *y-intercept*. Então, para o cálculo da concentração, procedeu-se a busca do valor de x . Dessa maneira, $x = y - b/a$.

Constatou-se que a melhor combinação de solventes para a separação de ambas as fases foi de uma parte de álcool isopropílico, como extrator auxiliar inicial, seguido de nove partes de hexano, como extrator diluente e separador, sendo possível majorar a concentração de β -caroteno e de licopeno na microemulsão e nos padrões comerciais, presumindo assim a eficiência de encapsulação da formulação (Quadro6).

Quadro 6: Eficiência de encapsulação do β -caroteno e do licopeno pela microemulsão.

	Massa pesada da Nanoemulsão	Quantificação por Espectrofotometria	Aproveitamento dos carotenoides na Nanoemulsão
β-caroteno	2,6mg	2,111781mg/g	81,22234%
Licopeno	2,7mg	2,090522mg/g	77,42675%

Dessa maneira, a eficiência de encapsulação pela formulação desenvolvida foi de 81,22% para o β -caroteno e de 77,42% para o licopeno. Segundo a literatura, esses valores encontram-se dentro do esperado, uma vez que 70% já é considerado um padrão de excelência. Além disso, este trabalho foi pioneiro ao propor a incorporação de dois carotenoides ao mesmo tempo. Diferentes relatos na literatura demonstraram maiores capacidades de incorporação de fármacos em sistemas emulsionados através da modificação da fase oleosa, tanto na proporção dos componentes quanto no tipo de óleo utilizado.

Gupta e Ghosh (2012) obtiveram uma eficiência de encapsulação para o β -caroteno de 79.6% em nanopartículas compostas por esteróis vegetais, óleo de linhaça, caseinato de cálcio, alginato de sódio e água; enquanto outra preparação composta por quitosana, Tween 80 e tripolifostato alcançou uma eficiência de 89% (Thamaket & Raviyan, 2015). Xia *et al.* (2006) demonstraram uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 90% em um nanopolipossoma composto por colesterol, coenzima Q10, Tween 80 e tampão fosfato. Além disso, também são relatados valores maiores, de até 98.6%, como descrito por Ho *et al.* (2016). Baseados no diagrama de fases e no ensaio de condutividade elétrica, a

microemulsão desenvolvida foi caracterizada como do tipo A/O, formada por uma fase oleosa (30% de óleo de miristato) e uma fase aquosa (20% de água e propilenoglicol), estabilizada com uma alta porcentagem de uma mistura de surfactantes (25% de Tween 80 e 25% de Span 80) e enriquecida com 0,05% de β -caroteno e licopeno (Figura 13A). A figura 13B demonstra a forma como essa microemulsão pode estar organizada em gotículas de aproximadamente 1 μ m de diâmetro, quando em contato com meio aquoso, como visto na análise da distribuição do tamanho das gotículas. A figura 13C representa uma ampliação do que seria uma gotícula da microemulsão, para representar hipoteticamente a localização dos carotenoides. Assim, sugere-se que os carotenoides poderiam estar presentes tanto na fase oleosa quanto na interfase desta com a fase aquosa, formada pelos tensoativos.

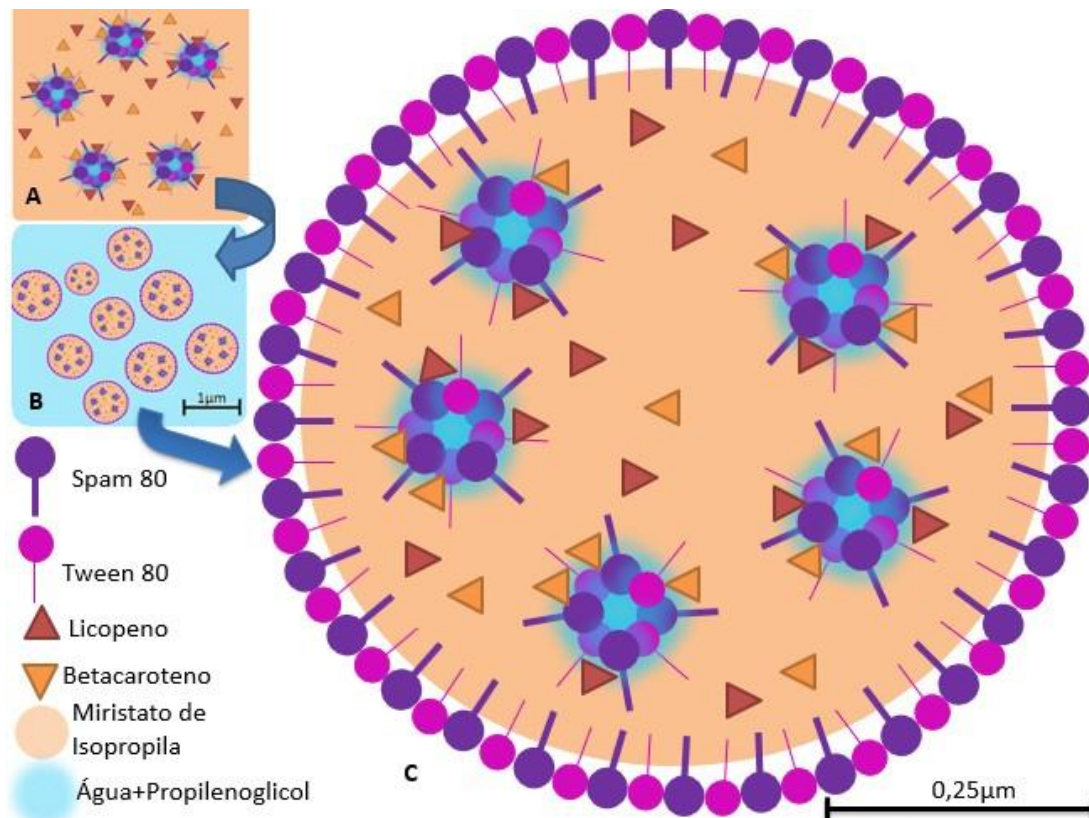


Figura 13: Esquema ilustrando uma configuração hipotética da microemulsão carreadora de β -caroteno e licopeno proposta no presente estudo. Emulsão formada por miristato de Isopropila, água, propilenoglicol, tensoativos e carotenoides (A). Gotículas formadas pela microemulsão em meio aquoso (B). Esquema mostrando a possível distribuição dos componentes da microemulsão, com base nas suas afinidades físico-químicas (C). De acordo com a representação proposta, os carotenoides podem estar dispersos tanto na fase oleosa (de cor salmão) quanto na interfase entre a fase oleosa e a fase aquosa (azul), ligados aos tensoativos. Fonte: o próprio autor.

5.7. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da microemulsão carreadora de β -caroteno e licopeno.

- **Ensaio de viabilidade celular das linhagens celulares tratadas com a microemulsão carreadora de β -caroteno e licopeno**

Após o preparo e a caracterização físico-química de uma microemulsão múltipla de carotenoides contendo β -caroteno e licopeno, procedeu-se a avaliação *in vitro* dos seus possíveis efeitos citotóxicos sobre várias linhagens celulares de diferentes origens. Para isso, as células SH-SY5Y, 8505 e Vero, de origem neural, endócrina e renal, respectivamente, foram plaqueadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, em uma densidade celular de 3×10^4 , 2×10^3 , e 10^3 , respectivamente. Após atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), o meio antigo foi retirado, e as células foram tratadas por 24 e 48 horas, com diferentes concentrações (0%; 0,05%; 0,075%; 0,1%; 0,125%; 0,25% e 0,50%) da microemulsão diluída em meio de cultura novo; usando como controle a formulação sem os bioativos (veículo) nas mesmas concentrações. Os valores da absorbância, obtidos por espectrofotometria e correspondentes ao ensaio colorimétrico do MTT, podem ser observados na figura 14.

Dessa maneira, verificou-se que, após 24 horas do tratamento, houve uma redução da viabilidade celular das células SH-SY5Y (Figura 14A) e Vero (Figura 14E) nas concentrações de 0,25% e de 0,50%; tanto da microemulsão, quanto do veículo. Além disso, observou-se uma redução significativa da viabilidade celular das células 8505 (Figura 14C) somente na concentração de 0,5%; tanto da microemulsão quanto do veículo. Com 48 horas de tratamento, constatou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular das células SH-SY5Y (Figura 14B), ainda nas concentrações de 0,25% e 0,50% da microemulsão e do veículo, em relação ao controle (0%). Nesse mesmo período de tratamento, não houve alteração estatisticamente significativa na viabilidade celular das células 8505 (Figura 14D). Em contrapartida, as células Vero tiveram sua viabilidade celular comprometida, na presença da microemulsão e do veículo, já na concentração de 0,05% (Figura 14F). Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela Análise de Variância *One Way Anova*, com o pós-teste Tukey. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

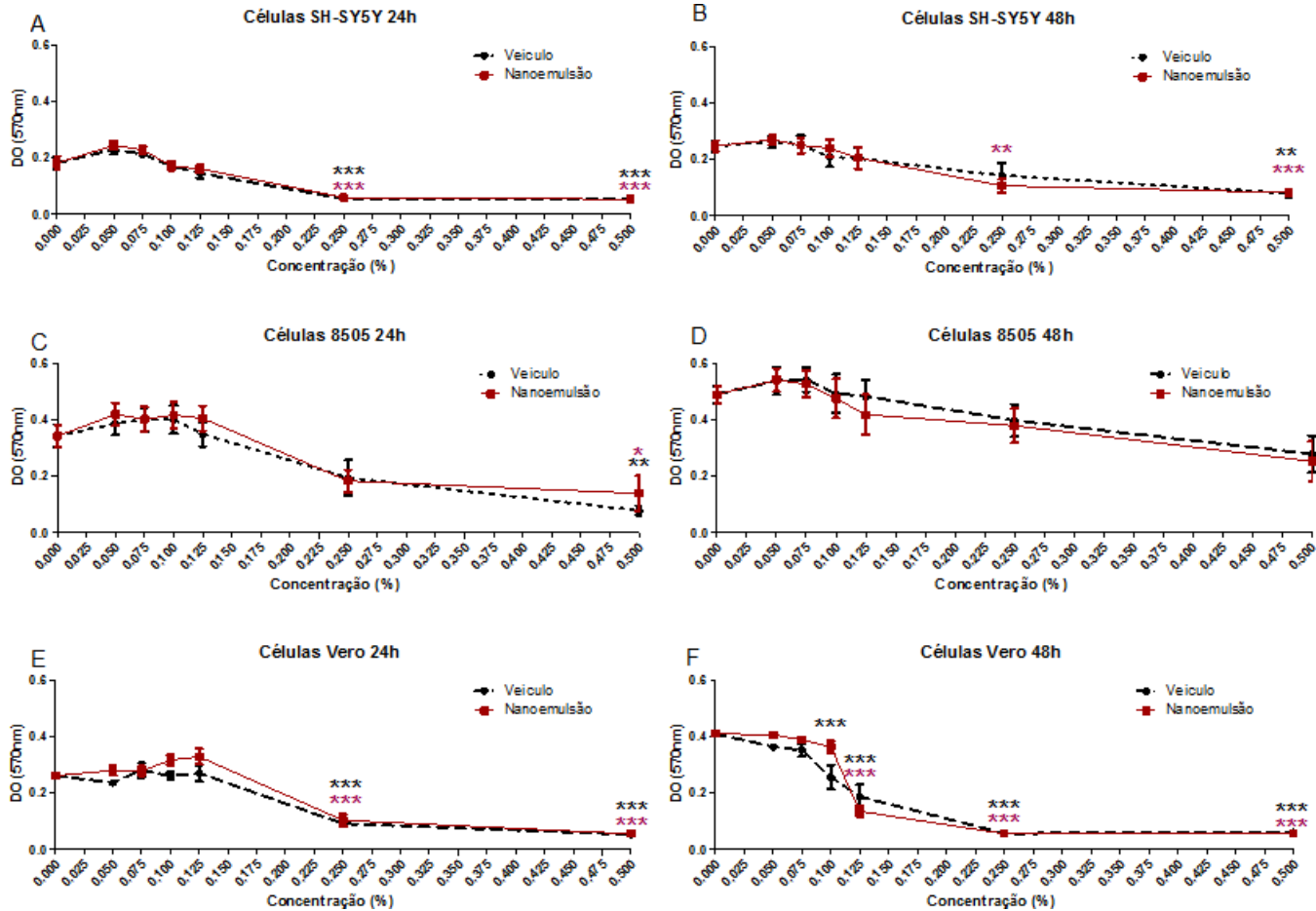


Figura 14. Análise da viabilidade celular das células SH-SY5Y, 8505 e Vero tratadas com diferentes concentrações da microemulsão contendo β -caroteno e licopeno. As células foram plaqueadas em placas de 96poços e, quando semiconfluentes, foram tratadas com diferentes concentrações (0%;0,05%;0,075%;0,1%;0,125%;0,25% e 0,5%) da formulação, carregada com os carotenoides (β -caroteno e licopeno) ou sem os ativos incorporados, diluída no meio de cultura durante 24 e 48 horas. Após cada período de tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT. Os valores da absorbância, como uma medida indireta da viabilidade celular, são expressos como a média mais ou menos o desvio padrão de três ensaios independentes. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

- **Análise da morfologia celular das linhagens celulares tratadas com a microemulsão carreadora de β -caroteno e licopeno**

Como na análise de viabilidade celular, para a análise da morfologia celular, as células SH-SY5Y, 8505 e Vero foram plaqueadas em uma densidade celular de 3×10^4 , 2×10^3 , e 10^3 , respectivamente. Quando atingida a semiconfluência, o meio antigo foi trocado por meio novo contendo 0%; 0,05%; 0,075%; 0,1%; 0,125%; 0,25% e 0,50% da microemulsão. As células foram tratadas por 24 e 48 horas, e a morfologia celular foi monitorada através de um microscópio de contraste de fase. Células controles foram cultivadas pelo mesmo período, na presença das mesmas concentrações do veículo, sem os bioativos. Após as 24 horas, com 0% de tratamento, as células SH-SY5Y exibiram uma morfologia mais ou menos estrelada, com curtos prolongamentos surgindo do corpo celular. Nas concentrações de 0,05% e de 0,075%; tanto da microemulsão contendo os carotenoides (Figura 15), quanto do veículo sem os carotenoides (Figura 16), as células SH-SY5Y exibem uma morfologia celular semelhante à das células controle. Entretanto, a partir de 0,1%, essas células experimentam uma alteração na morfologia celular, tornando-se arredondadas e retraídas, característica que se mantém nas concentrações de 0,125%, 0,25% e 0,50%; tanto da microemulsão carreando os carotenoides (Figura 15), quanto do veículo sozinho (Figura 16). Após 48 horas com 0% de tratamento, as células SH-SY5Y continuam sendo de morfologia estrelada, observando-se também um aumento na densidade celular, exibindo características morfológicas similares nas concentrações de 0,05%, 0,075%, 0,10%, e 0,125% de ambos: da microemulsão (Figura 17) e do veículo (Figura 18). Todavia, foi possível constatar uma mudança na morfologia celular nas concentrações de 0,25% e 0,50%; tanto da microemulsão (Figura 17), quanto do veículo (Figura 18), onde as células tornam-se arredondadas e retraídas. Em relação às células 8505, pode-se observar que, às 24 horas na condição 0% de tratamento, a maioria das células exibe uma morfologia fibroblastoide, com algumas células de morfologia arredondada, característica ainda presente nas concentrações de 0,05%, 0,075%, 0,10% e 0,125%; tanto da microemulsão (Figura 19), quanto do veículo (Figura 20). No entanto, no mesmo período de tratamento, nas concentrações de 0,25% e 0,50% da microemulsão e do veículo (Figuras 19 e 20, respectivamente), as células tornam-se muito retraídas. Com 48 horas de tratamento, as células 8505 continuam sendo de morfologia fibroblastoide nas diferentes concentrações da

microemulsão contendo os carotenoides (Figura 21), exceto nas concentrações de 0,25% e 0,50%; onde as células observam-se retraídas. Um padrão similar acontece com as células 8505 cultivadas na presença de diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides (Figura 22). No que diz respeito às células Vero, pode ser observado que na ausência do tratamento (0%) as células exibem um formato fibroblastoide. Na presença tanto da microemulsão (Figura 23), como do veículo sozinho (Figura 24), elas tornam-se poliédricas, na sua maioria, exceto nas concentrações de 0,25 e 0,50%; onde tornam-se muito retraídas (Figuras 23 e 24, respectivamente). Com 48 horas de tratamento, as células Vero sofreram uma retração mais intensa, podendo ser observadas alterações na morfologia ainda nas menores concentrações (0,05%); tanto da microemulsão, quanto do veículo sem os carotenoides (dados não mostrados).

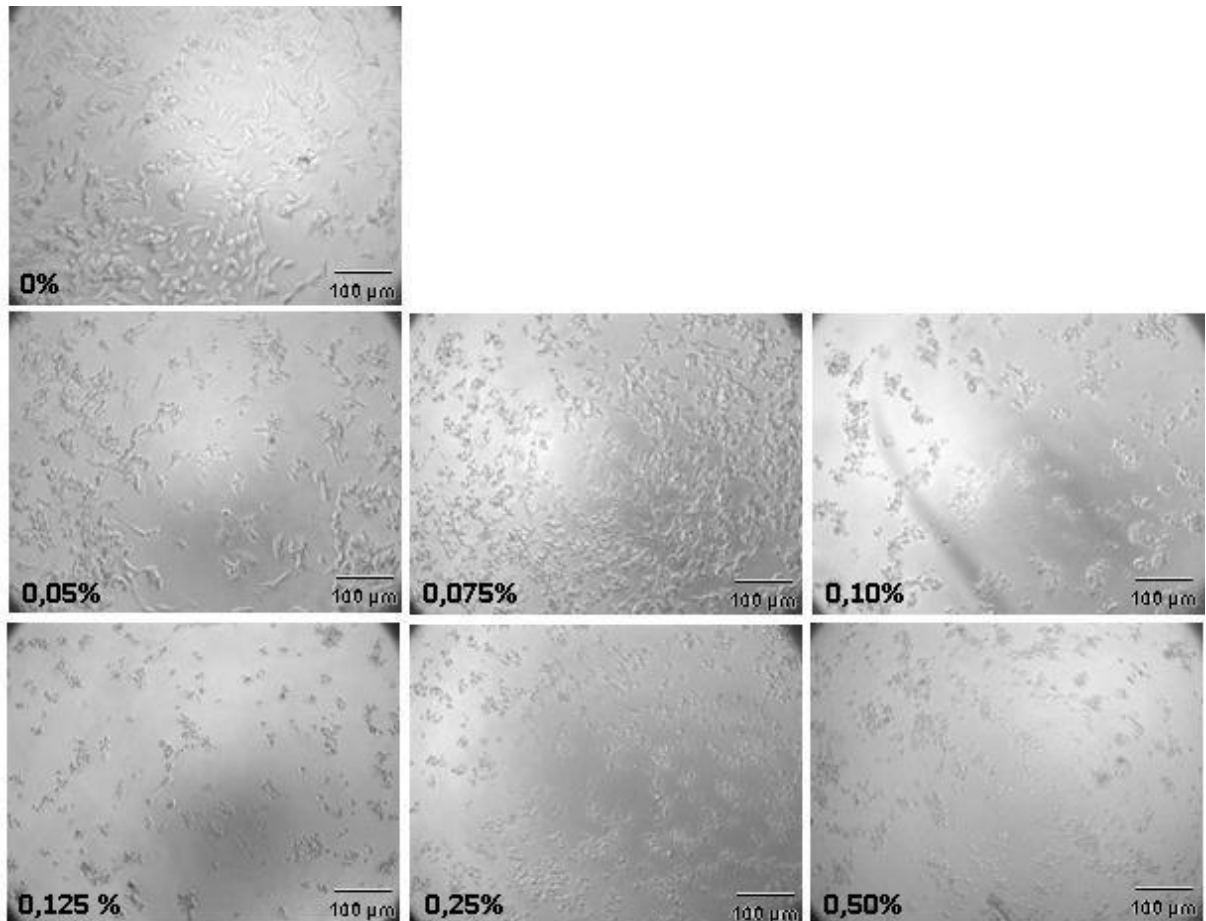


Figura15. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células SH-SY5Y tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da microemulsão enriquecida com os carotenoides. As células SH-SY5Y foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi retirado e as células foram tratadas por 24h com diferentes concentrações (0%,0,05%, 0,075%, 0,10%, 0,125%, 0,25% e 0,50%) da microemulsão enriquecida com β -caroteno e licopeno diluída em meio de cultura novo. Na ausência do tratamento (0%), as células são de morfologia estrelada ou fusiforme; com curtos prolongamentos projetando-se do corpo celular. Essa morfologia se manteve nas concentrações de 0,05 e 0,075%. A partir da concentração de 0,10%, houve uma mudança na morfologia celular, observando-se arredondada se de menor tamanho.

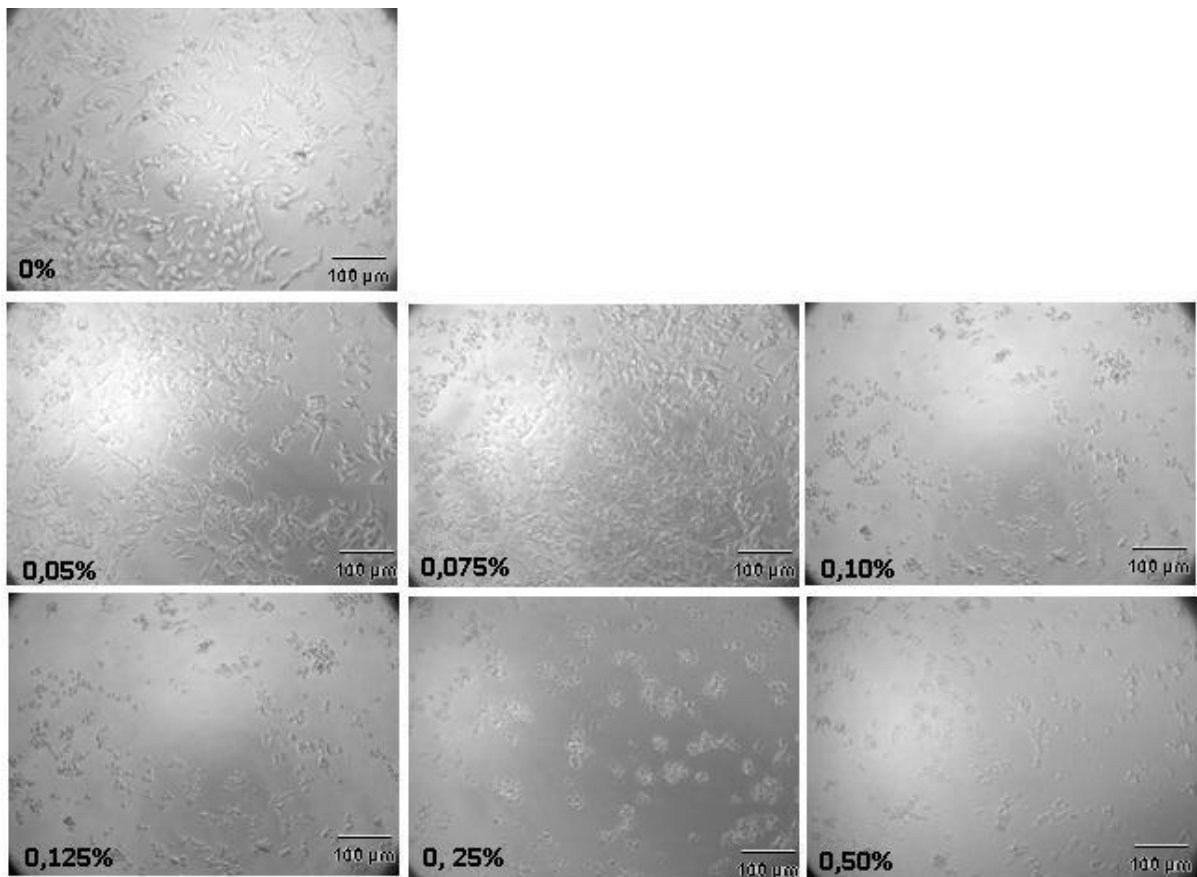


Figura16. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células SH-SY5Y tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides. As células SH-SY5Y foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi retirado e as células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações (0%, 0,05%, 0,075%, 0,10%, 0,125%,0,25% e 0,50%) do veículo diluído em meio de cultura novo. Como nas células tratadas com a microemulsão contendo os carotenoides, verificou-se uma mudança na morfologia celular a partir da concentração de 0,10% do veículo; onde as células se observam retraídas, sendo mais acentuada nas concentrações mais altas.

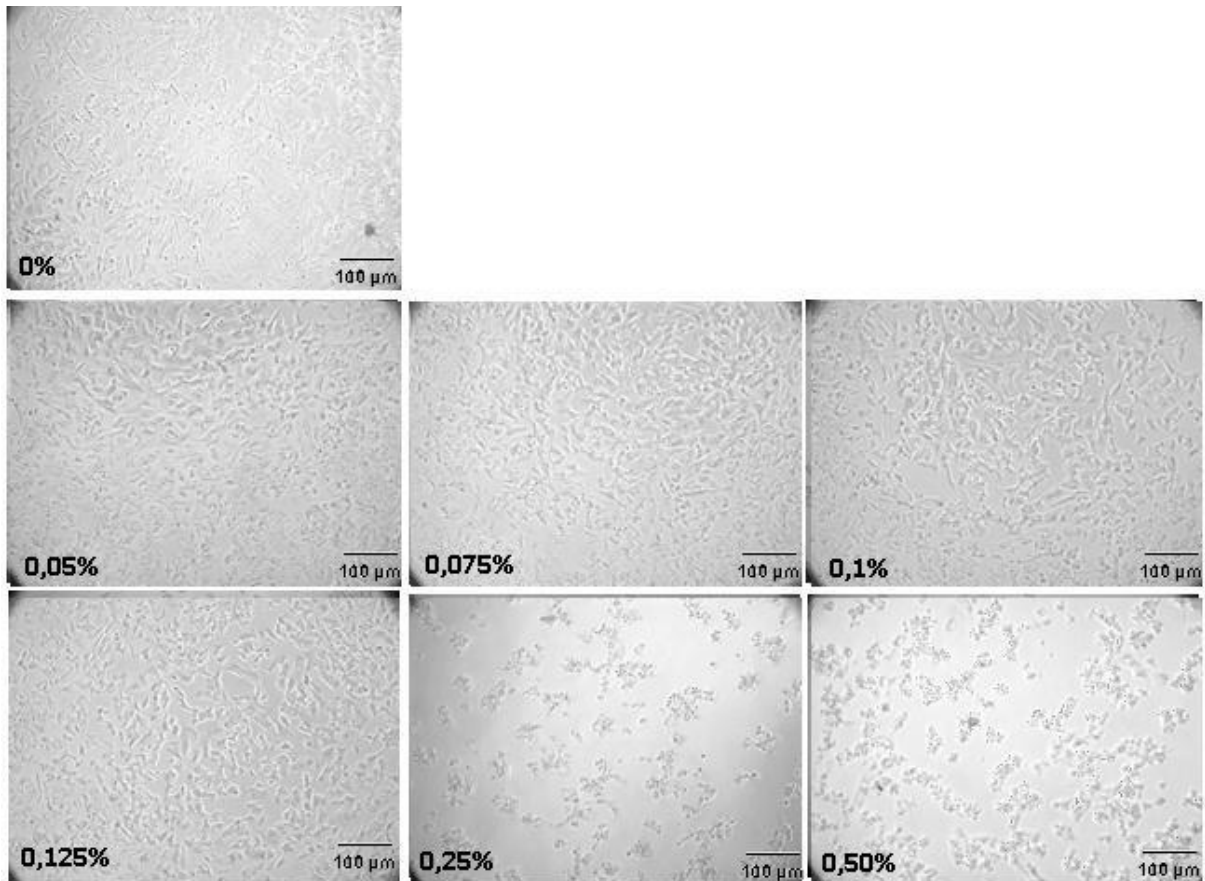


Figura17. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células SH-SY5Y tratadas por 48 horas com diferentes concentrações da microemulsão enriquecida com os carotenoides. As células SH-SY5Y foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi trocado e as células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações (0%,0,05%, 0,075%,0,10%,0,125%,0,25% e 0,50%) da microemulsão veiculando o β -caroteno e o licopeno diluída em meio novo. Na ausência do tratamento (0%), as células exibiram sua típica morfologia estrelada e algumas células fusiformes, com curtos prolongamentos projetando-se do corpo celular. Essa características e manteve nas concentrações de 0,05%, 0,075% e 0,125%. A partir da concentração de 0,25%,houve uma alteração da morfologia celular, ficando retraídas, e com uma diminuição da densidade celular.

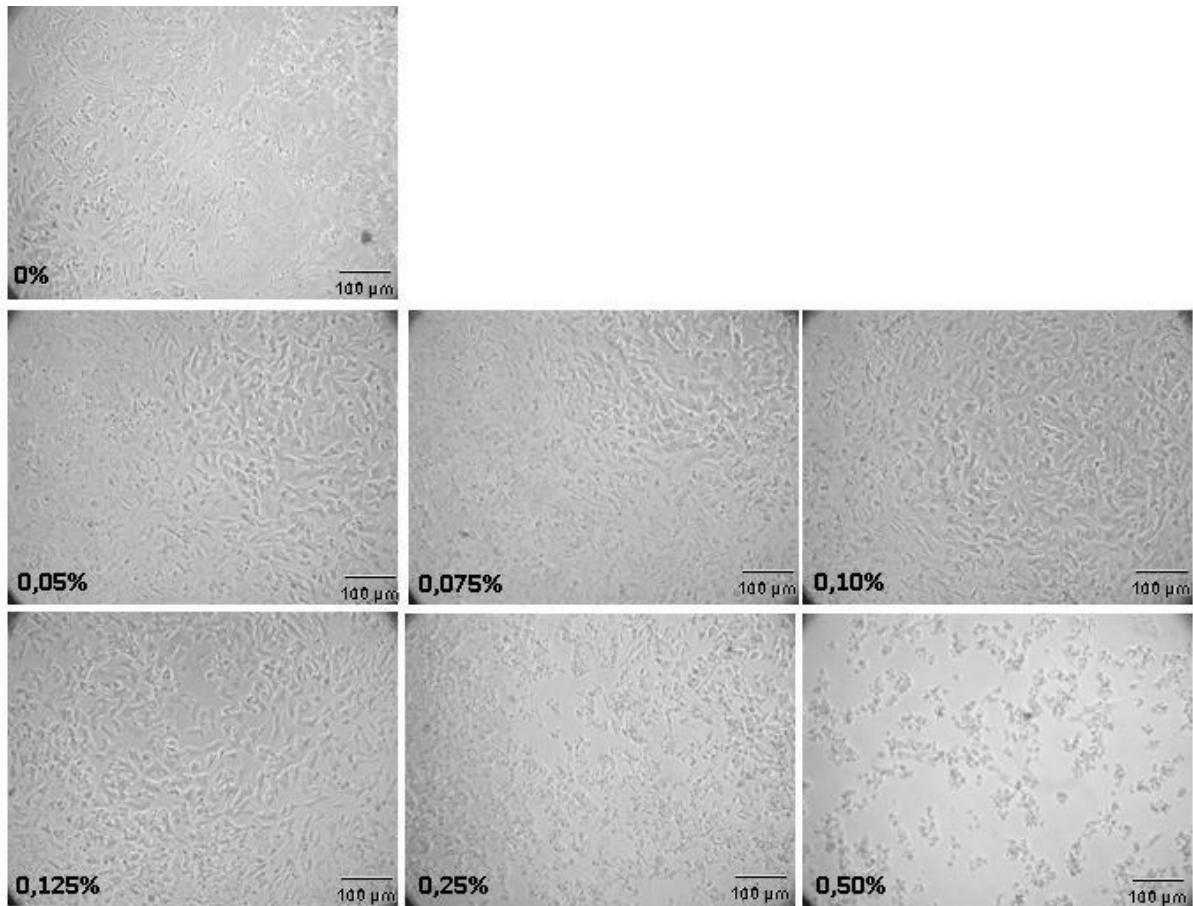


Figura18. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células SH-SY5Y tratadas por 48 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides. As células SH-SY5Y foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi trocado e as células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações (0%,0,05%,0,075%, 0,10%,0,125%,0,25% e 0,50%) do veículo sem o β -caroteno e o licopeno diluído em meio de cultura novo. Nesta condição de cultura, as alterações da morfologia surgem a partir da concentração de 0,25%, com as células ficando retraídas e com uma diminuição na densidade celular.

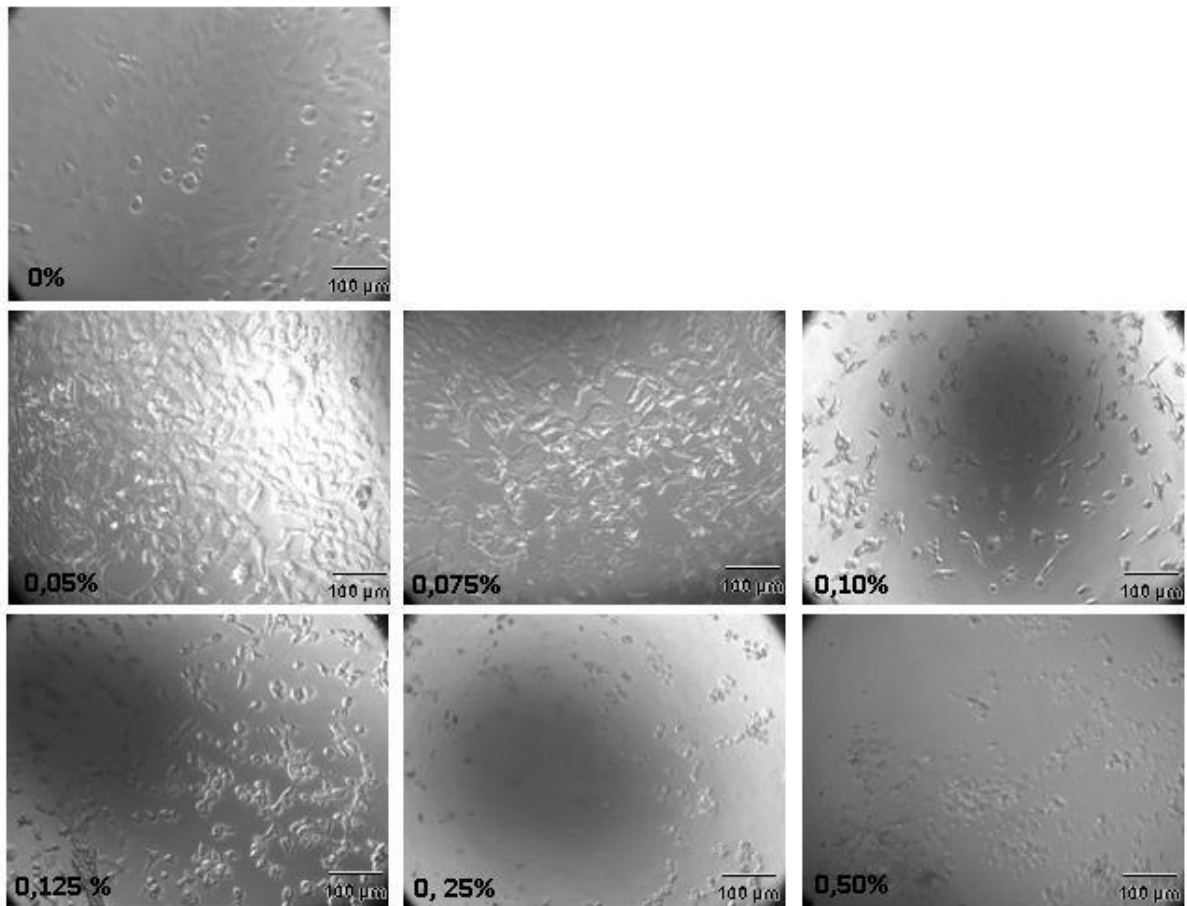


Figura19. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células 8505 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da microemulsão veiculando oscarotenoides. As células 8505 foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi retirado, e as células foram tratadas por 24h com diferentes concentrações (0%,0,05%,0,075%,0,10%,0,125%,0,25% e 0,50%) da microemulsão enriquecida com os carotenoides diluída em meio de cultura novo. Nas concentrações de 0%,0,05%,0,075%, e 0,125%, as células exibem uma morfologia fusiforme, na sua maioria. Já nas concentrações de 0,25% e 0,50%, as células perderam sua característica morfológica fibroblastoide, tornando-se retraídas.

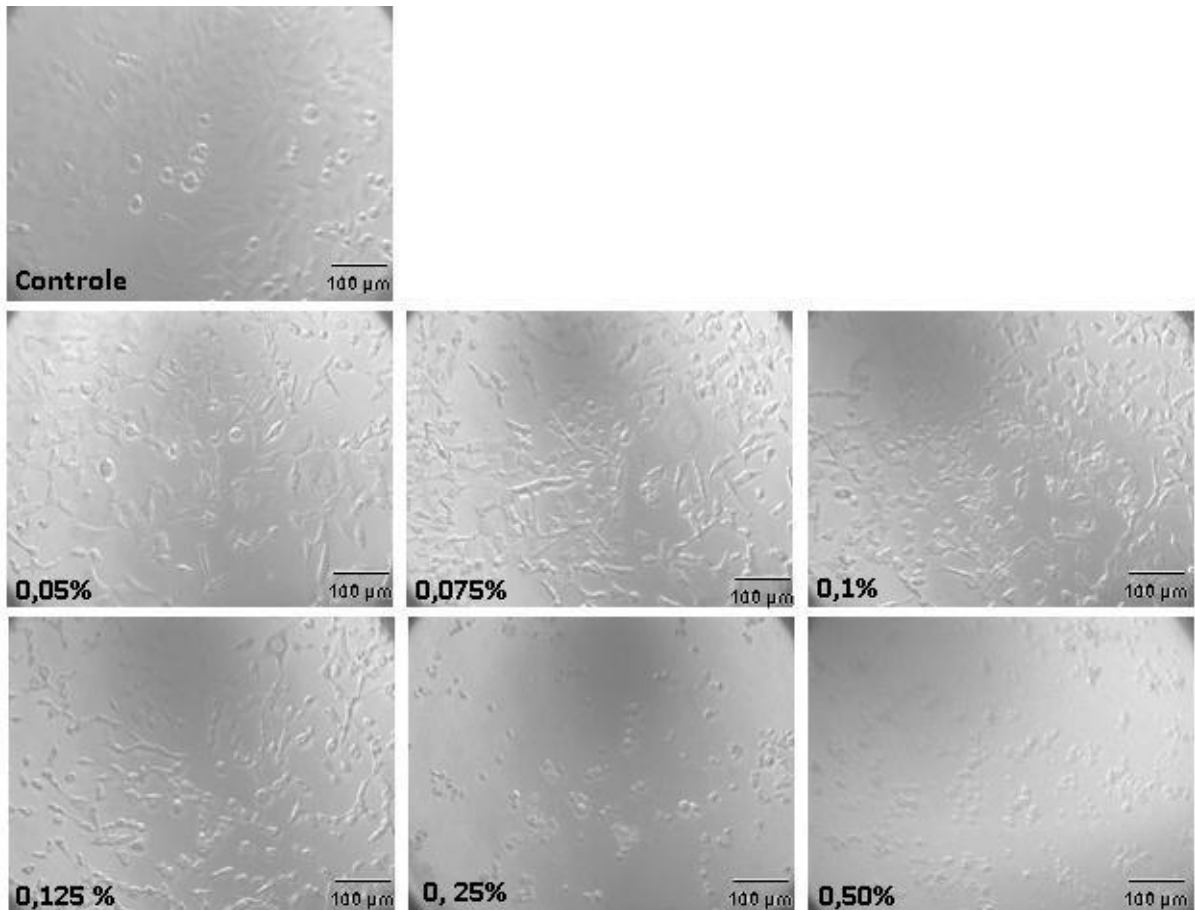


Figura20. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células 8505 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides. As células 8505 foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi retirado, e as células foram tratadas por 24h com diferentes concentrações (0%,0,05%,0,075%,0,10%,0,125%, 0,25% e 0,50%) do veículo sem os carotenoides diluído em meio de cultura novo. Como nas células 8505, tratadas com a microemulsão contendo os carotenoides, pode ser visto que nas concentrações de 0%,0,05%,0,075%, e 0,125% do veículo a maioria das células são fibroblastoide, sofrendo alteração na morfologia nas concentrações de 0,25% e 0,50%, onde se verifica uma mudança expressiva na morfologia celular, tornando-se de morfologia arredondada.

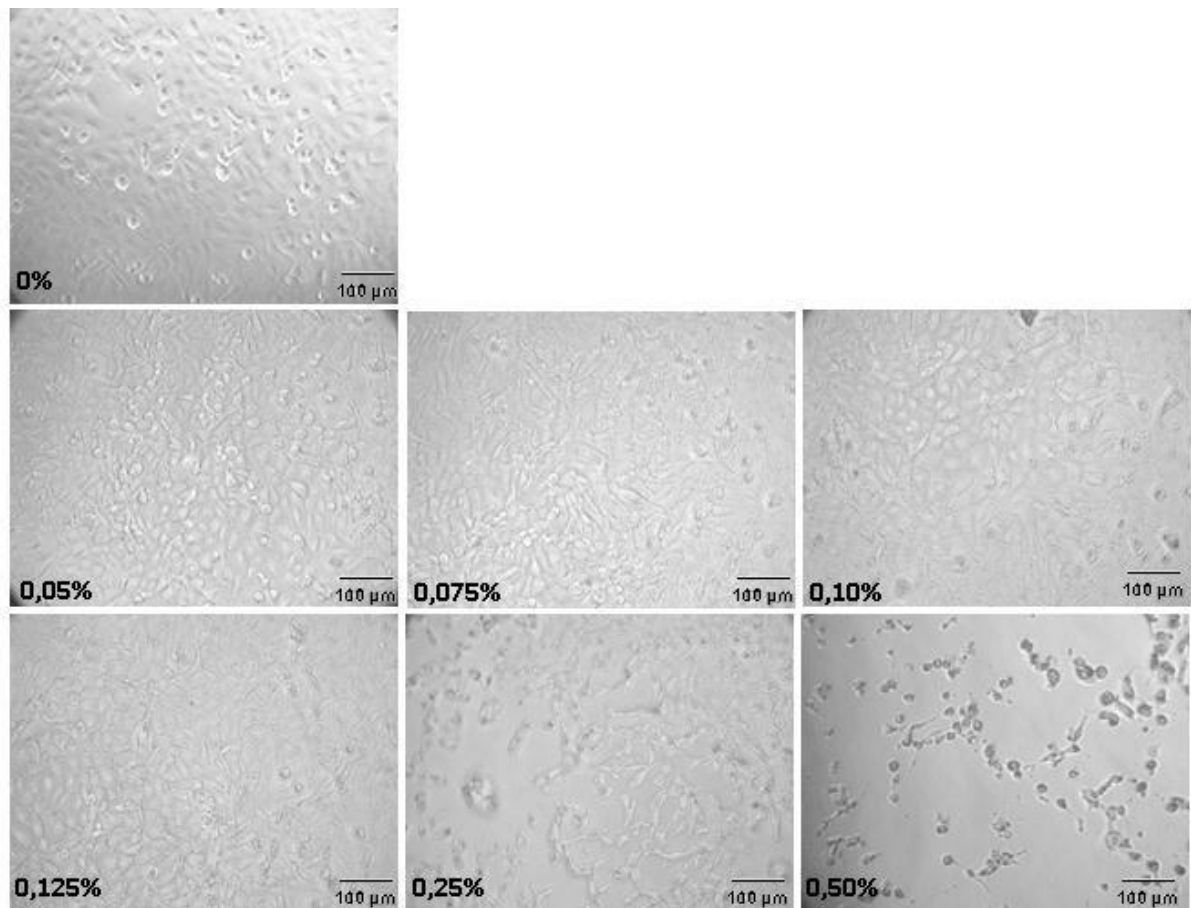


Figura 21. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células 8505 tratadas por 48 horas com diferentes concentrações da microemulsão, contendo os carotenoides. As células 8505 foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi trocado, e as células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações (0%, 0,05%, 0,075%, 0,10%, 0,125%, 0,25% e 0,50%) da microemulsão enriquecida com carotenoides diluída em meio novo. Neste período de tratamento, as células 8505 tratadas com as concentrações de 0%, 0,05%, 0,075%, e 0,125% da nanoemulsão continuam exibindo uma morfologia fibroblastoide, sofrendo alteração na morfologia celular a partir de concentração de 0,25%; onde é possível observar algumas células retraídas. Esta alteração na morfologia celular se torna mais evidente na concentração de 0,50%, onde a maioria das células são arredondadas, verificando-se ademais uma redução na densidade celular.

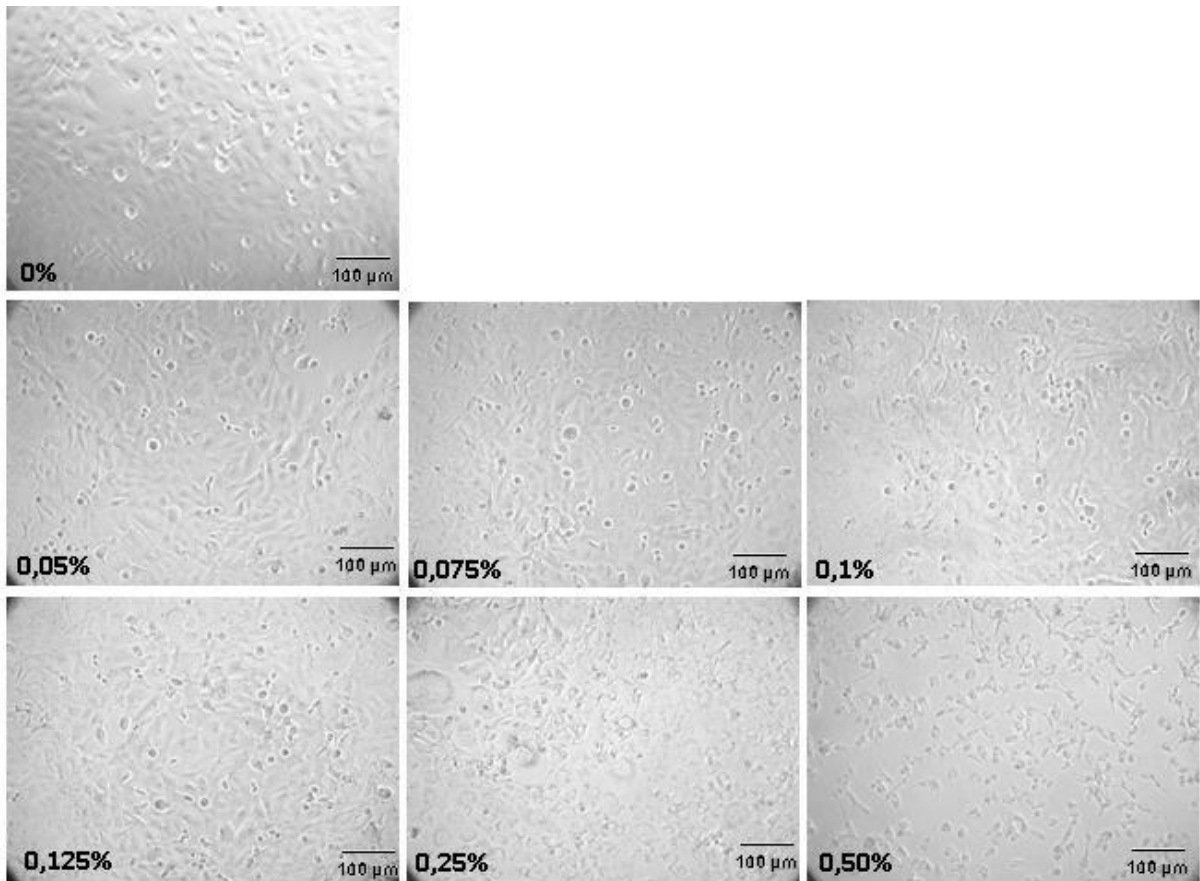


Figura22. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células 8505 tratadas por 48 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides. As células 8505 foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi retirado, e as células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações (0%,0,05%,0,075%,0,10%,0,125%,0,25% e 0,50%) do veículo sem os carotenoides diluído em meio novo. Note que as células exibem um formato fibroblastoide em todas as concentrações do veículo, exceto na concentração de 0,50%, onde a maioria das células observam-se arredondadas.

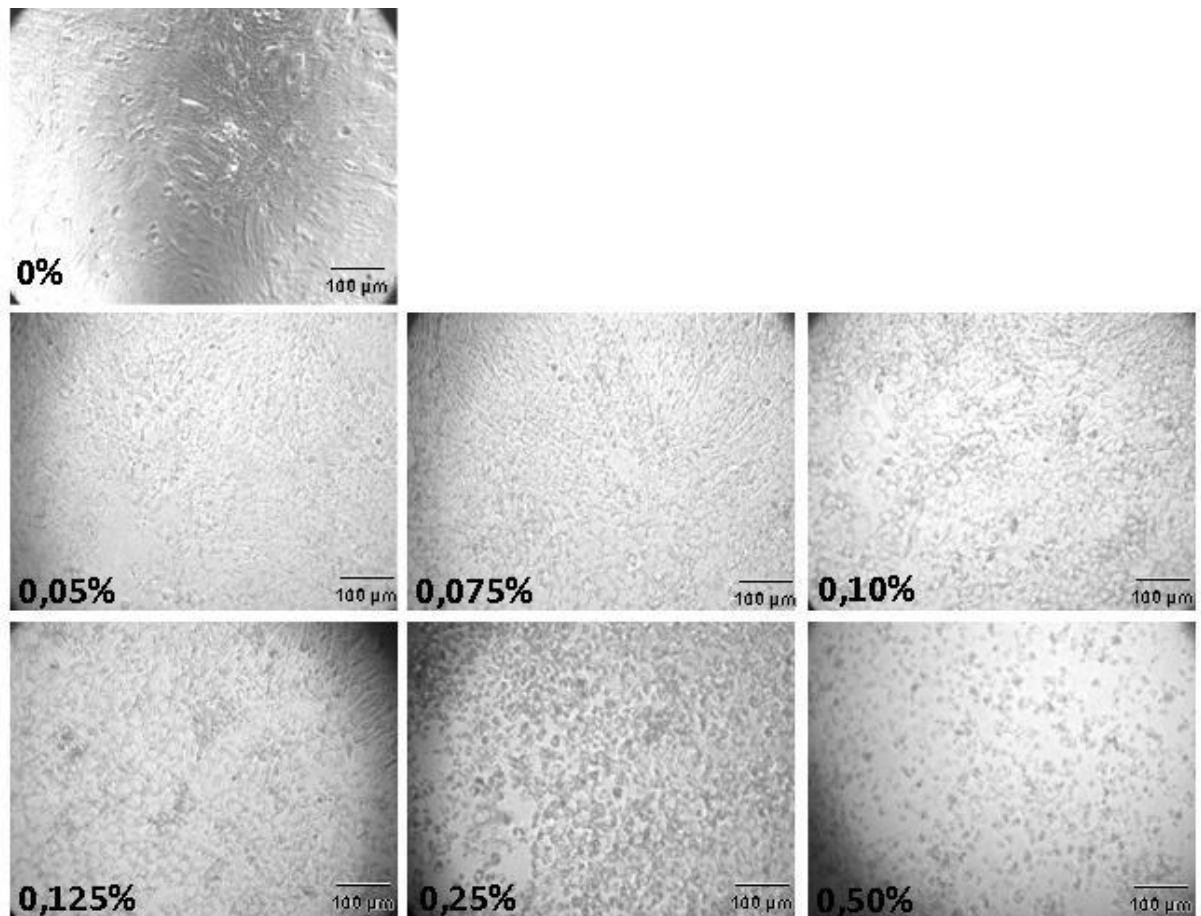


Figura23. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células Vero tratadas por 24horas com diferentes concentrações da microemulsão enriquecida com os carotenoides. As células Vero foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi trocado, para serem tratadas por 24h com diferentes concentrações (0%,0,05%,0,075%, 0,10%,0,125%,0,25% e 0,50%) da microemulsão diluída em meio de cultura novo. Nesta condição de cultura, foi possível observar que a partir de 0,05% da microemulsão há uma alteração na morfologia celular, que normalmente era fibroblastoide, como visto na concentração de 0%. As células se observam agora arredondadas. Essa característica se manteve nas concentrações de 0,075%, 0,10%, e 0,125%. Nas concentrações de 0,25% e 0,50%, as células se observam mais arredondadas e retraídas.

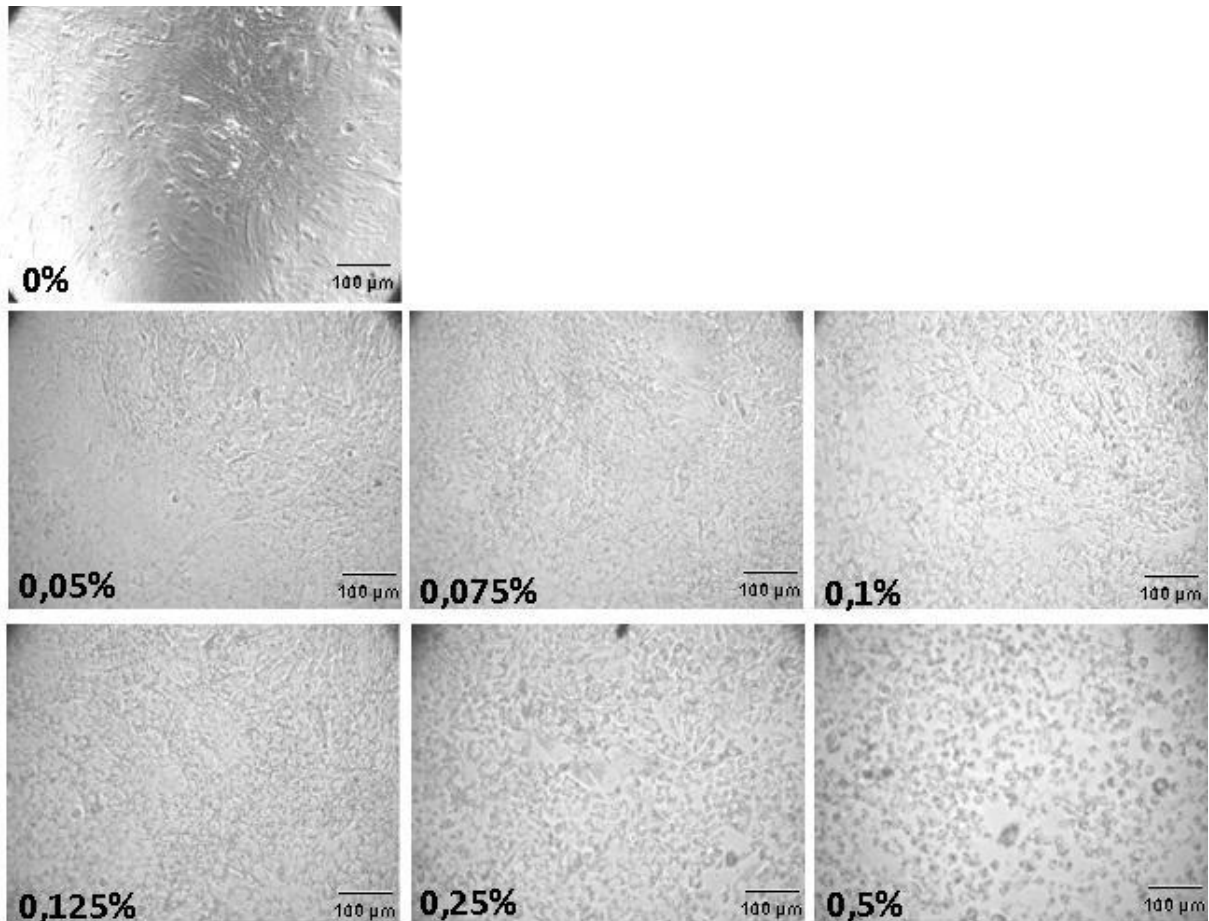


Figura24. Análise por microscopia de contraste de fase da morfologia celular das células Vero tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do veículo, sem os carotenoides. As células Vero foram cultivadas até atingirem a semiconfluência (após de 72 horas em cultura), momento no qual o meio foi trocado, para serem tratadas por 24h com diferentes concentrações (0%, 0,05%, 0,075%, 0,10%, 0,125%, 0,25% e 0,50%) do veículo diluído em meio de cultura novo. Note que, na ausência do tratamento (0%) ,as células exibem uma morfologia fibroblastoide, em sua maioria, e já a partir de 0,05% do veículo, há uma alteração na morfologia, tornando-se arredondadas, característica que se mantém nas concentrações de 0,075%, 0,10%, e 0,125%. Nas concentrações de 0,12%, 0,25% e 0,50%, as células se observam mais arredondadas e retraídas.

A análise de citotoxicidade foi importante para avaliar os possíveis efeitos da microemulsão proposta nesse trabalho sobre a viabilidade celular de três linhagens celulares de origens diferentes. Assim, pode-se constatar que a viabilidade celular das células tratadas com diferentes concentrações da microemulsão carregada com β -caroteno e licopeno, e da formulação sem os carotenoides, ficou significativamente comprometida; sobretudo nas concentrações de 0,25 e 0,50% da microemulsão e do veículo, em ambos os períodos de estudo propostos. Por outro lado, o acompanhamento da morfologia celular por microscopia de contraste de fase das células tratadas nas mesmas condições permitiu verificar que as três linhagens celulares sofreram alterações morfológicas precoces, sugestivas de alterações estruturais, e talvez metabólicas, ainda em menores concentrações da microemulsão e da formulação sem os carotenoides, precedendo as alterações na viabilidade celular evidenciada pelo método colorimétrico do MTT.

Deve-se destacar que está é a primeira microemulsão múltipla de β -caroteno e de licopeno da qual se tem conhecimento na literatura. Com base nas características físico-químicas desses carotenoides, a microemulsão proposta foi elaborada pela técnica de autoemulsificação (conhecida também como emulsificação espontânea), considerada um método de baixa energia, na qual a incorporação dos diferentes componentes (óleos, água, surfactantes e cossolventes) é realizada à temperatura ambiente, sob agitação suave. Dados da literatura indicam que os métodos de baixa energia oferecem baixo impacto sobre os carotenoides, preservando-os da degradação (revisado por Hong *et al.* (2017), e consequentemente conservando suas propriedades antioxidantes. Em contrapartida, com estes métodos, é necessário o uso de uma maior concentração de surfactantes que podem ser tóxicos para células em ensaios *in vitro*, o que explica a diminuição da viabilidade celular observada no presente estudo nas células tratadas com a formulação sem os carotenoides.

Vale ressaltar, ademais, que as alterações na morfologia celular, ainda em baixas concentrações tanto da microemulsão quanto do veículo, revelam a necessidade de utilizar métodos de estudo específicos que permitam identificar alterações celulares mais sutis; como alterações metabólicas e alterações do ciclo celular, além da avaliação das proteínas do citoesqueleto, os quais não foram aplicados aqui por estar fora do escopo da pesquisa. Testes de citotoxicidade *in vitro* de sistemas de entrega autoemulsificantes baseados em

lipídios foram realizados por Bu *et al.* (2018), utilizando o modelo celular Caco-2, uma linhagem de células de tumor de colon humano. Os autores demonstraram que a formulação contendo 30% de surfactante (Tween 80), 35% de monoglicerídeos e 35% de triglicerídeos foi a menos tóxica.

No mesmo estudo foi demonstrado também que a confluência e a maturidade de culturas Caco-2 influenciariam na sensibilidade desse modelo celular à mistura de surfactante-lipídios. Dessa maneira, a cultura de 1 dia pareceu ser mais frágil, mostrando a sensibilidade mais elevada à maioria das misturas de surfactantes e lipídios testadas. Por outro lado, após 5 dias de cultura, as células Caco-2 mostraram tolerância marcada em relação à maioria das formulações, sendo capazes de resistir a baixa concentração (0,1%) e de tolerar a concentração média (0,2%), com lesão celular moderada. Quando as células foram cultivadas em monocamada, por 21-23 dias, em placas de cultura *transwell* para ensaios de permeação, a tolerância às misturas de surfactante/óleo foi melhor do que a das células de 5 dias de cultura.

Assim, ficou demonstrado que a maturidade das células Caco2 em cultura foi um fator determinante para os resultados de citotoxicidade (Bu *et al.*, 2018). No presente estudo, ficou claramente demonstrado que as células SH-SY5Y, 8505 e Vero foram sensíveis aos componentes da formulação, como mostram os resultados da viabilidade e da análise da morfologia celular, quando as células foram tratadas com diferentes concentrações da formulação sem os carotenoides.

Em defesa da nossa pesquisa, deve-se lembrar que o tempo de tratamento proposto foi de 24 e 48 horas, enquanto no trabalho de Bu *et al.* (2019), a viabilidade celular das células Caco-2 foi avaliada apenas após de duas horas de tratamento, com as formulações preparadas utilizando diferentes proporções surfactante/óleo. O tempo maior de exposição das células à microemulsão pode ter sido um fator crucial para a maior toxicidade exibida pelas três linhagens celulares utilizadas e, mais ainda, se considerar o uso de uma alta concentração de surfactantes, de 50%, em contraposição ao estudo por Bu e *et al.*, onde usaram uma concentração de surfactante de 30%. Ainda quando essa maior concentração da mistura de surfactantes tornou a microemulsão altamente estável, não há dúvidas de que essa concentração resultou em toxicidade para os modelos celulares utilizados na pesquisa, suposição que pode ser respaldada pelos dados da literatura (Bu *et al.*, 2017; Ujhelyi *et al.*, 2012). Apesar de constatar esse fato, a estabilidade da microemulsão, em conjunto com os testes físico-químicos, permite sugerir que a microemulsão desenvolvida nopresente

estudo é própria para o uso oral e tópico. Logo, novos experimentos *in vivo* poderiam auxiliar na elucidação dos seus possíveis efeitos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

- No presente trabalho foi elaborado um sistema de entrega de carotenoides que, em meio aquoso, é capaz de gerar gotículas com uma taxa de tamanho em torno de 400-1200nm, sendo caracterizado como uma microemulsão;

- A microemulsão múltipla de carotenoides, produzida pelo método de baixa energia, é do tipo A/O (determinada pelo diagrama de fases e pela medida da condutividade elétrica), altamente estável, e com uma adequada capacidade de encapsulamento de dois carotenoides funcionais: β -caroteno e licopeno;

- As células SH-SY5Y, 8505 e Vero exibiram uma sensibilidade significativa aos componentes da formulação sem os carotenoides, como ficou demonstrado no ensaio de citotoxicidade realizado no presente estudo, devido possivelmente à alta concentração da mistura de surfactantes (25% de Tween 80 e 25% de Span 80), presentes na mesma;

- Os resultados da análise do pH da microemulsão permitem caracterizá-la como um ácido fraco, o que possibilita a sua aplicabilidade para o uso oral ou tópico. Diante desta colocação, recomenda-se a realização de testes em modelo animal que seja mais tolerante à quantidade alta de surfactantes presentes na formulação e que permita determinar os possíveis efeitos da microemulsão carregada com os carotenoides.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A. G.; KUMAR, A.; GIDE, P. S. Self - emulsifying drug delivery system for enhanced solubility and dissolution of glipizide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v 126, p 553-560, 2015.

ANSEL, H. C; POPOVICH, N. G.; LOYD, V. O. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6a ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ASSAR, E.; CASTELLANO VIDALLE, M.; CHOPRA, M.; HAFIZ, S. Lycopene acts through inhibition of I κ B kinase to suppress NF- κ B signaling in human prostate and breast cancer cells. **Tumor Biol**, v, p, 2016.

AUGUSTI, P. R. Efeito dos carotenóides licopeno e astaxantina sobre danos renais induzidos por cloreto de mercúrio. 97f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Toxicologia) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), Rio Grande do Sul, 2007.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmaceuticas** 2a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BADAWI, A.A.; NOUR, S.A.; SAKRAN, W.S.; EL-MANCY, S.M.S. Preparation and evaluation of microemulsion systems containing Salicylic Acid. **AAPS Pharma Sci Tech**, v 10, p 1081-1084, 2009.

BAUERNFEIND, J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. **J. Agric. Food Chem**, v 20, n 3, p 456-473, 1972.

BILBAO-SAÍNZ, C.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; WOOD, D.F.; WILLIAMS, T.G.; MCHUGH, T. H. Nanoemulsions prepared by a Low-Energy emulsification method applied to edible films. **J. Agric. Food Chem**, v, 58, 11932-11938, 2010,

BOGENMANN, E.A metastatic neuroblastoma model in SCID mice. **Int J Cancer**, v 67, p 379-385, 1996.

BÖHM, F.; TINKLER, J. H.; TRUSCOTT, T. G. Carotenoids protect against cellmembrane damage by the nitrogen dioxide radical. **Nat Med**, v 2, p 98-99, 1995.

BOILEAU, T. W.; BOILEAU, A. C.; ERDMAN, J. W. JR. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. **Exp Biol Med** (Maywood), v 227, p 914-919, 2002.

BORBA, C.; TAVARES, M.; DORA, C.; BURKET, J. Nanoemulsões de B-caroteno e óleos vegetais: estabilidade física durante o armazenamento. **Bioprocess Engineering Laboratory, School of Chemistry and Food**, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Brazil, 2017.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v 280, p 241-251, 2004.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. EDS.; BIRKHÄUSER VERLAG. UV/visible spectroscopy in carotenoids. **Spectroscopy**, v 1b, p 13-62, 1995.

BU, P.; JI, Y.; NARAYANAN, S.; DALRYMPLE, D.; CHENG, X.; SERAJUDDIN, ABU. Assessment of cell viability and permeation enhancement in presence of lipid-based self-emulsifying drug delivery systems using Caco-2 cell model: Polysorbate 80 as the surfactant. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 99, p 350-360, 2016.

BUTNARIU, M. Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Product. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v 6, p 2789-2795, 2016.

CHASSENIEUX, C.; NICOLAI, T.; BENYAHIA, L. Rheology of associative polymer solutions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v 16, n 1, p 18-26, 2011.

CHEN, H. Y.; YUEH, T. C.; CHEN, Y. C.; HUANG, C. H.; YANG, C. M.; HU, M. L. Antimetastatic effects of α -carotene and possible mechanisms of action in human hepatocarcinoma SK-Hep-1 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 61, n 43, p 10368-10376, 2013.

CHEN, Y. J.; INBARAJ, B. S.; PU, Y. S.; CHEN, B. H. Development of lycopene micelle and lycopene chylomicron and a comparison of bioavailability. **Nanotechnology**, v 25, 155102, 2014.

CONSTANTINIDES, P. P. Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects. **Pharmaceutical Research**, v 12, n 11, p 1561-1572, 1995.

DAHAN, A., HOFFMAN, A. enhanced gastrointestinal absorption of lipophilic drugs. In: Touitou, E., Barry, B. (Eds.), **Enhancement in Drug Delivery**. CRC Press, USA, v 6 p 111, 2011.

DAMASCENO, B. P. G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L.L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v 32, p 9-18, 2011.

DANIELSSON I, LINDMAN B. The definition of microemulsion. **Colloids Surf**, v 3, p 391-395, 1981.

DE ABREU, L. C. L.; DE SOUZA FURTADO, P.; DA SILVA HONORIO, T.; HUDSON HOSSY, B.; DE PÁDULA, M.; FRANCIELLE SOUZA DOMINGOS, T.; MENDES CABRAL, L. A synergistic nanoformulation of babassu and copaiba oils as natural alternative for prevention of benign prostatic hyperplasia. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v 47, p 167–175, 2018.

DONHOWE, E. G.; KONG, F. Beta-carotene: digestion, microencapsulation, and in vitro bioavailability. **Food and Bioprocess Technology**, v 7, n 2, p 338-354, 2014

ELIASSEN, A. H.; HENDRICKSON, S. J.; BRINTON, L. A.; BURING, J. E.; CAMPOS, H.; DAI, Q.; DORGAN, J. F.; FRANKE, A. A.; GAO, Y. T.; GOODMAN, M. T.; HALLMANS, G.; HELZLSOUER, K. J.; HOFFMAN-BOLTON, J, HULTÉN K, SESSO HD, SOWELL AL, TAMIMI RM, TONIOLO, P.; WILKENS, L. R.; WINKVIST, A.;ZELENIUCH-JACQUOTTE,A.; ZHENG, W.; HANKINSON, S. E. Circulating carotenoids and risk of breast cancer: pooled analysis of eight prospective studies. **J Natl Cancer Inst**, v 104, p 1905-1916, 2012.

ESTERBAUER, H.; WAEG, G.; PUHL, H.; DIEBER-ROTHENEDER, M.; TATZBER, F. Inhibition of LDL oxidation by antioxidants. **Exs**, v 62, p 145-57,1992.

Farmacopéia Brasileira. 4a Ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FANUN, M. Microemulsions delivery systems **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v 17, n 5, p 306-313, 2012.

FAST, J., MECOZZI, S. nanoemulsions for intravenous drug delivery. In: de Villiers, M.M., Aramwit, P., Kwon, G.S. (Eds.), *Nanotechnology in Drug Delivery*, vol. X. **American Association of Pharmaceutical Scientists Press**, USA, v 15 p 461, 2009.

FENG, C. H.; LUO, T.; ZHANG, S.; LIU, K.; ZHANG, Y.; LUO, Y.; GE, P. Lycopene protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against hydrogen peroxide-induced death via inhibition of oxidative stress and mitochondria-associated apoptotic pathways. **Molecular Medicine Reports**, v 13, p 4205-4214, 2016.

FENG, X.; YU, W.; LIANG, R.; SHI, C.; ZHAO, Z.; GUO, J. Receptor-interacting protein 140 overexpression promotes neuro-2a neuronal differentiation by ERK1/2 signaling. **Chin Med J (Engl)**, v 128, p 119-124, 2015.

FILLMORE, H. L.; VAN METER, T. E.; BROADDUS, W. C. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. **J Neuro Oncol**, v 53, p 187–202, 2001.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M. Carotenóides: cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n 13, p 40-45, 2000.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M.C.C.; JUNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v 41, n 3, p 301-313, 2005.

FOOTE, C. S.; CHANG, Y. C.; DENNY, R. W. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. **Journal of the American Chemical Society**, v 92, p 5216-5218, 1970.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v 23, p 558-566, 2004.

GANTA, S., DESHPANDE, D., KORDE, A., AMIJI, M. A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug, delivery barriers. **Molecular Membrane Biology**, v 27, p 260-273, 2010

GÄRTNER. C.; STAHL, W.; SIES, H. Lycopene is more bioavailable from tomatopaste than from fresh tomatoes. **Am J Clin Nutr**, v 66, p 116-122, 1997.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. **J Natl Cancer Inst**, v 91, p 317-331, 1999.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **J Control Release**, v 146, p 276-290, 2010.

GUAN, Y.; WU, J.; ZHONG, Q. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene. **Food Chem**, v 194, p 787–796, 2016.

Gullapalli, R.P. Soft gelatin capsules. **J. Pharm Sci** v 99, p 4107, 2010

GUIMARÃES, G.P. Desenvolvimento e Caracterização da microemulsão antifúngica contendo derivado do tiofeno. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, 2013.

GUPTA S.; MOULIK S.P. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Science**, v 97, n 1, p 22-45, 2008.

GUPTA, S. S; & GHOSH, M. In vitro study of anti-oxidative effects of β -carotene and α - carotene and α - lipoic acid for nanoencapsulated lipids. **LWT Food Sci. Technol**, v 49, p 131-138, 2012.

HA, T. V. A.; KIM, S.; CHOI, Y.; KWAK, H-S.; SUNG JE LEE, S. J.; WEN, J.; OEY, I.; KO, S. Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. **Food Chemistry**, v 178, p 115–121, 2015.

HAZUKA, M. B.; EDWARDS-PRASAD, J.; NEWMAN, F.; KINZIE, J. J.; PRASAD, K. N. Beta-carotene induces morphological differentiation and decreases adenylate

- cyclase activity in melanoma cells in culture. **J Am Coll Nutr.**, v 9, p 143–149, 1990.
- HOAR TP, SCHULMAN JH. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. **Nature**, v 152, p 102-105, 1943
- HO, N. H.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Utilization of Microemulsions from *Rhinacanthus nasutus (L.) Kurz* to Improve Carotenoid Bioavailability. **Sci Rep**, v 6, n 25426, 2016.
- HSU, H. J.; HUANG, R. F.; KAO, T. H.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Preparation of carotenoid extracts and nanoemulsions from *Lycium barbarum L.* and their effects on growth of HT-29 colon cancer cells. **Nanotechnology**, v 28, n 135103, 2017.
- HUANG, R. F.S.; WEI, Y. J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Inhibition of colon cancer cell growth by nanoemulsion carrying gold nanoparticles and lycopene. **International Journal of Nanomedicine**, v 10, p 2823-2846, 2015.
- I-CHUNG, T. Rheological behavior of poloxamer 407 aqueous solutions during sol-gel and dehydration processes **International Journal of Pharmaceutics**, v 107, n 2, p 85-90, 1994
- IVANOV, N. I.; COWELL, S. P.; BROWN, P.; RENNIE, P. S.; GUNS, E. S.; COX, M. E. Lycopene differentially induces quiescence and apoptosis in androgen-responsive and -independent prostate cancer cell lines. **Clin Nutr**, v 26, p 252-263, 2007.
- JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech**, v 2, p 123–127, 2015.
- JAMBHEKAR, S.S., BREEN, P.J. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. **Drug Discov.** Today 18, 1173, 2013.
- KAMILA, M.M.; MONDAL, N.; GUPTA, B.K.; GOSHI, L.K. Preparation, characterization and in vitro evaluation of Sunflower oil-Tween 80- Glycerol based microemulsion formulation of a BCS class-II drug. **Latin American Journal of Pharmacy**, v 28, p 621-627, 2009.
- KAWABATA, W.; YONEZAWA, S.; HAYASHI, K. Rear-Side Localization of the Centrosome in Migrating Neuroblastoma Neuro-2a Cells and Its Roles in Process

Elongation. **Dev Neurosci**, v 34, p 20-29, 2012.

KIM, M. S.; YU, J. M.; KIM, H. J.; KIM, H. B.; KIM, S. T.; JANG, S. K.; CHOI, Y. W.; LEE, D. I.; JOO, S. S. Ginsenoside Re and Rd enhance the expression of cholinergic markers and neuronal differentiation in Neuro-2a cells. **Biol Pharm Bull**, v 37, p 826-833, 2014.

KIM, S. O.; HA, T. V. A.; CHOI, Y. J.; KO, S. Optimization of homogenization–evaporation process for lycopene nanoemulsion production and its beverage applications. **Journal of Food Science**, v 79, p 1604-1610, 2014.

KLEBE, R. J.; RUDDLE, F. H. Cell Culture Analysis of a differentiating stem cell system. **J. Cell Biol**, v 43, n 69, 1969.

KOTAKE-NARA, E.; KUSHIRO, M.; ZHANG, H.; SUGAWARA, T.; MIYASHITA, K.; NAGAO, A. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. **J Nutr**, v 131, p 3303-3306, 2001.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v 66, p 1003-1010, 1994.

LAWRENCE, M. J.; RESS, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v 45, p 89 – 121, 2000.

LAURENCE, M.J., WARISNOICHAROEN, W. recent advances in microemulsions as drug delivery vehicles. In: Torchillin, V. (Ed.), *Nanoparticulates as Drug Carriers*. **Imperial College Press**, UK, v 7, 2006

LI, D.; CHEN, L.; ZHAO, W.; HAO, J.; AN, R. MicroRNA-let-7f-1 is induced by lycopene and inhibits cell proliferation and triggers apoptosis in prostate cancer. **Molecular Medicine Reports**, v 3, p 2708-2714, 2016.

LI, G.; FAN, Y.; LI, Y. WANG, X. LI, Y.; LI, M. In vitro and in vivo evaluation of simple microemulsion formulation for propofol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 425, n. 1-2, p. 53-61, 2012.

LIANG, R.; SHOEMAKER, C. F.; YANG, X.; ZHONG, F.; HUANG, Q. Stability and bioaccessibility of b-carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches. **J Agric Food Chem**, v 61, p 1249–1257, 2013.

LIU, Y. Z.; YANG, C. H.; CHEN, J. Y.; LIAO, J. W.; H.U, M. Alpha-carotene inhibits metastasis in Lewis lung carcinoma *in vitro* and suppresses lung metastasis and tumor growth in combination with taxol in tumor xenografted C57BL/6 mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v 26, p 607-615, 2015.

LUO, X.; ZHOU, Y.; BAI, L.; LIU, F.; DENG, D.; MCCLEMENS, J. Fabrication of β -carotene nanoemulsion-based delivery systems using dual-channel microfluidization: physical and chemical stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v 490, p

328-335, 2016.

MARTÍ, R., ROSELLÓ, S., CEBOLLA-CORNEJO, J. Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. **Cancers (Basel)**, v 8, p 1-28, 2016.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v 51, n 4, p 285-330, 2011.

McClements, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter* v 8, p 1719, 2012.

MCCLEMENTS, D.J. Nanoscale nutrient delivery systems for food applications: improving bioactive dispersibility, stability, and bioavailability. **J. Food Sci.** v 80, p 1602, 2015.

MONTEIRO, LIDIANE M. Preparo e avaliação de sistemas microemulsionados Biologicamente ativos de dapsona. Dissertação. Faculdade de Farmácia. Rio de Janeiro. UFRJ. p 124, 2011

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. Biodisponibilidade de licopeno. **Rev Nutr**, v 19, n 2, 2006.

MURAKOSHI, M.; TAKAYASU, J.; KIMURA, O.; KOHMURA, E.; NISHINO, H.; IWASHIMA, A. Inhibitory effects of alpha-carotene on proliferation of the human neuroblastoma cell line GOTO. **J Natl Cancer Inst**, v 81, p 1649–1652, 1989.

NANDI, I.; BARI.M.; JOSH, I. Study of isopropyl myristate microemulsion systems containing cyclodextrins to improve the solubility of two model hydrophobic drug. **AAPS Pharma SciTech**, v 4, p 1-9, 2003.

NAYAK, A. K.; DHARA, A. K. Nanotechnology in drug delivery applications: A review. **Arch. Apl. Sci.Res.** V 2, p 284-293, 2010.

NGAN, C.L., BASRI, M., TRIPATHY, M., KARJIBAN, R.A., ABDUL-MALEK, E. Physicochemical characterization and thermodynamic studies of nanoemulsion-Based transdermal delivery system for fullerene. **Sci. World J.** v 1, 2014

NIRANJANA, R.; GAYATHRI, R.; NIMIS, H.; MOL, S.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T.; MIYASHITA, K. Carotenoids modulate the hallmarks of cancer cells. **Journal of Functional Foods**, v 18, p 968-985, 2015.

NOORNO, A. O.; ZHENG, H.; LOPES, L. B.; RESTREPO, B. J.; KANNAN, K.; REED, R. Oral microemulsions of paclitaxel: In situ and pharmacokinetic studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v 71, p 310-317, 2009.

NORNOO, A. O.; OSBORNE, D. W.; CHOW, D. S. L. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel I: Formulation, citotoxicity and hemolysis. **International**

Journal of Pharmaceutics, v 349, p 108-116, 2007.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; OMS-OLIU, G.; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components - Mini Review Article **Frontiers in Nutrition- Nutrition and food Science Technology**, v 1, p 1-4, 2014.

OLSON J. A.; KRINSKY, N. I. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. **FASEB Journal**, v 9, p 1547-1550, 1995.

OLSON, J. A. Absorption, transport and metabolism of carotenoids in humans. **Pure and Applied Chemistry**, v 66, p 1011-1016, 1994.

OLSON, P. P. Carotenoids and human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v 49, p 7-11, 1999.

PADULA, C.; NICOLI, S.; SANTI, P. Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v 372, p 12-16, 2009.

PALOZZA, P.; SIMONE, R.; CATALANO, A.; MONEGO, G.; BARINI, A.; MELE, M. C.; PARRONE, N.; TROMBINO, S.; PICCI, N.; RANELLETTI, F. O. Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: inhibition of NF- κ B nuclear binding and increase in PPAR γ expression. **J Nutr Biochem**, v 22, p 259-268, 2011.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. **FASEB Journal**, v 10, p 542-551, 1996.

PEPE, D., PHELPSH, J., LEWIS, K., DUJACK, J., SCARLETT, K., JAHAN, S., BONNIER, E., MILIC- PASETTO, T., HASS, M., LOPES, L. Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. **Int. J. Pharm.** V 434, p 420, 2012

QIAN, C. H.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, v 135, p 1440 –1447, 2012.

RAJPOOT, P.; PATHAK, K.; BALI, V. Therapeutic applications of nanoemulsion based drug delivery systems: a review of patents in last two decades. **Recent Pat Drug Deliv Formul**, v 5, n 2, p 163-172, 2011.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Flavor Oil Microemulsions, Nanoemulsions and Emulsions: Influence of Composition and Preparation Method. **J. Agric. Food Chem**, v 59, p 5026–5035, 2011.

RAO, A. V; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacol Res**, v 55, p 207-216, 2007.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in food. Washington, DC: **International Life Sciences Institute Press**, p 64, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. (2004) HARVESTPLUS HANDBOOK FOR CAROTENOID ANALYSIS. WASHINGTON, DC AND CALI: IFPRI and CIAT, p 58, Harvest Plus Technical Monograph. Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/sites/default/files/tech02.pdf>>. Acessado em: 30 de abril de 2019.

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

ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; NETO. A.A.D.; MACIEL. M.A.M. Microemulsões; uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Rev. Univ. Ser. Ci. Exatas e da Terra**, v 26, n 1-2, p 45-66, 2007.

SAINI, R. K.; NILE, S. H; PARK, S.W. Carotenoids from Fruits and Vegetables: Chemistry, Analysis, Occurrence, Bioavailability and Biological Activities. **Food Research International**, v 76, n 3, 735-750, 2015.

SAKAGAMI, Y.; SUMIYA, Y.; KOMEMUSHI, S. Research on search of the carotenoid-producing microorganisms in marine area and the improvement of production ratio. **J Dent Res**, v 130, p 1445-1451, 2010.

SALVIA-TRUJILLO, L.; QIAN, C.; MARTÍN-BELLOSO, O.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of particle size on lipid digestion and b-carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. **FoodChem**, v 141, p 1472–1480, 2013.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v 17, p 227-236, 2004.

SHARMA, S. K.; MULVANEY, S. J.; RIZVI, S. S. H. Food processing engineering: [theory and laboratory experiments. **United States of America: Wiley-Interscience**, p 348, 2000.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; SINGH, Y., MEHER, J. G., RAVAL, K., KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v 252, p 28-49, 2017.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. Nano-emulsions. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci**, v 34, p 102–110, 2005.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, 2ª Ed. Freeman Press, East Lansing, Michigan State, USA. p 418, 1996.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v 17, p 3202-3242, 2012.

THAMAKET, P.; RAVIYAN, P. Preparation and physical properties of carotenoids encapsulated in chitosan cross-linked tripolyphosphate nanoparticles. **Food and Applied Bioscience**, v3, p 69-84, 2015.

TINKLER, J. H.; BÖHM, F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. Dietary carotenoids protect human cells from damage. **J Photochem Photobiol B**, v 3, p 283-285, 1994.

Tong, K., Zhao, C., Sun, Z., Sun, D. Formation of concentrated nanoemulsion by W/O microemulsion dilution method: biodiesel, tween 80, and water system. **ACS Sustain. Chem. Eng.** v 3, p 3299, 2015

TREMBLAY, R. G.; SIKORSKA, M.; SANDHU, J. K.; LANTHIER, P.; RIBECCO-LUTKIEWICZ, M.; BANI-YAGHOUB, M.; TSIPER, M. V.; YURCHENCO, P. Laminin assembles into separate basement membrane and fibrillar matrices in Schwann cells. **J. Cell Sci**, v 115, p 1005-1015, 2002.

TSAI, Y. H.; HSIEH, Y. H.; HUANG, Y. B.; CHANG, J. S.; HUANG, C. T.; WU, P. C. Microemulsions for intravesical delivery of gemcitabine. **Chem. Pharm. Bull**, v 11, p 1461-1465, 2010.

TUCKER, K. L.; CHEN, H.; VOGEL, S.; WILSON, P. W.; SCHAEFER, E. J.; LAMMI-KEEFE, C. J. Carotenoid intakes, assessed by dietary questionnaire, are associated with plasma carotenoid concentrations in an elderly population. **J. Nutr**, v 129, n 2, p 428-445, 1999.

UJHELYI, Z.; FENYVESI, F.; VÁRADI, J.; FEHÉR, P.; KISS, T.; VESZELK, S.; DELI, M.; VECSENYÉS, M.; BÁCISKAY, I. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 47, p 564-573, 2012.

UPADHYAYA, K. R.; RADHA, K. S.; MADHYASTHA, H. K. Cell cycle regulation and induction of apoptosis by beta carotene in U937 and HL-60 leukemia cells. **JBiochem Mol Biol**, v 40, p 1009-1015, 2007.

VAN HET HOF, K. H.; DE BOER, B. C.; TIJBURG, L. B.; LUCIUS, B. R.; ZIJP, I.; WEST, C. E.; HAUTVAST, J. G.; WESTSTRATE, J. A. Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. **J Nutr**, v 130, p 1189-1196, 2000.

VAN POPPEL, G.; GOLDBOHM, R. A. Epidemiologic evidence for Beta-carotene and cancer prevention. **Am J Clin Nutr**, v 62, p 1393S-1402S, 1995.

VAN VLIET, T. Absorption of beta-carotene and other carotenoids in humans and animal models. **European Journal of Clinical Nutrition**, v 50, p 32S-37S, 1996.

- VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T. Carotenoids and cardiovascular health. **Am J Clin Nutr**, v 83, p 1265–1271, 2006.
- WANG, L.; LI, X.; ZHANG, G.; DONG, J.; EASTOE, J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. **J Colloid Interface Sci**, v 314, p 230-235, 2007.
- XIA, X.; XU, S.; ZHANG, X. Optimization in the Preparation of Coenzyme Q10 Nanoliposomes. **J. Agric. Food Chem**, v 176, p 6358-6366, 2006.
- YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of B-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, v 41, n 1, p 61-68, 2008.
- YUKUYAMA, M. N.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, T. J. A.; BOU-CHACRA, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics – a review. **International Journal of Cosmetics Science**, v 38, p 13-24, 2016.
- ZHANG, J.; MICHIMIYAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine and caffeine. **International of Pharmaceutics**, v 421, p 34-44, 2011.
- ZIEGLER, R. G. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. **J Nutr**, v 119, p 116–122, 1989.