



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA - CITA



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS A PARTIR DA MANTEIGA DE CUPUAÇU - TEOBROMA GRANDIFLORUM (SHUM) COM APLICAÇÕES NANBIOTECNOLÓGICAS

ANDERSON LUIS RAMOS

RIO BRANCO

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA - CITA



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS A PARTIR DA MANTEIGA DE CUPUAÇU - THEOBROMA GRANDIFLORUM (SHUM) COM APLICAÇÕES NANOBIO TECNOLÓGICAS

ANDERSON LUIS RAMOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre Stricto Sensu em Ciências.

Área de Concentração: Ciência, Inovação e Tecnologia

Orientador _____

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez

Coorientador _____

Prof. Dr. Fernando Sergio Escócio Drummond Viana de Faria

Rio Branco – Acre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA

ANDERSON LUIS RAMOS

*SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS A
PARTIR DA MANTEIGA DE CUPUAÇU - THEOBROMA GRANDIFLORUM (SHUM)
COM APLICAÇÕES NANBIOTECNOLÓGICAS*

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/2016

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez
(Orientador – CCBN/UFAC)

Prof. Dra. (Cristiane de Oliveira Cardoso)
(CCSD/UFAC)

Prof. Dr. (Miguel Gustavo Xavier)
(CCBN/UFAC)

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por sua misericórdia.

À minha amada esposa Karoline por me apoiar nessa empreitada.

Ao meu orientador por sua paciência incentivo.

Ao meu co-orientador, professor Fernando por igual modo me auxiliar e orientar nesta pesquisa.

À colega de Bionorte, Marta, pela valiosa troca de saberes.

Ao colega Jerry pelo auxílio na aquisição de imagens.

Ao ilustre colega e professor Igor Anatoliech Degterev pela paciência de ensinar e auxiliar na interpretação e tratamento dos dados.

Ao colega de Bionorte, Franciso Panero, pelo auxílio com os gráficos.

A Professora Clarisse Maia e Joana no auxílio microbiológico.

Ao Professor Sócrates do Egito - UFRN

Aos demais professores e colegas da UFAC, Rede Bionorte e Universidades parceiras.

À CAPES pelo apoio financeiro neste projeto.

RESUMO

O cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* é uma planta típica da região amazônica e do seu fruto são produzidas geleias, licores e doces, entre outros do uso tradicional. Da semente obtemos a manteiga de cupuaçu, uma gordura rica em ácidos graxos e triglicerídeos, e fitoesteróis que proporcionam efeitos benéfico sobre a pele como alta capacidade de hidratação e atividade antioxidante. A manteiga de cupuaçu foi utilizada como matriz lipídica na preparação de nanopartículas lipídicas sólidas – NLS com aplicações nanobiotecnológicas. As NLS de cupuaçu foram obtidas por meio de um planejamento fatorial fracionado 3³, em que os fatores selecionados em seus respectivos níveis mostraram as melhores respostas na obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas. Estas NLS foram caracterizadas por meio *DLS - Dynamic Light Scattering*, potencial zeta e espectroscopia de fluorescência molecular. As nanoemulsões contendo NLS de cupuaçu apresentaram um tamanho mínimo de 129 nm, máximo de 305,4 mn, com média de 214 nm, Potencial Zeta médio de -36,3 mV e um índice de polidispersividade médio de 0,172 considerando estes resultados em resposta de cada fator e seu nível correspondente. O fator **TG** foi que mais influenciou o tamanho das NLS, as NLS de cupuaçu apresentaram fluorescência molecular na faixa espectral de 740 a 760 nanômetros, evidenciado seu uso futuro em pesquisas. Estes resultados foram satisfatórios ao usarmos um bioproduto como a manteiga de cupuaçu na formulação de desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos.

PALAVRAS CHAVE: *Theobroma grandiflorum*, nanopartículas lipídicas sólidas, *DLS*, potencial zeta e, fluorescência.

ABSTRACT

The *Theobroma grandiflorum* cupuassu is a typical plant of the Amazon region; the fruit are produced jellies, liqueurs, sweets and other traditional use. Seed cupuassu butter obtain a fat rich in fatty acids and triglycerides, plus phytosterols that provide beneficial effects on the skin hydration as high capacity and antioxidant activity. The cupuassu butter was used as lipid matrix in the preparation of solid lipid nanoparticles - SLN with nanobiotechnological applications. The cupuassu NLS were obtained through a fractional factorial design 3³, in which the factors selected at their respective levels showed the best responses in obtaining solid lipid nanoparticles. These NLS were characterized by DLS - Dynamic Light Scattering, zeta potential, and molecular fluorescence spectroscopy. Nanoemulsions containing cupuassu NLS had a minimum size of 129 nm, maximum 305.4 nm, with an average of 214 nm, average Zeta potential -36.3 Mv and an average polydispersity index of 0.172 considering these results in response each factor and its corresponding level. **TG** factor was that most influenced the size of NLS. The cupuassu NLS showed molecular fluorescence in the spectral range 740-760 nm, demonstrated their use in future research. These results demonstrated satisfactory for use as a bioproduct cupuassu seed butter nanocarriers in the lipid formulation development.

KEYWORDS: *Theobroma grandiflorum*, solid lipid nanoparticles, DLS, zeta potential and fluorescence.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Principais áreas de produção de cupuaçu <i>Theobroma grandiflorum</i> no estado do Acre.....	17
Figura 2 - Cupuaçu.....	18
Figura 3 - Composição percentual de ácidos graxos da manteiga de cupuaçu.....	20
Figura 4 - Capacidade de retenção de água da manteiga de cupuaçu frente à manteiga de karité e lanolina.....	21
Figura 5 - Característica de uma molécula anfifílica.....	23
Figura 6 - Tipos de polimorfismo cristalino do triacilglicerol.....	25
Figura 7 - Principais lipídios e emulsificantes usados na produção de nanopartículas lipídicas sólidas.....	27
Figura 8 - Manteiga de cupuaçu.....	33
Figura 9 - Homogeneizador tipo rotor-estator e agitador magnético com aquecimento.....	34
Figura 10 - Equipamento de ultrassom/sonicador com haste em titânio.....	35
Figura 11 - Nanoemulsões contendo Nanopartículas Lipídicas Sólidas - NLS de cupuaçu.....	39
Figura 12 - Imagem de TEM das NLS de Cupuaçu.....	48
Figura 13 - Espectro de Fluorescência da NLS de Cupuaçu.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - DLS representando o d.mn para as diferentes concentrações de TG 2,5%, 5% e 10% respectivamente.....	40
Gráfico 2 - DLS representando o d.mn de 132,2 nanômetros na concentração de TG 2,5%, SONIC 20% e HSH 5.000 Rpm.....	41
Gráfico 3 - DLS representando o d.mn de 134,8 nanômetros na concentração de TG 2,5%, SONIC 60% e HSH 5.000 Rpm.....	42
Gráfico 4 - DLS representando o d.mn de 129 nanômetros na concentração de TG 2,5%, SONIC 20% e HSH 15.000 Rpm.....	42
Gráfico 5 - DLS representando o d.mn de 176 nanômetros na concentração de TG 2,5%, SONIC 60% e HSH 15.000 Rpm.....	43
Gráfico 6 - DLS representando o d.mn de 205 nanômetros na concentração de TG 5%, SONIC 40% e HSH 10.000 Rpm.....	44
Gráfico 7 - DLS representando o d.mn de 202 nanômetros na concentração de TG 5%, SONIC 40% e HSH 10.000 Rpm.....	44
Gráfico 8 - DLS representando o d.mn de 203,7 nanômetros na concentração de TG 5%, SONIC 40% e HSH 10.000 Rpm.....	45
Gráfico 9 - DLS representando o d.mn de 201,4 nanômetros na concentração de TG 5%, SONIC 40% e HSH 10.000 Rpm.....	45
Gráfico 10 - DLS representando o d.mn de 305,4 nanômetros na concentração de TG 10%, SONIC 20% e HSH 5.000 Rpm.....	46
Gráfico 11 - DLS representando o d.mn de 300 nanômetros na concentração de TG 10%, SONIC 60% e HSH 5.000 Rpm.....	46
Gráfico 12 - DLS representando o d.mn de 286,7 nanômetros na concentração de TG 10%, SONIC 20% e HSH 15.000 Rpm.....	47
Gráfico 13 - DLS representando o d.mn de 297 nanômetros na concentração de TG 10%, SONIC 60% e HSH 15.000 Rpm.....	47
Gráfico 14 - Zeta Potencial referente às 36 leituras do experimento com a mobilidade da fase eletroforética nas amostras em função do tempo.....	48
Gráfico 15 - Representação do gráfico Pareto mostrando a interação entre os fatores do planejamento fatorial para o d.mn.....	49
Gráfico 16 - Representação do gráfico Pareto mostrando significância da interação entre os fatores no PDI.....	50

Gráfico 17 – HCA representando o <i>d.mn</i> e o <i>PDI</i> para as diferentes concentrações de <i>TG</i> 2,5%, 5% e 10%.....	51
Gráfico 18 – Análise dos componentes principais – <i>PCA</i>	52
Gráfico 19 - Representação do gráfico Pareto mostrando significância da interação entre os fatores no Potencial Zeta.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de contraste para um planejamento fatorial fracionado 3^3	36
Tabela 2 - Variáveis independentes e seus respectivos níveis usados na formulação das nanopartículas.....	37
Tabela 3 - Média dos valores obtidos para diâmetro médio de nanopartícula d.mn, Índice de Polidispersividade PDI e potencial zeta ZP.....	39

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE GRÁFICOS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 NANOTECNOLOGIA.....	14
2.1.1 Aplicações nanobiotenológicas.....	15
2.2 O CUPUAÇU(<i>Theobroma grandiflorum</i> Shum.).....	16
2.3 MANTEIGA DE CUPUAÇU.....	19
2.4 SISTEMAS COLOIDAIS.....	22
2.4.1 Classificação dos sistemas coloidais.....	22
2.5 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS – NLS.....	23
2.6 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO.....	28
2.6.1 Homogeneização de alta pressão (HPH).....	28
2.6.1.1 Homogeneização a quente.....	28
2.6.1.2 Homogeneização a frio.....	29
2.6.2 Método de microemulsão.....	29
2.6.3 Cisalhamento e ultrassom.....	30
2.6.4 Evaporação do solvente.....	30
2.6.5 Emulsificação e difusão do solvente.....	30
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo Geral.....	32
4.2 Objetivos Específicos.....	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1 Materiais.....	33
5.1.1 Manteiga de Cupuaçu.....	33
3.1.2 Homogeneizador tipo rotor-estator.....	34
5.1.3 Ultrassom.....	35

5.2	Métodos.....	35
5.2.1	Delineamento estatístico.....	36
5.2.2	Formulações.....	37
5.2.3	Caracterização.....	37
5.2.3.1	Espalhamento dinâmico de luz – DLS.....	37
5.2.3.2	Potencial Zeta.....	38
5.2.3.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET.....	38
5.2.3.4	Espectroscopia de fluorescência molecular.....	38
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1	Diâmetro médio da nanopartícula.....	39
6.2	Índice de polidispersividade – PDI.....	40
6.2.1	Concentração TG 2,5%.....	41
6.2.2	Concentração TG 5%.....	43
6.2.3	Concentração TG 10%.....	45
6.3	Potencial Zeta.....	47
6.4	Microscopia eletrônica de transmissão – MET.....	48
6.5	Análise estatística do diâmetro médio da nanopartícula – <i>d.nm</i>	49
6.6	Análise estatística do índice de polidispersividade – PDI.....	49
6.7	Análise estatística do potencial zeta.....	52
6.8	Fluorescência molecular.....	53
7.	CONCLUSÃO.....	54
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1 Introdução

Ao pensarmos sobre biodiversidade de fauna e flora, a floresta Amazônica brasileira se destaca entre as florestas tropicais úmidas por apresentar uma grande diversidade genética, sendo alvo de numerosos estudos e pesquisas.

Nesse sentido, o cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum*, árvore típica da região amazônica, aparece como a segunda mais importante espécie econômica do gênero *Theobroma*, após o cacau, e sua gordura tem recebido atenção por apresentar propriedades comestíveis análogas ao chocolate e características hidratantes e emolientes com aplicação na indústria cosmética. A espécie se dissemina na bacia amazônica e concentra sua produção e comercialização nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre e Maranhão.

Do fruto são produzidas geleias, licores, compotas, doces, biscoitos, sorvetes e muitas outras iguarias locais. Da semente é extraída a gordura ou manteiga de cupuaçu e desta são obtidos produtos de interesse cosmético, farmacêutico e alimentar.

As sementes constituem cerca de 20% do peso do fruto e vêm despertando o interesse de pesquisadores para o seu aproveitamento industrial por possuir um rico e balanceado teor de triglicerídeos e ácidos graxos como esteárico, oléico, araquídico que trazem efeitos altamente benéficos sobre a pele (De Oliveira Cohen e Jackix, 2009).

A manteiga de cupuaçu é conhecida por apresentar uma ótima capacidade de hidratação sobre a pele, superior em mais de duzentas vezes à lanolina, uma cera obtida a partir da lã de carneiro. Assim, percebe-se no mercado atual de cosméticos o acréscimo de produtos derivados do cupuaçu (Oliveira, 2003).

Por essas qualidades, a manteiga de cupuaçu tem sido utilizada como base lipídica na preparação de *Nanopartículas Lipídicas Sólidas – NLS* –, pois vêm mostrando bons resultados na composição de formulações para nanocarreadores ao apresentar características físico-químicas e biocompatibilidade favoráveis na obtenção de carreadores para fármacos de uso tópico (Dos Santos, 2012).

Produtos à base de manteiga de cupuaçu, destinada à produção de *NLS*, tem recebido o nome de *Teosferas*, e caracterizam bem o resultado das técnicas de preparação utilizando este bioproduto (Colomé *et al.*, 2010).

Inicialmente, as *NLS* foram desenvolvidas em 1991, como um sistema alternativo de encapsulamento e entrega de fármacos e princípios bioativos em relação aos tradicionais sistemas coloidais, tais como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (Müller *et al.*, 2000; Souto, 2011).

As *NLS* atualmente são empregadas no transporte de fármacos ou substâncias de interesse médico, terapêutico, cosmético e alimentar. Estes nanossistemas podem entregar a substância ativa numa concentração adequada durante o período de tratamento, dirigindo-a para o local desejado de ação, já que os tratamentos convencionais nem sempre atendem a esses requisitos (Bonifacio *et al.*, 2014).

Na literatura são descritas várias técnicas para a obtenção de *NLS*. A escolha da técnica adequada é determinante na obtenção das características desejadas da nanopartícula. O custo para obtenção e uso de solventes que podem ser tóxicos no sistema, também influenciam a escolha da melhor metodologia. Entre as técnicas mais utilizadas estão a homogeneização de alta pressão (*High Pressure Homogenization – HPH*) que vêm apresentando melhores resultados em diversos trabalhos, bem como a técnica de inversão de fases, a evaporação do solvente e a ultrasonificação, também com excelentes resultados. (Hou *et al.*, 2003; Souto, 2011).

Tomando como base a biodiversidade local na prospecção, obtenção e desenvolvimento de novos bioprodutos e tecnologias, o cupuaçu mostra-se com atrativos promissores no desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos com aplicações nanobiotecnológicas. O uso da manteiga de cupuaçu para compor uma matriz lipídica abre possibilidades no desenvolvimento de novos produtos para a indústria farmacêutica e cosmética e ajuda a agregar valor aos produtos naturais de origem vegetal que fazem parte na nossa floresta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanotecnologia

Com o desenvolvimento científico decorrente do avanço tecnológico, várias metodologias são desenvolvidas nos mais diversos campos do conhecimento.

No campo da ciência e tecnologia, a nanociência e a nanotecnologia se estabelecem engenhosamente com grande potencial para solução de problemas presentes na nossa sociedade (Lima e De Almeida, 2012). A nanotecnologia, por exemplo, visa a caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas na escala nanométrica (Assis *et al.*, 2012).

A escala métrica *nano* faz menção à bilionésima parte de um metro 10^{-9} m, ou milionésima parte de um milímetro e se tornou possível graças ao desenvolvimento de técnicas moleculares modernas que permitem a compreensão e manipulação de materiais em níveis atômicos em escala molecular (Chau *et al.*, 2007).

Estas novas tecnologias desenvolvidas permitiram a criação e manipulação de substâncias e produtos com estrutura molecular conhecida e combinada conforme o interesse desejado, podendo trabalhar com partículas menores, com maior área de contato e mais eficazes no envio de bioativos à sistemas específicos como o respiratório (Weber *et al.*, 2014a).

Em decorrência da descoberta de novas técnicas de pesquisa, as considerações sobre os riscos que estes novos produtos podem trazer têm sido estudadas, pois as características físico-químicas e biológicas como: cor, solubilidade, viscosidade e toxicidade apresentada por cada nova molécula, mostra interações diferentes e únicas daquelas em escala macromolecular (Tamjidi *et al.*, 2013).

Estes nanomateriais têm inúmeras aplicações regulamentadas pela *Food and Drug Administration – FDA* – que recentemente elaborou um *guide line* que regulamenta, dispõe sobre adulteração, características e rotulagem destes novos produtos. As propriedades exclusivas destes produtos, destinadas

majoritariamente às aplicações cosméticas, devem ser abordadas nas avaliações de segurança (Fda, 2015).

Na Nanotecnologia o desenvolvimento de *Nanopartículas Lipídicas Sólidas – NLS*, a partir de bioprodutos naturais, mostra-se como uma importante ferramenta nas áreas médicas, farmacológicas, terapêutica e estética por carrear substâncias de interesse a um local específico com maior eficiência, baixa citotoxicidade e toxicidade sistêmica (Müller *et al.*, 1997).

2.1.1 Aplicações Nanobiotecnológicas

As aplicações das técnicas de nanotecnologia nas áreas médicas e biológicas de estruturas com tamanho nanométrico tendem a ser melhor distribuídas por um determinado sistema, atuando como nanocarreadores farmacêuticos, terapêutico ou cosmético. São aplicadas técnicas de nanotecnologia na produção de estruturas submétricas, usando, por exemplo, polímeros como polietileno glicol (PEG), sílica entre outros (Torchilin, 2006).

Na entrega de um fármaco ou substância com característica lipofílica se faz uso de nanocarreadores lipídicos e os mais utilizados são: Lipossomas, *NLS*, *Nanostructured Lipid Carriers – NLC* – e nanoemulsões. Estes tipos de carreadores oferecem vantagens como estabilidade física e química, podendo ainda fazer a entrega – *delivery* de maneira controlada (Yang, Yihui *et al.*, 2014).

2.2 O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum.)

Theobroma grandiflorum (Wildenow ex Sprengel) Shumann, pertence à mesma família do cacauzeiro. Seu nome comum é cupuaçu, copoaçu, pupu e pupuaçu.

Cupuaçu é um nome que provém da língua Tupi (*Kupu* = que parece com cacau + *Uasu* = grande). É uma espécie muito produtiva e comum em alguns países tropicais como Costa Rica, Colômbia, Equador, Guiana Francesa,

Venezuela e Suriname. Possivelmente foi disseminado de seu centro de origem para todos os estados da Região Norte do Brasil, inicialmente, pela intensa movimentação das populações indígenas no interior da Amazônia (Yang *et al.*, 2003; Moreira, 2009).

O cupuaçuzeiro pertence ao gênero *Theobroma* (*Theos* = Deus + *Broma* = Alimento), ou “manjar dos deuses” (Di Stasi, 2002). Apresenta o maior tamanho de flores e frutos do gênero que dá nome à espécie *T. grandiflorum* (flores grandes). Está classificado taxonomicamente na família Sterculiaceae, que apresenta cerca de 50 gêneros e 750 espécies entre árvores e arbustos todas predominantemente tropicais (Coral, 1990; Souza *et al.*, 2011).

Em sistemas agroflorestais implantados na região Norte do Brasil, o cupuaçuzeiro é uma das mais importantes frutíferas exploradas comercialmente na região amazônica devido seu potencial no aproveitamento da polpa, sementes e a conquista de mercado em outras regiões do País e no exterior (José Thomazini, 2002). Isto significa que sua importância se dá tanto do ponto de vista econômico como social.

Como planta nativa originária da região Sul e Sudeste da Amazônia, teve sua produção em escala comercial desenvolvida a partir da década de 70, onde até então era obtido unicamente em sistemas conhecidos como “fundo de quintal”. (ANDRADE, 1998; ALVES, 1999; GONÇALVES *et al.* 2013).

É um fruto típico amazônico, cultivado principalmente no estado do Pará, Amazonas, Rondônia e Acre, mas tem apresentado sucesso na implantação de cultivares na Bahia e outros estados do Sudeste (FILHO, 1998).

No estado do Acre este fruto é produzido nos municípios de Acrelândia, Bujari, Rio Branco, e Senador Guimard, conforme se pode verificar nas áreas destacadas na Figura 1, que indica o mapa do Estado. Porém, a concentração da produção está nos municípios de Cruzeiro do Sul, Sena Madureira, Xapuri e Brasiléia. Figura 1 (GONDIM *ET AL.* 2001; Suframa 2003; RUSCHEINSKY, 2005).

O fruto é caracterizado como baga, constituída da casca (epicarpo + mesocarpo) e polpa (endocarpo) que envolve as sementes. O epicarpo é rígido, lenhoso e com epiderme clorofilada recoberta por revestimento ferruginoso e tricomas se soltam facilmente no manuseio, conforme se pode verificar na figura 2. Depois de colhidos podem ser consumidos em até 10 dias.



Figura 2. Cupuaçu.

Sua polpa mucilaginosa possui uma característica de acidez com pH em torno de 3.4. Estudos anteriores demonstraram que seu aroma floral se deve à presença de componentes voláteis como linalol, α -terpinol, 2-phenyllethanol, mirceno, limoneno, dióis, methoxy 2,5-dimethyl-3(2H)-furanona (Rogez *et al.*, 2004).

Este fruto apresenta crescente utilização no Brasil e no mercado externo. É apreciado por sua polpa ácida de aroma intenso, comercializada geralmente congelada, apresenta diversas opções de consumo na culinária como: sucos, sorvetes, licores, doces, bombons e geleias; outros produtos análogos ao chocolate (Cupulate) produzidos a partir da semente.

2.3 Manteiga de Cupuaçu

As sementes de cupuaçu são ricas em gordura correspondendo à cerca de 60 % do peso seco, o que equivale a 20% do fruto. Apresenta alta digestibilidade em humanos de aproximadamente 91%. Seus componentes lipídicos apresentam grande potencial para uso na indústria alimentícia como lipídios análogos substituintes da semente de cacau, pois apresentam ponto de fusão semelhante (cupuaçu 19-34 °C; cacau 25-35 °C). (Cohen *et al.*, 2003; Lannes *et al.*, 2003).

Nas sementes de cupuaçu são encontradas várias substâncias antioxidantes. Yang et al (2003) em seus estudos, identificaram dois novos flavonoides glicosídeos sulfatados: a theograndina I e II, em complemento a outros nove antioxidantes flavonoides já conhecidos, como a (+)-catequina, (-)-epicatequina, isoescutelareina 8-O- β -D-glucoronida, hipolaetina 8-O- β -D-glucoronida, quercitina 3-O- β -D-glucoronida, quercetin 3-O- β -D-glucoronida 6"-methyl ester, quercetina, kaempferol, e isoscutelareina 8-O- β -D-glucoronida 6"-methyl ester. Dentre estes a Teograndina I e II demonstrou melhores resultados de atividade antioxidante em ensaios com DPPH.

Na indústria farmacêutica e cosmética as gorduras de origem vegetal têm servido como base na preparação de diversas formulações e nas mais variadas aplicações como: cremes, emulsões, lipossomas e carreadores lipídicos nanoestruturados que geralmente são produzidas por compostos laboratoriais.

A manteiga de cupuaçu é um triglicérideo que se solidifica em temperaturas inferiores à 30°C aproximadamente, por haver em sua composição um equilibrado teor de ácidos graxos saturados e insaturados como esteárico, oléico e araquídico, conforme se observa abaixo, na Figura 3.

ÁCIDOS GRAXOS	%
Ácido mirístico (C14:0)	0,08
Ácido palmítico (C16:0)	11,25
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,40
Ácido esteárico (C18:0)	38,9
Ácido oleico (C18:1)	38,79
Ácido linoleico (C18:2)	2,39
Ácido araquídico (C20:0)	7,97
Ácido linolênico (C18:3)	0,22
Ácido behênico (C22:0)	0,74
Saturados – totais	58,13
Monoinsaturados – totais	39,19
Poliinsaturados – totais	2,61

Figura 3. Composição percentual de ácidos graxos da manteiga de cupuaçu. Adaptado de Cohen e Jackix 2009.

Estes componentes dão origem a uma manteiga com grande poder de umectação e hidratação, que produz grandes benefícios sobre a pele, possibilitando a recuperação da sua umidade e elasticidade natural (De Oliveira Cohen e Jackix, 2009).

Este triglicerídeo possui alta capacidade de retenção de água, em torno de 440%, segundo se pode observar na Figura 4. Além disso, testes de absorção de água realizadas em laboratório mostraram que 1Kg de manteiga de cupuaçu pode absorver até 4.4 Kg de água, sendo considerado muito promissor no cuidado com a pele, mais até que a manteiga de karité e a lanolina que pode provocar sensibilidade e alergia em algumas pessoas (Fleck e Newman, 2012).

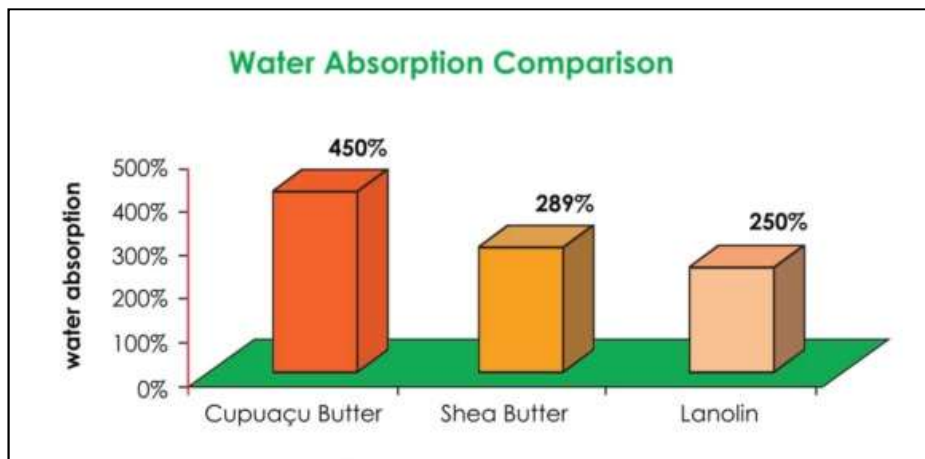


Figura 4. Capacidade de retenção de água da manteiga de cupuaçu frente à manteiga de karité e lanolina (Fleck e Newman, 2012).

Sua elevada capacidade de penetração transdermal e retenção de humidade são excepcionais. É considerado um excelente emoliente que restaura a elasticidade da pele com ação antioxidante. Contém fitosteróis insaponificáveis que atuam em nível celular como regulador do equilíbrio hídrico da pele. Com propriedades anti-inflamatórias estes esteróis são utilizados topicamente para tratar dermatites e ulcerações, estimulando o processo de cicatrização (Oliveira, 2003).

Estas propriedades químicas da manteiga de cupuaçu tornam-na um produto capaz de auxiliar na estabilidade das emulsões, devido a sua característica hidrofílica atribuída às pontes de hidrogênio realizadas entre as moléculas de água e os fitosteróis (Teixeira, 2014).

Segundo alguns estudos realizados na Alemanha, a manteiga de cupuaçu apresenta um determinado grau de absorvência de raios UV especialmente em UVA e UVB, porém não podendo ser reconhecido como FPS pela *Food and Drug Administration* (Freitas *et al.*, 2011).

2.4 Sistemas coloidais

Coloides são misturas heterogêneas que apresentam pelo menos duas fases diferentes nas quais a partícula da fase dispersa, que pode ser um sólido, líquido ou gás, está finamente dispersa ou misturada na outra fase, e quando em escala nanométrica, é invisível ao olho humano.

As soluções coloidais são compostas por dispersante e disperso: o dispersante é o equivalente ao solvente e o disperso é o equivalente ao soluto. Não há sedimentação e podem ser filtrados por filtros compatíveis com o tamanho da partícula, ou nanopartícula. Estas recebem a classificação de acordo com seu tamanho e são chamadas de coloides. Estas partículas coloidais possuem tamanho médio entre 1 a 1000 nm (Junior e Varanda, 1999).

2.4.1 Classificação dos sistemas coloidais

Os sistemas coloidais são classificados em relação a sua composição e são considerados como sendo micelares, moleculares ou iônicos: quando temos coloides micelares as partículas em dispersão são basicamente formadas por átomos agregados; quando temos sistemas moleculares os coloides são compostos por macromoléculas; e quando os sistemas são iônicos sua composição coloidal é basicamente de íons.

Estes sistemas coloidais podem ser classificados em relação ao meio em que a partícula coloidal está dissolvida. Quando em uma dispersão o dispersante é líquido e o disperso também é um líquido, temos uma emulsão, pois o meio líquido como, por exemplo, a água, pode facilitar as interações do sistema. As emulsões tipo óleo e água *O/W* naturalmente não se misturam devido as suas polaridades, posto que enquanto a água é um líquido com natureza polar, os óleos de maneira geral são formados por moléculas apolares.

Como a natureza das polaridades do óleo e da água é incompatível, há um sistema estável e podemos resolver este problema com o uso de agentes emulsificantes como detergentes ou tensoativos.

Os agentes emulsificantes ou tensoativos são moléculas com propriedades anfífilas polar e apolar (figura 5), que se adsorvem na interface combinada entre a fase dispersa e dispersante no processo de emulsificação agindo contra o fenômeno de instabilidade que acarreta na separação das fases (LOCHHEAD 1994).

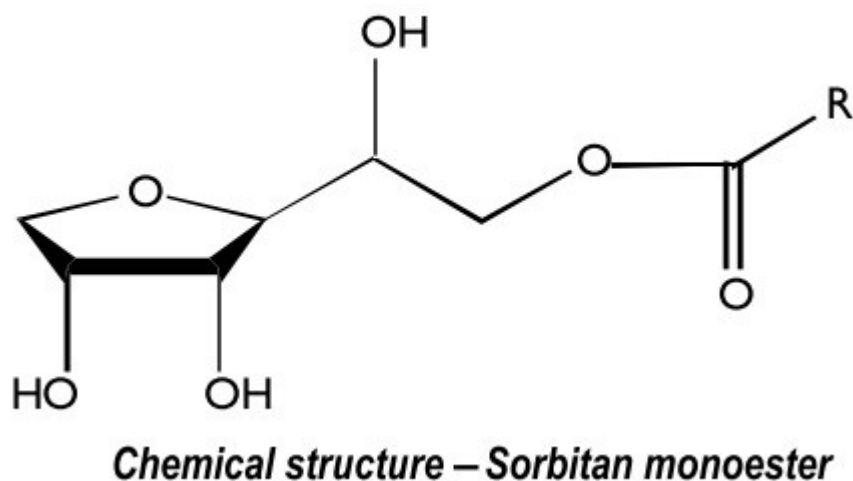


Figura 5. Característica de uma molécula anfifílica. Fonte: croda.com

2.5 Nanopartículas Lipídicas Sólidas – NLS

As primeiras formas de incorporar drogas lipofílicas em partículas de gordura para aplicação parenteral datam da década de 60 e foram utilizadas para aplicação de ativos com baixa solubilidade em água como, por exemplo, propofol ou diazepam.

A primeira geração de nanopartículas lipídicas desenvolvidas na década de 90 foi chamada de Nanopartículas Lipídicas Sólidas – NLS – sendo composta de 0.1-30% (p/p) de lipídio disperso em uma solução aquosa de surfactante como agente estabilizante variando de 0.5-5% (p/p) (Weber *et al.*, 2014b).

Nanopartículas Lipídicas Sólidas como o próprio nome diz, são partículas de tamanho nanométrico que possui sua matriz formada por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e corporal, como um sistema diferenciado e vantajoso de encapsulação e entrega de princípios ativos em relação aos tradicionais

sistemas coloidais, tais como emulsões, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas (HOU et al., 2002; SOUTO et al., 2011).

As NLS são, ainda, sistemas coloidais que transportam, encapsulam, protegem e distribuem componentes lipofílicos ou hidrofóbicos funcionais tais como drogas e bioativos (Assis *et al.*, 2012). Hoje os nanocarreadores que tem base lipídica em sua matriz formadora são utilizados na entrega de drogas ou bioativos principalmente por via transdermal (Guo, 2015).

A vantagem da utilização de um sistema de NLS está na liberação controlada de seu conteúdo em comparação a outros sistemas de entrega coloidais, pois seu núcleo sólido à temperatura ambiente confere menor mobilidade ao conteúdo nele incorporado, podendo controlar o tempo que estas substâncias serão liberadas. Estas características são vantajosas no encapsulamento de componentes ativos incluindo a melhora da estabilidade física e proteção contra degradação química (Ana-Maria Manea, 2014; Yang, Y. *et al.*, 2014), apresentando boa estabilidade, baixa toxicidade por não necessitarem de grandes quantidades de surfactantes, alta biocompatibilidade e capacidade de produção em grande escala (GOLMOHAMMADZADEH et al., 2012).

Nanopartículas feitas a partir de uma matriz lipídica sólida tem recebido grande atenção como novo carreador coloidal para aplicações tópicas sobre a pele e intravenosa. Esta última tem sido uma proposta bem particular deste sistema carreador (Torchilin, 2006). NLS são carreadores coloidais sub-micrométricos, variando de 50 a 1000 nm e compostos por um core de lipídios sólidos biocompatíveis (mono-di e tri glicerídeos, ácidos graxos, esteroides e ceras) dispersos em água ou em uma solução aquosa de variadas classes de emulsificantes e surfactantes. NLS oferecem propriedades únicas como tamanho reduzido, ampla área de superfície, alta capacidade de encapsulamento, interação entre fases e possui uma interessante possibilidade para o uso farmacêutico (Mehnert, W. M., Karsten, 2012; P. Ekambaram, 2012).

Este sistema de encapsulamento também pode apresentar algumas desvantagens, principalmente em relação à expulsão ou liberação da droga ou do conteúdo encapsulado durante o período de armazenamento. Isso ocorre

devido ao polimorfismo dos triacilgliceróis e a baixa organização dos lipídios na matriz da partícula durante sua produção que se transforma em alta organização em forma de β -modificações, de acordo com a Figura 6 (Weiss *et al.*, 2008), abaixo.

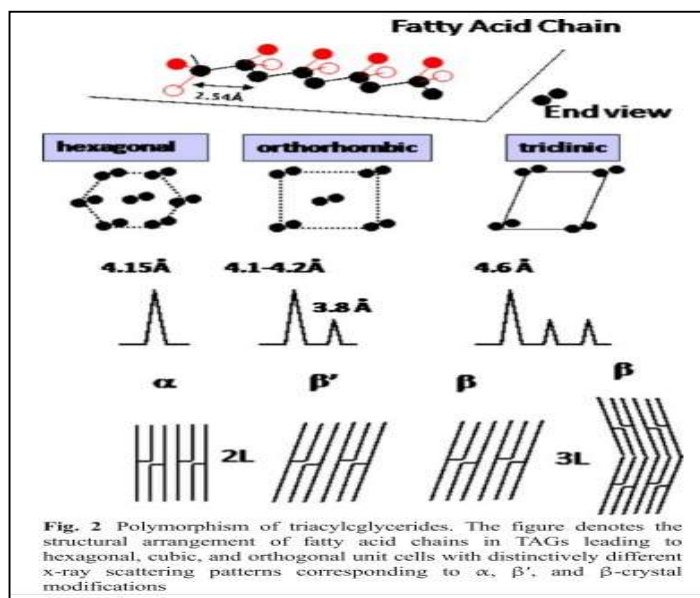


Figura 6. Tipos de polimorfismo cristalino do triacilglicerol (Weiss *et al.*, 2008).

Deste modo, a composição dos ácidos graxos e triglicerídeos que formam a matriz lipídica na nanopartícula determina a capacidade de estabelecer um sistema eficaz para estabilizar e encapsular um fármaco ou bioativo, pois o arranjo cristalino do interior das nanopartículas determina o espaço ocupado pela substância a ser entregue (Bonifacio *et al.*, 2014).

O efeito da cristalização da matriz lipídica confere ao ácido graxo uma conformação molecular em forma β ligações. Quando ocorre a recristalinização dos ácidos graxos do core sólido lipídico, a substância encapsulada tende a ser expulsa da nanopartícula, pois o rearranjo dos ácidos graxos não permite que uma quantidade suficiente da substância de interesse se mantenha no interior da nanopartícula.

A dificuldade em manter a “carga” ou conteúdo nas nanopartículas pode ser corrigida ao adicionar em sua formulação lipídios de cadeia média. Estes,

por sua vez, favorecem um desarranjo estrutural nas redes cristalinas da matriz lipídica sólida, melhorando a eficácia do encapsulamento mesmo nas recristalizações. Este outro tipo de nanocarreador é classificado como sendo de segunda geração, pois é um complemento à primeira geração de nanopartículas lipídicas como as *NLS*, e recebe o nome de *Nanostructured Lipid Carriers - NLC*, em inglês (Weber *et al.*, 2014b).

Vários são os tipos de componentes lipídicos e emulsificantes utilizados na preparação de *NLS*. Mehnert e Mäder (2014), em sua revisão, trazem os principais componentes que são utilizados na formulação e produção de nanopartículas lipídicas sólidas, que pode ser verificado na Figura 7, a seguir:

Table 1
Lipids and emulsifiers used for preparation of solid lipid nanoparticles

Lipids	Literature
Triglycerides	
Tricaprin	[47]
Trilaurin	[124,139,47,59,102,87,156]
Trimyristin	[124,148,139,187,56]
Tripalmitin	[49,62,65,139,56,118,124,135]
Tristearin	[124,139,47,56]
Hydrogenated coco-glycerides (Softisan [®] 142)	[129]
Hard fat types	
Witepsol [®] W 35	[118,49,56]
Witepsol [®] H 35	[148,56]
Witepsol [®] H 42	[149]
Witepsol [®] E 85	[148,129]
Glyceryl monostearate (Imwitor [®] 900)	[152]
Glyceryl behenate (Compritol [®] 888 ATO)	[174,181,136,140,106,187,137,179,56,59,102,115]
Glyceryl palmitostearate (Precirol [®] ATO 5)	[181]
Stearic acid	[176,175,71,151,154,149,86,155,152,74,70,153,159]
Palmitic acid	[150]
Decanoic acid	[150]
Behenic acid	[86]
Acidan N12	[86]
Emulsifiers/Coemulsifiers	
Soybean lecithin (Lipoid [®] S 75, Lipoid [®] S 100)	[139,148,59,102,118,124,135]
Egg lecithin (Lipoid [®] E 80)	[135]
Phosphatidylcholine (Epikuron [®] 170, Epikuron 200)	[65,176,175,86,152,74]
Poloxamer 188	[118,49,65,174,181,136,140,106,137,187,129,179,159,158,56,59,102,115]
Poloxamer 182	[129]
Poloxamer 407	[174,181]
Poloxamine 908	[174,181]
Tyloxapol	[62,65,139,148,124,135]
Polysorbate 20	[74,70]
Polysorbate 60	[70]
Polysorbate 80	[129]
Sodium cholate	[187,129]
Sodium glycocholate	[49,65,139,176,175,148,118,124,135]
Taurocholic acid sodium salt	[176,175,152]
Taurodeoxycholic acid sodium salt	[71,150,151,154,149,86,155,74,70,153]
Butanol	[71,151,155,152,74,153]
Butyric acid	[154,155]
Diocetyl sodium sulfosuccinate	[155]
Monooctylphosphoric acid sodium	[70]

Figura 7. Principais lipídios e emulsificantes usados na produção de nanopartículas lipídicas sólidas (Mehnert, W. M., Karsten, 2012).

2.6 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO

2.6.1 Homogeneização de Alta Pressão – HAP

A técnica de Homogeneização de Alta Pressão – HPH – (sigla em Inglês) inclui homogeneização a quente e homogeneização a frio. Em ambas a droga é primeiramente solubilizada no lipídio fundido e homogeneizada sobre elevada pressão.

2.6.1.1 Homogeneização a quente

Esta técnica é conduzida com a temperatura acima do ponto de fusão do lipídio em questão. Uma pré-emulsão com o lipídio fundido recebe o fármaco de interesse e a fase aquosa com o emulsificante é preparada nas mesmas condições de temperatura.

Esta emulsão é obtida sob agitação ou utilizando um equipamento tipo rotor-estador para misturar e reduzir o tamanho das partículas (P. Ekambaram, 2012). Esta técnica por si somente pode produzir NLS com tamanho médio desejado (Ana-Maria Manea, 2014). Algumas metodologias são utilizadas em complemento a esta técnica para otimização do tamanho da partícula de interesse, e dentre elas está a homogeneização de alta pressão (*HPH*) (Guterres, 2012) e ultrassom (Souto, 2011).

Quando esta pré-emulsão (óleo em água) está de acordo com os parâmetros desejados, então segue a homogeneização de alta pressão (100-1500 bar). Geralmente são utilizados 3 ciclos para obtenção das NLS (Marcato, 2009); contudo, Guo et al. (2015), na formulação de NLC para administração percutânea de alcaloides, conseguiu melhores resultados utilizando 5000 rpm na pré-emulsão e 5 ciclos de 800 bar na homogeneização de alta pressão.

2.6.1.2 Homogeneização à frio

Na técnica de homogeneização à frio a fase lipídica contendo o fármaco é vertida em uma solução de surfactantes fria, induzindo à formação de micropartículas. Estas micropartículas são homogeneizadas em alta pressão e reduzidas à nanopartículas resfriadas abaixo da temperatura ambiente (Feng e Mumper, 2013).

Geralmente, a técnica de homogeneização à frio é utilizada em detrimento dos problemas que podem estar presentes na técnica de homogeneização a quente. Dentre estes problemas estão a degradação do fármaco induzida pela temperatura, a distribuição do fármaco na fase aquosa durante a homogeneização e a complexidade do processo de cristalização quando levada em conta as várias modificações na matriz lipídica se super-resfriada (Mehnert, W. K., Mäder, 2012).

2.6.2 Método de Microemulsão

Na técnica de microemulsão são formados sistemas de duas fases tipo óleo em água (o/w), feita por um lipídio de baixo ponto de fusão, tipicamente ácido esteárico e um emulsificante que pode ser tween ou span (Mehnert e Mader, 2001).

Estes compostos que são termodinamicamente estáveis podem se formar espontaneamente, pois apresentam uma baixa tensão superficial entre uma fase e outra. Na preparação da microemulsão, inicialmente, funde-se o lipídio e então é acrescentado o princípio ativo por dissolução ou dispersão, de acordo com a natureza polar do mesmo (Souto, 2011). Após a preparação da microemulsão esta é vertida sobre uma solução gelada contendo surfactante, sendo basicamente uma diluição da microemulsão (P. Ekambaram, 2012).

2.6.3 Cisalhamento e Ultrassom

A correta mistura das fases que compõem a emulsão é determinante para um resultado satisfatório da formulação estudada. A técnica de homogeneização de alto cisalhamento (corte) ou *High Shear Homogenization* – HSH – consiste em altas rotações que variam de 5 a 25 mil RPM forçam a passagem da mostra por um conjunto composto de um rotor-estator, quebrando fisicamente a amostra em partes menores.

Na maioria das vezes a técnica de ultrasonificação é utilizada em conjunto com a técnica de alto cisalhamento, uma vez que a primeira gera partículas em escala micrométrica; já o ultrassom libera uma grande quantidade de energia por cavitação na solução. Por meio de uma haste de titânio a energia liberada faz com que as moléculas lipídicas sejam quebradas em partes menores formando as gotículas ou *droplets*, geralmente de tamanhos menores que 1000 nanômetros (Wissing, 2004).

2.6.4 Evaporação do solvente

As NLS podem ser produzidas dissolvendo o material lipídico em um solvente orgânico imiscível em água como o ciclohexano, o qual é emulsificado em uma fase aquosa (P. Ekambaram, 2012).

Após a emulsificação, o solvente é evaporado sob baixa pressão entre (40 – 60 mbar) e, neste processo, nano ou micropartículas são formadas por precipitação do lipídio na fase aquosa. Quando o tamanho das partículas está na escala de micrômetros complementa-se a técnica usando homogeneizador de alta pressão ou ultrassom para obtenção das NLS (Marcato, 2009; Mehnert, W. K., Mäder, 2012).

2.6.5 Emulsificação e difusão do solvente

A preparação de NLS por emulsificação- evaporação do solvente consiste na preparação de uma fase orgânica, constituída pelo lipídio dissolvido num solvente orgânico imiscível com a água como, por exemplo, a acetona ou ciclohexano. Nesta fase incorpora-se o princípio ativo, e adiciona-se fosfatidilcolina para incrementar a estabilidade termodinâmica da emulsão. A fase orgânica é depois emulsificada numa fase aquosa que contém um

tensoativo. E, posteriormente o solvente orgânico é evaporado em pressão reduzida entre 40-60 mbar (P. Ekambaram, 2012).

Os princípios ativos hidrossolúveis, em vez de serem dispersos na fase orgânica podem, alternativamente, serem dissolvidos numa fase aquosa que, posteriormente, vai constituir a fase interna de uma emulsão múltipla A/O/A.

Este processo é particularmente adequado para a incorporação de peptídeos e proteínas em NLS. Em comparação com o processo de preparação das NLS por fusão emulsificação, a emulsificação-evaporação do solvente origina partículas com dimensões mais reduzidas, em torno de ± 25 nm devido à menor viscosidade da fase interna, que resulta do lipídio se encontrar dissolvido num solvente orgânico em lugar de fundido. Este método apresenta a vantagem de evitar a exposição dos princípios ativos a temperaturas elevadas, contudo, apresenta o inconveniente relacionado ao uso de solventes orgânicos (Souto, 2011).

3. Justificativa

Diante do exposto, a diversidade e disponibilidade de bioprodutos presentes na Amazônia brasileira fomenta a busca de novos produtos voltados ao uso sustentável da floresta.

O uso de fontes lipídicas alternativas como a manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), mostra-se viável e pode servir de estímulo aos pequenos produtores a fim de agregar mais renda ao cultivo local deste fruto, como valiosa fonte de ácidos graxos (AG) biocompatível com o uso e aplicações cosméticas e farmacêuticas.

O tamanho médio da nanopartícula ($d.mn$) igualmente a um índice de polidispersividade (PDI) baixo e um potencial zeta igual ou maior que ± 10 . Estes parâmetros são determinantes para a obtenção de uma NLS com estabilidade e tamanho adequados ao uso e aplicações nanobiotecnológicas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas – NLS – para uso como nanocarreadores, a partir da manteiga de cupuaçu *Teobroma grandiflorum*, como componente lipídico principal.

4.2 Objetivos Específicos

Obter um sistema nanoemulsionado contendo nanopartículas lipídicas sólidas a partir da manteiga de cupuaçu.

Avaliar a obtenção das melhores formulações de NLS por meio das técnicas de cisalhamento e ultrassom e por meio de um planejamento fracionado 3³.

Caracterizar por espectroscopia de luz (DLS/PCS) e fluorescência molecular as formulações obtidas no experimento.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Manteiga de Cupuaçu

Na preparação das NLS foi utilizada manteiga de cupuaçu *non refined* como componente lipídico majoritário nas formulações de síntese das nanopartículas. A manteiga foi adquirida juntamente à Associação de Produtores Rurais Vencedora – ASPRUVE – em um sistema de Reflorestamento Econômico Consorciado e Adensado – RECA – localizada no município de Nova Califórnia, estado de Rondônia.

Os tensoativos usados nas formulações foram monolaurato de polioxietileno de sorbinato 80 TWEEN (Sigma Aldrich UK) e monooleato de

sorbitano 80 SPAN (Sigma Aldrich USA), água bidestilada proveniente do próprio laboratório e todos os reagentes foram utilizados assim como recebidos.



Figura 8: Manteiga de cupuaçu.

5.1.2 Homogeneizador tipo Rotor-Estator

Para a preparação da pré-emulsão a quente foi utilizado um homogeneizador tipo rotor-estator da marca IKA, modelo Ultra Turax® - T18 com velocidade mínima de 5.000 e máxima de 25.000 Rpm. Junto a este aparato foi utilizado um agitador magnético com aquecimento marca Quimis modelo Q261-22 para a obtenção de um banho maria com temperatura desejada.



Figura 9: Homogeneizador tipo rotor-estator e agitador magnético com aquecimento.

5.1.3 Ultrassom

Para a redução da pré-emulsão em partículas com tamanhos menores, foi utilizado um equipamento tipo sonicador/desruptor de células marca Sonoplus Bandelin modelo UW 2070, equipado com haste de titânio.



Figura 10: Equipamento de ultrassom/sonicador com haste em titânio.

5.2 MÉTODOS

Foi utilizada a técnica de homogeneização a quente (Mehnert, 2001) para a preparação das pré-emulsões. Cada amostra foi preparada em tubo de ensaio de vidro de 20 ml que continha a quantidade de lipídio correspondente à formulação.

A fase lipídica contendo o surfactante foi aquecida em banho maria a 55 ± 5 °C até fusão total da fase. Em seguida, com o auxílio de um homogeneizador tipo rotor-estator de alto cisalhamento, as amostras foram misturadas à fase aquosa por um período de 10 minutos (Ana-Maria Manea, 2014), e, logo em seguida, cada amostra previamente homogeneizada seguiu para o equipamento de ultrassom por um período igual de 10 minutos, a fim de produzir partículas em escala nanométrica a partir da formulação estudada. Por fim cada formulação foi resfriada à temperatura ambiente sob agitação constante (Figura 10). A faixa de operação para cada equipamento seguiu o proposto no delineamento experimental.

5.2.1 Delineamento Estatístico

A otimização do experimento por meio de delineamento experimental é determinante para o desenvolvimento de novas formulações voltadas à nanocarreadores, com aplicações médicas e farmacêuticas, pois permite melhorar os procedimentos em sua obtenção visando características como tamanho de partícula adequado com um número menor de corridas experimentais (Sahu *et al.*, 2014).

O experimento foi delineado por meio de um planejamento fatorial fracionado 3^3 , ou seja, composto por três níveis e três fatores, mas contendo apenas 12 formulações. Os fatores estudados foram: concentração (%) da manteiga de *T. grandiflorum* (TG), amplitude (%) Watt de sonicação (SONIC) e velocidade (RPM) de homogeneização da pré-emulsão (HSH), conforme tabela 1.

Os níveis de cada fator foram determinados tendo como base valores encontrados na literatura como concentração (%) de (TG) (Colomé *et al.*, 2010; Dos Santos, 2012), amplitude de sonicação (%) (Shah, 2015) e velocidade (RPM), (P. Ahlin, 1998; Gambhire, 2011).

Nível do Fator			
corridas	TG	Sonic	HSH
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

Tabela 1. Matriz de contraste para um planejamento fatorial fracionado 3^3 .

5.2.2 Formulações

As formulações variaram do nível mais baixo (-1) ao mais alto (+1) com zero (0) representando o valor de interesse encontrado na literatura. Os valores

foram acrescidos de 20 pontos percentuais até a concentração máxima de 60% para os níveis do fator Sonic, 5 em 5 para o fator HSH e 2,5 para o primeiro nível de TG seguido de 5 para os demais (Tabela 2), afim de avaliarmos as melhores respostas de saída para este delineamento experimental. Os dados obtidos neste experimento foram tratados utilizando o *software* STATISTICA 7.0.

Fatores		Níveis	
	-1	0	1
TG %	2,5	5	10
Sonic %	20	40	60
HSH Rpm	5	10	15

Tabela 2. Variáveis independentes e seus respectivos níveis usados na formulação das nanopartículas.

Através deste experimento foram obtidas nanoemulsões contendo NLS que, posteriormente, foram caracterizadas conforme proposto neste trabalho.

5.2.3 Caracterização

5.2.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz

O Espalhamento Dinâmico de Luz ou *DLS – Dynamic Light Scattering* – , ou *PCS – Photon Correlation Spectroscopy* – em inglês, é um método baseado na determinação do movimento Browniano dependente do equilíbrio hidrodinâmico da partícula. A média do diâmetro e o índice de polidispersividade (PDI) das dispersões de NLS foram determinadas por DLS usando um Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments; Malvern, UK).

Para facilitar a medição, cada amostra foi diluída na proporção 1:100 com água bidestilada para cada medição, as leituras foram realizadas em triplicata a uma temperatura de 25°C.

5.2.3.2 Potencial Zeta

O Potencial zeta (ζ) das partículas lipídicas foi realizado usando o Zeta Size Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram diluídas na proporção 1:100 com água bidestilada e acondicionada em cubeta poliestireno modelo (DTS 1070). O equipamento mede a direção e a velocidade em que as partículas se movimentam quando aplicado um campo elétrico. O Zeta potencial é calculado baseado no modelo de Smoluchowski.

5.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

A fim de investigar a morfologia e o tamanho das nanopartículas, as NLS foram submetidas à Microscopia Eletrônica de Transmissão. As medidas foram realizadas com um microscópio eletrônico de transmissão JOEL, modelo 1011, operando em 80 kV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Para a obtenção de boas micrografias as amostras foram diluídas em água destilada e, em seguida, colocadas em aparelho ultrassom para sua homogeneização por 15 minutos. Após, uma alíquota da dispersão final foi depositada sobre um filme de formvar suportado por uma grade de cobre de 200 mesh, e deixada secar à temperatura ambiente.

5.2.3.4 Espectroscopia de fluorescência molecular

As nanoemulsões contendo NLS a partir da manteiga de cupuaçu, foram analisadas por espectroscopia de fluorescência molecular com Espectrofotômetro PerkinElmer LS-55. A amostra foi acondicionada em cubeta de quartzo com 10mm/10mm de caminho óptico. A amostra foi diluída com água bidestilada 5, 10, 15 e 20 mil vezes subsequentemente para melhor obtenção dos espectros de fluorescência. A amostra foi excitada com luz em um comprimento de onda de 400 nm, e a emissão lida em 450 nm.

6. Resultados e Discussão

6.1 Diâmetro médio das nanopartículas

Mediante as formulações estudadas utilizando a manteiga de cupuaçu *T. grandiflorum*, usando de um planejamento fatorial fracionado 3^3 , foram obtidas nanoemulsões contendo NLS (Figura 11).

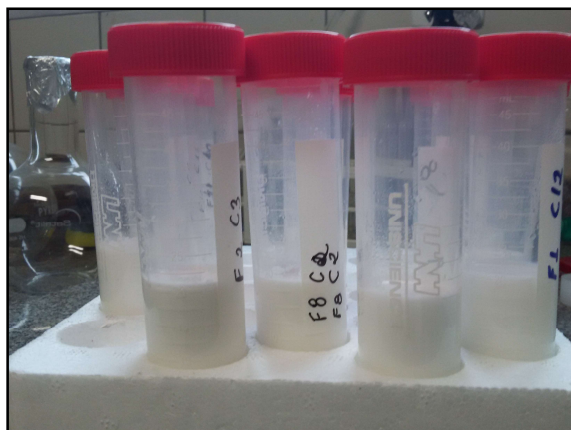


Figura 11. Nanoemulsões contendo Nanopartículas Lipídicas Sólidas - NLS de cupuaçu.

Foram obtidas NLS com tamanhos médios que variaram de 132,2 a 305,4 nanômetros. Na Tabela 3, a seguir, podemos observar a média de todos os 36 resultados obtidos para o diâmetro médio de nanopartícula - ***d.mn*** referente as 12 formulações estudadas em triplicata no experimento.

Corridas	<i>d.mn</i>	PDI	ZP
1	132,2	0,153	-30,5
2	305,4	0,182	-38,4
3	134,8	0,131	-32,5
4	300	0,174	-37,5
5	129	0,171	-30,6
6	286,7	0,276	-41
7	176	0,125	-36,3
8	297	0,208	-37,7
9	205	0,168	-38,3
10	202	0,14	-38,1
11	203,7	0,17	-36,3
12	201,4	0,176	-39,2
Média	214	0,172	-29,83

Tabela 3. Média dos valores obtidos para diâmetro médio de nanopartícula ***d.mn***, Índice de Polidispersividade ***PDI*** e potencial zeta ***ZP***.

O ***d.mn*** representa o tamanho médio da nanopartícula obtida em resposta à interação entre os fatores e seus respectivos níveis decorrentes de cada ensaio do experimento. Os valores obtidos neste experimento ficaram de acordo com resultados descritos por Mehnert e Mäder (2012), em que a média do tamanho da partícula ficou entre 100-200nm, utilizando a técnica de alto cisalhamento e ultrassom.

As respostas obtidas em função de cada corrida do experimento e as interações entre as variáveis mostraram que o fator (**TG**) ou concentração da manteiga de cupuaçu é quem influencia de maneira mais significativa no tamanho obtido da nanopartícula, sendo que a concentração de 2,5% resultou em nanopartículas com um diâmetro médio de 143 nanômetros.

Com a concentração de 5% de manteiga de cupuaçu obtivemos um **d.mn** de 203 nanômetros. E na maior concentração, que foi de 10% de base lipídica, foram obtidas NLS com tamanho médio de 297 nanômetros, conforme podemos observar no gráfico gerado por *DLS* (Gráfico 1) que representa o número total de 36 leituras três de cada uma das 12 corridas.

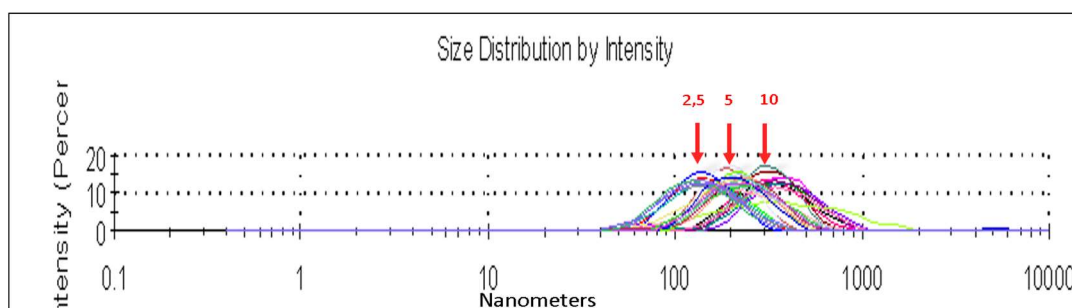


Gráfico1. *DLS* representando o *d.mn* para as diferentes concentrações de TG 2,5%, 5% e 10%, respectivamente

6.2 Índice de Polidispersividade – PDI

O índice de polidispersividade (*Polidispersivity Index – PDI* ou IP indica a distribuição média do tamanho da nanopartícula, sendo que um valor inferior a 0,2 indica uma boa homogeneidade da amostra (Melo *et al.*, 2010), devendo permanecer assim quando uma formulação experimental está devidamente equacionada.

Os valores baixos para o PDI são necessários para a manutenção da estabilidade dos coloides sem que apresentem precipitados ou ainda micropartículas.

6.2.1 Concentração de TG 2,5%

Na concentração de 2,5% da manteiga de cupuaçu foram obtidas nanopartículas lipídicas sólidas com tamanho de 132,2, 134,8, 129 e 176 nanômetros, conforme pode ser observado nos gráficos 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Quando a concentração da manteiga de cupuaçu é de 2,5%, a potência do sonicador – SONIC – em 20% e a velocidade do cisalhador – HSH – em 5.000 Rpm, permite obter NLS com diâmetro médio de nanopartícula - *d.mn* de 132,2 nanômetros (Gráfico 2).

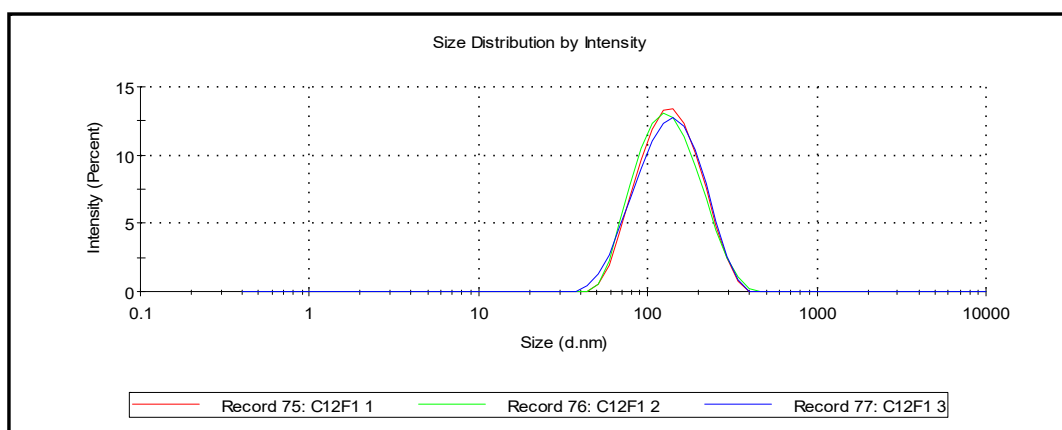


Gráfico 2. DLS representando o *d.mn* de 132,2 nanômetros na concentração de TG 2,5%.

Mantendo o fator **TG** fixo em 2,5% nos gráficos seguintes, e variando apenas os níveis de SONIC e HSH, notamos pequenas variações no tamanho médio da nanopartícula – *d.mn*. Isto se deve à reduzida quantidade de manteiga de cupuaçu na formulação que representa somente 2,5% da amostra analisada. O valor do índice de polidispersividade *PDI* de 0,153 indica a heterogeneidade da formulação, ou seja, o quanto os tamanhos das NLS diferem entre si. Este valor de 0,153 mostra uma boa homogeneidade da formulação.

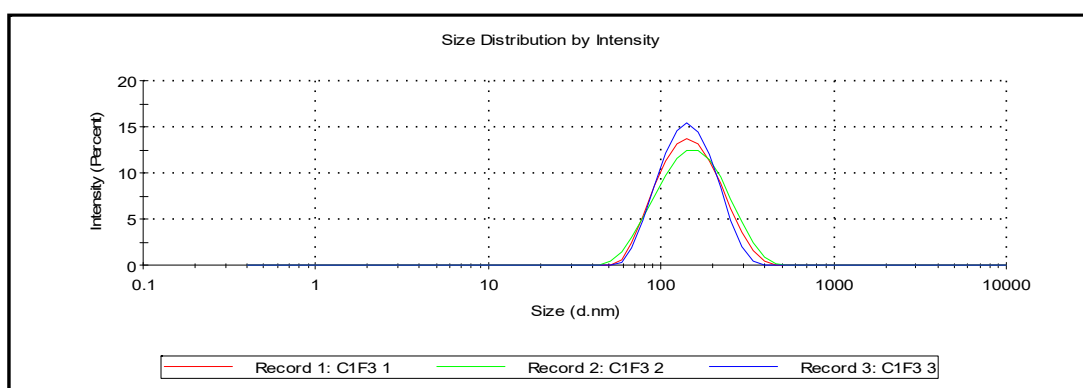


Gráfico 3. *DLS* representando o *d.mn* de 134,8 nanômetros na concentração de TG 2,5%.

O Gráfico 3 mostra que esta formulação apresenta *NLS* com *d.mn* de 134,8 nanômetros com os níveis de SONIC em 60% e HSH em 5.000 Rpm. O gráfico mostra que o aumento da potência do sonicador – SONIC não influenciou positivamente o tamanho da nanopartícula. O *PDI* foi de 0,131.

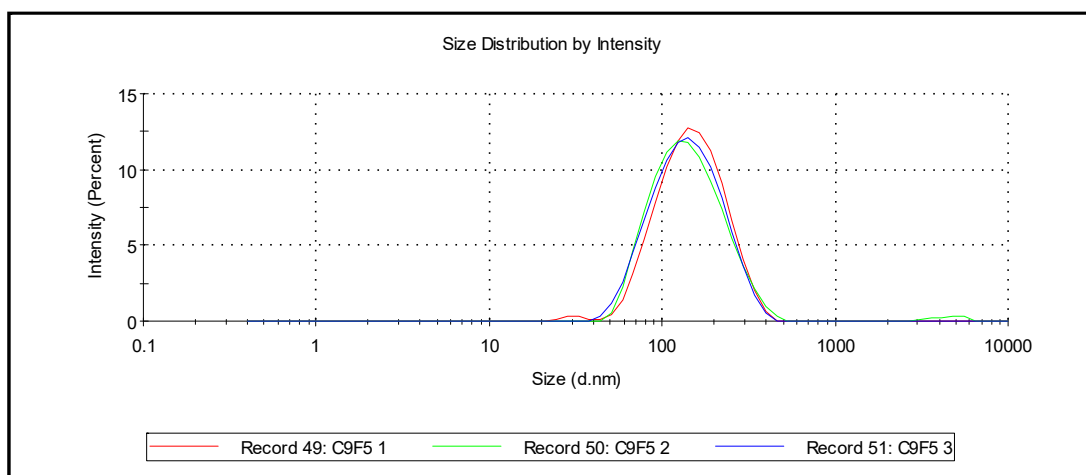


Gráfico 4. *DLS* representando o *d.mn* de 129 nanômetros na concentração de TG 2,5%.

O Gráfico 4 mostra que a formulação analisada possui *NLS* com *d.mn* de 129 nanômetros quando utilizamos o nível do sonicador – SONIC em 20% e o valor de HSH em 15.000 Rpm. As *NLS* obtidas nesta formulação apresentaram o menor *d.mn* 129 nanômetros. O *PDI* foi de 0,171 e mostra que nanopartículas de tamanho reduzido podem ser heterogêneas.

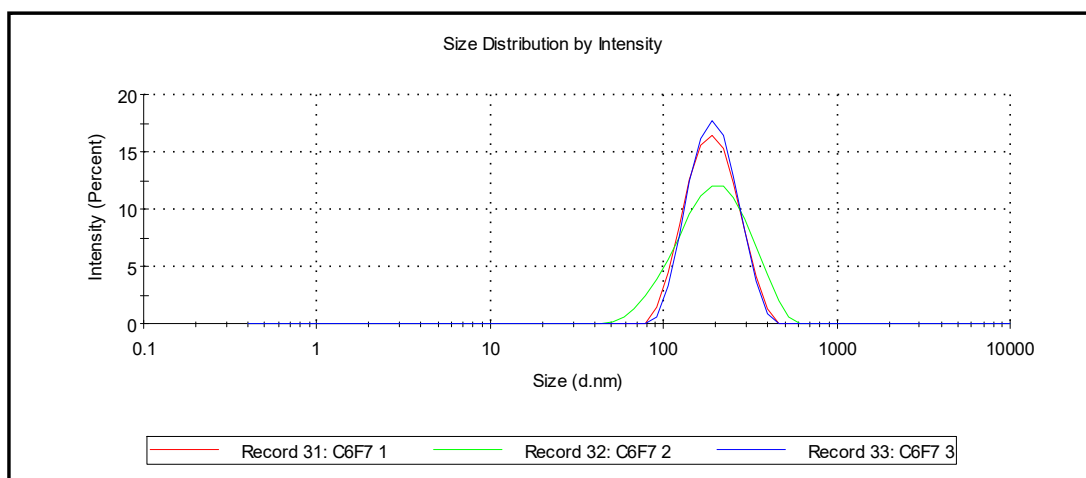


Gráfico 5. *DLS* representando o *d.mn* de 176 nanômetros na concentração de TG 2,5%.

No gráfico 5 observamos um comportamento comum às outras 3 formulações contendo 2,5% da manteiga de cupuaçu **TG**: o tamanho da *NLS* é de 176 nanômetros, com SONIC 60% e HSH15.000 Rpm, resultando em um *PDI* de 0,125.

A média do *d.mn* foi de 143 nanômetros quando utilizados 2,5% de **TG** na formulação das nanoemulsões, as interações entre SONIC e HSH geraram um *PDI* médio de 0,145.

6.2.2 Concentração de TG 5%

Na concentração de 5% da manteiga de cupuaçu foram obtidas nanopartículas lipídicas sólidas com tamanho de 205, 202, 203,7 e 201,4 nanômetros, assim como pode ser observado nos gráficos 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

Fixando a concentração de **TG** em 5% obtemos um *d.mn* de 205 nanômetros, conforme podemos ver no gráfico 6, com SONIC em 40% e HSH com 10.000 Rpm obtivemos um valor de *PDI* de 0,168.

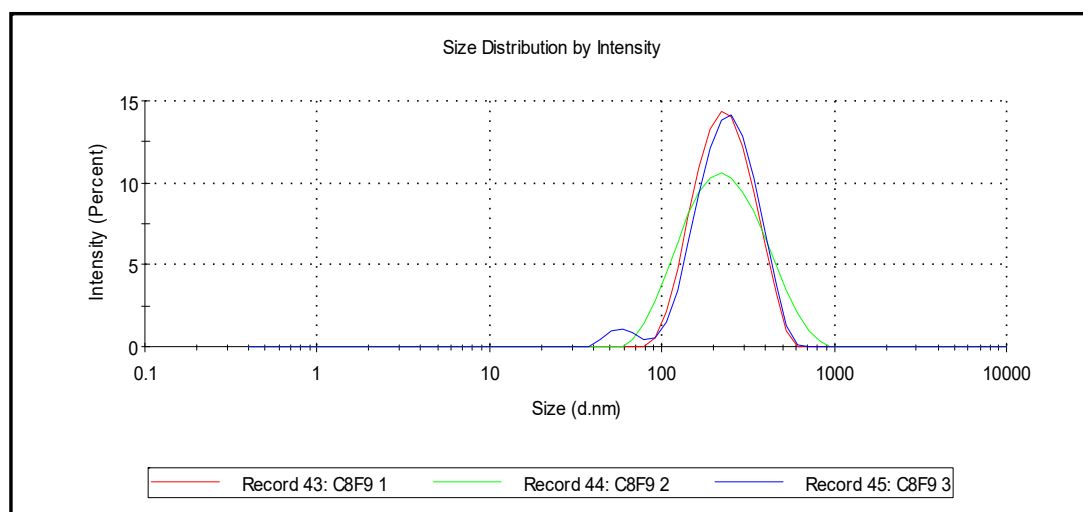


Gráfico 6. *DLS* representando o *d.mn* de 205 nanômetros na concentração de TG 5%.

No gráfico 7, com **TG** em 5%, SONIC em 40% e HSH em 10.000 % e HSH em 10.000 Rpm, obtivemos nanopartículas com *d.mn* de 202 nanômetros e *PDI* de 0,14.

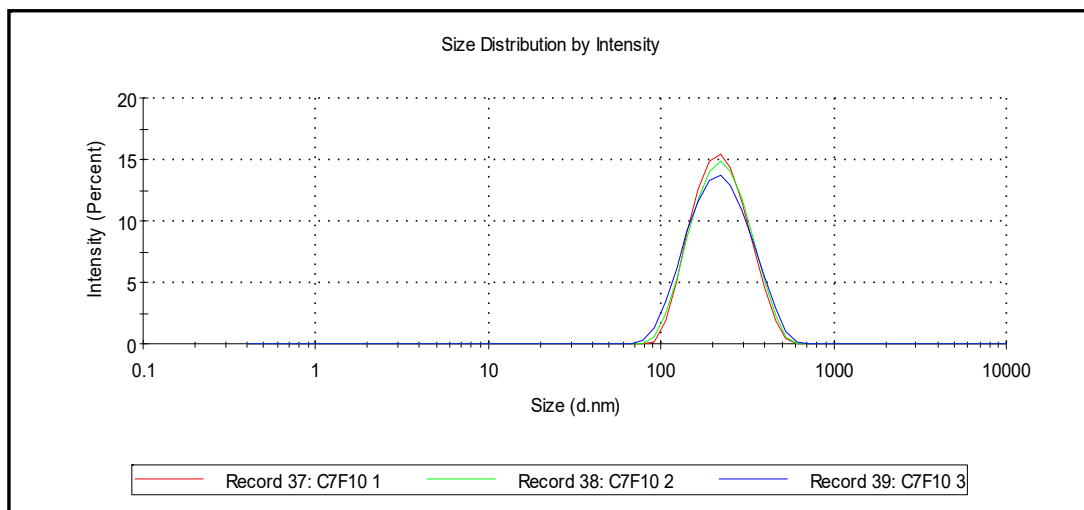


Gráfico 7. DLS representando o *d.mn* de 202 nanômetros na concentração de TG 5%.

O gráfico 8 mostra o *d.mn* em 203,7 nanômetros e *PDI* de 0,17 com os níveis dos fatores SONIC em 40% e HSH em 10.000 Rpm.

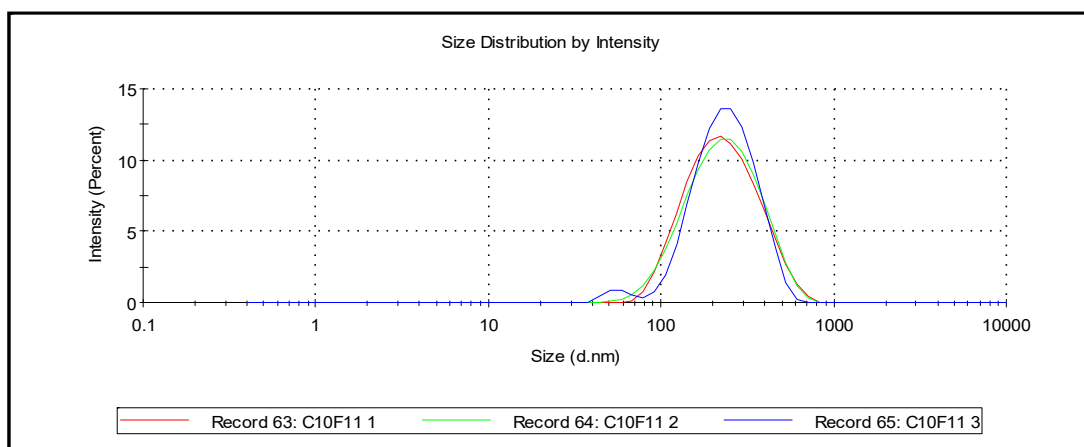


Gráfico 8. DLS representando o *d.mn* de 203,7 nanômetros na concentração de TG 5%.

O gráfico 9 mostra um *d.mn* de 201,4 nanômetros com um *PDI* de 0,176 nos valores de SONIC e HSH em 40% e 10.000 Rpm, respectivamente. Como observado anteriormente, o tamanho médio da nanopartícula tende a se manter quando fixado a sua concentração. Com **TG** 5%, o tamanho médio das NLS foi de 203 nanômetros, com *PDI* médio de 0,163.

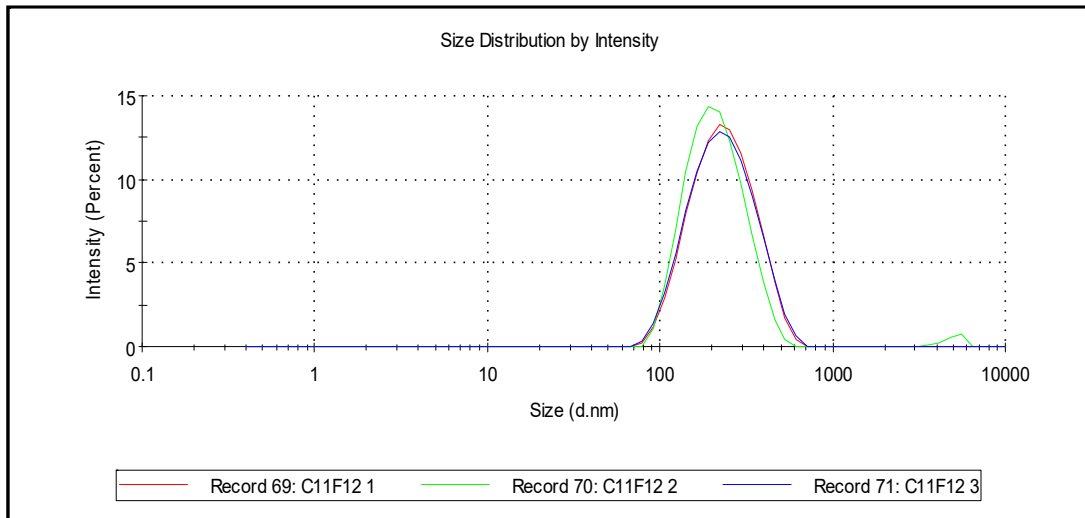


Gráfico 9. *DLS* representando o *d.mn* de 201,4 nanômetros na concentração de TG 5%.

6.2.3 Concentração de TG 10%

Na concentração de 10% da manteiga de cupuaçu foram obtidas nanopartículas lipídicas sólidas com tamanho de 305,4 300, 286,7 e 201,4 nanômetros, conforme pode ser verificado nos gráficos 10, 11, 12 e 13, respectivamente. Como podemos observar nos gráficos seguintes, a maior concentração de manteiga de cupuaçu 10%, produz NLS com *d.mn* maior, e tendem a apresentar agregados, como visto nos gráficos, com uma tendência bimodal das curvas. No gráfico 10 o *d.mn* obtido foi de 305,4 nanômetros, com os fatores de SONIC em 20% e HSH em 5.000 Rpm. O *PDI* foi de 0,182.

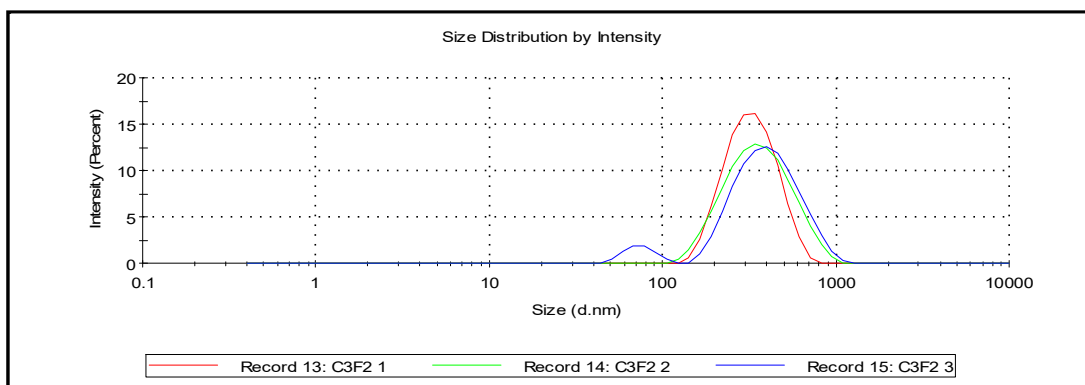


Gráfico 10. *DLS* representando o *d.mn* de 305,4 nanômetros na concentração de TG 10%.

O Gráfico 11 mostra o *d.mn* de 300 nanômetros com um *PDI* de 0,174 quando os níveis dos fatores SONIC e HSH estão em 60% e 5.000 Rpm, respectivamente.

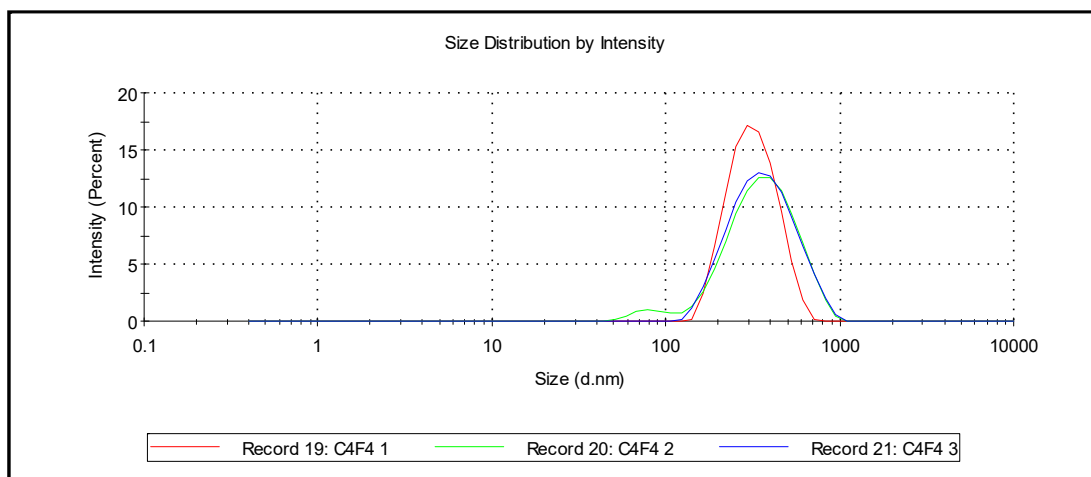


Gráfico 11. *DLS* representando o *d.mn* de 300 nanômetros na concentração de TG 10%.

O gráfico 12 mostra os resultados obtidos por *DLS*, com *d.mn* de 300 nanômetros, um *PDI* de 0,174 com SONIC a 20% e HSH 15.000 Rpm.

A corrida C5F6 2 e evidência a agregação ou formação de micelas nas concentrações de **TG** em 10%.

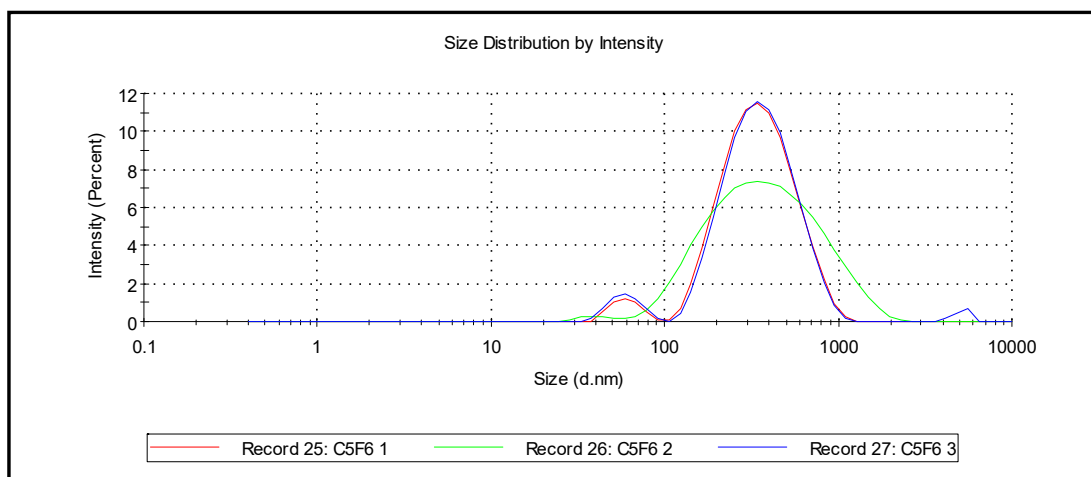


Gráfico 12. *DLS* representando o *d.mn* de 286,7 nanômetros na concentração de TG 10%.

Por fim o gráfico 13 mostra o tamanho da NLS por *DLS* em 297 nanômetros, *PDI* de 0,20 com SONIC em 60% e HSH em 15.000 Rpm. A média do *d.mn* para as quatro formulações foi de 297,2 nanômetros e um *PDI* médio de 0,21.

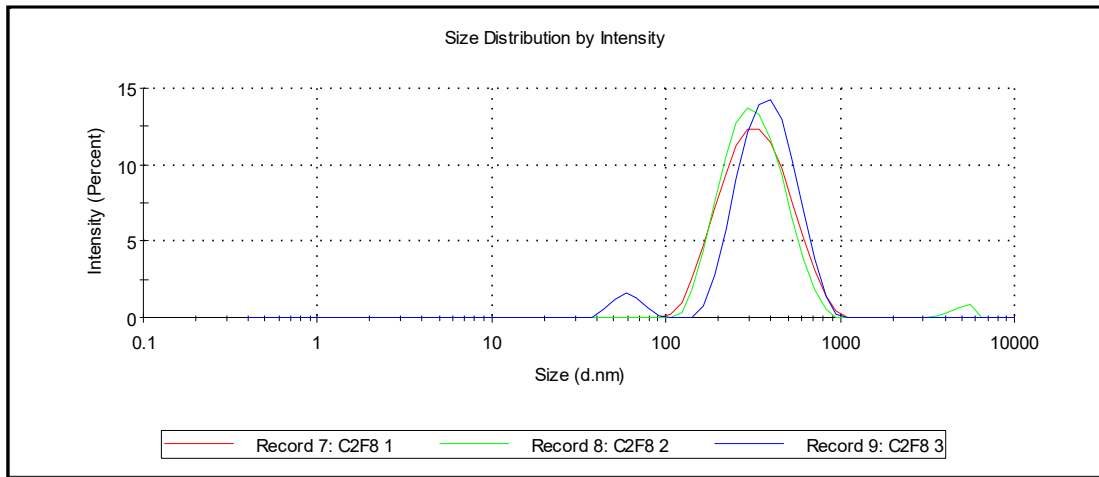


Gráfico 13. DLS representando o *d.mn* de 297 nanômetros na concentração de TG 10%.

6.3 Potencial Zeta

Potencial zeta (ζ) é comumente usado como um indicador de estabilidade de partículas em suspensão e amostras coloidais. A princípio um alto potencial zeta (podendo ser positivo ou negativo) deve fornecer suficiente energia repulsiva às partículas a fim de mantê-las em uma distância que forneça estabilidade à amostra, prevenindo a floculação e agregação (Malvern, 2014).

O potencial médio obtido em triplicata de todas as doses corridas experimentais foi em torno de -29,83 mV, indicando que as formulações possuem uma boa tendência à estabilidade cinética (Negi *et al.*, 2013). O gráfico 14 mostra o comportamento da fase elétrica das amostras evidenciando sua característica negativa.

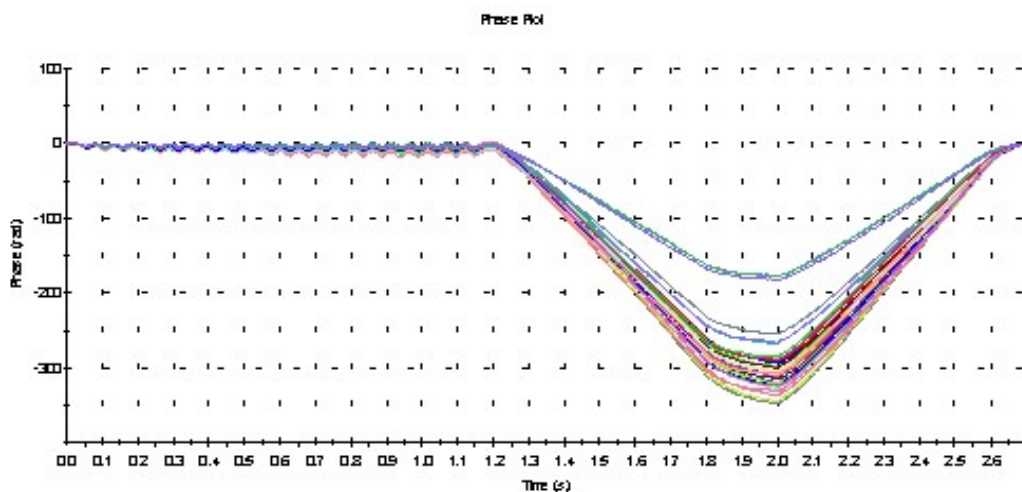


Gráfico 14. Zeta Potencial referente às 36 leituras do experimento com a mobilidade da fase eletroforética nas amostras em função do tempo.

6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

Seguiu-se a obtenção das imagens com a amostra no microscópio de transmissão (MET), como se pode observar na figura 12, abaixo:

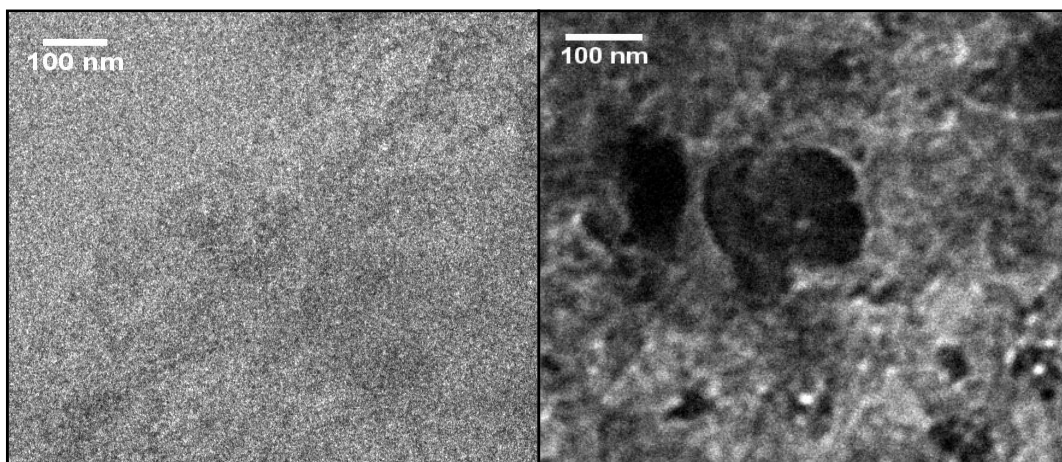


Figura 12. Imagem de TEM das NLS de Cupuaçu em aumento de 80.000 e 200.000x, respectivamente.

6.5 Análise estatística do diâmetro médio da nanopartícula – d.mn

Os resultados obtidos através do planejamento fatorial fracionado 3^3 são representados através do gráfico 15, abaixo, no qual se evidencia a interação entre os fatores do experimento e seus respectivos níveis. O gráfico de Pareto mostra que d.mn aumenta significativamente quando o TG varia de 2,5% a 10%, porém sofre um leve aumento quando o SONIC varia de 20 para 60. Quando variamos o HSH de 5 para 15, isso não provoca uma variação no d.mm, já as

interações TGSONIC, TGHSH e SONICHSH, não possuem significância a 95% de confiança para o aumento do d.mn.

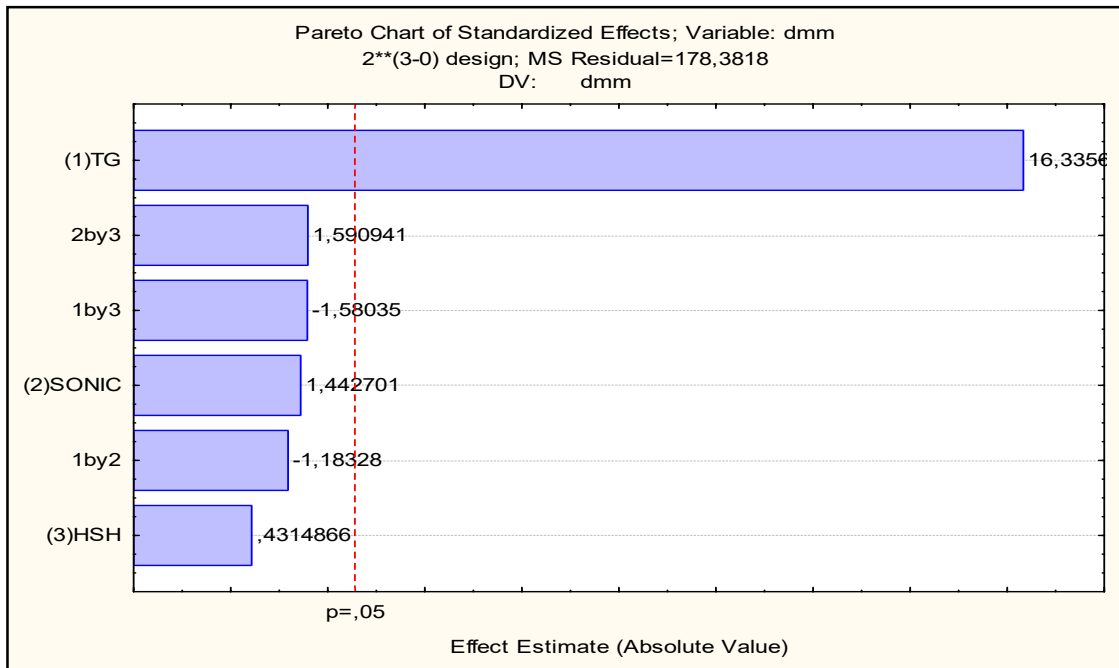


Gráfico 15.Representação do gráfico Pareto mostrando a interação entre os fatores do planejamento fatorial para o d.mn. ($p=0,5$)

6.6 Análise estatística do índice de polidispersividade – PDI

O índice de polidispersividade – PDI – aumenta significativamente quando a concentração de TG vai de 2,5 para 10%, e também sofre um aumento quando o SONIC decresce de 60 para 20. O PDI aumenta consideravelmente quando o HSH passa de 5 para 15. Em suma, quando reduzimos o SONIC para 20, aumentamos o HSH para 15 e TG para 10%, obtemos o máximo de valor de PDI 0,276. Como é possível observar no gráfico 16, as variáveis TG, HSH, SONIC possuem uma significância de 95% de confiança no aumento do PDI, já as interações TGSONIC, TGHSH e SONICHSH, não possuem significância.

As concentrações de 2,5%, 5% e 10% apresentaram um *PDI* médio de 0,145, 0,163 e 0,21 respectivamente. O gráfico 17 da análise hierárquica de cluster – *HCA* mostra a divisão dos grupos conforme seus valores médios do *PDI* e *d.mn* com 0.572 de similaridade.

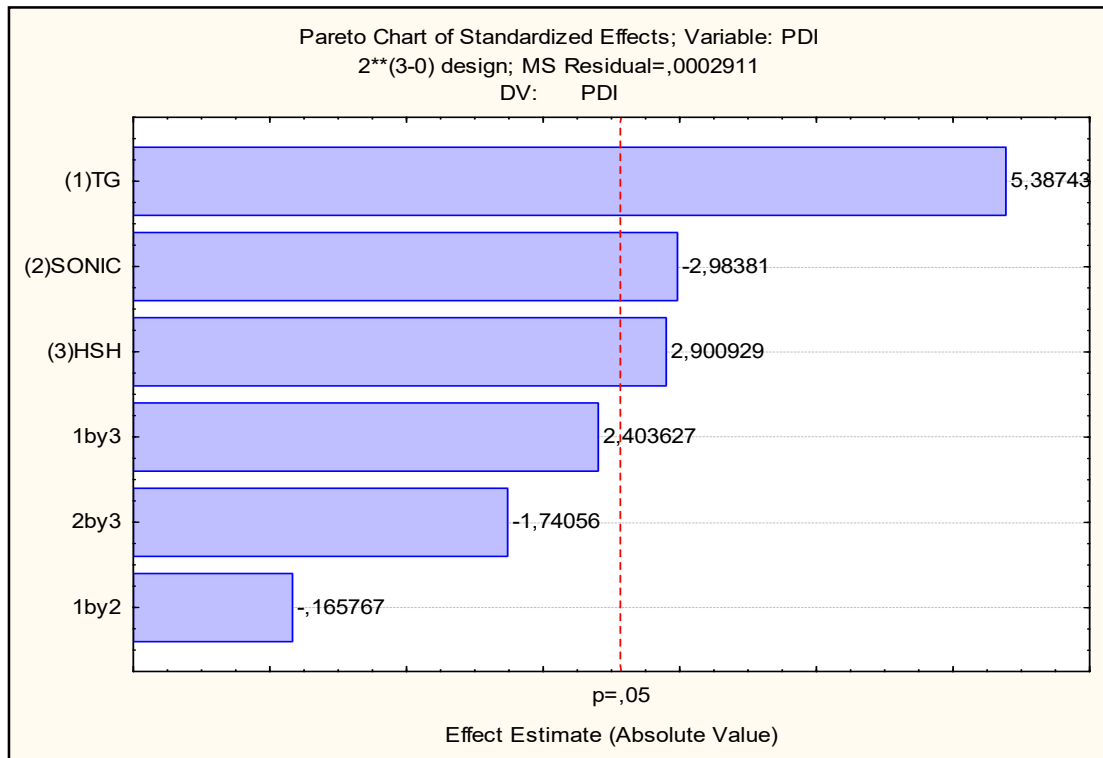


Gráfico 16. Representação do gráfico Pareto mostrando significância da interação entre os fatores no *PDI*, ($p=0,5$).

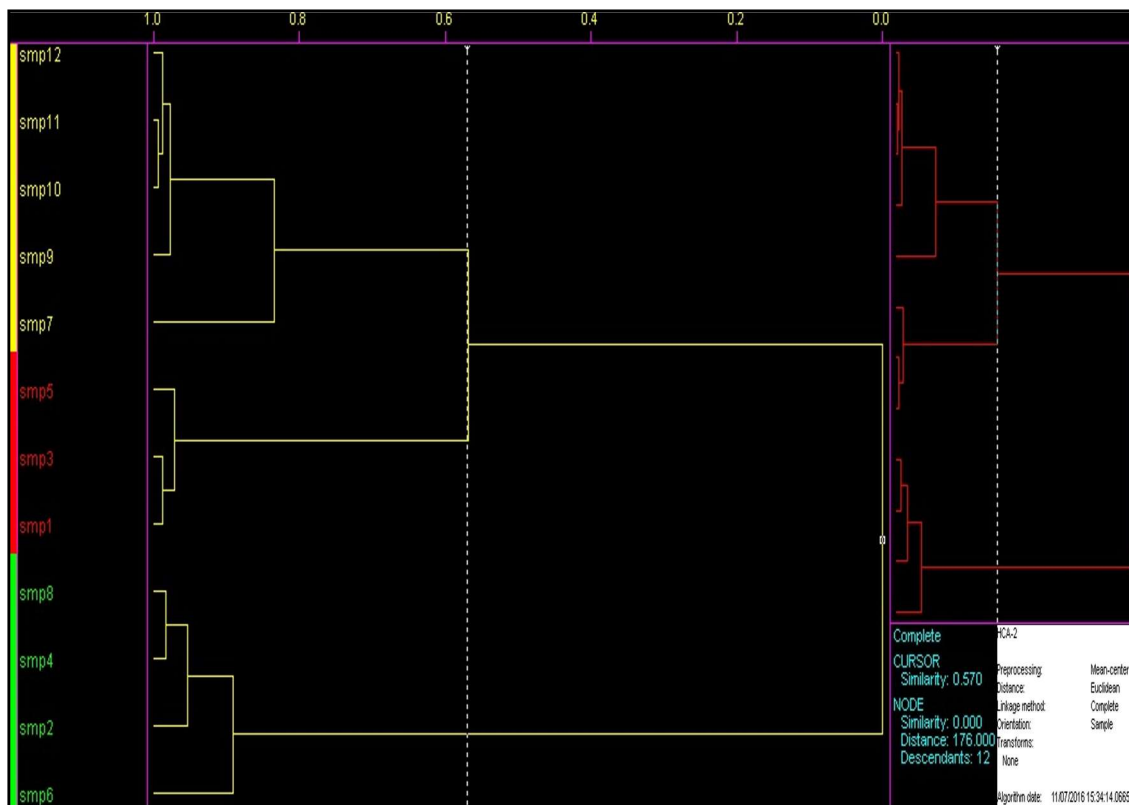


Gráfico 17. HCA representando o *d.mn* e o *PDI* para as diferentes concentrações de **TG** 2,5%, 5% e 10%.

As NLS foram agrupadas em 3 conjuntos distintos por apresentarem valores semelhantes de *PDI* e *d.mn* obtidas no experimento. No entanto, a formulação smp7, mesmo apresentado um *PDI* baixo 0,125, foi agrupada à concentração de 5% por apresentar *d.mn* maior que a média na concentração de 2,5%.

O gráfico 18 de análise dos componentes principais – *PCA* – mostra o agrupamento das formulações de NLS em relação do *PDI* e o *d.mn*. As amostras 6 e 7 mostraram maior e menor variação do índice de polidispersividade 0,276 e 0,125, respectivamente.

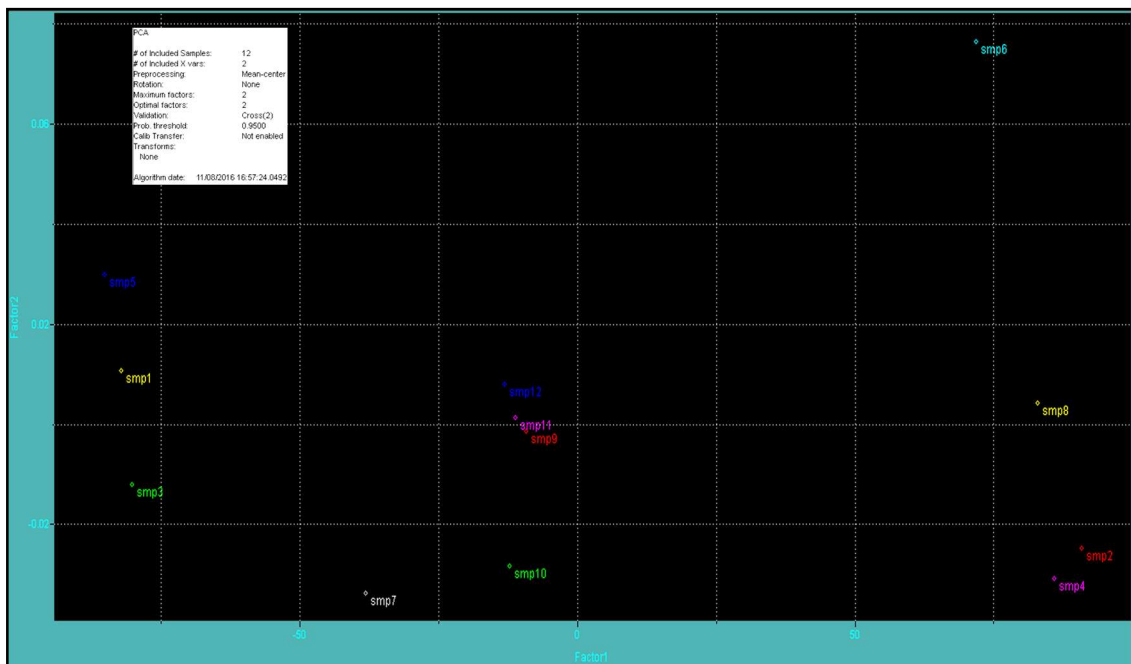


Gráfico 18. Análise dos componentes principais – PCA

6.7 Análise estatística do Potencial Zeta

Neste experimento verificamos que nenhuma das variáveis apresentadas, bem como as suas interações possuem significância para o aumento da resposta de Potencial Zeta, como podemos observar no gráfico 19.

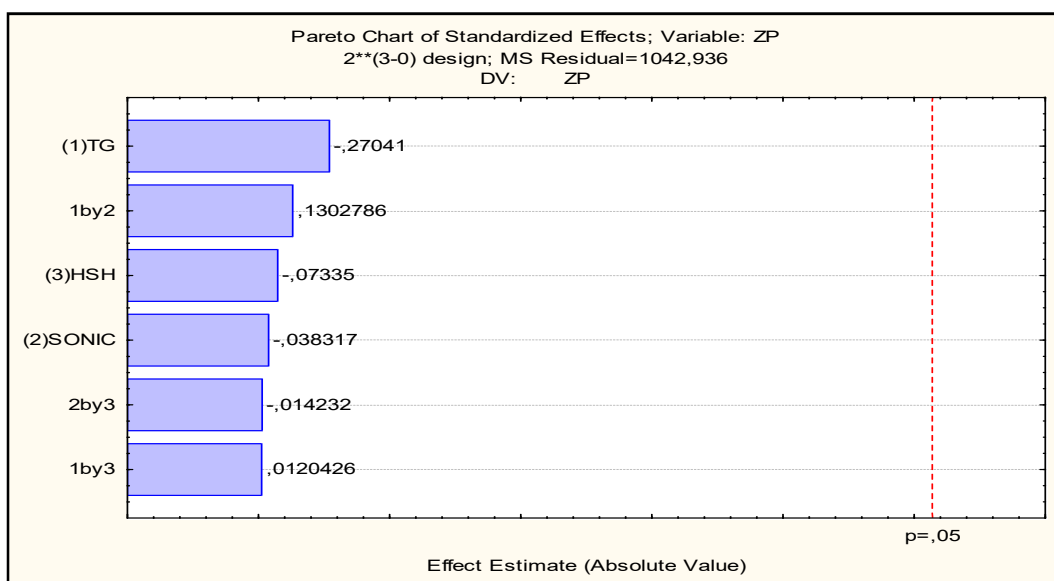


Gráfico 19. Representação do gráfico Pareto mostrando significância da interação entre os fatores no Potencial Zeta, ($p=0,5$).

6.8 Fluorescência molecular

A figura 13 mostra as informações obtidas através da espectroscopia de fluorescência para as nanoemulsões contendo NLS de cupuaçu. Foram detectados picos de fluorescência com intensidade de 345 AU num comprimento de onda de 740 a 760 nanômetros.

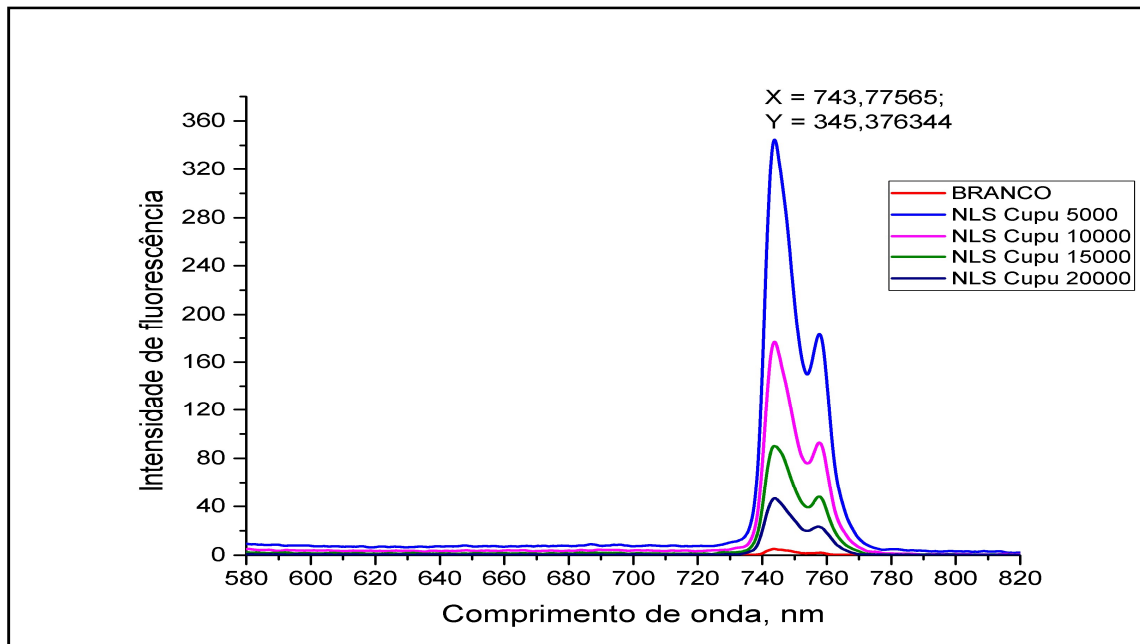


Figura 13: Espectro de Fluorescência da NLS de Cupuaçu

7. CONCLUSÃO

Neste experimento pudemos obter nanopartículas lipídicas sólidas utilizando como matriz lipídica principal a manteiga de cupuaçu *T. grandiflorum*. As NLS foram obtidas por meio de um planejamento fatorial fracionado 3^3 , e apresentaram tamanho compatível com a escala manométrica de 214 nanômetros.

Através do planejamento estatístico, pudemos verificar quais fatores e seus respectivos níveis influenciam nas respostas relacionadas à produção de NLS. O fator que influenciou de maneira mais significativa o d.mn foi a concentração da manteiga de cupuaçu - %TG, sendo que a variação desse componente fez com que o tamanho médio da nanopartícula variasse de 129 nm até 305,4 nm. Fatores como velocidade de cisalhamento HSH e a porcentagem de ultrassom SONIC estatisticamente influenciaram pouco no d.mn neste experimento.

O índice de polidispersividade – PDI – sofre influência direta no aumento da concentração da manteiga de cupuaçu em 10%, juntamente com a baixa potência do ultrassom em 20% e a alta velocidade do cisalhador em 15.000 rpm, que produziu um *PDI* médio de 0,276.

O potencial Zeta não sofre influência alguma dos fatores avaliados no experimento, pois, sua carga elétrica varia em função da composição química estrutural das NLS. Estas são formadas basicamente por radicais COOH que complementam a dupla camada elétrica por cargas negativas já que os surfactantes utilizados nas formulações possuem natureza não iônica.

A espectroscopia de fluorescência molecular mostrou que as emulsões de NLS de cupuaçu apresentam fluorescência entre 740 e 760 nanômetros. Esta faixa de fluorescência está dentro da janela fotodinâmica compreendida entre 600 e 800 nanômetros evidenciando possibilidades futuras em novos estudos.

De modo geral, a produção de nanopartículas lipídicas sólidas, a partir da manteiga de cupuaçu, tem se mostrado cada vez mais promissora uma vez que este bioproduto apresenta baixo custo e grande disponibilidade regional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos.** 2002. Tese de diutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Agronomia – Genética e melhoramento de plantas. Piracicaba, São Paulo.

ALVES, Moisés Rafael. **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental.** Embrapa Amazônia Oriental. Documentos técnicos 16. 137p. Belém, 1999.

ANA-MARIA MANEA, C. A., AURELIA MEGHEA. GREEN TEA EXTRACT LOADED INTO SOLID LIPID NANOPARTICLES. **UPB Scientific Bulletin**, v. 76, n. 2, 2014.

ASSIS, L. M. D. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

ASSIS, L. M. D.; ZAVAREZE, E. D. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. D. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

ANDRADE, F. G.; SÁ, C. P.; ALMEIDA, N. F. D. **Uma visão prospectiva do cupuaçu no Acre:** Vilas Nova Califórnia e Extrema, RO. 1998

BONIFÁCIO, B. V.; DA SILVA, P. B.; DOS SANTOS RAMOS, M. A.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1, 2014.

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

COHEN, Kelly de Oliveira; JACKIX, Marisa de Nazaré H. **Características Químicas e Física da Gordura de Cupuaçu e da Manteiga de Cacau**. Embrapa Cerrados. Documentos técnicos 269. 22p. Planaltina, 2009.

COHEN, K. D. O. et al. **Processamento tecnológico das amêndoas de cacau e de cupuaçu**. Embrapa Amazônia Oriental, 2003.

COLOMÉ, L. M. et al. Theospheres Based on Theobroma Grandiflorum Seed Butter: Development of Innovative Nanoparticles for Skin Application. **Soft Materials**, v. 8, n. 2, p. 72-88, 2010.

CORAL, R. D. S. O cupuaçu: boa opção para investimento. **O cupuaçu: boa opção para investimento**, 1990.

DE OLIVEIRA COHEN, K.; JACKIX, M. D. N. H. **Características Químicas e Física da Gordura de Cupuaçu e da Manteiga de Cacau**. 2009.

DI STASI, L. C. L., H. A. CLÉLIA. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

DOS SANTOS, G. S. P., G. G.; BENDER, E. A.; COLOMÉ, L. M.; GUTERRES, S. S. DE; CARVALHO, D.; CANEMA M.; WEISSMÜLLER, G. Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Lipídicas Destinadas à Aplicação tópica de Dapsona. **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388-1394, 2012.

FADDA, P. M., M.; CABOI, F.; PIRAS, S.; LAZZARI, P. Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: Influence of microemulsion microstructure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 446, n. 1-2, p. 166-175, 3/25/ 2013.

FENG, L.; MUMPER, R. J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. **Cancer Lett**, v. 334, n. 2, p. 157-75, Jul 1 2013.

FLECK, C. A.; NEWMAN, M. Advanced Skin Care - A Novel Ingredient. **J Am Coll Clin Wound Spec**, v. 4, n. 4, p. 92-4, Dec 2012.

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE POLPA DE CUPUAÇU CONGELADA E IRRADIADA. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2011, In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2.; CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE FRUTOS TROPICAIS, 1., 2010, Aracaju. Avanços em tecnologia de alimentos: anais. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2010. 1 CD-ROM. p. 778-781.

GAMBHIRE, M. S. G. M. R. B. V. M. Statistical optimization of dithranol-loaded solid lipid nanoparticles using factorial desing. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, 2011.

GUO, T. Z., Y.; ZHAO, J.; ZHU, C.; FENG, N. Nanostructured lipid carriers for percutaneous administration of alkaloids isolated from Aconitum sinomontanum. **J Nanobiotechnology**, v. 13, p. 47, 2015.

GUTERRES, G. S. D. S. G. G. P. E. A. B. L. M. C. E. S. S. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DESTINADAS À APLICAÇÃO TÓPICA DE DAPSONA. **Quimica Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388-1394, 2012.

GONÇALVES, M. V. V. A.; DA SILVA, J. P. L.; MATHIAS, S. P.; ROSENTHAL, A.; DE ARAUJO CALADO, V. M. Caracterização físico-química e reológicas da polpa de cupuaçu congelada (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Exatas & Engenharia**, v. 3, n. 7, 2014.

GOLMOHAMMADZADEH, S.; MOKHTARI, M.; JAAFARI, M. R. Preparation, characterization and evaluation of moisturizing and UV protecting effects of topical solid lipid nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 683-690, 2012.

GONDIM, T.M de S. ET al. **Aspectos da produção de Cupuaçu**. Embrapa Acre. Documentos técnicos 67. 43p. Rio Branco, 2001. ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, Theobroma grandiflorum (Willd. ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. 2002. Universidade de São Paulo

ANA-MARIA MANEA, C. A., AURELIA MEGHEA. GREEN TEA EXTRACT LOADED INTO SOLID LIPID NANOPARTICLES. **UPB Scientific Bulletin**, v. 76, n. 2, 2014.

ASSIS, L. M. D. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

BONIFACIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

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

COHEN, K. D. O. et al. **Processamento tecnológico das amêndoas de cacau e de cupuaçu**. Embrapa Amazônia Oriental, 2003.

COLOMÉ, L. M. et al. Theospheres Based on Theobroma Grandiflorum Seed Butter: Development of Innovative Nanoparticles for Skin Application. **Soft Materials**, v. 8, n. 2, p. 72-88, 2010.

CORAL, R. D. S. O cupuaçu: boa opção para investimento. **O cupuaçu: boa opção para investimento**, 1990.

DE OLIVEIRA COHEN, K.; JACKIX, M. D. N. H. Características Químicas e Física da Gordura de Cupuaçu e da Manteiga de Cacau. 2009.

DI STASI, L. C. L., H. A. CLÉLIA. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

DOS SANTOS, G. S. P., G. G.; BENDER, E. A.; COLOMÉ, L. M.; GUTERRES, S. S. DE; CARVALHO, D.; CANEMA M.; WEISSMÜLLER, G. Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Lipídicas Destinadas à Aplicação tópica de Dapsona. **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388-1394, 2012.

FDA, F. A. D. A.-. **Guideline de Segurança de Nanomateriais em Produtos Cosméticos.** Cosmetics & Toiletries 27 2015.

FENG, L.; MUMPER, R. J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. **Cancer Lett**, v. 334, n. 2, p. 157-75, Jul 1 2013.

FLECK, C. A.; NEWMAN, M. Advanced Skin Care - A Novel Ingredient. **J Am Coll Clin Wound Spec**, v. 4, n. 4, p. 92-4, Dec 2012.

FREITAS, D. et al. AVALIAÇÃO SENSORIAL DE POLPA DE CUPUAÇU CONGELADA E IRRADIADA. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2011, In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2.; CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE FRUTOS TROPICAIS, 1., 2010, Aracaju. Avanços em tecnologia de alimentos: anais. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2010. 1 CD-ROM. p. 778-781.

GAMBHIRE, M. S. G. M. R. B. V. M. Statistical optimization of dithranol-loaded solid lipid nanoparticles using factorial desing. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, 2011.

GUO, T. Z., Y.; ZHAO, J.; ZHU, C.; FENG, N. Nanostructured lipid carriers for percutaneous administration of alkaloids isolated from Aconitum sinomontanum. **J Nanobiotechnology**, v. 13, p. 47, 2015.

GUTERRES, G. S. D. S. G. G. P. E. A. B. L. M. C. E. S. S. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DESTINADAS À APLICAÇÃO TÓPICA DE DAPSONA. **Quimica Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388-1394, 2012.

HOU, D. et al. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v. 24, n. 10, p. 1781-1785, 2003.

JOSÉ THOMAZINI, M. Flutuação populacional e intensidade de infestação da broca-dos-frutos em cupuaçu. **Sci. agric.(Piracicaba, Braz.)**, v. 59, n. 3, 2002.

JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. **Química nova na escola**, v. 9, p. 9-13, 1999.

LANNES, S.; MEDEIROS, M.; GIOIELLI, L. Physical interactions between cupuassu and cocoa fats. **Grasas y Aceites**, v. 54, n. 3, p. 253-258, 2003. ISSN 1988-4214.

LIMA, M. C. A.; DE ALMEIDA, M. J. P. Articulation of texts on nanoscience and nanotechnology for the initial training of physics teachers. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, p. 1-9, 2012.

MALVERN, L. I. **Measuring Surface Zeta Potential using the Surface Zeta Potential Cell**. Application Note. Worcestershire, UK: 7 p. 2014.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 6, n. 2, 2009. ISSN 1808-0804.

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

MEHNERT, W. K., MÄDER. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supplement, n. 0, p. 83-101, 2012.

MEHNERT, W. M., KARSTEN. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.

_____. Solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MELO, N. F. S. D. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, p. 65-69, 2010.

MOREIRA, J. D. S. D. A. **Desidratação de polpa de cupuaçu (theobroma grandiflorum) em estufa com circulação de ar forçado**. 2009. Dissertação de Mestrado Agronomia - Produção Vegetal Universidade Federal do Acre - UFAC, Rio Branco, Acre.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H. et al. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 4, p. 458-462, 1997.

NEGI, J. S. et al. Development of solid lipid nanoparticles (SLNs) of lopinavir using hot self nano-emulsification (SNE) technique. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 1-2, p. 231-9, Jan 23 2013.

OLIVEIRA, L. Benefícios comprovados de óleos Brasileiros. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, 2003.

P. AHLIN, J. K., J. ŠMID-KOBAR. Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions **Acta Pharmaceutica**, v. 48, p. 257–267, 1998.

P. EKAMBARAM, A. A. H. S. A. K. P. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. **Sci. Revs. Chem. Commun.:** 2012 v. 2(1),, p. 80-102, 2012.

ROGEZ, H. et al. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 4, p. 380-384, 2004.

SAHU, A. K.; KUMAR, T.; JAIN, V. Formulation Optimization of Erythromycin Solid Lipid Nanocarrier Using Response Surface Methodology. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SHAH, B. K., DIGNESH; BHATT, HIMANSHU; MISRA, MANJU; PADH, HARISH. Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 54-66, 2015.

SOUTO, E. B. S., PATRÍCIA.; SANTANA, MARIA HELENA A.; PINHO, SAMANTHA C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

SOUZA, A. D. G. et al. **Boas práticas na colheita e pós-colheita do cupuaçu**. Circular Técnica, 36. OCIDENTAL, E. A. Manaus/Itacoatiara: 8 p. 2011.

SUFRAMA. Projeto potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica. Cupuaçu. . **Superintendência da Zona Franca de Manaus**, v. 4, p. 71, 2003.

TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 29-43, 2013.

TEIXEIRA, G. L. Estudo da estabilidade e do comportamento reológico de emulsões de gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) com diferentes tensoativos. 2014.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p. 1532-1555, 12/1/ 2006.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7-22, 1// 2014.

_____. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 86, n. 1, p. 7-22, Jan 2014.

WEISS, J. et al. Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 146-154, 2008.

WISSING, S. A. K., O; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. 9, p. 1257-72, May 7 2004.

YANG, H. et al. New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* ("Cupuaçu"). **Journal of natural products**, v. 66, n. 11, p. 1501-1504, 2003.

YANG, Y. et al. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. **J Colloid Interface Sci**, v. 418, p. 261-72, Mar 15 2014.

YANG, Y. et al. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 418, n. 0, p. 261-272, 3/15/ 2014. ISSN 0021-9797.