



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Síntese e caracterização de nanoemulsão de óleo de canola e nanopartículas de quitosana contendo acetato de retinol para serem veiculadas por película comestível elaborada pela combinação de biopolímeros para revestimento de frutas

Alessandra Barreto da Silva

Brasília, DF

2015

Alessandra Barreto da Silva

Síntese e caracterização de nanoemulsão de óleo de canola e nanopartículas de quitosana contendo acetato de retinol para serem veiculadas por película comestível elaborada pela combinação de biopolímeros para revestimento de frutas

Orientador: Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília, DF

2015

Eu quero dedicar esta dissertação de mestrado aos que junto comigo vivenciam o amor...

...meus amados pais, Mônica e Nilton Barreto, por terem abdicado do próprio conforto em prol dos meus estudos. Por terem feito o possível e o impossível, desde a creche até hoje, para me prover todo o apoio que precisei;

...meus irmãos Tiago e Jeane Barreto, pela infância incrível;

...meu grande companheiro, Paulo Strobel, parceiro de vida, sonhos e planos, por cada sorriso de amor que me arranca e aos que chegaram na minha vida junto com ele, em especial ao casal Delzely Strobel e João Augusto, que têm a minha admiração e respeito;

...minha família Mutuca, pelas lindas tardes no quintal da vó e em especial o vô Geraldo que me faz suspirar de saudade (*in memoriam*);

...meus caríssimos amigos Camila Evangelista, Fabiana Vilanova, Tatiana Marinho, Clarissa Jahn, Kelly Sampaio, Marcos Passos, Amanda e Patrícia Chacel, Philipe Nagô, os sempre feios Alex Lima, Israel Faria, Thomaz Monclaro e Dirceu Tissiani, Giulia e André Borelli e Tadeu Luz, por serem exemplos de sucesso. Cada um, do seu jeito, em algum momento e acreditando no meu potencial, me impulsionou a ir além do que eu mesma acreditava.

E eu gostaria de agradecer ...

À Universidade de Brasília, sua estrutura física e excelente corpo docente me proporcionaram a valiosa possibilidade de ensino de qualidade;

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Espectrometria de Massa, Sala de Nanobiotecnologia, por toda estrutura que me foi oferecida para o desenvolvimento deste trabalho;

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAP-DF, pelo apoio financeiro;

Aos colegas de trabalho, principalmente Giselle Zayra, Vanessa Albernaz, Luciane Silva e José Cardozo, por todas as discussões, troca de ideias, ajuda e incentivo;

Ao Dr. Cláudio Lopes pela ajuda com as análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão;

Às professoras Zulmira Lacava e Sandra Arruda, pelas correções e valiosas sugestões na ocasião da qualificação do projeto de mestrado.

Aos professores João Paulo Figueiró Longo e Luiz Borgo, pela leitura atenta, correções e sugestões;

Ao Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva, meu orientador. Pela excelente orientação, pelo exemplo de professor e pesquisador, sempre entusiasmado e inspirado com a ciência. Obrigada pela incansável disposição em me ensinar, discutir e ajudar. Estou certa de que sem essa disposição meu crescimento não teria sido tão intenso.

Resumo

Uma das inovações da nanotecnologia na nutrição é a possibilidade de películas comestíveis formadas por biopolímeros veicularem nutrientes nanoencapsulados e conseqüentemente enriquecer nutricionalmente o alimento revestido. A nanoencapsulação protege um ativo sensível à elementos pró-oxidantes por constituir uma barreira fisicoquímica a este. A vitamina A é um importante nutriente a ser considerado, pois a sua deficiência é um problema nutricional no mundo e é um nutriente sensível a tais elementos. Este estudo se propôs a sintetizar e caracterizar uma nanoemulsão de óleo de canola e nanopartículas de quitosana contendo acetato de retinol para serem incorporadas em uma película comestível elaborada pela combinação de amidos de milho e de mandioca para revestimento de maçãs. A presença de acetato de retinol foi confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF. Sintetizou-se nanoemulsões de óleo de canola (caNE) com diâmetro hidrodinâmico médio de $228,83 \pm 11,83$ nm, com instabilidade coloidal incipiente (potencial- ζ de $-29,3 \pm 0,0$ mV) e polidispersas ($PdI = 0,708 \pm 0,021$), com formação de gotículas oleosas com formato esférico, isoladas e sem formação de agregados. O método de síntese foi reproduzível e as nanoemulsões permaneceram estáveis por até 60 dias após sua obtenção. Estas aprisionaram 100% do acetato de retinol e a liberação deste ativo foi mínima ($<20\%$) em fluido mimético gástrico (FMG) e relevante em fluido mimético intestinal (FMI) ($>80\%$). As nanopartículas de quitosana (qsNP) formadas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio igual à $1398,00 \pm 52,71$ nm, divididas em duas subpopulações, a maior com ± 100 nm e a menor ± 1000 nm, sendo dessa forma considerado um nanossistema composto por micropartículas e nanopartículas. Estas qsNP apresentaram excelente estabilidade coloidal (potencial- $\zeta = 54,2 \pm 0,7$ mV) e baixa polidispersão ($PdI = 0,365 \pm 0,035$). O método de obtenção das qsNP foi reproduzível, propiciando nanopartículas estáveis até 21 dias após a sua obtenção. A eficiência de encapsulação das qsNP foi de 98,67% e a liberação do ativo ocorreu principalmente em FMG ($>100\%$). Houve formação de solução filmogênica (SF) transparente, incolor e inodora. As maçãs submetidas a revestimento, independente do tratamento recebido apresentaram boa aparência geral e não sofreram alterações de brilho e cor ao longo dos dez dias de observação. O grupo de maçãs revestidas com SF, SF e caNE e caNE perderam mais massa (%) do que as do grupo tratado com água. Contudo, o grupo de maçãs tratadas com SF e qsNP e qsNP foram os com menores perdas de massa (%). Conclui-se que houve a formação de nanoestruturas por dois métodos diferentes. A otimização dos métodos possibilitou a formação de nanoestruturas capazes de aprisionar acetato de retinol com alta eficiência de encapsulação. Dentre as duas, a caNE ofereceu o perfil de liberação mais indicado para o nanoaprisionamento de acetato de retinol pois a liberação é retardada em FMG e rápida em FMI, protegendo este ativo até o local alvo da sua liberação. Ambas nanoestruturas são passíveis de serem aplicadas às maçãs pela película comestível de amidos podendo ser empregadas no enriquecimento nutricional de alimentos.

Palavras-Chave: Nanoencapsulação, Revestimentos Comestíveis, Películas Comestíveis, Vitamina A, Retinol, Biopolímeros, Quitosana, Amido.

Abstract

One of nanotechnology's innovations in nutrition is the possibility of edible films formed by biopolymers entrap nanocapsulated nutrients and hence, enhance the nutritional value of the coated food. The nanoencapsulation protects sensitive actives from pro-oxidant elements mainly because it constitutes a physical and chemical barrier. The vitamin A is an important nutrient to be considered to nanoentrapment, because its deficiency is a nutritional problem around the world and is a sensitive nutrient to such pro-oxidant elements. This study aimed to synthesize and characterize a nanoemulsion of canola oil and also chitosan nanoparticles containing retinol acetate to be incorporated into an edible film prepared by a combination of corn and cassava starches to coat apples. The presence of retinol acetate was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry. Canola oil nanoemulsions were synthesized (caNE) and reached an average hydrodynamic diameter of 228.83 ± 11.83 nm, with incipient colloidal instability (Zeta potential of -29.3 ± 0.0 mV), and polydisperse (PdI = 0.708 ± 0.021). There was the formation of oily droplets with spherical shape, isolated and without aggregates. The synthesis method was reproducible and nanoemulsions remained stable up to 60 days after formulation. These entrapped 100% of retinol acetate and the release of this active was low (<20 %) in mimetic gastric fluid (MGF) and was mainly released in mimetic intestinal fluid (MIF) (>80%). The nanoparticles of chitosan (qsNP) had an average hydrodynamic diameter of 1398.00 ± 52.71 nm, divided into two subpopulations, abundant with ± 100 nm and the lowest with ± 1000 nm. These qsNP showed excellent colloidal stability (Zeta potential = 54.2 ± 0.7 mV) and low polydispersity (PdI = 0.365 ± 0.035). This method was reproducible, providing stable nanoparticles within 21 days. The encapsulation efficiency of the qsNP was 98.67% and the release profile indicated that it occurs mainly in MGF (>100%). It was formed a film solution (SF) clear, colorless and odorless. The coated apples, independent of treatment, showed good general appearance and did not undergo brightness and color changes over the ten days of observation. The group of apples coated with FS, FS and caNE and caNE lost more mass (%) than the group treated with water. However, the coated apples treated with FS and qsNP and qsNP lost less mass (%). It is concluded that there was the formation of nanostructures by two different methods. The optimization of these methods allowed the formation of nanostructures able to nanoencapsulate retinol acetate with high encapsulation efficiency. Among the two nanostructures, the caNE offered the most appropriate release profile for retinol acetate since the release was delayed at MGF and very quick at MIF, protecting this active until it reached the target site of release. Both nanostructures are capable of being carried by starch edible film and may be used in nutritional food fortification.

Key Words: Nanoencapsulation, Edible Coatings, Edible Films, Vitamin A, Retinol, Biopolymers, Chitosan, Starch.

Lista de Figuras

1	Cálice do Licurgo sob diferentes incidências de luz. Fonte: Museu Britânico - http://www.britishmuseum.org	17
2	Estrutura básica de retinoides e exemplos de retinoides dietéticos pré e pró vitamina A.	24
3	Diagrama representativo da estratégia experimental seguida para a obtenção da película com acetato de retinol nanoestruturado incorporado. Fonte: a própria autora.	38
4	Configuração utilizada para a preparação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. Adaptado de Muera-Huertas (2010).	44
5	Esquema da diálise utilizada para verificar a taxa de liberação do acetato de retinol das nanoestruturas em meio fisiológico. Fonte: adaptada do próprio fornecedor. Disponível em http://www.spectrumlabs.com/dialysis/Fund.html	48
6	Espectros de massa molecular do acetato de retinol em pó diluído em 1:10, 1:100 e 1:1000 e da Matriz DHB sem o acetato de retinol.	52
7	Estrutura molecular do acetato de retinol e do retinol. Adaptado de TANUMIHARDJO (2013) [106].	53
8	Curva de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de partículas verificadas por espectroscopia de fotocorrelação nas nanoemulsões com razões de surfactante/óleo de 0,1, 0,4, 1,0, 2,3 e 9,0 (caNE(0,1), caNE(0,4), caNE(1,0), caNE(2,3) e caNE(9,0), respectivamente).	56
9	Curva de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número verificados por espectroscopia de fotocorrelação das nanoemulsões de óleo de canola com acetato de retinol e os grupos controle (sem acetato retinol) emulsionadas por 30 segundos à 21500 rpm (caNE(30) e caNE(30)C) ou por 120 segundos à 43000 rpm (caNE(120) e caNE(120)C), no dia da formulação.	59
10	Curva de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número verificados por espectroscopia de fotocorrelação das nanopartículas de quitosana (qsNP) contendo acetato de retinol ou não(qsNPC) obtidas por nanoprecipitação verificadas nos dia da obtenção das formulações.	60

11	Curva de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de partículas verificados por espectroscopia de fotocorrelação das qsNP aprisionando acetato de retinol, variando o gotejamento da fase orgânica, lento (1500 $\mu\text{L/h}$) ou rápido (3000 $\mu\text{L/h}$), na fase aquosa mantida em agitação magnética moderada (600 rpm) ou vigorosa (1200 rpm).	62
12	Curvas de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de partículas verificadas por espectroscopia de fotocorrelação das qsNP(0), qsNP(30), qsNP(60), qsNP(120) e qsNP(180).	64
13	Imagens de microscopia eletrônica de transmissão e histograma de distribuição de frequência dos diâmetros das gotículas presentes nas nanoemulsões a) caNE (com acetato de retinol) e b) caNEC (sem o acetato de retinol).	65
14	Imagens de microscopia de força atômica obtidas em modo dinâmico das qsNP (com acetato de retinol) antes de serem submetidas ao ultra-turrax.	66
15	Imagens de microscopia de força atômica obtidas em modo dinâmico das qsNP após serem submetidas ao ultra-turrax. Histograma de distribuição de frequência dos diâmetros hidrodinâmicos das qsNP (com acetato de retinol) após serem submetidas ao ultra-turrax.	67
16	Imagens de microscopia de força atômica obtidas em modo dinâmico das qsNPC (sem o ativo) após serem submetidas ao ultra-turrax.	68
17	Curvas de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número verificados por espectroscopia de fotocorrelação comparando os três lotes das a) nanoemulsões e b) nanopartículas de quitosana aprisionando acetato de retinol.	69
18	Avaliação da estabilidade coloidal da caNE e qsNP ao longo de 90 dias de armazenamento à 20° C e 5° C. Dados relativos ao diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z-average</i>).	70
19	Curva padrão de acetato de retinol livre com água ultrapura (Milli-Q) em dez diferentes concentrações, com base no máximo utilizado para formulações (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) com leitura de absorbância no comprimento de onda de 370 nm.	72

20	Perfil de liberação do acetato de retinol das nanoemulsões e nanopartículas de quitosana com ativo em fluido mimético gástrico (EcaNE e EqsNP) e em fluido mimético intestinal (IcaNE e IqsNP).	73
21	Registro fotográfico das maçãs no dia 2 após os tratamentos com a) água b) solução filmogênica (SF) c) solução filmogênica e nanossistema de quitosana com acetato de retinol (SF e qsNP) d) nanossistema de quitosana com acetato de retinol (qsNP) e) solução filmogênica e nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (SF e caNE) f) nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (caNE).	77
22	Registro fotográfico das maçãs no dia 10 após os tratamentos com a) água b) solução filmogênica (SF) c) solução filmogênica e nanossistema de quitosana com acetato de retinol (SF e qsNP) d) nanossistema de quitosana com acetato de retinol (qsNP) e) solução filmogênica e nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (SF e caNE) f) nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (caNE).	77
23	Valores de perda de massa (%) ao longo de 10 dias das maçãs tratadas com água, solução filmogênica (SF), solução filmogênica e nanossistema de quitosana com acetato de retinol (SF e qsNP), nanossistema de quitosana com acetato de retinol (qsNP), solução filmogênica e nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (SF e caNE) e nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (caNE).	78

Lista de Tabelas

1	Siglas de identificação dos nanossistemas com acetato de retinol e respectivos controles sem o acetato de retinol.	40
2	Classificação do comportamento da estabilidade coloidal pelo valor de Potencial- ζ , segundo ASTM (1985).	41
3	Volumes em μL de óleo de canola e surfactante (Tween 80) utilizados na obtenção das nanoemulsões com razões de surfactante/óleo de 0,1, 0,4, 1,0, 2,3 e 9,0 (caNE(0,1), caNE(0,4), caNE(1,0), caNE(2,3) e caNE(9,0), respectivamente.	42
4	Descrição do tempo e velocidade de emulsificação aplicados na obtenção das nanoemulsões de óleo de canola e os grupos controle (sem retinol) emulsionadas por 30 segundos a 21500rpm (caNE(30) e caNEC(30)) ou por 120 segundos a 43000rpm (caNE(120) e caNEC(120)).	43
5	Descrição dos parâmetros adotados na mistura da fase orgânica com a fase aquosa na obtenção das qsNP, variando o gotejamento da fase orgânica, lento (1500 $\mu\text{L}/\text{h}$) ou rápido (3000 $\mu\text{L}/\text{h}$), sob a fase aquosa, mantida em agitação magnética moderada (600 rpm) ou vigorosa (1200 rpm).	45
6	Descrição dos tempos e velocidades de agitação utilizados na dissociação das partículas de quitosana obtidas por nanoprecipitação submetidas ao ultraturrax por 0 (qsNP(0)), 30(qsNP(30)), 60(qsNP(60)), 120 (qsNP(120)) e 180 (qsNP(180)) segundos.	45
7	Reagentes e as respectivas concentrações dos fluidos miméticos gástrico (FMG) e fluidos miméticos intestinal (FMI).	49
8	Composição e proporção dos componentes dos tratamentos com água, solução filmogênica (SF), solução filmogênica e nanoemulsão de óleo de canola (SF e caNE), nanoemulsão de óleo de canola e água (caNE), solução filmogênica e nanossistema com nanopartículas de quitosana (SF e qsNP), nanossistema com nanopartículas de quitosana (qsNP).	50
9	Solubilidade das amostras de acetato de retinol solubilizadas em Água (A), Acetonitrila à 20, 50 e 70% (AA20, AA50, AA70), Etanol à 20, 50 e 70% (E20, E50, E70), Óleo de Soja, Óleo de Canola, Azeite de Oliva e Óleo de Tomate.	51

10	Valores de <i>Z-Average</i> , Potencial- ζ e Índice de Polidispersividade (PdI) verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície das nanoemulsões com razões de surfactante/óleo de 0,1, 0,4, 1,0, 2,3 e 9,0 (caNE(0,1), caNE(0,4), caNE(1,0), caNE(2,3) e caNE(9,0) respectivamente.	55
11	Valores de <i>Z-Average</i> , Potencial- ζ e índice de polidispersividade (PdI) verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície das nanoemulsões de óleo de canola e os grupos controle (sem retinol) emulsionadas por 30 segundos à 21500 rpm (caNE(30) e caNEC(30)) ou por 120 segundos à 43000 rpm (caNE(120) e caNEC(120)), nos dia da obtenção e após 7 dias.	57
12	Valores de <i>Z-Average</i> , Potencial- ζ e índice de polidispersividade (PdI) verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície das nanopartículas de quitosana (qsNP) contendo acetato de retinol ou não (qsNPC) obtidas por nanoprecipitação verificados no dia da sua obtenção e após 7 dias.	60
13	Valores de <i>Z-Average</i> , Potencial- ζ e índice de polidispersividade verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície das qsNP aprisionando acetato de retinol variando o gotejamento da fase orgânica, lento (1500 μ L/h) ou rápido (3000 μ L/h) na fase aquosa mantida em agitação magnética moderada (600 rpm) ou vigorosa (1200 rpm).	61
14	Valores de <i>Z-Average</i> , Potencial- ζ e índice de polidispersividade (PdI) verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície de partículas de quitosana obtidas por nanoprecipitação submetidas ao ultraturrax por 0 (qsNP(0)), 30 (qsNP(30)), 60 (qsNP(60)), 120 (qsNP(120)) ou 180 (qsNP(180)) segundos.	63
15	Valores de <i>Z-Average</i> , Potencial- ζ e índice de polidispersividade verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície dos lotes de nanoemulsões (caNE) e dos lotes das nanopartículas de quitosana (qsNP) e os respectivos controles.	69

16	Valores de <i>Z-Average</i> , Potencial- ζ e índice de polidispersividade verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície nas nanoemulsões de óleo de canola e nas nanopartículas de quitosana e os grupos controle (sem retinol) verificados para as análises de microscopia de força atômica e eletrônica de transmissão (MFA e MET), nos testes de reprodutibilidade e estabilidade das nanoestruturas e na eficácia de encapsulação e taxa de liberação (diálise) do acetato de retinol.	95
----	--	----

Sumário

1	Introdução	15
2	Revisão Teórica	17
2.1	A Nanotecnologia	17
2.2	Nanoencapsulamento	21
2.3	Vitamina A	23
2.4	Películas Comestíveis	27
2.5	Os Biopolímeros	29
2.6	Nanotecnologia Aplicada às Películas	31
2.7	Aspectos Ambientais	33
3	Justificativa	35
4	Objetivos	37
4.1	Objetivo Geral	37
4.2	Objetivos Específicos	37
5	Metodologia	38
5.1	Identificação do Acetato de Retinol	39
5.2	Síntese dos Nanossistemas	40
5.2.1	Nanoemulsão	41
5.2.2	Nanopartículas de Quitosana	43
5.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia de Força Atômica	45
5.3	Testes com os Nanossistemas	46
5.3.1	Reprodutibilidade dos Nanossistemas	46
5.3.2	Estabilidade dos Nanossistemas	47
5.3.3	Eficiência de Encapsulamento do Acetato de Retinol	47
5.3.4	Taxa de Liberação do Acetato de Retinol em Meio Fisiológico	48
5.4	Desenvolvimento da Película Comestível	49
5.4.1	Desenvolvimento da Película Comestível	49
5.4.2	Avaliação da Aplicação da Película Comestível	50

6	Resultados e Discussão	51
6.1	Identificação do Acetato de Retinol	51
6.2	Síntese dos Nanossistemas	53
6.2.1	Nanoemulsão	53
6.2.2	Nanopartículas de Quitosana	59
6.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia de Força Atômica	64
6.3	Testes com os Nanossistemas	68
6.3.1	Reprodutibilidade dos Nanossistemas	68
6.3.2	Estabilidade dos Nanossistemas	70
6.3.3	Eficiência de Encapsulamento do Acetato de Retinol	71
6.3.4	Taxa de Liberação do Acetato de Retinol em Meio Fisiológico	73
6.4	Desenvolvimento da Película Comestível	75
6.4.1	Desenvolvimento da Película Comestível	75
6.4.2	Avaliação da Aplicação da Película Comestível	76
7	Conclusões	80
	Referências Bibliográficas	82
	Apêndice	94

1 Introdução

A nanociência e a nanotecnologia têm demonstrado potencial para solucionar desafios enfrentados pela sociedade. Há na literatura autores [36] que sugerem que a nanotecnologia será o próximo grande avanço científico capaz de revolucionar a sociedade [15] [73] por, possivelmente, ser foco de uma nova revolução industrial [17] [85] [45].

Perspectivas à parte, atualmente o rápido avanço da nanociência e da nanotecnologia tem ampliado o leque de inovações em diversas áreas do conhecimento [15] [73] [27] [11] e a ciência da nutrição é uma das áreas em que a nanotecnologia ganha importância. Isso porque suas inovações podem perpassar todas as fases da cadeia produtiva de alimentos e resultar em incremento não somente na oferta como também na sua qualidade nutricional e sanitária destes [85] [57] [36] [55] [27] [15] [11] [73] [20] [95] [56].

De maneira mais específica, dentre as possíveis inovações tecnológicas da nanotecnologia na nutrição, pode-se citar como aplicação prática as películas comestíveis. Uma película comestível é uma camada fina de material comestível que reveste um alimento [24], principalmente os hortifrúteis, em sua forma *in natura* ou minimamente processados [24]. Esta é um complemento aos métodos usuais de conservação pós colheita [24] e que age como uma barreira entorno do alimento [33] e, conseqüentemente, protege-o de danos mecânicos, físicos, químicos e de atividades microbiológicas [31] [51].

A nanotecnologia pode inovar as películas comestíveis no tocante às suas características estruturais e funcionais. Dentre as funcionalidades emergentes, está a possibilidade das películas veicularem nutrientes nanoencapsulados e, conseqüentemente, enriquecer nutricionalmente o alimento revestido [29]. A nanoencapsulação oferece proteção a um ativo pois pode constituir uma barreira físico-química [44] a diversos elementos pró-oxidantes.

Nesse contexto, a vitamina A é um importante nutriente a ser considerado. Devido à sua importância para o organismo humano, já que está envolvida em várias funções metabólicas, [106] [91] [21] e ao fato de que a sua deficiência é um dos principais problemas nutricionais no mundo [13] [5] [53], é necessário o desenvolvimento de novas estratégias para a oferta desse nutriente e a sua veiculação, sob proteção em nanoestruturas, por películas comestíveis aplicadas em frutos populares parece ser uma estratégia promissora.

Dessa forma o objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar uma nanoemulsão de óleo de canola e nanopartículas de quitosana contendo acetato de retinol para serem incorporadas

em uma película comestível elaborada pela combinação de amidos de milho e de mandioca para revestimento de maçãs.

2 Revisão Teórica

2.1 A Nanotecnologia

Já na antiguidade é possível identificar o uso empírico de materiais nanoestruturados por artesãos e fabricantes de utensílios metálicos, cerâmicos e de vidro. Um exemplo é o Cálice do Licurgo (figura 1) produzido por um vidreiro medieval no período romano (30 a.C - 640 d.C) e atualmente disponível para visitação no Museu Britânico em Londres, na Inglaterra. Esse cálice possui colora o verde ou vermelha, dependendo da incidência da luz, pois, conforme análise atual, possui nanop rticulas de ouro e prata com tamanho similar ao do comprimento de onda da luz visível que lhe confere característica dicróica [64] [58].



Figura 1: Cálice do Licurgo sob diferentes incidências de luz. Fonte: Museu Britânico - <http://www.britishmuseum.org>.

A nanociência surge como um campo de estudo no final do século vinte e os primeiros conceitos fundamentais que a embasam foram citados, de maneira ainda pouco desenvolvida, pelo físico norte americano Richard Feynman em uma reunião da Sociedade Americana de

Física no Instituto de Tecnologia da Califórnia em 29 de dezembro de 1959. Em sua palestra, intitulada “*There’s a plenty of room at the bottom*”, Feynman suscitou a possibilidade de manipular átomos e moléculas com o objetivo de alcançar unidades proporcionalmente menores [35] [75].

Embora haja a crença comum de que as idéias de Feynman (1960)[35] representem a origem da nanotecnologia contemporânea é importante ressaltar que somente em 1974 o termo “nanotecnologia” foi definido. O físico japonês Norio Taniguchi em seu trabalho intitulado “*On the Basic Concept of Nanotechnology*” que descreve a produção de matérias em escala nanométrica define o termo da seguinte forma: “Nanotecnologia” consiste principalmente do processamento, separação, consolidação e deformação dos materiais por um átomo ou uma molécula” [64] [69].

Nos últimos trinta anos, com o avançar da ciência o conceito de nanotecnologia vem sendo modificado e aprimorado, porém ainda não há um consenso internacional para o termo. Contudo, diferentes organizações governamentais e alguns estudos compartilham o que parece ser o mais difundido conceito, estabelecido pela Iniciativa Nacional de Nanotecnologia dos Estados Unidos que a define como “a compreensão e controle da matéria em dimensões de cerca de 1-100 nm, onde fenômenos únicos permitem novas aplicações” [58] [23] [85] [3].

Apesar de difundido, há controvérsia em relação à este conceito no que se refere à faixa de tamanho (1-100 nm) das nanopartículas visto que o diferencial são as propriedades únicas apresentadas por materiais em nanoescala e que não necessariamente estão entre 1 e 100 nm. Por exemplo, uma publicação recente na Sociedade Americana de Química, ao definir nanotecnologia ressaltam as propriedades únicas que são dependentes do tamanho, sem limitar a faixa de tamanho [82].

É importante salientar que existe diferença entre os termos nanociência e nanotecnologia. O primeiro refere-se ao estudo dos princípios fundamentais das moléculas e estruturas nanométricas, enquanto que o segundo refere-se às aplicações tecnológicas dessas moléculas e estruturas em dispositivos e objetos. O prefixo “nano”, presente nos termos nanociência e nanotecnologia, é derivado de uma palavra Grega que significa “anão”. Baseando-se em uma definição mais técnica, o prefixo “nano” indica a bilionésima parte de uma unidade. Dessa forma o nanômetro é a bilionésima parte de um metro, ou seja, 10^{-9} metro [23] [3] [69] [45] [19] [97] [17] [7].

Para contextualizar a dimensão do nanômetro, Kovvuru *et al* (2012) [69], no estudo da nanotecnologia como ciência emergente na odontologia, compara os tamanhos de um nanômetro e de um metro como sendo uma bolinha de gude para o tamanho da terra, respectivamente, e também que um nanômetro é o comprimento de barba humana que cresce no tempo que um homem demora para levantar a navalha à face. Outra colocação interessante a respeito das dimensões nanométricas foi colocada por Sekhon (2010), que diz que nanomateriais são tão pequenos que até mesmo uma bactéria precisaria de um microscópio para visualizá-los.

É justamente as dimensões nanométricas das partículas que são o grande diferencial. Feynman (1960) [35], em sua palestra, já reconhecia que havia distinção no comportamento de partículas nano em relação às partículas macro do mesmo elemento químico. Isso se explica devido ao fato de que à medida que o tamanho das partículas fica reduzido, há um enorme aumento relativo entre área de superfície e o volume. Consequentemente, há mudanças na natureza das interações das forças entre as moléculas constituintes do material. Sendo assim, materiais com tecnologias "nano", devido às propriedades físicas, químicas e biológicas fundamentalmente diferentes, possuem comportamentos distintos que oferecem aplicações funcionais singulares e inovadoras de interesse ao processo de produção industrial [75] [85] [47].

Diversos estudos relacionam as propriedades inovadoras com o interesse industrial na nanotecnologia, pois este comportamento distinto proporciona avanços incrementais na elaboração de produtos já conhecidos e na introdução de produtos inovadores. Esse interesse industrial se dá devido ao fato de que na nanotecnologia, a partir da manipulação de átomos e moléculas, é possível projetar, processar e manufaturar materiais e estruturas em escala nanométrica e também integrar estas estruturas em sistemas maiores. Envolve conhecimento interdisciplinar que perpassa a física, a química, a matemática e a biologia [3] [45] [19].

A ciência em nanoescala e a nanotecnologia são identificadas por alguns autores como de grande potencial para solucionar desafios atuais e futuros da sociedade com significativos impactos em aspectos e economia global, produção industrial e da vida das pessoas. Fischer (2012) [36] aponta que a nanotecnologia será o próximo grande avanço científico que vai revolucionar a sociedade, enquanto Chaundry e Castle (2011) e Vazquez, Brunner e Siegrist (2012) [15] [73], de forma mais específica, consideram a nanotecnologia como o foco de uma nova revolução industrial [17] [85] [45].

A nanociência alcança fronteiras científicas amplas e a nanotecnologia tem adquirido relevância bastante significativa e ganhado força como ferramenta líder mundial. Huang (2012) [57] afirma que países em amplo desenvolvimento, como é o caso da China, Índia e do Brasil, que desenvolvem pesquisas na área, têm potencial para serem líderes globais em nanotecnologia [85] [17] [101].

O rápido avanço da nanociência e da nanotecnologia possibilitou um salto em inovações em diversas áreas tecnológicas e nos últimos anos abriu novas perspectivas para diversos setores industriais e de consumo, incluindo os setores de pesquisa e desenvolvimento tanto público quanto privado, com prospecção para produção e consumo comum significativo em larga escala [15] [73] [27] [11].

Na produção industrial, sua aplicabilidade, de um modo extremamente singular, alcança a produção de cosméticos, fármacos, equipamentos médicos, energia, segurança, tecidos, produtos biotecnológicos e do setor agro-alimentar. Greiner (2009) [45] cita exemplos de produtos da nanotecnologia que atualmente estão no mercado, dentre eles “os têxteis antibacterianos, protetores solares transparentes, tecidos que repelem água e odor, tinta livre de arranhões para automóveis, revestimentos repelentes de sujeiras, janelas autolimpantes, bolas de tênis mais elásticas, raquetes de tênis mais rígidas [101].

De acordo com a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (2013), nos Estados Unidos o financiamento federal direcionado ao avanço das nanotecnologias para 2014 foi orçado para \$1,7 bilhão de dólares enquanto que para 2013 esse investimento foi de \$1,6 bilhão e em 2004 foi de \$0,9 bilhão. Em termos de investimento financeiro global em nanotecnologia é possível verificar um aumento nos últimos dez anos. Para o ano de 2004 o investimento alcançou \$7 bilhões enquanto que a estimativa para os anos de 2011-2015 é de 1 trilhão [58].

Uma das áreas em que a nanotecnologia ganhou importância recentemente é a ciência da nutrição. Do campo à mesa, ou seja, em todas as fases da cadeia produtiva, o uso da nanotecnologia tem o potencial de revolucionar incrementando não só a oferta de alimentos mas também a qualidade nutricional e sanitária. Em se tratando de aplicações da nanotecnologia na cadeia produtiva de alimentos, há uma vasta lista de aplicações que já são utilizadas e também as potenciais, dentre as quais: o uso de nanossensores para acompanhamento do crescimento das culturas e controle de pragas, pesticidas em culturas, identificação de doenças em plantas e animais; funcionalização de alimentos por meio de aditivos nanoencapsulados

com melhor solubilidade em água e estabilidade térmica que permitem alterações nutricionais e sensoriais nos alimentos; sistemas de veiculação inteligente de princípios ativos ou micronutrientes com maior biodisponibilidade; embalagens inteligentes que respondem às condições do ambiente, detectam contaminantes e organismos patogênicos e controlam a deterioração do alimento; aumento da eficiência dos filtros para bebidas [85] [57] [36] [55] [27] [15] [11] [73] [20] [95] [56].

Todas as possibilidades citadas podem gerar benefícios à produção e principalmente ao consumidor final que dependendo da tecnologia aplicada pode contar com redução no uso de conservantes, sal, gordura e surfactantes em produtos alimentares, sabores novos ou melhorados, texturas e sensações, melhor captação, absorção e biodisponibilidade de nutrientes e suplementos no corpo [27].

Considerando a importância econômica dos investimentos direcionados à pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologias aplicadas aos alimentos, houve um aumento do valor global investido de \$7 bilhões de dólares no ano de 2006 para \$20,4 bilhões de dólares em 2010. É importante ressaltar que o número de empresas buscando pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologias aplicadas ao setor agrícola e alimentar vem aumentando. Enquanto que no ano de 2006 havia cerca de 400 empresas, a estimativa para o ano de 2015 é de aproximadamente 1000 empresas [85].

2.2 Nanoencapsulamento

Dentre os possíveis sistemas de veiculação inteligente de ativos, o nanoencapsulamento é uma estratégia promissora. Constituintes orgânicos que estão naturalmente presentes em alimentos (ex.: proteínas, carboidratos e lipídeos) podem variar em tamanho, desde grandes polímeros até pequenas moléculas. Esses nanomateriais orgânicos podem ser manipulados para fins específicos, como, por exemplo, o nanoencapsulamento [20]. A nanoencapsulação é uma alternativa tecnológica que oferece proteção a um ativo pois pode constituir uma barreira fisicoquímica [44] à diversos agentes.

Imobilizando o ativo em uma plataforma de encapsulamento, ou seja, em um adequado transportador, é possível oferecer resistência à ação de diversos fatores, como, por exemplo, radicais livres, oxigênio, variações de temperatura, alterações de pH, incidência de luz (UV), ação de enzimas, etc. Além da proteção, é possível mascarar sabores ou odores desagradáveis,

melhorar a biodisponibilidade de nutrientes, controlar a liberação e melhorar a solubilidade de ingredientes e ativos insolúveis em sistemas aquosos [20].

Os sistemas clássicos desenvolvidos em nanoencapsulação baseiam-se em encapsulamento em reservatórios ou matrizes onde respectivamente as (i) formulações de base lipídicas aprisionam o ativo ou as (ii) formulações aprisionam o ativo na matriz de um polímero [44]. Nos últimos dez anos, foram diversos os estudos que utilizaram-se de ao menos um desses sistemas para o nanoencapsulamento de diferentes ativos.

Giroux, Houde e Britten (2010) desenvolveram nanopartículas estáveis a partir de proteínas solúveis de soro de leite (*whey protein*) com potencial para serem uma plataforma de encapsulamento para compostos sensíveis, tais como aromas ou nutracêuticos [43]. A proteína isolada do soro do leite também foi utilizada nos estudos de Abbasi (2014) na obtenção de nanopartículas capazes de encapsular vitamina D_3 (colecalférol). Ficou demonstrado que a nanoestrutura foi capaz de aprisionar a vitamina e retardar a sua degradação em presença de oxigênio resultando em aumento do tempo de prateleira [1]. Ainda a partir do leite, Pan, Yao e Jiang (2007) utilizaram caseína para desenvolver nanopartículas com potencial para sistema de encapsulamento de diferentes nutrientes instáveis e hidrofóbicos [87].

Donsì *et al* (2011) formularam nanoemulsões com óleos vegetais (girassol e palma), incorporando compostos antimicrobianos, uma mistura de terpenos extraídos de *Melaleuca alternifolia* e D-limoneno para verificar se esses compostos mantinham ou até mesmo aumentavam a atividade antimicrobiana. As formulações foram testadas em sumos de fruta inoculados com *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia colie*, *Lactobacillus delbrueckii*. Dentre outros resultados, os autores observaram que as nanoemulsões com baixas concentrações dos terpenos foram capazes de retardar e inibir o crescimento microbiano sem prejudicar as propriedades organolépticas dos sucos de frutas [26].

A vitamina E, grupo de diferentes tocoferóis e tocotrienóis tiveram foco nos trabalhos de nanoencapsulação. Cheong *et al* (2008) desenvolveram nanodispersões contendo α -tocoferol, que demonstraram estabilidade físico-química quando armazenados sob refrigeração (4°C) [18]. Em estudo com isômeros de tocoferol, Kuo *et al* (2008) obtiveram diferentes nanoemulsões contendo estes ativos. Essas nanoemulsões demonstraram propriedades anti-inflamatórias em ratos CD-1, maior biodisponibilidade em comparação com suspensões desses compostos e concentração plasmática de γ -tocoferol em montantes similares aos encontrados

para o α -tocoferol, que é mais biodisponível [70]. Cheng e Wagner (2004) desenvolveram com sucesso nanopartículas de amido aprisionando α -tocoferol para superarem os problemas de estabilidade física, turbidez, problemas sensoriais e preocupações regulatórias que existem com os produtos de vitamina E que estão no mercado [16].

Os carotenoides, por serem um grupo de compostos lipossolúveis, possuem moléculas sensíveis que devem ser preservadas de elementos pró-oxidantes (ex.: luz, oxigênio e calor). Essa estabilidade e a biodisponibilidade podem ser melhoradas por nanoencapsulação [48], o que foi demonstrado por estudos desenvolvidos nos últimos dez anos.

Ribeiro *et al* (2008) desenvolveram nanopartículas de um polímero biodegradável carregadas com β -caroteno com alta estabilidade [50]. Yuan *et al* (2008) obtiveram nanoemulsões do tipo óleo em água aprisionando β -caroteno que tiveram boa estabilidade física mas degradação química significativa do β -caroteno durante quatro semanas de armazenamento [117], resultado que confirmou os encontrados por Tan e Nakajima (2005) [103]. Já Sheng *et al* (2014) sintetizaram nanopartículas carregadas com β -caroteno por precipitação antissolvente sob ultrassom. Por esse método a composição química foi mantida mesmo após o tratamento com ultrassom e rápida dissolução em meio aquoso [99].

Kim *et al* (2006) desenvolveram nanopartículas de quitosana nanoencapsulando retinol. Os resultados demonstraram que a concentração de retinol nanoencapsulado foi similar à inicial usada na formulação. Também houve um aumento de solubilidade do retinol em 1600 vezes. As nanopartículas eram estáveis e mantiveram as características peculiares do retinol [68].

2.3 Vitamina A

A vitamina A foi identificada por McCollum e Davis entre 1907 e 1913. Na época, os autores concluíram que “existia, em alguns alimentos, um fator de crescimento solúvel em lipídeos (primeiramente nomeado de fator “lipossolúvel A”, ao contrário do “fator hidrossolúvel B”) além do próprio lipídeo e que este fator foi essencial para o nosso crescimento e sobrevivência” [79] [78].

Vitamina A ou retinol, hoje amplamente conhecida e reportada na literatura científica, é um nutriente essencial lipossolúvel que está envolvido em várias funções metabólicas no organismo, como já havia referido McCollum e Davis, e é derivada de fontes animais e vegetais

sob a forma de diferentes compostos, os retinoides [106] [91] [21].

Os retinoides constituem um grupo de compostos relacionados com a vitamina A, incluindo os seus análogos naturais e sintéticos, com ou sem atividade biológica. Os retinoides contêm uma estrutura básica constituída de três partes: um anel ciclohexeno trimetilado, que é um grupo hidrofóbico volumoso; uma cadeia lateral conjugada, que serve como uma unidade de ligação; e um grupo funcional, tipicamente um ácido carboxílico (figura 2) [106] [94].

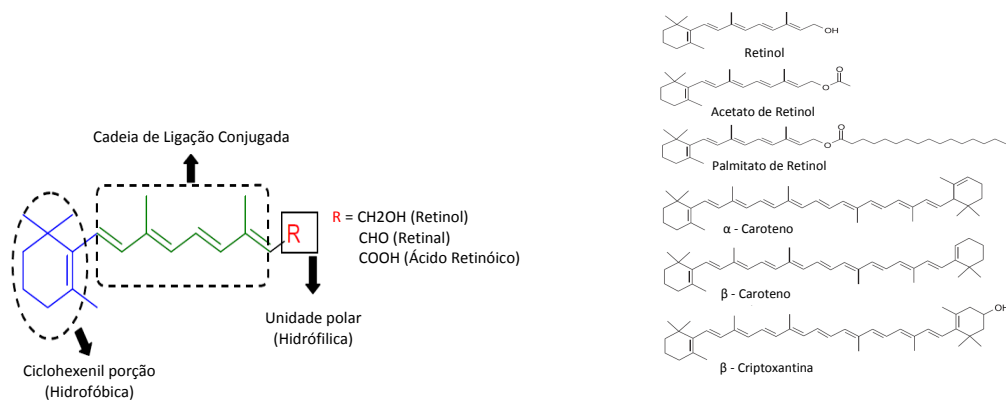


Figura 2: Estrutura básica de retinoides e exemplos de retinoides dietéticos pré e pró vitamina A.

A depender da origem do alimento fonte de vitamina A, é possível separar o retinoide em duas categorias: pré vitamina A e pró vitamina A. A vitamina A encontrada em fontes animais é chamada de pré vitamina A. Esta é obtida na forma de esters de retinil e é absorvida na a forma de retinol. Os alimentos fontes incluem fígado, leite integral, ovos e carnes. Retinol pode ser transformado em outras formas ativas (retinal e ácido retinoico) no corpo [113] [96] [21].

A vitamina A encontrada em alimentos derivados de plantas, são denominadas pro vitaminas A e são obtidas sob a forma de carotenoides que podem ser biologicamente convertidos em um precursor de vitamina A em organismos animais. Apesar de mais de 700 carotenoides terem sido identificados na natureza, apenas cerca de 50 podem ser convertidos ao retinol [106].

Dentre os carotenoides provitamínicos A (por exemplo α - Caroteno, β - Caroteno e β - Criptoxantina), o β - Caroteno é o o mais distribuído em alimentos e o mais ativo, ou seja o que possui a maior taxa de conversão a retinol. Os carotenoides são encontrados principalmente

em vegetais folhosos verdes e frutas de coloração amarela e laranja. Por exemplo, cenouras são de cor laranja devido a quantidades elevadas de α e β - Caroteno, as laranjas e tangerinas são laranja por causa da alta quantidades de β - Criptoxantina [113] [13] [108] [106].

Em relação aos retinoides de fontes sintéticas, o acetato e o palmitato de retinol são as formas comumente utilizadas em suplementos alimentares e na fortificação de alimentos. Por exemplo o palmitato de retinol é adicionado à leites desnatados e o acetato de retinol é por vezes adicionada a iogurtes [106].

Independente da fonte, uma vez que o retinoide chega ao intestino inicia-se o processo de bioconversão. A bioconversão ocorre sucessivamente, iniciando no intestino, em seguida no fígado, e, por fim, nas células-alvo. Todo esse processo ocorre com o apoio de várias proteínas de ligação incluindo as Proteínas Celulares de Ligação de Retinol, as Proteínas de Ligação de Retinol e as Proteínas Celulares de Ligação de Ácido Retinoico [21].

No processo de bioconversão, os retinoides são bioquimicamente convertidos em ácido retinoico (AR), que é essencial para a modulação de uma grande variedade de processos biológicos, [21] muito bem reportados na literatura científica da última década, sendo eles: participação no processo de visão na regeneração de fotorreceptores, crescimento celular normal, diferenciação de tecidos e integridade e estabilidade da superfície da mucosa, função imunológica tanto na tolerância imunológica quanto em respostas imunes adaptativas, reprodução e desenvolvimento embrionário [13] [63] [106] [96] [91] [105] [104] [5] [113]. Há ainda estudos que hipotetizam que a vitamina A tem propriedades anticarcinogênicas, pois regula os receptores nucleares que suprimem a formação de tumores, induz a apoptose de células e melhora a função imunológica [88] [111].

O Instituto de Medicina (IOM), que é responsável pela revisão histórica e de literatura científica atual para recomendação dos níveis apropriados de ingestão de nutrientes para as pessoas saudáveis, recomenda diariamente para mulheres e homens 700 e 900 equivalentes de atividade de retinol (EAR), respectivamente, e entre 300 e 500 EAR para crianças, a depender da faixa etária [106].

Para retinol, a equivalência de 1 μg retinol para 1 EAR. Já para os carotenoides, o IOM atribui o valor de equivalência de 12 μg de β - caroteno e 24 μg α - caroteno ou β - criptoxantina para 1 EAR. Contudo, é importante ressaltar que muitos fatores podem influenciar a biodisponibilidade dos carotenoides a partir da matriz de um alimento, bem

como a sua bioconversão a retinol [106].

Biodisponibilidade refere-se à fração de determinado nutriente que fica disponível para as funções fisiológicas do organismos [5] [106]. No caso dos carotenoides, vários são os fatores influentes na sua biodisponibilidade. Na literatura científica esse conjunto de fatores são denominados "SLAMENGHI". SLAMENGHI é um recurso mnemônico utilizado para facilitar a memorização destes fatores influentes e associa-se a *Species of carotenoids, molecular Linkage, Amount of carotenoids consumed in a meal, Matrix in which the carotenoid is incorporated, Effectors of absorption and bioconversion, Nutrient status of the host, Genetic factors, Host-related factors and mathematical Interactions* que em tradução literal significa tipos de carotenoides, ligação molecular, quantidade de carotenoides consumidos em uma refeição, matriz na qual os carotenoides estão incorporados, efetores de absorção e bioconversão, estado nutricional do indivíduo, fatores genéticos e fatores inerentes ao indivíduo [5].

Além do mais, há diversos fatores que podem afetar a composição de carotenoides em vegetais, os quais Campos e Rosado (2005)[13] cita a "variedade, desigualdade na distribuição em dado alimento e parte do vegetal que é consumido, grau de maturação, clima, tipo de solo, condições de cultivo e área geográfica de produção, condições de colheita, processamento e armazenamento".

Além de todos esse fatores, é importante considerar que os alimentos de origem animal são, em geral, mais caros do que os de origem vegetal. Associando este fato à todos os fatores influentes na biodisponibilidade dos carotenoides tem-se como resultado repercussões que atingem a saúde pública no que diz respeito à deficiência de vitamina A ou hipovitaminose A. Isto porque as populações em risco desta deficiência, de maneira geral, contam com carotenoides para contemplarem suas recomendações diárias de vitamina A. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as provitaminas vegetais atingem 88%, do total de vitaminas dietéticas em países em desenvolvimento [13] [5].

São diversos estudos que reconhecem que a deficiência de vitamina A pode levar à xerofthalmia, cegueira noturna, hiperqueratose folicular e xerodermia e possui efeito imunossupressor em mulheres e crianças e ainda maior risco de perda de apetite, perda de peso, sarampo, diarreia e infecções respiratórias em crianças. Dessa forma, a deficiência de vitamina A resulta em aumento de morbidade e mortalidade para sua população de risco [13] [105] [5] [53] [63].

A deficiência de vitamina A é um dos principais problemas nutricionais no mundo e

principalmente em países em desenvolvimento. De acordo com a OMS, no mundo inteiro 45 países apresentam a hipovitaminose A como problema de saúde pública em níveis clínicos, ou seja, com sinais evidentes da deficiência, enquanto que em 122 países o problema é subclínico, onde há depleção das reservas hepáticas mas sem sinais clínicos evidentes. Nas Américas, a prevalência de hipovitaminose A é de aproximadamente 20%. No Brasil, em algumas regiões a hipovitaminose constitui-se em problema endêmico, dentre os estados que se destacam estão o Amazonas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina [13] [5] [53].

Com vistas a superar esse problema nos países em desenvolvimento, diversas alternativas são citadas na literatura científica, como por exemplo o fornecimento de suplementos de vitamina A, o fornecimento de altas doses de suplementos de vitamina A duas ou três vezes por ano, a biofortificação de alimentos, como o óleo de cocção e o açúcar com carotenoides pró-vitamina A, programas de incentivo à mudanças na alimentação visando ao aumento do consumo de vegetais ricos em carotenoides [104] [108] [13] [53]. No Brasil, a estratégia adotada é principalmente por meio do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A. Este programa consiste na suplementação profilática medicamentosa para crianças de 6 a 59 meses de idade e mulheres no pós-parto imediato. O suplemento de vitamina A é distribuído gratuitamente e é composto por vitamina A na forma líquida, diluída em óleo de soja e acrescida de vitamina E [22].

A vitamina A, enquanto composto lipossolúvel, é composta por moléculas sensíveis que devem ser preservadas de elementos pró-oxidantes que podem afetar a sua integridade química e reduzir os seus benefícios fisiológicos. Para tanto, a nanoencapsulação é uma abordagem promissora. Com a nanoencapsulação é possível preservar as propriedades nativas deste tipo de vitamina ao longo do tempo [44].

2.4 Películas Comestíveis

Os revestimentos comestíveis protetores são uma tecnologia pós colheita, dispostos ou formados diretamente sobre o alimento, que agem como uma barreira ao seu entorno [33], por exemplo, filmes, invólucros ou um dos objetos de investigação deste estudo, as películas.

Uma película comestível é uma fina camada de material comestível que reveste um alimento. A aplicação pode ser feita de duas maneiras. A primeira por meio de imersão da fruta

em uma matriz formadora de filme, a chamada solução filmogênica, seguida de repouso para evaporação da água. A segunda maneira é por meio de aspersão, onde a solução filmogênica (SF) é borrifada sobre o alimento, seguido por repouso [24]. Essa matriz pode ser constituída por carboidratos, proteínas, lipídeos ou uma mistura destes, [31] onde necessariamente ao menos um deve ser capaz de formar uma matriz contínua, homogênea e coesa [62].

O principal grupo de alimentos que se beneficiam com as técnicas de aplicação de revestimentos são os hortifrútis, em sua forma *in natura* ou minimamente processados. Isso por que após a colheita, em sua maioria, inicia-se o processo de maturação seguido de deterioração em consequência das mudanças bioquímicas e fisiológicas [24]. Quanto aos minimamente processados, devido à natureza desses alimentos, o mínimo processamento ou o aumento de superfície consequente do processamento de corte lhe confere alta sensibilidade que resulta em mudanças na sua qualidade [84].

A deterioração pode ocorrer devido a processos químicos, físicos e microbiológicos como por exemplo: a perda de água, mudanças de coloração por indução enzimática ou da luz, oxidação, perda da integridade celular e consequente amolecimento e crescimento de microrganismos [84]. Usualmente, a conservação após a colheita baseia-se no controle de temperatura e em boas práticas de armazenamento e manuseio [24].

A tecnologia de aplicação de revestimentos comestíveis é um complemento aos métodos usuais de conservação pós colheita de hortifrútis. Quando um revestimento é aplicado, em frutas, por exemplo, os estômatos e lenticelas da estrutura dessa fruta são parcialmente preenchidos e assim a transpiração e respiração são reduzidas limitando a transferência de umidade e as trocas gasosas (oxigênio e dióxido de carbono) e inibindo a migração de lipídeo, aromas voláteis, dentre outros, entre o alimento e o meio ambiente [24]. O amadurecimento das frutas se dá devido ao etileno, um hormônio que necessita de O_2 para ser produzido. Dessa forma, quando o filme reduz a permeação de O_2 para o interior da fruta, a produção de etileno fica comprometida e assim há um prolongamento da vida do fruto [24].

Dessa forma, os revestimentos podem desempenhar um papel importante em diferentes etapas da cadeia de produção dos alimentos, desde a conservação, distribuição, até a sua comercialização pois, devido à própria natureza dos revestimentos, estes podem proteger o produto de danos mecânicos, físicos, químicos e de atividades microbiológicas [31] [51].

Os revestimentos comestíveis oferecem inúmeras vantagens. Destaca-se o aspecto atrativo

por mais tempo [10], aumento da vida de prateleira, aumento da segurança higiênico-sanitária, melhora das propriedades sensoriais enquanto mantém a estabilidade do produto [80]. Além disso, possuem potencial inovador considerável, principalmente no tocante às possíveis ações como carreadores de compostos bioativos (antimicrobianos, antioxidantes e nutrientes) [24] [28].

É desejável que os revestimentos comestíveis não interfiram nas características sensoriais das frutas como cor, sabor e odor e também possuir boa aderência dificultando a possibilidade de remoção ao manuseio. As propriedades mecânicas e de barreiras devem conferir-lhe resistência à quebra e abrasão para que o filme possa desempenhar o papel de proteção ao alimento, e, por fim, flexibilidade, conferindo-lhe adaptação a possíveis deformações [24].

Uma das principais limitações do uso de películas comestíveis é a produção em escala industrial, que está limitada devido a questões de performance e processamento [8]. Também, comparativamente aos polímeros sintéticos as propriedades mecânicas e de barreira dos revestimentos comestíveis são menos favoráveis. Alternativamente, têm sido utilizados componentes para reforçar a sua estrutura e melhorar essas propriedades [9].

2.5 Os Biopolímeros

Dentre os possíveis formadores da matriz estrutural dos revestimentos comestíveis estão os biopolímeros naturais, pois estes possuem capacidade filmogênica [12]. Os biopolímeros mais utilizados para tal fim são as proteínas, os lipídeos, e os polissacarídeos ou mesmo a combinação dos mesmos; [112] [24]) Para este último caso, dependendo do objetivo do revestimento, utiliza-se vantajosamente as diferentes características funcionais de cada biopolímero [24].

A escolha dos biopolímeros que compõem a formulação dos revestimentos vai depender do seu objetivo e do alimento em que será aplicado. Deve-se considerar que as interações entre os componentes do material vão interferir nas propriedades de barreira, mecânicas e sensoriais dos filmes [74].

As proteínas representam uma possibilidade de matriz estrutural, principalmente as gelatinas, caseínas, ovoalbuminas, glúten de trigo, zeínas e algumas proteínas miofibrilares. Alguns lipídeos também entram na lista de possíveis formadores de matriz, principalmente os monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo. Contudo, os po-

lissacarídeos são o carro chefe na elaboração de películas para serem aplicadas em alimentos [24]. Isso por que apresentam hidroflicidade natural, que é uma característica diferencial. Sua afinidade por água está associada à predominância de grupos altamente polares como o grupo hidroxila [24].

Os polissacarídeos originam revestimentos comestíveis com aplicações limitadas devido às suas moderadas propriedades mecânicas e de solubilidade em água, além da baixa permeabilidade ao vapor de água. Algumas alternativas são propostas a fim de superar estas limitações, por exemplo, a adição de materiais hidrofóbicos como óleos e ceras ou a mistura de diferentes biopolímeros [12]. Por outro lado, estes revestimentos apresentam baixa permeabilidade a gases, reduzindo, principalmente, a taxa de escurecimento enzimático [24].

As películas desenvolvidas para serem aplicadas em frutas são comumente elaboradas pelos seguintes polissacarídeos: alginatos, pectina, carragena, amidos, quitosana e derivados da celulose (por exemplo, a metilcelulose, carboximetilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose) [24]. As próprias frutas servem como substrato para a elaboração desses revestimentos devido à presença de polissacarídeos em sua composição. Esses tipos de revestimentos apresentam vantagens, pois combinam as propriedades de barreira e mecânicas dos componentes do filme com as cores e sabores dos pigmentos e componentes voláteis da fruta [9].

O amido é um polissacarídeo sintetizado pelos vegetais para ser utilizado como reserva energética. Seu armazenamento nos organismos vegetais é sob a forma de grânulos e apresentam certo grau de organização molecular. Dois tipos diferentes de polímeros de glicose formam o amido, são eles a amilose e a amilopectina, que diferem entre si em estruturas e funções [74]. Tanto a amilose quanto a amilopectina são polímeros compostos por unidades de D-glicose ligados por ligações α -(1→4), porém a amilose é linear e a amilopectina altamente ramificada em α -(1→6) [74] [12]. Sendo estes polímeros diferentes, variações em suas proporções ou em suas estruturas podem gerar modificações físico-químicas com implicações no uso do amido na indústria. Teores elevados de amilose do amido são de interesse para elaboração de filmes [74].

A produção de revestimentos comestíveis a partir de amido se baseia nas propriedades físico-químicas e funcionais da amilose, pois esta forma gel e filme. Por ser um polímero linear, as moléculas de amilose, quando em solução aquosa tendem a se orientar paralelamente e estabelecerem ligações de hidrogênio. Sendo assim, a hidroflicidade é reduzida favorecendo

a formação de pastas e filmes isotrópicos, sem odor, sabor ou cor [12] [74]. Alimentos como o milho, a batata, o arroz, o trigo e a mandioca são as principais fontes comerciais de amido para a obtenção de revestimentos comestíveis, porém há outras fontes como o inhame e os grãos de aveia [74].

Para a formação da matriz polimérica homogênea, característica dos revestimentos comestíveis à base de amido, é necessário que ocorra a disruptura da organização dos grânulos. Esta disruptura pode ocorrer por meio da gelatinização ou da fusão. A gelatinização ocorre na presença de excesso de água e transforma irreversivelmente o amido granular em pasta viscoelástica. Na gelatinização a água desfaz a cristalinidade e a organização molecular do grânulo rompendo assim, as ligações de hidrogênio. Já na fusão, o amido com pequenas quantidades de água é aquecido sob altas temperaturas até ocorrer a gelatinização [74].

Ao contrario do que ocorre na gelatinização, no processo de fusão a estrutura formada é mais ordenada o que possibilita, em condições adequadas, a reassociação das ligações de hidrogênio e a formação de uma estrutura novamente cristalina, fenômeno chamado retrogradação ou recristalização [12] [74]. Em se tratando de revestimento comestível de amido este fenômeno tem relevância, pois leva ao envelhecimento dos filmes, tornando-os rígidos e quebradiços. A velocidade de retrogradação depende das condições de armazenamento e pode ser determinada segundo análise da transição vítrea [74].

É importante ressaltar que, além das limitações devido ao fenômeno de retrogradação [8], películas formadas a partir de amido são sensíveis à água, quebradiças e até difíceis de manusear [4] [52] o que limita as suas aplicações. Isso porque exibem propriedades de tensão pobres e alta permeabilidade aos gases e ao vapor de água devido à sua natureza hidrofílica e sensível à umidade [12] [102] [8]. Sendo assim, é recomendável a adição de um elemento plastificante para alcançar as propriedades mecânicas desejadas a revestimentos [12] [4] [112]. Apesar dessa estratégia melhorar as propriedades mecânicas há um decréscimo das propriedades de barreira, especialmente a permeabilidade ao vapor de água [4].

2.6 Nanotecnologia Aplicada às Películas

Os revestimentos comestíveis podem se beneficiar de aplicações nanotecnológicas, tanto para a melhora de suas características estruturais quanto no sentido de ampliar as suas funções. Em relação à melhora de características estruturais dos revestimentos comestíveis,

o uso de nanomateriais é uma estratégia recente que tem sido aplicada para superar as limitações dos biopolímeros [42]. Esse tipo de aplicação abre possibilidades de melhorar as propriedades estruturais como também o custo/benefício de produção [8].

Um exemplo de biopolímero que apresenta limitações que podem ser superadas por meio da nanotecnologia é o amido que muitas vezes exige o acréscimo de elementos plastificantes para alcançar as propriedades mecânicas desejadas a revestimentos, mas acarreta decréscimo das propriedades de barreira, como a permeabilidade ao vapor de água.

Na literatura, há alguns estudos que sugerem alternativas para driblar esta a perda de propriedades de barreira. Muller, Laurindo e Yamashita (2009) [81]. ao incluírem fibras de celulose na elaboração do filme de amido observaram um decréscimo da permeabilidade ao vapor de água, da solubilidade e da difusão de água em proporção inversa ao acréscimo de celulose. Alternativamente, Chang *et al* (2010) [14], propôs a adição de nanopartículas de celulose à elaboração de filmes e obteve resultados semelhantes ao encontrado pelo trabalho anterior. Para este estudo o resultado foi obtido devido à presença das nanopartículas de celulose tornarem mais difícil o caminho para travessia de moléculas de água pela matriz do filme. Azeredo *et al* (2009) citam que a incorporação de nanopartículas de quitosana a um revestimento pode melhorar suas propriedades mecânicas e de barreira [8].

Em geral, a melhora das propriedades se dá devido ao uso de preenchimentos nanométricos. O uso de preenchimentos com ao menos uma dimensão em nanoescala produz nanocompósitos poliméricos que, quando em uma dispersão uniforme, geram uma área interfacial entre matriz e preenchimento muito grande, resultando em mudança na mobilidade molecular, o comportamento de relaxação, e, conseqüentemente, mudanças nas propriedades térmicas e mecânicas do material [8].

Dentre as funcionalidades emergentes relacionadas à nanotecnologia está a possibilidade dos revestimentos veicularem compostos ativos, como, por exemplo, nutrientes, com consequente aumento do valor nutricional do alimento revestido. Contudo, a eficiência funcional está diretamente relacionada com a natureza e estrutura física dos componentes na elaboração de nanossistemas, logo a escolha desses componentes vai depender do objetivo e da natureza do alimento que será revestido [29]. Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada ao potencial de polímeros naturais, tais como polissacarídeos, como componentes alternativos na elaboração de nanossistemas [29] [65] [39]. Neethirajan e Jayas (2011) ressaltam esse

potencial como inovador e tecnológico.

As nanopartículas de quitosana são promissoras na função de carreadores pois podem facilitar o transporte de moléculas carregadas através do epitélio celular absorvivo, e, ainda, proteger moléculas bioativas sensíveis da ação de enzimas e da degradação química, tanto *in vivo* quanto durante o período de estocagem [25].

2.7 Aspectos Ambientais

É importante que o desenvolvimento de novas tecnologias estejam em sintonia com as preocupações com o meio ambiente amplamente discutidas na atualidade. Nesse sentido é importante ressaltar que tanto a elaboração de revestimentos comestíveis como de nanoestruturas podem (e preferencialmente devem) estar em consonância com os interesses na proteção ambiental.

A destinação imprópria de um enorme volume de plásticos derivados de petróleo suscita preocupações ambientais e econômicas [30] [25] [83]. Dentre o montante desse lixo que é gerado diariamente, as embalagens de alimentos abarcam uma parte considerável [8], pois são geradas em grandes quantidades, descartadas rapidamente e os programas de reciclagem não suportam essa demanda [9]. Por não serem biodegradáveis, é possível que essas embalagens permaneçam por centenas e até milhares de anos sem decomposição [102]. Dessa forma, há uma necessidade expressiva de que novos materiais compostos por polímeros biodegradáveis para a elaboração de embalagens de alimentos sejam desenvolvidos [30] [52].

É importante esclarecer que um material biodegradável é aquele que é passível de ser inteiramente deteriorado pela ação de microorganismos até se tornarem compostos naturais simples; exemplos gás carbônico (CO_2), água (H_2O), metano (CH_4) e hidrogênio (H_2) e serem então redistribuídos na natureza por ciclos elementares, como exemplo o do Carbono [74]. Sendo assim, revestimentos comestíveis ajustam-se perfeitamente ao ecossistema e transpõem as questões econômicas e ambientais que as embalagens tradicionais apresentam [24] [102]. Isto porque, em condições normais de temperatura, pressão e umidade, são hidrolisados por micro-organismos como fonte de nutriente, sendo hidrolisáveis a CO_2 , H_2O e CH_4 [74].

Dessa forma, a biodegradabilidade representa uma enorme vantagem dos revestimentos comestíveis elaborados a partir de biopolímeros. Estes atendem ao desafio de aumentar a vida de prateleira e manter a qualidade dos alimentos e, ao mesmo tempo reduzir, os resíduos

de embalagens [25] [8], e respondem as demandas crescentes de consumidores que cada vez mais buscam por produtos naturais e com baixo impacto ambiental [12].

Considerando as preocupações relacionadas ao meio ambiente, o amido se destaca dentre os diferentes polímeros passíveis de aplicação para fins de revestimento [4]. Isso por que é um biopolímero versátil, com grande potencial para escalonamento, pode ser disponível por um baixo preço e possui excelente biodegradabilidade [4] [52].

Em relação à síntese de nanoestruturas, para que esta tenha baixo impacto ambiental, deve utilizar rotas de síntese que utilizem preferencialmente organismos biológicos (ou parte deles) e/ou solventes de baixa ou nula toxicidade no lugar de produtos químicos, tóxicos e caros, e que resultem em nanoestruturas biocompatíveis e biodegradáveis [90] [60] [114]. São diversas as possibilidades que servem como alternativa sustentável ao uso de reagentes químicos tóxicos, como por exemplo extratos de diversas plantas, micro-organismos, partes de organismos biológicos como os órgãos, tecidos, células ou biomoléculas.

3 Justificativa

A Vitamina A é um nutriente essencial envolvido em várias funções metabólicas no organismo [106]. Sua deficiência pode gerar diversos prejuízos à saúde dos indivíduos e resultar em aumento de morbi-mortalidade para sua população de risco, mulheres e crianças. Principalmente em países em desenvolvimento, mas não somente, a deficiência de vitamina A (hipovitaminose A) é um dos principais problemas nutricionais da atualidade.

Esta deficiência alcança proporções alarmantes. A Organização Mundial de Saúde (OMS) esclarece que no mundo inteiro 45 países apresentam a hipovitaminose A como problema de saúde pública em níveis clínicos, enquanto que em 122 países o problema é subclínico. No Brasil, estados de todas as regiões passam por esse problema em condição de endemia [13] [5] [53].

Uma das dificuldades em desenvolver estratégias que visem à redução dos casos de hipovitaminose A, é o fato de que esta vitamina é uma molécula sensível que deve ser preservada de elementos pró-oxidantes que podem afetar a sua integridade química e reduzir os seus benefícios fisiológicos [44].

Khoo e Knorr (2014) em trabalho recente citam a integração científica e os investimentos em investigação de tecnologias modernas como essencial para o enfrentamento dos desafios para a segurança alimentar e nutricional nas próximas décadas. Ainda, reforça a necessidade de “desenvolvimento, aplicação, coordenação e partilha de abordagens integradas de pesquisa e soluções interdisciplinares” para problemas da ciência da nutrição [66].

Nesse sentido, convém a integração de duas tecnologias: a nanoencapsulação e as películas comestíveis como estratégias no enfrentamento da hipovitaminose A. Considerando as possibilidades oferecidas pelo uso da nanobiotecnologia e a necessidade real de oferta de retinol em alimentos acessíveis à população, é plausível desenvolver nanossistemas que aprisionem vitamina A para serem veiculados por uma película comestível revestindo frutas, por exemplo maçãs.

A associação destas duas tecnologias pode permitir que a vitamina A seja veiculada de maneira que as suas propriedades permaneçam nativas ao longo do tempo [44], de modo que fiquem protegidas, já que a nanoencapsulação a protege de diversos agentes [44], como, por exemplo, oxigênio, variações de temperatura, alterações de pH, incidência de luz (UV) e etc [20]. E ainda, em um sistema de revestimento biodegradável que pode aumentar a vida de

prateleira e a segurança higiênico-sanitária do fruto que reveste. As maçãs constituem uma boa alternativa por serem populares, de boa aceitação entre os brasileiros, com produtividade competitiva no mercado internacional e, em termos de distribuição, exige atenção à conservação dos frutos maduros [93].

É importante esclarecer que a escolha dessa estratégia, no que diz respeito às rotas de sínteses e os reagentes utilizados para a obtenção das nanoestruturas, bem como ao desenvolvimento das películas e os biopolímeros utilizados, foi feita considerando a importância do desenvolvimento de novas tecnologias em sintonia com as preocupações com o meio ambiente, amplamente discutidas na atualidade e ponto chave em todos os trabalhos realizados pelo Grupo de Pesquisa em Nanobiotecnologia e Biologia Sintética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Por fim, ressalta-se que o desenvolvimento dessa pesquisa tem potencial para inovar e incrementar os estudos relativos à nanoencapsulação e películas comestíveis desenvolvidos até o momento, principalmente por integrar estas duas tecnologias e por não haver atualmente estudos envolvendo a veiculação de vitamina A com essa abordagem.

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar uma nanoemulsão de óleo de canola e nanopartículas de quitosana contendo acetato de retinol para serem incorporadas em uma película comestível elaborada pela combinação de amidos de milho e de mandioca para revestimento de maçãs.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar qualitativamente acetato de retinol comercial por espectrometria de massa MALDI-TOF;
- Obter nanoemulsões aprisionando acetato de retinol;
- Obter nanopartículas de quitosana aprisionando acetato de retinol pelo método de nanoprecipitação;
- Caracterizar morfológicamente e físico-quimicamente as nanoemulsões e as nanopartículas de quitosana quanto à forma, ao tamanho, à carga de superfície, à homogeneidade da suspensão e à estabilidade coloidal;
- Avaliar a reprodutibilidade das rotas de síntese da nanoemulsão e das nanopartículas de quitosana;
- Verificar a cinética de estabilidade coloidal da nanoemulsão e das nanopartículas de quitosana;
- Quantificar a eficiência de encapsulação das nanopartículas de quitosana;
- Avaliar a taxa de liberação das nanoemulsões e das nanopartículas de quitosana em meios fisiológicos;
- Desenvolver uma película comestível incorporando as nanoemulsões e as nanopartículas de quitosana;
- Avaliar os impactos da aplicação da película em maçãs quanto à aparência geral, brilho, cor e perda de massa.

5 Metodologia

O presente estudo seguiu a estratégia experimental representada esquematicamente na figura 3. Foram elaborados dois tipos de nanossistemas aprisionando retinol livre sob forma de acetato de retinol. Estes foram caracterizados e avaliados fisicoquimicamente e quanto à estrutura. Paralelamente, desenvolveu-se uma película comestível a partir da combinação de biopolímeros de amido de duas fontes vegetais e, em seguida, os nanossistemas obtidos foram incorporados à película. Por fim, o impacto da aplicação das películas incorporadas com os nanossistemas foi verificado em maçãs. A metodologia utilizada e os resultados obtidos em cada etapa serão abordados em detalhes.

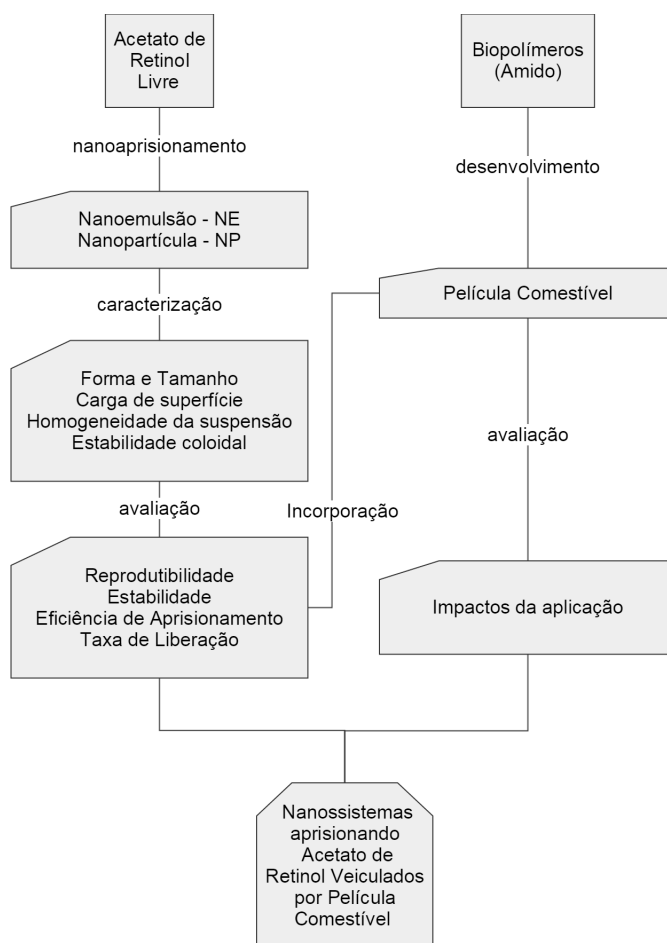


Figura 3: Diagrama representativo da estratégia experimental seguida para a obtenção da película com acetato de retinol nanoestruturado incorporado. Fonte: a própria autora.

5.1 Identificação do Acetato de Retinol

A amostra de acetato de retinol foi adquirida em um farmácia magistral localizada na região de Brasília-DF/Brasil. Junto com a amostra, foi solicitado ao fornecedor um relatório técnico do produto. Até o momento da sua análise, a amostra foi armazenada sob o abrigo da luz, em umidade relativa do ar de aproximadamente 30% e temperatura de 20° C.

Primeiramente, foi realizada uma análise sensorial da amostra quanto aos seus aspectos físicos (forma física e cor), confrontando esta análise com as informações constantes no relatório técnico apresentado pelo fornecedor e disponível na literatura científica.

Em seguida, a solubilidade da amostra foi avaliada em diferentes solventes. Para tanto, foram pipetados em microtubos de polipropileno (tipo Eppendorf, 1,5 mL), individualmente e na seguinte ordem: 130 mg da amostra de acetato de retinol em pó e 1 mL de um dos solventes: Água ultrapura (Milli-Q), Acetonitrila a 20, 50 e 70%, Etanol a 20, 50 e 70%. Ou, então, 20,5 mg de cada amostra de acetato de retinol em pó e 1 mL de óleo de soja, óleo de canola, azeite ou óleo de tomate. A fim de homogeneizar as suspensões, cada amostra foi submetida ao agitador de tubos vortex (Quimis[®], Q220) por 30 segundos. As amostras de acetato de retinol foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU EX 200; Max.: 200g, Min.: 0,01g)

Por fim, todas as amostras foram analisadas por inspeção visual e classificadas quanto ao aparecimento de precipitado (nenhum, escasso e abundante) e homogeneidade da suspensão (homogênea ou heterogênea) 48 horas após a sua obtenção. É importante ressaltar que todos os procedimentos foram realizados em condições de baixa luminosidade.

A confirmação da presença do acetato de retinol na amostra se deu por espectrometria de massa, realizada em espectrômetro de massa MALDI-TOF (Bruker-Daltonics; Microflex). Primeiramente, preparou-se uma suspensão contendo 130 mg de acetato de retinol em pó e 1 mL de água ultrapura (Milli-Q). A partir dessa suspensão, realizou-se uma diluição seriada em água ultrapura (Milli-Q), nas proporções de 1/10, 1/100 e 1/1000 (resultando nas concentrações de 13 mg/mL, 0,13 mg/mL e 0,013 mg/mL respectivamente), aqui denominadas de Amostra 1, Amostra 2 e Amostra 3, respectivamente.

Em seguida, com o auxílio de uma pipeta misturou-se 3 µL de matriz de ácido dihidroxibenzoico (DHB) em acetona (10 mg/mL), reagente que facilita a ionização da amostra a ser analisada, além de conferir suporte sólido, previamente preparada com 1 µL de cada uma

das 3 amostras. O controle foi obtido com a mistura da matriz com água ultrapura (Milli-Q). Por fim, as 3 amostras juntamente com o controle foram depositadas na placa de análise própria do MALDI-TOF. Aguardou-se a cristalização destas amostras e a placa foi submetida à análise. As amostras foram analisadas sob modo refletido e positivo, acumulando o sinal correspondente a 5000 disparos de laser e com intensidade fixada em 60%.

5.2 Síntese dos Nanossistemas

Foram sintetizados dois tipos de nanossistemas aprisionando acetato de retinol. O primeiro foi uma nanoemulsão do tipo óleo de canola em água com agente emulsificante. O segundo foi um nanossistema (nanopartícula) de quitosana obtida por nanoprecipitação. Ambas passaram por um processo de otimização dos parâmetros de síntese onde, ao final, foi possível estabelecer para cada uma delas um método de obtenção otimizado com um conjunto de condições de síntese o qual forneceu nanoestruturas com potencial para diversas aplicações. O processo de obtenção de cada nanossistema foi dividido em etapas, as quais serão detalhadas nos subtópicos seguintes. Para facilitar a compreensão e evitar a repetição dos termos, criou-se uma denominação para os nanossistemas sintetizados, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1: Siglas de identificação dos nanossistemas com acetato de retinol e respectivos controles sem o acetato de retinol.

Sigla	Notação
caNE	Nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol
caNEC	Nanoemulsão de óleo de canola sem acetato de retinol
qsNP	Nanopartícula de quitosana com acetato de retinol
qsNPC	Nanopartícula de quitosana sem acetato de retinol

A cada etapa de obtenção, as suspensões obtidas foram caracterizadas por espectroscopia de fotocorrelação (espalhamento de luz dinâmico) e potencial Zeta de superfície quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-Average*), índice de polidispersidade (PDI), Potencial - ζ e distribuição de diâmetro hidrodinâmico (por número), por meio do equipamento ZetaSizer Nano (Malvern Zeta Sizer Instrument, Nano ZS). A diluição utilizada foi de 1:20 (suspensão : água ultrapura). Foram utilizadas cubetas do tipo DTS1070 e a avaliação foi realizada em modo de análise geral. O espalhamento de luz foi detectado em um ângulo de 173° e em temperatura igual a 25° C. As medidas foram obtidas em triplicata.

A classificação do índice de polidispersividade (PdI) considerou sua expressão em uma escala de 0 a 1, onde quanto mais próximo de 0 mais monodispersa é a amostra, ou seja, quanto mais próximo de 0 mais estreita é a distribuição dos tamanhos das partículas da amostra [41].

Apesar de que a estabilidade coloidal é influenciada por um conjunto de fatores, para o presente estudo o comportamento da estabilidade coloidal foi avaliado pelo valor de Potencial- ζ e a sua classificação deu-se de acordo com o proposto em norma técnica da *American Society for Testing and Materials ASTM* (1985) [38], conforme tabela 2.

Tabela 2: Classificação do comportamento da estabilidade coloidal pelo valor de Potencial- ζ , segundo ASTM (1985).

Potencial- ζ (mV)	Comportamento da estabilidade coloidal
Entre 0 e ± 5	Coagulação rápida ou floculação
Entre ± 10 e ± 30	Instabilidade incipiente
Entre ± 30 e ± 40	Estabilidade moderada
Entre ± 40 e ± 60	Boa estabilidade
Mais que ± 61	Excelente estabilidade

Os gráficos de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em classes foram plotados utilizando o programa Origin[®] 8. Esta caracterização repetiu-se ao longo de todo o trabalho, pois trata-se de uma caracterização básica de estudos que envolvem nanopartículas. Para os testes com os nanossistemas, os valores verificados por esta análise, não mostrados ao longo do trabalho, constam no Apêndice 1. É importante ressaltar que todos os procedimentos foram realizados ao abrigo da luz.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Alguns resultados encontrados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações com nível de significância $P < 0,05$ e utilizando o teste de Tukey. As análises foram feitas com o auxílio do software PAST - Palaeontological Statistics (versão 2.17b, Hammer e Harper, Noruega).

5.2.1 Nanoemulsão

A primeira etapa de obtenção das caNE se deu pela busca da melhor proporção entre o surfactante usado (monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80)) e óleo. Nesse sentido

adotou-se o óleo de canola como modelo e optou-se por cinco diferentes proporções entre este óleo e o surfactante (Tween 80). Estas proporções, bem como as razões surfactante/óleo, estão expostas na tabela 3:

Tabela 3: Volumes em μL de óleo de canola e surfactante (Tween 80) utilizados na obtenção das nanoemulsões com razões de surfactante/óleo de 0,1, 0,4, 1,0, 2,3 e 9,0 (caNE(0,1), caNE(0,4), caNE(1,0), caNE(2,3) e caNE(9,0), respectivamente).

Composição	Amostra				
	caNE(0,1)	caNE(0,4)	caNE(1,0)	caNE(2,3)	caNE(9,0)
Óleo (μL)	45	35	25	15	5
Surfactante (μL)	5	15	25	35	45
Razão (S/O)	0,1	0,4	1	2,3	9

Todos os componentes, juntamente com água ultrapura (Milli-Q) completados para o volume de 300 μL , foram pipetados em microtubos de polipropileno (tipo Eppendorf, 1,5 mL) individuais, segundo suas respectivas proporções e na seguinte ordem: água ultrapura (Milli-Q), óleo e surfactante. Com o auxílio do ultra-turrax (Dremel[®], 300), as suspensões foram emulsionadas em velocidade moderada (21500 rpm) por 30 segundos. As suspensões resultantes foram caracterizadas por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta, conforme especificado.

De posse dos resultados encontrados na primeira etapa, selecionou-se a caNE que apresentou os parâmetros mais favoráveis quanto ao diâmetro hidrodinâmico, Potencial- ζ e PdI, e sua proporção foi utilizada para prosseguir com a otimização. Nesta segunda etapa, as nanoemulsões foram obtidas da mesma maneira que a relatada previamente, porém ajustando para um volume final de 1050 μL , com o acréscimo de 20,5 mg de acetato de retinol e também variando o tempo de emulsificação (30 ou 120 segundos) e a velocidade de emulsificação (21500 ou 43000 rpm), detalhados na tabela 4. As amostras e os respectivos controles foram analisadas por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície, imediatamente após a obtenção e após 7 dias da formulação.

Tabela 4: Descrição do tempo e velocidade de emulsificação aplicados na obtenção das nano-emulsões de óleo de canola e os grupos controle (sem retinol) emulsionadas por 30 segundos a 21500rpm (caNE(30) e caNEC(30)) ou por 120 segundos a 43000rpm (caNE(120) e caNEC(120)).

Amostra	Tempo de Agitação (s)	Velocidade de Agitação (rpm)
caNE(30)	30	21500
caNEC(30)	30	21500
caNE(120)	120	43000
caNEC(120)	120	43000

5.2.2 Nanopartículas de Quitosana

As nanopartículas de quitosana (qsNP) aprisionando acetato de retinol foram obtidas pelo método de nanoprecipitação proposto por FESSI e colaboradores (1988) [34], com modificações e também passou por um processo de otimização. Basicamente, o método constitui-se da mistura de duas suspensões denominadas fase orgânica e fase aquosa.

Para a obtenção da fase aquosa, pesou-se (QUIMIS[®] BK 300; Max.: 310 g, Min.: 0,02 g) 40 mg de quitosana e depositou-se esta quantidade em um becker. Neste becker pipetou-se 5 mL de água ultrapura (Milli-Q) e ácido acético a 3,5%. A suspensão foi levada à agitação magnética até a máxima dissolução da quitosana. Por fim, a suspensão foi filtrada com o auxílio de papel filtro (9 mm).

Para a obtenção da fase orgânica, pesou-se 41 mg de acetato de retinol em pó e depositou-se esta quantidade em um microtubo de polipropileno (tipo Eppendorf, 1,5 mL). Em seguida, pipetou-se 500 µL de água ultrapura (Milli-Q) e 500 µL de etanol absoluto (50%(v/v)). A solução foi levada ao agitador de tubos vortex (Quimis[®], Q220) por 30 segundos.

A fase orgânica foi misturada à fase aquosa por meio de um sistema de dosagem controlada. A figura 4 representa a configuração utilizada na mistura das duas fases.

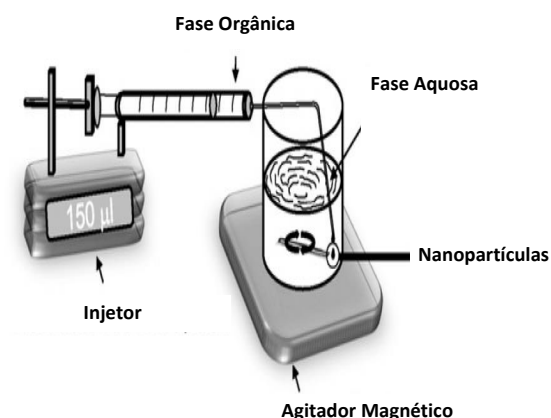


Figura 4: Configuração utilizada para a preparação de nanopartículas pelo método de nano-precipitação. Adaptado de Muera-Huertas (2010).

A fase orgânica foi injetada com o auxílio de um injetor automático (KDSscientific[®], 3000 $\mu\text{L/h}$). Neste primeiro momento, a taxa de gotejamento foi de 3000 $\mu\text{L/h}$ e a fase aquosa foi mantida sob agitação magnética moderada (600 rpm) constante (Quimis[®], modelo Q261, Min.:50 e max.:1300 rpm). As suspensões contendo as qsNP resultantes desta primeira etapa foram analisadas por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta, conforme especificado anteriormente. A amostra controle foi elaborada da mesma maneira, excluindo-se o acréscimo do acetato de retinol.

Considerando os resultados encontrados nesta primeira etapa, repetiu-se a síntese das qsNP, contudo variaram-se os parâmetros para a mistura da fase orgânica com a fase aquosa. A taxa de gotejamento foi de 1500 ou 3000 $\mu\text{L/h}$ e a fase aquosa foi mantida sob agitação magnética moderada (600 rpm) ou vigorosa (1200 rpm). Ao final do procedimento obtiveram-se 4 amostras sob condições diferentes, detalhadas na tabela 5. Por fim, as amostras resultantes foram submetidas à caracterização utilizando espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície.

Considerando os resultados encontrados nas duas fases anteriores, foi necessária uma terceira etapa de otimização. Para tanto, selecionou-se a qsNP com parâmetros de síntese mais promissores. Repetiu-se a síntese seguindo os parâmetros da qsNP selecionada na segunda etapa, porém com o incremento de um processo físico em que as nanopartículas obtidas foram submetidas ao ultra-turrax (Dremel[®], 300), variando a velocidade de agitação, resultando em cinco diferentes condições descritas na tabela 6. As suspensões resultantes foram caracte-

Tabela 5: Descrição dos parâmetros adotados na mistura da fase orgânica com a fase aquosa na obtenção das qsNP, variando o gotejamento da fase orgânica, lento (1500 $\mu\text{L/h}$) ou rápido (3000 $\mu\text{L/h}$), sob a fase aquosa, mantida em agitação magnética moderada (600 rpm) ou vigorosa (1200 rpm).

Amostra	Taxa de Gotejamento ($\mu\text{L/h}$)	Velocidade de Agitação (rpm)
qsNP(LentoModerada)	1500	600
qsNP(LentoVigorosa)	1500	1200
qsNP(RápidoModerada)	3000	600
qsNP(RápidoVigorosa)	3000	1200

*Lento ou Rápido e Moderada ou Vigorosa referem-se à taxa de gotejamento e velocidade de agitação respectivamente.

rizadas por meio de espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície, conforme exposto nas etapas anteriores.

Tabela 6: Descrição dos tempos e velocidades de agitação utilizados na dissociação das partículas de quitosana obtidas por nanoprecipitação submetidas ao ultra-turrax por 0 (qsNP(0)), 30 (qsNP(30)), 60 (qsNP(60)), 120 (qsNP(120)) e 180 (qsNP(180)) segundos.

Amostra	Tempo de Agitação (s)	Velocidade de Agitação (rpm)
qsNP(0)	0	0
qsNP(30)	30	10000
qsNP(60)	60	21500
qsNP(120)	120	43000
qsNP(180)	180	43000

Após a análise dos resultados foi selecionada uma condição de obtenção das caNE e das qsNP e, a partir de então, todos os ensaios do presente trabalho se deram com nanoestruturas obtidas sob estas condições.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia de Força Atômica

Para a análise das caNE e seu controle (caNEC), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi a técnica utilizada. Analisou-se a morfologia, o diâmetro médio e a distribuição do diâmetro das micelas da nanoemulsão. Para tanto utilizou-se um microscópio eletrônico

de transmissão (JEM-1011, Jeol, Japão);) operado a 100 kV, sendo as imagens obtidas com uma câmera digital (Ultrascan, Gatan, Estados Unidos) associada ao microscópio.

As caNE e caNEC foram sintetizadas de acordo com a metodologia relatada anteriormente. Para análise, foi necessário diluir a suspensão das caNE em 1:10. Dessa solução, depositou-se 1 μL em uma grade de cobre com 150 malhas vazadas recobertas com um filme de suporte de colódio. Obteve-se eletromicrografias contrastadas negativamente por meio do ácido fosfotúngstico (2%) (TPA).

A microscopia de força atômica (MFA) foi a técnica utilizada para caracterização das qsNP e qsNPC. Por meio dessa técnica foi possível desenvolver análises quanto à morfologia, diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição do diâmetro (em altura) das partículas.

As qsNP e qsNPC foram sintetizadas conforme anteriormente relatado. Para análise no microscópio, foi necessário diluir a suspensão das qsNPs em 1:10. Dessa suspensão depositou-se 1 μL sobre superfícies recém clivadas de mica muscovita montadas em um suporte metálico em formato de moeda com o auxílio de fita dupla-face. Aguardou-se a secagem em temperatura ambiente e sob abrigo em placas de Petri.

As imagens foram obtidas em um microscópio de força atômica (SPM 9600, Shimadzu, Japão) com resolução de 512 x 512 linhas, por modo de operação dinâmico com varreduras realizadas na frequência de 1 Hz. A dimensão máxima de varredura alcançou 10 x 10 μm . A ponteira cônica utilizada foi de silício, acoplada a cantilever de formato retangular.

O processamento das imagens foi realizado com o auxílio do software próprio do equipamento (SPM-9600 off-line). Foram utilizadas apenas imagens de altura. Estas passaram por ajustes no plano automático e do eixo x. As imagens em 3D foram magnificadas no eixo X em 1,0 x. Houve redução das linhas contendo ruídos para fins de visualização.

5.3 Testes com os Nanossistemas

5.3.1 Reprodutibilidade dos Nanossistemas

Uma vez que todos os parâmetros de síntese foram otimizados, o procedimento de síntese foi realizado sob condições selecionadas. Cada procedimento de síntese foi realizado três vezes, um seguido do outro, respeitando individualmente cada etapa da síntese, primeiro para a obtenção das caNE e, depois, para obtenção das qsNP.

Como resultado, obteve-se três lotes de caNE e três lotes de qsNP, juntamente com os

respectivos controles. Todas as amostras foram caracterizadas por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície.

5.3.2 Estabilidade dos Nanossistemas

A fim de verificar a estabilidade das nanoestruturas ao longo do tempo e em diferentes condições de armazenamento, repetiu-se o procedimento de obtenção dos dois nanossistemas e estes foram submetidas à caracterização por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície imediatamente após a sua obtenção (dia 0). Em seguida, foram armazenadas a 20° C ou 5° C (em câmara fria), e depois novamente caracterizadas após 1, 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias.

5.3.3 Eficiência de Encapsulamento do Acetato de Retinol

A eficiência de encapsulamento foi realizada somente para as qsNP e seu controle, pois considerando a estrutura formada pela nanoemulsão todo o acetato de retinol ficou retido na suspensão formada por esse método.

Para a avaliação da eficiência de encapsulamento das qsNP submeteram-se alíquotas de 500 µL destas suspensões, previamente preparadas, à ultrafiltração através de uma membrana com limite de exclusão de massa molecular nominal de 3 kDa (Amicon Ultra-0.5, Millipore).

Para tanto, as alíquotas foram depositadas em microtubos contendo o filtro e, em seguida, centrifugadas (MiniSpin, Eppendorf, 13.000 rpm) por 30 minutos à uma rotação de 13.000 rpm. O conteúdo que conseguiu atravessar o filtro (solução contendo acetato de retinol livre) foi retirado, diluído 25 vezes em água ultra-pura (Milli-Q) e levado à análise por espectrofotometria de absorção UV-vis, leitura de absorbância com comprimento de onda a 370 nm (UV 2500 UV-VIS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

A curva padrão de concentrações (para a obtenção da equação da reta) foi construída a partir da leitura de absorbância de dez soluções de água ultrapura (Milli-Q) com acetato de retinol livre, em dez diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), onde 100% representa o valor máximo equivalente à mesma concentração utilizada para a obtenção das qsNP. As soluções foram diluídas 25 vezes em água ultra-pura e procedeu-se a leitura das absorbâncias. Todas as leituras foram efetuadas em triplicata.

A eficiência de encapsulamento foi estimada aplicando o valor da absorbância da solução

ultrafiltrada de qsNP à equação obtida pela curva de calibração (curva padrão).

5.3.4 Taxa de Liberação do Acetato de Retinol em Meio Fisiológico

A taxa de liberação do acetato de retinol das nanoemulsões e das nanopartículas de quitosana em meios fisiológicos foi identificada com o auxílio de membranas de diálise (Spectrapor, Thomas Scientific) constituídas de uma membrana de celofane com poros que permitem a passagem de moléculas menores que 14000 Da. Estes dispositivos, sob a forma de sacos contendo os nanossistemas foram inseridos em duas soluções onde uma era mimética dos fluidos gástricos e a outra mimética dos fluidos intestinais, conforme ilustrado na figura 5.

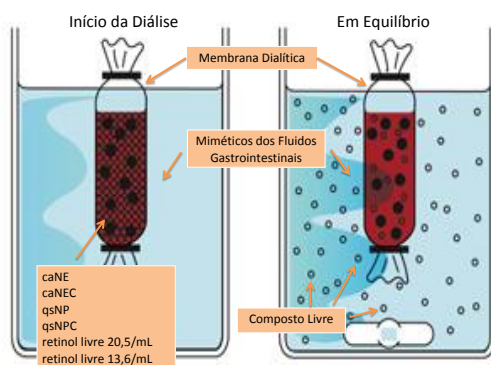


Figura 5: Esquema da diálise utilizada para verificar a taxa de liberação do acetato de retinol das nanoestruturas em meio fisiológico. Fonte: adaptada do próprio fornecedor. Disponível em <http://www.spectrumlabs.com/dialysis/Fund.html>

Foram utilizados como meios fisiológicos os fluidos miméticos gástrico (FMG) e intestinal (FMI). Estes foram elaborados segundo recomendação da farmacopeia internacional (OMS, 2006) [86] e sua composição está mostrada na tabela 7. Após serem elaborados, verificou-se o pH de cada uma das suspensões com o auxílio de um pHmetro (Quimis[®], modelo C488RS)

Ao todo foram analisados um total de doze tratamentos divididos em dois grupos, dos quais seis amostras em FMG e seis em FMI. As amostras são: caNE, caNEC, qsNP e qsNPC, previamente preparadas, e também retinol livre a 20,5 mg/1mL (mesma concentração utilizada na formulação da caNE) e retinol livre a 13,6 mg/1mL (mesma concentração utilizada na formulação da qsNP).

Tabela 7: Reagentes e as respectivas concentrações dos fluidos miméticos gástrico (FMG) e fluidos miméticos intestinal (FMI).

	Reagente	Concentração
FMG	Cloreto de Sódio	200 mg
	Ácido Clorídrico	700 µL
	Água	100 mL
	Pepsina	320 mg
FMI	Hidróxido de Sódio 0,2 mol	7,7 mL
	Fosfato de Potássio Monobásico	680 mg
	Água	100 mL
	Pancreatina	omitida

Para a análise, depositou-se 1 mL de cada formulação em um saco de diálise. Em seguida, cada um dos 12 sacos de diálise foi colocado em um tubo de tipo Falcon de 50 mL, contendo ou FMG ou o FMI, conforme o grupo. O tubo foi deixado em incubadora (Quimis[®], modelo Q816M22) a 37° C sob agitação horizontal constante variando de 80 a 100 rpm.

Durante 8 horas foram recolhidas a cada 1 hora amostras da suspensão mimética dos sucos gastrointestinais possivelmente contendo acetato de retinol liberado das nanoestruturas. Estas amostras foram levadas à análise por espectrofotometria de absorção UV-V, onde foram medidas as absorbâncias com comprimento de onda de 370 nm (UV 2500 UV-VIS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

5.4 Desenvolvimento da Película Comestível

5.4.1 Desenvolvimento da Película Comestível

Preparou-se a solução filmogênica (SF). Para tanto, usou-se 0,5 g de amido de mandioca, 0,5 g de amido de milho e 97 mL de água destilada. A solução foi levada à aquecimento até 70° C, sob agitação magnética lenta constante (200 rpm). Após a gelatinização dos amidos, a solução foi resfriada à 60° C e 2 mL de glicerol foram adicionados. Em seguida, foi feita uma análise qualitativa das qualidades sensoriais da SF, quanto à cor e odor.

As maçãs utilizadas foram adquiridas no comércio local da região de Brasília-DF/Brasil. Para a aplicação da SF, primeiramente as maçãs foram lavadas e higienizadas. O agente higienizante utilizado foi o Biocloro[®], composto por hipoclorito de sódio (2,5%) e cloreto de sódio (1%) diluído em água para uma concentração final de 0,001%. Após a secagem, as maçãs foram pesadas e organizadas em seis grupos contendo três maçãs cada. Em seguida, cada grupo de maçãs recebeu um dos tratamentos, sendo eles de água, SF, SF com um dos nanossistemas ou água com um dos nanossistemas, detalhado na tabela 8. O tratamento foi feito por aspersão voltada para a porção medial das maçãs, à uma distância de ± 7 cm.

Tabela 8: Composição e proporção dos componentes dos tratamentos com água, solução filmogênica (SF), solução filmogênica e nanoemulsão de óleo de canola (SF e caNE), nanoemulsão de óleo de canola e água (caNE), solução filmogênica e nanossistema com nanopartículas de quitosana (SF e qsNP), nanossistema com nanopartículas de quitosana (qsNP).

Tratamento	Quantidades		
	Água	Solução Filmogênica (SF)	Nanoestrutura
Água	1000 μ L	-	-
SF	-	1000 μ L	-
SF e caNE	-	996,7 μ L	3,3 μ L caNE
caNE	996,7 μ L	-	3,3 μ L caNE
SF e qsNP	-	997,8 μ L	2,2 μ L qsNP
qsNP	997,8 μ L	-	2,2 μ L qsNP

5.4.2 Avaliação da Aplicação da Película Comestível

Após aspersão dos tratamentos, as maçãs foram armazenadas sob condições controladas de temperatura (5° C) e umidade (30%) por um período de 10 dias. A fim de verificar alterações sensoriais nos frutos, nos dias 2 e 10 após a aspersão dos tratamentos, as maçãs foram qualitativamente analisadas e classificadas quanto à alteração no brilho (aumento ou redução) e cor (alteração ou não alteração), comparativamente ao controle (apenas água). Registros fotográficos também foram feitos.

A fim de verificar se os tratamentos influenciaram a perda de massa das maçãs ao longo do tempo, foram realizadas pesagens diárias nos 10 dias subsequentes aos tratamentos.

6 Resultados e Discussão

6.1 Identificação do Acetato de Retinol

Segundo análise sensorial, a amostra comercial de acetato de retinol apresentava-se em forma de pó, de cor amarelada e com grânulos pequenos. Este resultado está em conformidade com a literatura científica que afirma que a cor do acetato de retinol pode variar de amarelo a levemente alaranjado e também em conformidade com a alegação apresentada no relatório técnico emitido pelo fabricante [109]. Em relação à solubilidade, a tabela 9 mostra o resumo das características observadas para os solventes testados.

Tabela 9: Solubilidade das amostras de acetato de retinol solubilizadas em Água (A), Acetonitrila à 20, 50 e 70% (AA20, AA50, AA70), Etanol à 20, 50 e 70% (E20, E50, E70), Óleo de Soja, Óleo de Canola, Azeite de Oliva e Óleo de Tomate.

Amostra	Formação de Precipitado	Homogeneidade da Suspensão
A	Nenhum	Homogênea
AA20	Escasso	Homogênea
AA50	Escasso	Homogênea
AA70	Nenhum	Homogênea
E20	Nenhum	Homogênea
E50	Nenhum	Homogênea
E70	Nenhum	Homogênea
Óleo de Soja	Abundante	Heterogênea
Óleo de Canola	Abundante	Heterogênea
Azeite	Abundante	Heterogênea
Óleo de Tomate	Abundante	Heterogênea

De maneira geral, o acetato de retinol apresentou solubilização total em Água, e boa solubilização em acetonitrila e etanol em diferentes concentrações. A solubilização total em água está de acordo com o previsto no relatório técnico do produto. Quanto à solubilização em óleos vegetais, as amostras misturadas nos 4 tipos de óleos apresentaram-se heterogêneas com formação quase imediata de precipitado, formado por quase todo o conteúdo de acetato de retinol vertido inicialmente. É importante esclarecer que o retinol é lipossolúvel, contudo em forma de acetato de retinol, este é hidrossolúvel. Juntos, estes resultados indicam que, para a síntese de emulsões, não é possível solubilizar diretamente o ativo em óleo. É preciso primeiro solubilizá-lo em um dos outros meios aqui testados: água ultrapura (Milli-Q), etanol

ou acetonitrila.

A confirmação da presença de acetato de retinol na amostra se deu pela detecção das massas moleculares esperadas por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF. Para tanto, confrontou-se as informações das massas moleculares obtidas (figura 6) com a informação da massa molecular conhecida do acetato de retinol (328,49 Da) reportada no relatório técnico emitido pelo fabricante e na literatura científica [113] [111].

Não foi possível detectar a massa molecular esperada para o acetato de retinol 329,49 Da (referente à 328,49 Da do acetato de retinol e mais 1 Da da protonação conferida pelo H^+ ($MM = 1$)) em nenhuma das 3 amostras. Contudo, nos espectros da amostra nas três diferentes diluições se destaca a presença do íon de intensidade de sinal na região correspondente à massa molecular igual a 269,2 Da. Esse íon não foi observado no espectro de massa da matriz DHB (sem a presença do acetato de retinol).

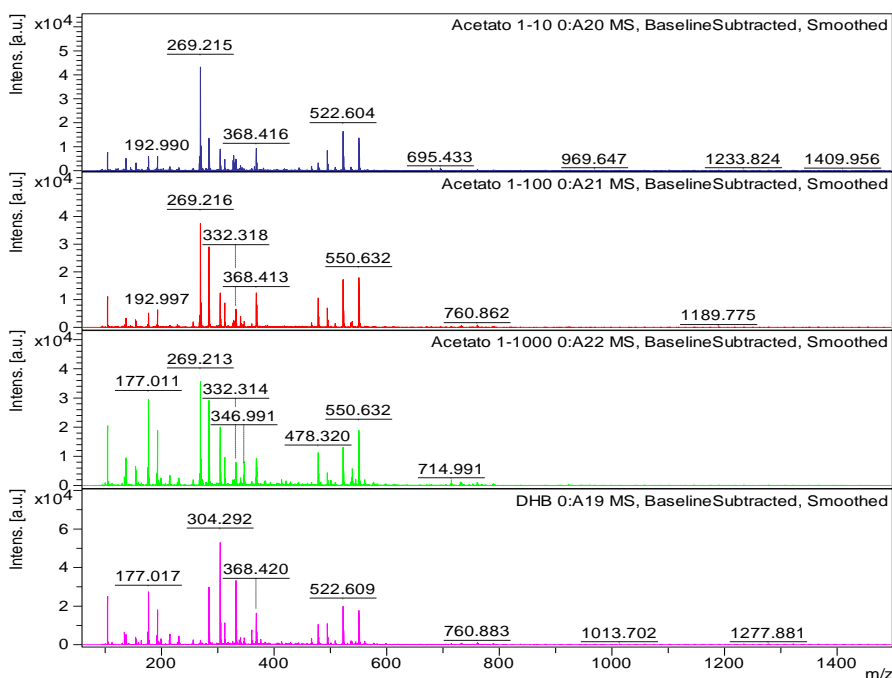


Figura 6: Espectros de massa molecular do acetato de retinol em pó diluído em 1:10, 1:100 e 1:1000 e da Matriz DHB sem o acetato de retinol.

A diferença de massas moleculares entre a esperada, (329,49 Da) e a observada (269,2 Da) é igual a aproximadamente 60 Da. Comparando a estrutura molecular do acetato de retinol e do retinol, cuja fórmula molecular é $C_{22}H_{32}O_2$ ($MM = 328,49$ Da), tem-se a presença do grupo ácido acético, cuja fórmula molecular é CH_3COOH ($MM = 60$ Da) [72] conforme

ilustrado na figura 7.

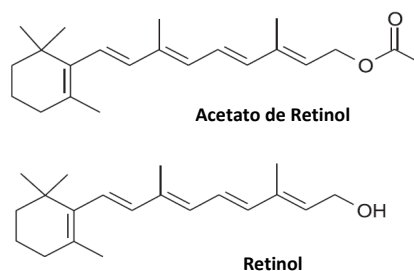


Figura 7: Estrutura molecular do acetato de retinol e do retinol. Adaptado de TANU-MIHARDJO (2013) [106].

Dessa forma, a hipótese é de que a presença do íon na região correspondente à massa molecular nominal de 269,2 Da se deu devido à eliminação de ácido acético (MM = 60 Da) a partir de moléculas protonadas de acetato de retinol, após a amostra ser submetida ao procedimento de análise por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF. Isso porque a porção da estrutura com massa molecular de 269 Da é a mais resistente e no processo de análise por espectrometria de massa MALDI-TOF houve a perda de componentes da molécula de acetato de retinol, o ácido acético. Essa hipótese é confirmada pelo trabalho clássico de Van Breemen *et al* (1998) e também pelo de Vinas *et al* (2013) que, analisando retinol, acetato de retinol e palmitato de retinol por meio de diferentes técnicas, também chegaram a esse valor de massa molecular [113] [111].

6.2 Síntese dos Nanossistemas

6.2.1 Nanoemulsão

A busca pela proporção mais apropriada entre surfactante e óleo, desenvolvida na primeira etapa da otimização do processo de obtenção das nanoemulsões, resultou em cinco nanoemulsões. As razões surfactante e óleo de 0,1 e 0,4 resultaram em nanoemulsões com valores de diâmetro hidrodinâmico médio, potencial- ζ e PDI sem diferenças estatísticas. A tabela 10 mostra os valores verificados.

O *Z-average* da amostra NE(2,3) foi estatisticamente diferente das demais amostras, apresentando um valor expressivamente maior, alcançando a escala dos micrômetros. Uma hipótese para explicar este resultado é uma eventual formação de aglomerados sob estas

condições ou até mesmo a presença de alguma contaminação na amostra.

Em relação aos valores de Potencial- ζ verificados, segundo a classificação de estabilidade coloidal proposta pela ASTM (1985), todas as emulsões obtidas possuem instabilidade incipiente, pois estão com carga superficial entre 10 e 20 mV em módulo. Sendo assim, devido à atração ser maior que a repulsão, o coloide é considerado eletricamente instável e tende a flocular [100].

É importante ressaltar que com a mudança de proporção entre óleo e surfactante há variação no valor da carga de superfície das amostras, evidenciado por diferença estatística entre elas. Com o incremento da quantidade de óleo e diminuição de surfactante houve aumento do valor em módulo do Potencial- ζ , ou seja, com o aumento da quantidade de óleo houve consequente aumento da estabilidade.

Outra observação importante e correlacionada é que os valores de Potencial- ζ são negativos, fato também reportado por Laouini *et al* (2012) e Yan *et al* (2009). Em emulsões os surfactantes iônicos são geralmente os responsáveis por fornecer carga elétrica para as gotículas de emulsão. Contudo, o surfactante utilizado na obtenção das nanoemulsões do presente estudo (Tween 80), e nos demais estudos citados, é não iônico [71] [115] [100]. Yan *et al* (2009) colocam que é possível que este fato ocorra pela absorção de OH das impurezas catiônicas do óleo ou do ativo, no caso do seu estudo com β -caroteno. Para o presente estudo, já que houve relação entre o aumento da quantidade de óleo e o aumento em módulo do Potencial- ζ presume-se que o óleo foi o responsável pela carga de superfície negativa e por aumentar o seu valor. Quanto ao índice de polidispersividade (PDI), todas as amostras analisadas obtiveram um valor alto (entre 0,575 e 1), indicando que todas as amostras são polidispersas.

Tabela 10: Valores de *Z-Average*, Potencial- ζ e Índice de Polidispersividade (PdI) verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície das nanoemulsões com razões de surfactante/óleo de 0,1, 0,4, 1,0, 2,3 e 9,0 (caNE(0,1), caNE(0,4), caNE(1,0), caNE(2,3) e caNE(9,0) respectivamente).

Amostra	Z-Average* (nm)	Potencial-ζ (mV)	PdI
caNE(0,1)	708,66 \pm 80,02	-20,7 \pm 0,6	0,676 \pm 0,068
caNE(0,4)	843,76 \pm 128,59	-20,1 \pm 0,5	0,752 \pm 0,039
caNE(1,0)	713,66 \pm 112,84	-15,8 \pm 0,3 ^{a,b}	1,000 \pm 0,000
caNE(2,3)	2203,66 \pm 104,27 ^{a,b,c}	-17,2 \pm 0,8 ^{a,b}	1,000 \pm 0,000
caNE(9,0)	497,16 \pm 60,39 ^{b,c}	-13,4 \pm 0,4 ^{a,b,c,d}	0,575 \pm 0,062 ^b

*Diâmetro hidrodinâmico médio; para cada parâmetro, as letras a, b, c e d indicam diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparado o grupo assinalado e aos grupos caNE(0,1), caNE(0,4), caNE(1,0) e caNE(2,3), respectivamente.

De acordo com a distribuição do diâmetro hidrodinâmico em percentuais relativos de classe por número de partículas (figura 8), as amostras caNE(0,1), caNE(0,4), caNE(1,0) e caNE(2,3) apresentaram distribuição unimodal, ou seja, com apenas uma população de tamanho, enquanto a emulsão caNE(9,0) possui estruturas com distribuição de tamanho bimodal indicando duas subpopulações com tamanhos diferentes. A emulsão caNE(2,3) possui curva de distribuição localizada na região de maior diâmetro hidrodinâmico (entre 100 e 500 nm), sendo esta também a que apresentou o maior valor de *Z-Average* (2203,6 \pm 60,2 nm).

Considerando estes resultados e tendo como critério o diâmetro hidrodinâmico, o Potencial- ζ e o PdI, a amostra caNE(0,1) foi selecionada para prosseguir na próxima etapa no processo de otimização da obtenção das nanoemulsões. Apesar de que esta é similar à caNE(0,4), a quantidade de surfactante utilizada é menor podendo representar uma eventual diminuição do custo de produção.

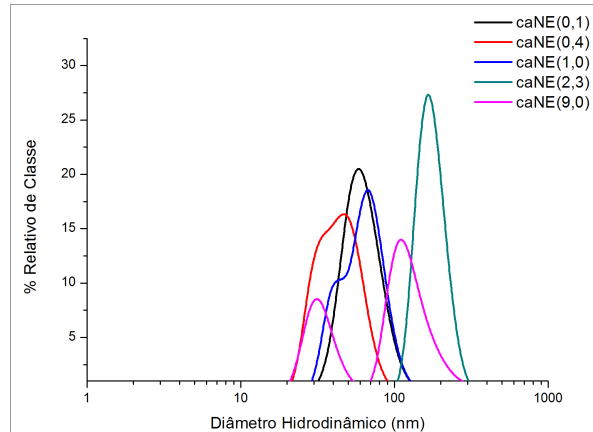


Figura 8: Curva de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de partículas verificadas por espectroscopia de fotocorrelação nas nanoemulsões com razões de surfactante/óleo de 0,1, 0,4, 1,0, 2,3 e 9,0 (caNE(0,1), caNE(0,4), caNE(1,0), caNE(2,3) e caNE(9,0), respectivamente).

Dessa forma, a segunda etapa de otimização prosseguiu com a obtenção de caNE respeitando a proporção de 0,1 (surfactante/óleo) e variando o tempo e a velocidade de emulsificação. Os resultados da análise por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta dessas emulsões encontram-se detalhados na tabela 11.

O diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas das nanoemulsões obtidas com menor tempo de emulsificação (caNE(30)) foi de $464,40 \pm 24,94$ nm. Com o aumento do tempo e intensidade do processo de emulsificação (caNE(120)) houve a formação de gotículas com diâmetro hidrodinâmico médio menor, com valor de $228,83 \pm 11,83$ nm, promissora para aplicações nanotecnológicas.

O diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-Average*) inicial da nanoemulsão contendo o ativo emulsionada por 30 segundos (caNE(30)) foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$) da formulação inicial após 7 dias, o que não ocorreu com a nanoemulsão emulsionada por 120 segundos, indicando a possibilidade de que o tempo de emulsificação possa influenciar na tendência de agregação ou disruptura das gotículas.

Tabela 11: Valores de *Z-Average*, Potencial- ζ e índice de polidispersividade (PdI) verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície das nanoemulsões de óleo de canola e os grupos controle (sem retinol) emulsionadas por 30 segundos à 21500 rpm (caNE(30) e caNEC(30)) ou por 120 segundos à 43000 rpm (caNE(120) e caNEC(120)), nos dias da obtenção e após 7 dias.

Amostra	Leitura	Z-Average* nm	Potencial mV	PdI
caNE(30)	Dia 1	464,40 ± 24,94	-27,7 ± 0,1	0,519 ± 0,029
	Dia 7	249,00 ± 03,84 ^a	-25,4 ± 0,2 ^a	0,433 ± 0,220
caNEC(30)	Dia 1	665,46 ± 27,98 ^{a,b}	-21,4 ± 0,2 ^{a,b}	0,629 ± 0,021
	Dia 7	622,93 ± 24,82 ^{a,b}	-20,6 ± 0,3 ^{a,b}	0,778 ± 0,158 ^{a,b}
caNE(120)	Dia 1	228,83 ± 11,83 ^{a,c,d}	-29,3 ± 0,0 ^{a-d}	0,708 ± 0,021 ^b
	Dia 7	279,13 ± 04,96 ^{a,c,d}	-33,4 ± 0,6 ^{a-e}	0,650 ± 0,058
caNEC(120)	Dia 1	281,30 ± 13,23 ^{a,c,d}	-20,4 ± 0,0 ^{a,b,e,f}	0,652 ± 0,065 ^b
	Dia 7	290,50 ± 05,36 ^{a,c,d}	-15,5 ± 0,4 ^{a-g}	0,481 ± 0,008 ^{d,e}

*Diâmetro hidrodinâmico médio; para cada parâmetro, as letras a, b, c, d, e, f e g, indicam diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparado o grupo assinalado e aos grupos caNE(30) dia 1, caNE(30) dia 7, caNEC(30) dia 1, caNEC(30) dia 7, caNE(120) dia 1, caNE(120) dia 7, caNEC(120) dia 1, respectivamente.

Em comparação aos controles, as amostras emulsionadas por 30 segundos apresentaram partículas com diâmetros hidrodinâmicos médios menores após 7 dias de formulados, contudo, para aquelas emulsionadas por 120 segundos não houve essa diferença ($P < 0,05$). Dentre os diferentes tratamentos foi possível observar que as amostras que foram submetidas à agitação mais intensa (120 segundos à 43000 rpm) apresentaram partículas com menor diâmetro hidrodinâmico médio, indicando que esta é uma condição favorável à obtenção de estruturas menores.

Laouini *et al* (2012), ao sintetizar nanoemulsões óleo em água com óleo MCT (composto por uma estrutura de glicerol e três ácidos graxos de cadeia média) e Tween 80 como surfactante para nanoencapsular vitamina E, também otimizou o método de preparação e avaliou a influência dos parâmetros de processo. Constataram que a velocidade de agitação tem influência no diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas da emulsão no sentido em que à medida em que há o aumento da velocidade do agitador há redução do tamanho médio das gotículas. Tsukada *et al.* (2009) relataram uma redução do tamanho da partícula de 220 nm para 170 nm com aumento da velocidade de 100 a 1000 rpm. Anais *et al* (2009), ao obterem uma nanoemulsão pelo método de emulsificação-difusão, relatou uma redução do tamanho

médio de 554 nm a 276 nm com o aumento da velocidade de agitação de 8000 rpm para 24000 rpm [71] [110] [6].

Todas as emulsões possuem instabilidade incipiente, pois apresentam Potencial- ζ entre 10 e 30 mV em módulo. A emulsão com maior tempo e velocidade de agitação (caNE(30)) possui maior valor em módulo de Potencial- ζ , mas, após 7 dias, esse valor apresentou-se inferior aos demais, indicando aumento da instabilidade e a necessidade de acompanhar a estabilidade a longo prazo. Todas as amostras possuem moderada para alta polidispersão e não se observa padrão nos valores de PdI e o tempo de agitação. Uma possível explicação para estes valores elevados de PdI está na formação de micelas pelo surfactante, que pode contribuir para o aumento do PdI. Esta elevada polidispersão implica na avaliação do tamanho da nanoestrutura por diâmetro hidrodinâmico médio (*A-average*), podendo superestimar ou subestimar o tamanho real nas nanopartículas, pois trata-se de uma média de partículas com distribuição de tamanhos multimodal.

A figura 9 compara a distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos em relação ao número das partículas segundo intervalo de classe das nanoemulsões obtidas nas diferentes condições. É possível verificar que independente do tempo e velocidade de emulsificação, as nanoemulsões apresentam estruturas com tamanhos distribuídos unimodalmente, formando apenas uma população de tamanho com ampla distribuição. A nanoemulsão emulsificada por mais tempo e em agitação vigorosa (caNE(120)) está concentrada em uma população de aproximadamente 40 nm, assim, é a de menor diâmetro hidrodinâmico. Este resultado está de acordo com o verificado pelo diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-Average*).

Os resultados obtidos após as duas etapas de otimização indicaram que a nanoemulsão que apresentou os parâmetros mais favoráveis quanto ao diâmetro hidrodinâmico, PdI e Potencial- ζ foi aquela elaborada com razão 0,1 de óleo de canola/Tween 80 (caNE(0,1)), emulsionada durante 120 segundos a uma velocidade de 43000 rpm (caNE(120)).

Estas condições e composição de síntese foram satisfatórias. Guttoff *et al* (2015) sintetizaram nanoemulsões com vitamina D preparadas por emulsificação espontânea variando composição e condições de síntese e verificaram que as nanoemulsões com os menores diâmetros hidrodinâmicos médios (menores que <200nm), foram as que tiveram como surfactante o Tween 80, com relação surfactante/óleo menores de 1 e emulsificadas em altas velocidades de agitação [49]. Esses resultados são compatíveis ao encontrado por Mayer *et al* (2013) em

estudo semelhante porém envolvendo vitamina E [76]. Dessa forma, todos os testes relatados daqui por diante foram conduzidos com nanoemulsões obtidas seguindo rota de síntese com esses parâmetros.

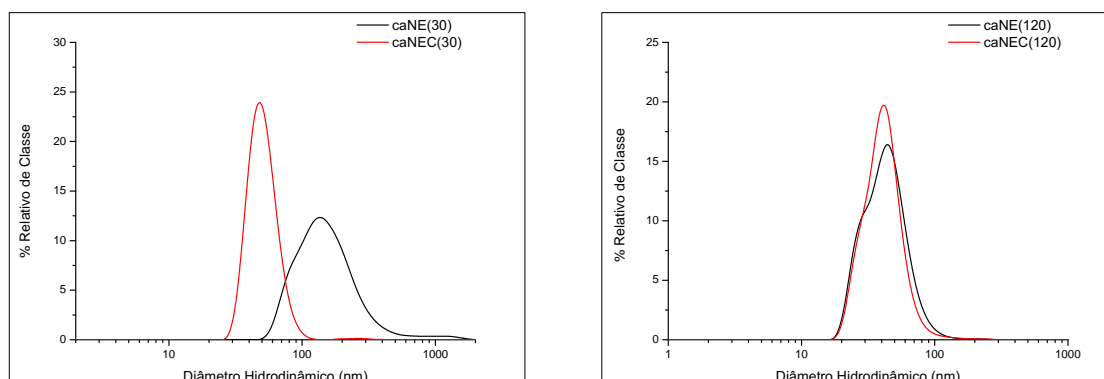


Figura 9: Curva de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número verificados por espectroscopia de fotocorrelação das nanoemulsões de óleo de canola com acetato de retinol e os grupos controle (sem acetato retinol) emulsionadas por 30 segundos à 21500 rpm (caNE(30) e caNE(30)C) ou por 120 segundos à 43000 rpm (caNE(120) e caNE(120)C), no dia da formulação.

6.2.2 Nanopartículas de Quitosana

A primeira etapa da otimização das qsNP resultou em nanopartículas com polidispersão baixa e carga de superfície alta, porém com diâmetro hidrodinâmico médio na escala dos micrômetros. A Tabela 12 detalha os resultados da análise por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta dessas partículas e do seu controle.

O *Z-Average* das qsNP (com ativo) foi de $1810,6 \pm 20,5$ nm, valor maior do que o verificado para a qsNPC (sem ativo), de $1555 \pm 414,2$ nm. Em relação à análise do Potencial- ζ , segundo a classificação de estabilidade proposta pela ASTM (1985), a qsNP possui boa estabilidade enquanto que a qsNPC possui estabilidade moderada. Kim *et al* (2006), obtiveram nanopartículas de quitosana aprisionando retinol por método semelhante ao presente estudo, porém com ultrasonicação e verificaram que estas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de $179,00 \pm 38,10$ nm e com excelente estabilidade coloidal (potencial- $\zeta = 74,86$ mV)[68], valor de diâmetro hidrodinâmico médio muito diferente do verificado neste estudo.

Tabela 12: Valores de *Z-Average*, Potencial- ζ e índice de polidispersividade (PdI) verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície das nanopartículas de quitosana (qsNP) contendo acetato de retinol ou não (qsNPC) obtidas por nanoprecipitação verificados no dia da sua obtenção e após 7 dias.

Amostra	Leitura	<i>Z-Average</i> (nm)	Potencial- ζ (mV)	PdI
qsNP	Dia 1	1810,66 \pm 20,50	58,7 \pm 0,6	0,222 \pm 0,136
	Dia 7	1719,00 \pm 242,35	42,6 \pm 2,1 ^a	0,828 \pm 0,129
qsNPC	Dia 1	1555,00 \pm 414,26	39,3 \pm 8,2 ^a	0,414 \pm 0,250
	Dia 7	1856,00 \pm 46,05	58,9 \pm 1,5 ^{a,b}	0,501 \pm 0,471

*Diâmetro hidrodinâmico médio; para cada parâmetro, as letras a, b e c indicam diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparado o grupo assinalado e aos grupos qsNP dia 1, qsNP dia 7, qsNPC dia 1, respectivamente.

A figura 10 mostra a distribuição do diâmetro hidrodinâmico por número em que as qsNP estão em uma única população com diâmetro hidrodinâmico variando entre 800 nm e 3000 nm, aproximadamente, evidenciando dessa forma a necessidade de otimização com vistas a reduzir o tamanho das partículas obtidas.

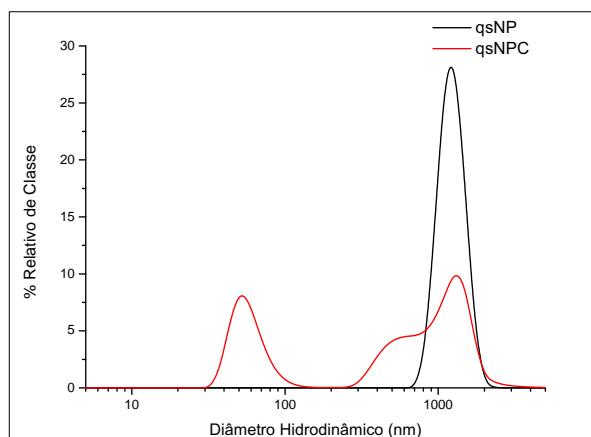


Figura 10: Curva de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número verificados por espectroscopia de fotocorrelação das nanopartículas de quitosana (qsNP) contendo acetato de retinol ou não (qsNPC) obtidas por nanoprecipitação verificadas nos dias da obtenção das formulações.

Em continuidade ao processo de otimização da síntese das qsNP, a segunda etapa contemplou uma síntese em que foram variados os parâmetros para a mistura da fase orgânica com a fase aquosa. A Tabela 13 mostra os valores obtidos pela análise por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta das quatro formulações obtidas sob diferentes condições.

Tabela 13: Valores de *Z-Average*, Potencial- ζ e índice de polidispersividade verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície das qsNP aprisionando acetato de retinol variando o gotejamento da fase orgânica, lento (1500 $\mu\text{L/h}$) ou rápido (3000 $\mu\text{L/h}$) na fase aquosa mantida em agitação magnética moderada (600 rpm) ou vigorosa (1200 rpm).

Amostra	Z-Average (nm)	Potencial-ζ (mV)	PdI
qsNP(LentoModerada)	1807,30 \pm 15,04	68,5 \pm 0,6	0,173 \pm 0,131
qsNP(LentoVigorosa)	1491,00 \pm 41,14	64,9 \pm 1,5 ^a	0,269 \pm 0,033 ^a
qsNP(RápidoModerada)	1558,70 \pm 44,55	66,9 \pm 0,8	0,294 \pm 0,138 ^a
qsNP(RápidoVigorosa)	1802,00 \pm 96,59	67,2 \pm 1,2	0,419 \pm 0,490 ^{b,c}

*Diâmetro Hidrodinâmico médio; para cada parâmetro, as letras a, b e c, indicam diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparado o grupo assinalado e aos grupos qsNP(LentoModerada), qsNP(LentoVigorosa), qsNP(RápidoModerada), respectivamente.

Todas as formulações obtidas sob diferentes condições apresentaram partículas com diâmetro hidrodinâmico médio sem diferença estatística e maior que 1000 nm. Sendo assim, nenhuma das variações experimentais testadas sob a fase orgânica e a fase aquosa foi capaz de modificar, expressivamente, o diâmetro hidrodinâmico médio em relação à síntese desenvolvida na primeira etapa da otimização. Sailaja *et al* (2011) esclareceram que a quitosana está disponível com uma variedade de massas moleculares e diferentes graus de desacetilação, e que estas duas características representam os maiores fatores que influenciam no tamanho da partícula e na sua agregação [92].

As cargas de superfície (Potencial- ζ) das partículas obtidas podem ser classificadas como de excelente estabilidade (maior que 61 mV), segundo a classificação de estabilidade proposta pela ASTM (1985). Hu *et al* (2008) e Kim *et al* (2006) também verificaram esta alta estabilidade em nanopartículas de quitosana. Os primeiros nanoencapsulando catequinas enquanto que os segundos nanoencapsulando acetato de retinol obtidas por métodos semelhante. Uma possível explicação pode estar relacionada ao fato de que as quitosanas com grau de desacetilação superior à 90%, apresentam vários grupos catiônicos disponíveis em sua composição, resultando em alta carga de superfície [54].

As nanopartículas obtidas com a taxa de gotejamento mais lenta (qsNP(LentoModerada)) são monodispersas ($\text{PdI} = 0,173 \pm 0,131$), com valor estatisticamente diferente das demais amostras investigadas ($P < 0,05$). O PdI também é influenciado pela massa molecular da quitosana, onde o incremento desta representa o incremento do PdI e, assim, mais heterogênea

à suspensão. Isso se dá devido ao fato de que quitosana com alta massa molecular é susceptível de ser degradada a vários fragmentos de diferentes dimensões, o que pode levar à nanopartículas com dimensões heterogêneas[54].

As amostras qsNP(LentoModerada), qsNP(RápidoModerada) e qsNP(LentoVigorosa) apresentaram curvas de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos por percentual de classe monomodal, em torno de 1000 nm enquanto que a amostra qsNP(RápidoVigorosa) é bimodal com duas subpopulações, uma variando entre 100 e 500 nm e, a outra, variando em torno de 1000 nm.

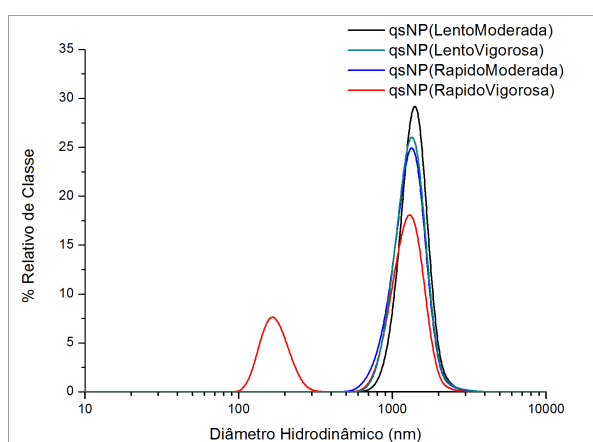


Figura 11: Curva de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de partículas verificados por espectroscopia de fotocorrelação das qsNP aprisionando acetato de retinol, variando o gotejamento da fase orgânica, lento (1500 $\mu\text{L/h}$) ou rápido (3000 $\mu\text{L/h}$), na fase aquosa mantida em agitação magnética moderada (600 rpm) ou vigorosa (1200 rpm).

Sendo assim, com exceção das nanopartículas obtidas com variação na velocidade de agitação magnética da fase aquosa (qsNP(RápidoVigorosa)), todas as demais mantiveram o mesmo perfil de distribuição do diâmetro hidrodinâmico por número verificados na síntese anterior, conforme mostra a figura 11. Para o prosseguimento do processo de otimização, selecionou-se a qsNP(LentoVigorosa).

A última etapa da otimização do processo de obtenção das nanopartículas de quitosana se deu pela submissão das nanopartículas ao ultra-turrax, variando tempo e velocidade de agitação deste. A Tabela 14 mostra os valores obtidos pela análise por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta.

Tabela 14: Valores de *Z-Average*, Potencial- ζ e índice de polidispersividade (PdI) verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície de partículas de quitosana obtidas por nanoprecipitação submetidas ao ultra-turrax por 0 (qsNP(0)), 30 (qsNP(30)), 60 (qsNP(60)), 120 (qsNP(120)) ou 180 (qsNP(180)) segundos.

Amostra	Z-Average* (nm)	Potencial- ζ (mV)	PdI
qsNP(0)	1915,66 \pm 251,14	54,3 \pm 1,0	0,542 \pm 0,068
qsNP(30)	1806,66 \pm 113,93	56,1 \pm 1,1	0,552 \pm 0,090
qsNP(60)	1718,66 \pm 75,39	54,2 \pm 0,9	0,594 \pm 0,085
qsNP(120)	1398,00 \pm 52,71	54,2 \pm 0,7	0,365 \pm 0,035 ^{a,b}
qsNP(180)	-	-	-

*Diâmetro hidrodinâmico médio; para cada parâmetro, as letras a, b e c, indicam diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparado o grupo assinalado e aos grupos qsNP(0), qsNP(30), qsNP(60), respectivamente

Primeiramente é importante ressaltar que a amostra qsNP(180), ao final do processo de agitação, mostrou-se com coloração acinzentada indicando que houve um possível desprendimento de íons ou fragmentos de metal do ultra-turrax pela geração de calor. Sendo assim, não foi feita a leitura desta amostra para não comprometer a segurança do equipamento ou alterar as características das formulações. Ademais, conforme mostra a tabela 14, assim como nas etapas anteriores, as partículas continuaram com diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-Average*) na escala dos micrômetros, com carga de superfície (Potencial- ζ) que lhes confere boa estabilidade coloidal pois estão entre 50 e 60 mV em módulo, e moderada polidispersão, considerando a expressão do índice de polidispersividade (PdI) em uma escala de 0 a 1.

Contudo, ao analisar o diâmetro hidrodinâmico das partículas segundo distribuição por número é possível verificar que o perfil de distribuição foi modificado, conforme mostra a figura 12. Todas as amostras apresentam duas subpopulações de tamanhos diferentes e, assim, com perfil diferente das nanopartículas obtidas nas etapas anteriores. Sugere-se que houve um processo de quebra ou dissociação das nanoestruturas ao serem submetidas a agitação no ultra-turrax resultando em um nanossistema composto por micropartículas e nanopartículas.

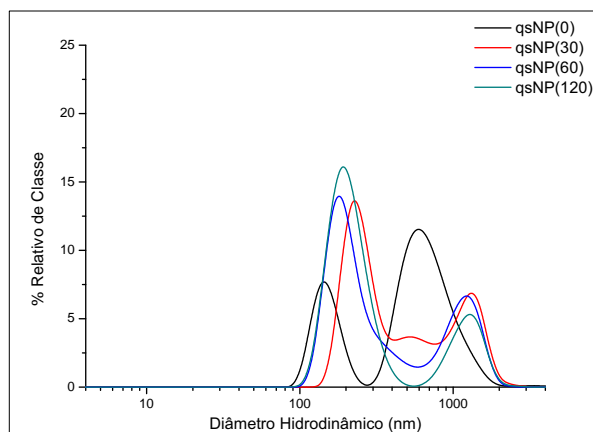


Figura 12: Curvas de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de partículas verificadas por espectroscopia de fotocorrelação das qsNP(0), qsNP(30), qsNP(60), qsNP(120) e qsNP(180).

Considerando os resultados obtidos na busca por uma síntese otimizada de nanopartículas de quitosana aprisionando acetato de retinol, selecionou-se a formulação qsNP(120) desenvolvida nesta última etapa por fornecer partículas com boa estabilidade coloidal, a menor polidispersão e com partículas que compõem um nanossistema contendo simultaneamente nanopartículas e micropartículas, pois é possível que estas tenham perfis diferentes de liberação do ativo, o que pode ser relevante do ponto de vista nutricional. Apesar de que na etapa anterior a qsNP(RápidoVigoroso) mostrou duas subpopulações de tamanhos distintos, a menor subpopulação (próximo a 100 nm) representava um menor percentual relativo quando comparada à qsNP(120).

Por fim, após as três etapas de otimização selecionou-se as qsNP elaboradas com taxa de gotejamento da fase orgânica a 1500 $\mu\text{L}/\text{h}$, sob fase aquosa mantida em agitação magnética constante de 1200 rpm (qsNP(LentoVigorosa)) e submetida ao ultra-turrax por 120 segundos a uma velocidade agitação de 43000 rpm (qsNP(120)). Todos os testes relatados daqui por diante foram conduzidos com o nanossistema obtido seguindo estes parâmetros.

6.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia de Força Atômica

A avaliação do tamanho e forma das gotículas da nanoemulsão de óleo de canola com (caNE) e sem (caNEC) acetato de retinol foi realizada por MET, figura 13. Esta técnica foi selecionada por ser usualmente a técnica utilizada para análise da morfologia de nanoemulsões [98].

As imagens obtidas (figura 13) mostram que houve a formação de gotículas oleosas com classes de tamanhos diferentes (confirmando o valor alto de PDI = $0,708 \pm 0,021$ mostrado na tabela 11) e com formato aproximadamente esférico, típico de nanoemulsões óleo em água, isoladas e sem formação de agregados. McClements (2012) e Yuan *et al* (2008) também verificaram a formação de partículas esféricas. Contudo, diferentemente do verificado no presente estudo, em ambos os trabalhos os autores verificaram, além da forma esférica, nanopartículas fusiformes ou irregulares provavelmente devido à aglomeração de partículas menores [117] [77].

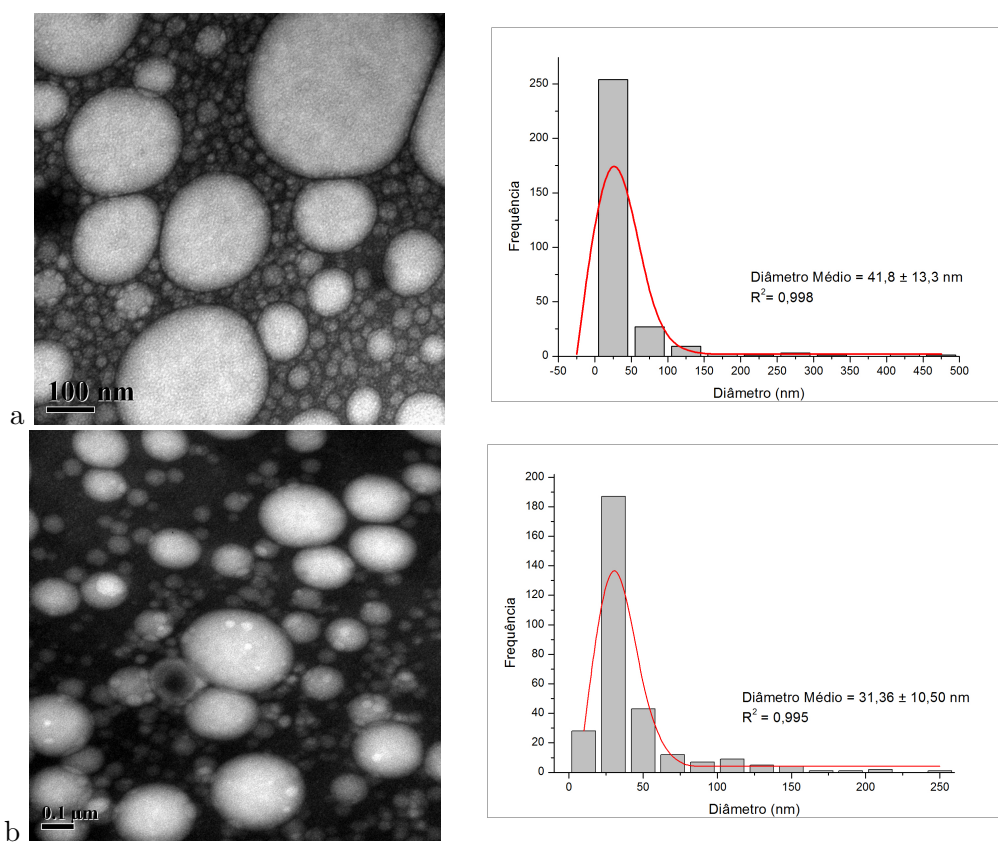


Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão e histograma de distribuição de frequência dos diâmetros das gotículas presentes nas nanoemulsões a) caNE (com acetato de retinol) e b) caNEC (sem o acetato de retinol).

Em relação à análise quantitativa, os resultados obtidos por MET diferem daqueles obtidos por espectroscopia de fotocorrelação (apresentados na tabela 11), tanto para as caNE quanto para as caNEC. Enquanto que no primeiro método (MET) o diâmetro médio verificado nas caNE foi de $41,8 \pm 13,3$ nm, no segundo (DLS) esta média foi de $281,30 \pm 13,23$ nm. Essa diferença justifica-se pelo fato de que a análise por microscopia fornece dados do diâmetro seco da nanoestrutura enquanto que a espectroscopia de fotocorrelação fornece dados do

diâmetro hidrodinâmico de partículas em meio líquido, e nessa condição há uma camada dipolo eléctrico aderida à superfície da partícula. Esta camada influencia o movimento das partículas na análise de espectroscopia de fotocorrelação.

Por MFA obteve-se imagens da qsNP não submetidas ao processo de quebra ou dissociação pelo ultra-turrax (figura 14) com o objetivo de compará-las qualitativamente com as qsNP após ultra-turrax (figura 15). Enquanto que na primeira condição (sem ultra-turrax) as qsNP apresentaram formato esférico bem definido (formato também verificado por Kim *et al* (2006) ao sintetizar nanopartículas de quitosana aprisionando retinol) e partículas maiores foram mais evidentes, na segunda condição (após submissão ao ultra-turrax) as qsNP, principalmente aquelas pertencentes à classe de menor diâmetro são mais evidentes, confirmando os resultados verificados pela análise de distribuição do diâmetro hidrodinâmico por classes (figura 12) e não apresentaram formato esférico bem definido e algumas chegam a ser disformes. Sendo assim, sugere-se que houve o processo de quebra ou dissociação das partículas grandes em menores, confirmando a formação de duas subpopulações com tamanhos diferentes, mostradas nos resultados obtidos por espectroscopia de fotocorrelação (apresentados na figura 12).

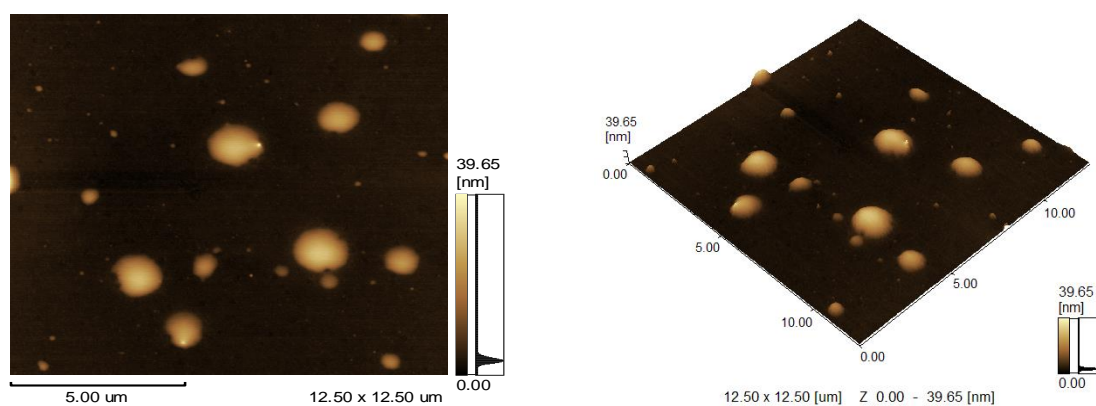


Figura 14: Imagens de microscopia de força atômica obtidas em modo dinâmico das qsNP (com acetato de retinol) antes de serem submetidas ao ultra-turrax.

Em relação ao diâmetro, detalhado no histograma de distribuição de frequência dos diâmetros (figura 15), não foi compatível com o verificado por espectroscopia de fotocorrelação (apresentado na tabela 14). O diâmetro médio verificado por MFA está na escala dos nanômetros, enquanto que nos resultados por espectroscopia de fotocorrelação esta média está na escala dos micrômetros (Z -average das qsNP(120) = 1398,00 ± 52,71 nm). Este

fato justifica-se da mesma maneira que para as análises por MET, ou seja, este valor menor refere-se ao diâmetro seco. Contudo, Gaumet *et al* (2008) ressaltam que, para a quitosana, esta não é uma explicação completa e relaciona esta diferença de tamanhos às influências do pH sofridas pelas cadeias de quitosana. Mais especificamente, devido ao fato da quitosana ser um polissacarídeo catiônico com propriedades fisicoquímicas específicas que variam com o pH, onde o pH neutro, induz a condensação das cadeias mais do que em pH ácidos. Portanto, como medições foram feitas em água não tamponada, espera-se que as cadeias de quitosana foram alongadas devido ao pH ácido, obtendo-se o diâmetro hidrodinâmico maior em comparação com as medições feita em ambiente neutro ou em estado seco [41].

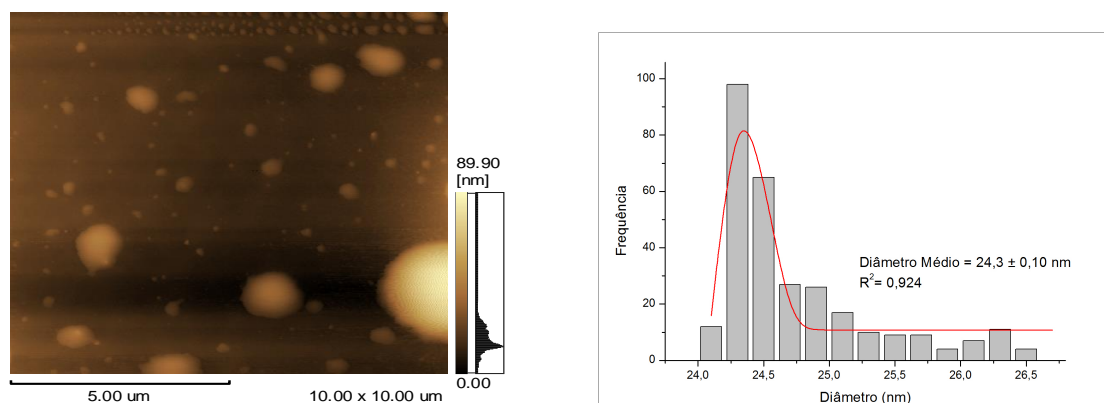
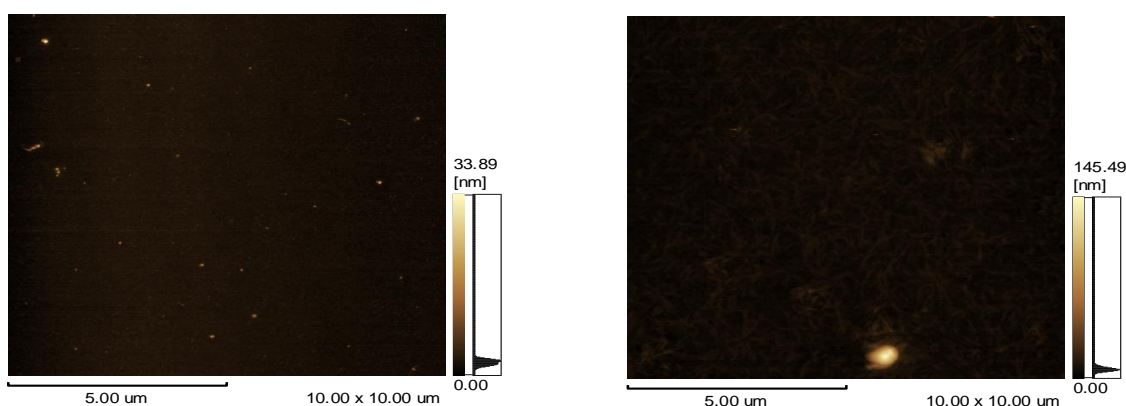


Figura 15: Imagens de microscopia de força atômica obtidas em modo dinâmico das qSNP após serem submetidas ao ultra-turrax. Histograma de distribuição de frequência dos diâmetros hidrodinâmicos das qSNP (com acetato de retinol) após serem submetidas ao ultra-turrax.

As imagens obtidas das qSNPC (sem ativo) (figura 16), mostraram duas áreas com diferentes características. Na figura 16-A vê-se apenas alguns aglomerados de estruturas, enquanto que na figura 16-B é possível observar uma trama de fibras similar à geralmente formada pelas moléculas de quitosana. Para ambos os casos, não foi possível observar a presença das qSNPC de maneira evidente, indicando que as nanoestruturas ao serem depositadas para varredura do MFA perdem a sua conformação. Visto que as nanopartículas com o ativo (qSNP), também ao serem depositadas, mantiveram a sua conformação e foi possível a varredura no equipamento; entende-se que o ativo faz parte da conformação da nanopartícula e lhe confere estabilidade maior.



A

B

Figura 16: Imagens de microscopia de força atômica obtidas em modo dinâmico das qsnPC (sem o ativo) após serem submetidas ao ultra-turrax.

6.3 Testes com os Nanossistemas

6.3.1 Reprodutibilidade dos Nanossistemas

Segundo a análise por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta, os três lotes das caNE produzidas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio sem diferença estatística. Já o potencial- ζ e o PDI apresentaram pequenas diferenças. Apesar dessa diferença estatística ($P < 0,05$), para os dois parâmetros, os lotes se classificariam da mesma maneira: com instabilidade incipiente e polidispersos.

Já para as qsnP só houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) para o potencial- ζ , onde o lote 3 apresentou valor maior que o lote 1. Porém, assim como para as caNE, esse valor não alterou a classificação do comportamento da estabilidade coloidal de acordo com o padrão de classificação. A Tabela 15 apresenta todos os resultados obtidos, para ambas estruturas.

Analisando o diâmetro hidrodinâmico das caNE segundo distribuição por número (figura 17) é possível perceber que os lotes 1 e 3 apresentaram perfil semelhante, pois ambos possuem partículas em uma única população. Já o lote dois apresentou uma distribuição por número bimodal, pois aparecem duas subpopulações. Para os lotes das qsnP, observa-se que estas mantiveram o mesmo perfil de distribuição bimodal, com duas subpopulações de tamanhos diferentes.

Tabela 15: Valores de *Z-Average*, Potencial- ζ e índice de polidispersividade verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície dos lotes de nanoemulsões (caNE) e dos lotes das nanopartículas de quitosana (qsNP) e os respectivos controles.

Amostra	pH	<i>Z-Average</i> * (nm)	Potencial- ζ (mV)	PdI	
caNE	Lote 1	6	327,46 ± 14,91	-25,1 ± 0,2	0,782 ± 0,033
	Lote 2	6	288,30 ± 23,27	-26,6 ± 0,4 ^a	0,503 ± 0,009 ^a
	Lote 3	6	299,16 ± 23,71	-24,6 ± 0,6 ^b	0,773 ± 0,029 ^b
	Lote 1 C	6	770,50 ± 142,69 ^{abc}	-5,0 ± 0,2 ^{abc}	0,743 ± 0,035 ^b
	Lote 2 C	6	278,76 ± 38,17 ^d	-11,6 ± 0,1 ^{abcd}	0,935 ± 0,023 ^{bcd}
	Lote 3 C	6	204,93 ± 5,45 ^d	-11,4 ± 0,2 ^{abcd}	0,587 ± 0,127 ^{ace}
qsNP	Lote 1	4	1185,00 ± 58,50	61,6 ± 3,0	0,381 ± 0,042
	Lote 2	4	1154,33 ± 26,02	69,1 ± 0,3	0,322 ± 0,082
	Lote 3	4	1292,66 ± 38,94	69,9 ± 0,8 ^a	0,314 ± 0,038
	Lote 1 C	3	1047,66 ± 32,02	68,3 ± 4,7	0,653 ± 0,127 ^{abc}
	Lote 2 C	3	3907,00 ± 1270,09 ^{abcd}	72,9 ± 1,9 ^a	1 ± 0 ^{abcd}
	Lote 3 C	3	1136,33 ± 58,62 ^e	66,2 ± 3,0	0,575 ± 0,087 ^{bce}

*Diâmetro hidrodinâmico médio; para cada nanossistema e parâmetro avaliado, as letras a, b, c, d e e, indicam diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparado o grupo assinalado e aos grupos do lote 1, lote 2, lote 3, lote 1 C, lote 2 C, respectivamente.

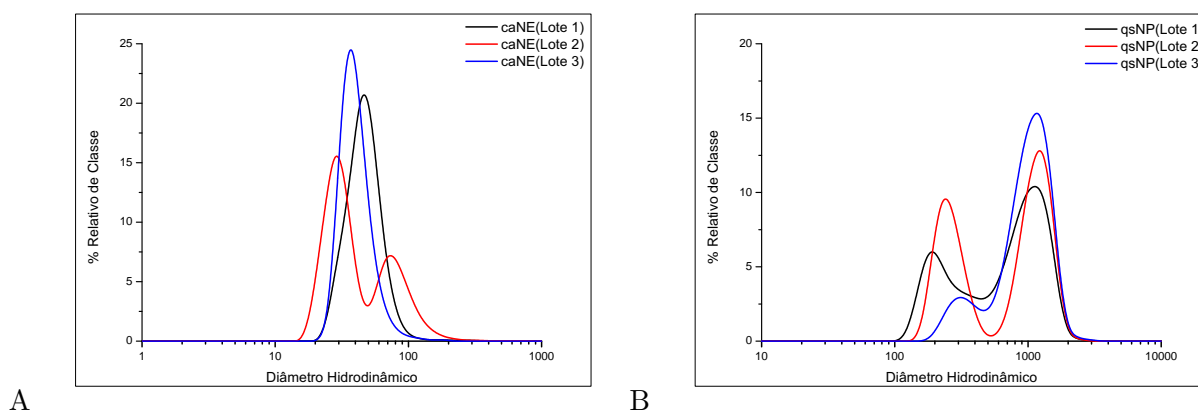


Figura 17: Curvas de distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número verificados por espectroscopia de fotocorrelação comparando os três lotes das a) nanoemulsões e b) nanopartículas de quitosana aprisionando acetato de retinol.

Apesar das pequenas diferenças estatísticas, é possível inferir que para fins de padronização e reprodutibilidade as condições de síntese garantiram a formação e estabilização das nanoestruturas, pois a diferença não afetou o perfil das nanoestruturas conforme padrão

estabelecido na literatura.

6.3.2 Estabilidade dos Nanossistemas

As amostras armazenadas à 20° C e 5° C foram analisadas nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 60 e 90 após suas formulações. A figura 18 mostra a variação do diâmetro hidrodinâmico médio ao longo do tempo.

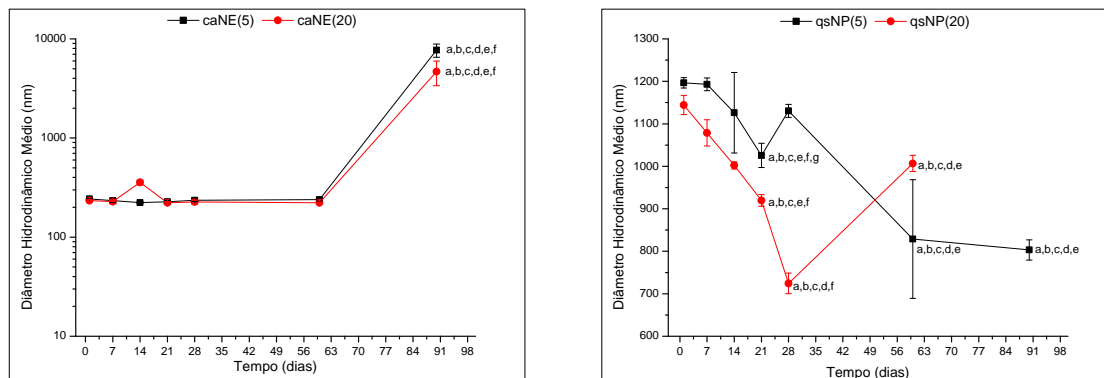


Figura 18: Avaliação da estabilidade coloidal da caNE e qsNP ao longo de 90 dias de armazenamento à 20° C e 5° C. Dados relativos ao diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*).

*Para cada condição de armazenamento, as letras a, b, c, d, e e f, indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os diâmetros hidrodinâmicos médios analisados nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 60 após as formulações, respectivamente.

As nanoemulsões (caNE) armazenadas nas duas temperaturas apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no valor do diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*) na última análise, aos 90 dias de armazenamento. Dessa forma, é possível afirmar que em até 60 dias esse nanossistema permaneceu estável, sem agregação ou ruptura das gotículas da nanoemulsão. A temperatura de armazenamento não interferiu na estabilidade coloidal.

Este resultado indica que o potencial zeta de superfície da nanoemulsão não foi o único a influenciar na sua estabilidade coloidal. Além disso, em geral, nanoemulsões polidispersas tendem a perder a estabilidade devido à coalescência das gotículas [99]. No presente estudo, apesar de que as nanoemulsões apresentaram alta polidispersidade (tabela 15), estas permaneceram estáveis até pelo menos 60 dias. Ademais, a nanoemulsão parece ter sido uma boa estratégia para o aprisionamento do acetato de retinol, algo almejavél, já que a instabilidade desse é devido à presença de duplas ligações conjugadas que se desfazem facilmente na oxidação ou por isomerização na presença de oxidantes, [21] e que em nanoemulsão óleo em

água o retinol dentro da fase oleosa é cercado por uma camada de óleo e água e a invasão desses agentes ao redor é suprimido por essa camada, resultando em alta estabilidade ao retinol [116].

As qsNP, para as duas condições de armazenamento, a partir do 21^o dia apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no diâmetro hidrodinâmico médio em relação ao dia da formulação, sugerindo que as qsNP são estáveis em suspensão por no máximo 21 dias e, assim, são menos estáveis que as caNE. Este fato causa estranheza, já que as qsNP tem potencial Zeta que lhe confere excelente estabilidade coloidal e pouca tendência à aglomeração, que deve ter explicação em propriedades intrínsecas aos nanossistemas.

É importante esclarecer que em armazenamento à 20° C não foi possível analisar a amostra no dia 90 após a formulação, pois a leitura inicial indicou valor de diâmetro hidrodinâmico médio muito alto, valor que ultrapassou os limites de leitura e confiabilidade do equipamento e, sendo assim, esta amostra foi excluída das análises.

É importante ressaltar que estes resultados são relacionados à estabilidade física dos nanossistemas e que, da forma como o ensaio foi conduzido, não há evidências do estado do ativo aprisionado ao final do período de armazenamento. Cheong *et al* (2008) e Yuan *et al* (2008) aprisionaram em nanoemulsões α -tocoferol e β - caroteno, respectivamente. Ambos estudos resultaram em nanoemulsões fisicamente estáveis a longo prazo, mas com redução de teor dos ativos [18] [117]. Dessa forma, ressalta-se a necessidade de desenvolver estudos futuros avaliando o teor e a integridade do ativo nanoaprisionado.

6.3.3 Eficiência de Encapsulamento do Acetato de Retinol

Em relação a eficiência de encapsulamento das nanoemulsões, que aqui neste estudo foi considerada de 100 %, é importante salientar que apesar de que o acetato de retinol é solúvel em água, sua porção mais resistente (retinol) é lipossolúvel o que indica que este ativo ficou retido no núcleo oleoso da nanoemulsão.

A média das leituras de absorvância das soluções resultantes das qsNP e qsNPC ultra-filtradas foi de 0,053 e 0,061, respectivamente, as quais foram interpoladas em uma curva de calibração (padrão). As leituras para calibração geraram uma reta com coeficiente de correlação de 0,9922 (figura 19).

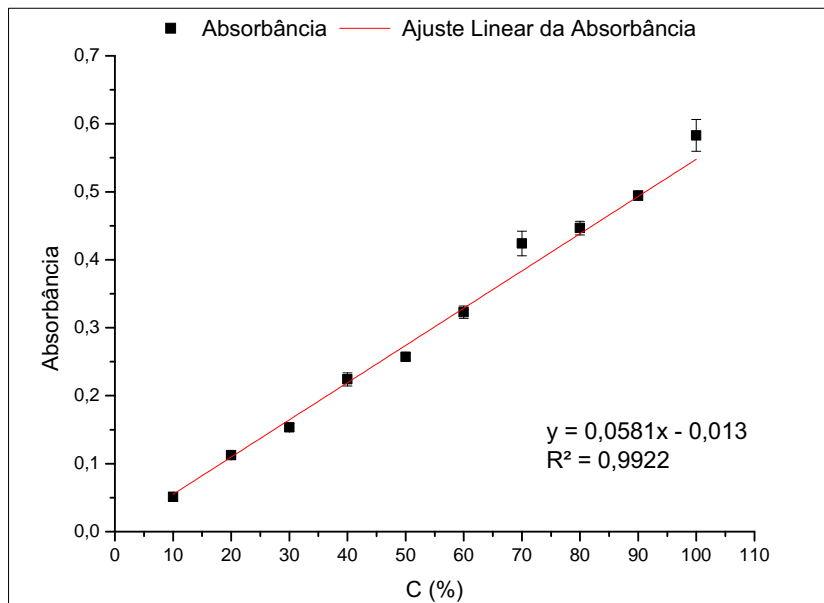


Figura 19: Curva padrão de acetato de retinol livre com água ultrapura (Milli-Q) em dez diferentes concentrações, com base no máximo utilizado para formulações (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) com leitura de absorvância no comprimento de onda de 370 nm.

Aplicando o valor da média das absorvâncias da solução ultrafiltrada a partir da qsNP (de concentração final desconhecida) à equação obtida pela curva de calibração, cálculo da concentração da solução problema tem-se o seguinte:

$$A = 0,0581C - 0,013, \quad (1)$$

onde A é o valor das médias das absorvâncias da solução ultrafiltrada a partir da qsNP e C é a concentração estimada em (%), tem-se que a concentração percentual de acetato de retinol (C) da solução ultrafiltrada é de 1,13%. Se a concentração inicial era de 41 mg então 0,463 mg estavam livres, ou seja, conseguiram atravessar a membrana do microtubo e estavam presentes na solução ultrafiltrada. Aplicando este valor à seguinte fórmula,

$$EE = AR_{inicial} - AR_{livre} / AR_{inicial} * 100 \quad (2)$$

onde, EE é a eficiência de encapsulamento, $AR_{inicial}$ é a quantidade de acetato de retinol usada na formulação e AR_{livre} é a quantidade estimada de acetato de retinol livre após filtração, verifica-se que a eficiência de encapsulamento (%) foi de 98,87%.

Estes valores estão próximos aos verificados por Kim *et al* (2006), que desenvolveram nanopartículas de quitosana aprisionando retinol com eficiência de encapsulamento (%) entre 91,2 e 95,1%, variando a concentração de retinol, onde, quanto maior a quantidade de retinol menor foi a capacidade de encapsulamento [67]. Esta alta eficiência de encapsulamento, verificado no presente estudo e no de Kim *et al* (2006), se dá possivelmente pela interação eletrostática entre o grupo amina da quitosana e o grupo hidroxila do retinol [68].

6.3.4 Taxa de Liberação do Acetato de Retinol em Meio Fisiológico

Assumiu-se, como referência, as absorvâncias do acetato de retinol livre, onde a máxima absorvância deste ativo livre representou o equivalente à 100% de liberação. A partir dessa referência calculou-se o valor percentual de liberação do ativo pelas nanoestruturas e, assim, identificou-se o padrão de liberação destas ao longo de 8 horas (figura 20).

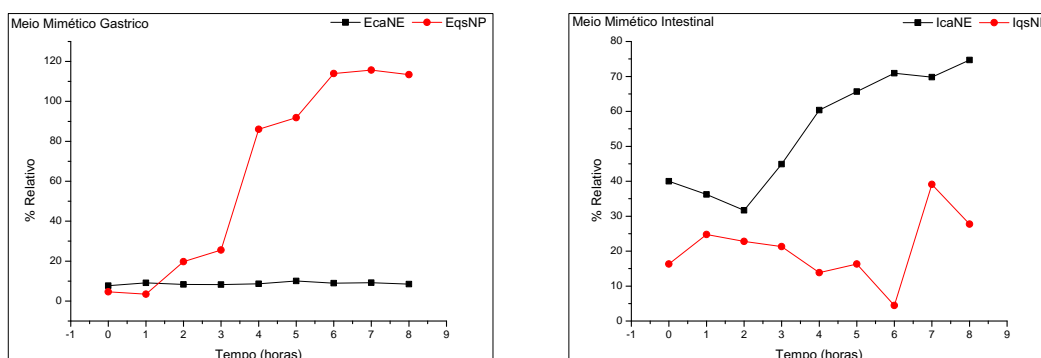


Figura 20: Perfil de liberação do acetato de retinol das nanoemulsões e nanopartículas de quitosana com ativo em fluido mimético gástrico (EcaNE e EqsNP) e em fluido mimético intestinal (IcaNE e IqsNP).

No FMG a liberação das qsNP foi mais expressiva enquanto que no FMI as nanoemulsões de destacaram. Para as qsNP o percentual ultrapassou o correspondente à 100% da liberação do ativo livre. Esse fato sugere que o meio pode ter induzido à dissociação de elementos do nanossistema, capazes de incrementar a absorvância. Esse fato foi observado também nos grupos controle (dados não mostrados).

A caNE liberou menos de 20% em meio mimético gástrico, mas em meio mimético intestinal apresentou liberação moderada na primeira hora e em seguida liberação crescente até

alcançar quase 80%. Já as qsNP, no meio mimético gástrico, liberou o ativo constantemente enquanto que no meio mimético intestinal liberou lentamente com o máximo de 40%. Para ambos os casos, houve um mecanismo de disparo para a libertação do ativo aprisionado de maneira dependente de pH e meio fisiológico.

Muitas variáveis podem ter interferido na liberação do ativo nanoaprisionado, dentre elas a morfologia e as dimensões das nanoestruturas, a solubilidade do ativo na nanoestrutura, estado de polimorfismo de nanoemulsões, eficiência de encapsulamento e valor de pH do meio [32]. Para ambos os casos, sugere-se que o pH influenciou na liberação do ativo. Não há indícios de que as dimensões das qsNP tenham interferido no perfil de liberação, conforme hipótese levantada anteriormente neste trabalho.

Dentre os perfis de liberação dos dois nanossistemas, o da nanoemulsão apresenta um diferencial. Por não liberar o ativo em FMG e liberá-lo em FMI, este representa uma proteção do ativo na condição gástrica e sua liberação no intestino, que é sítio de absorção do retinol [32].

Sistemas de entrega de nanoestruturas sintetizadas por métodos do tipo *bottom-up* normalmente apresentam polidispersão, o que pode limitar a liberação do ativo. Em um sistema polidisperso, nanoestruturas maiores supostamente apresentam maior capacidade de carga enquanto que as nanoestruturas menores apresentam maior eficiência na distribuição nos tecidos ou células. Dessa forma, mesmo que a eficiência de encapsulamento seja alta, a distribuição pode ser fraca e interferir na eficácia terapêutica ou nutricional [46].

Uma importante consideração a ser feita é sobre a biodisponibilidade do retinol nanoaprisionado nas nanoestruturas (qsNP e caNE). Biodisponibilidade, conforme já foi explicado no presente estudo, refere-se à fração de determinado nutriente que fica disponível para as funções fisiológicas do organismos [5] [106]. De maneira mais específica, a biodisponibilidade é a fração de um ativo que consegue ser absorvido através das paredes intestinais e alcançar a corrente sanguínea. Não necessariamente tudo que é absorvido através do intestino consegue ficar biodisponível devido aos vários processos envolvidos na absorção de nutrientes [2].

Contudo, sugere-se que o nanoaprisionamento pela quitosana (qsNP) é uma abordagem favorável já que permite a absorção de nanopartículas por enterócitos e células M. Isso porque a quitosana, por ser um polissacarídeo catiônico, introduz grupos hidrofílicos sobre a superfície da partícula que, por sua vez, estabelece interações iônicas com a camada de mucina que

reveste a superfície dos enterócitos e camadas M carregada negativamente e conseqüentemente aumenta a hidrofilicidade da superfície da nanoestrutura e promove a translocação desta em todo o citoplasma celular [2].

Já no caso da nanoemulsão (caNE), são vários os autores que concordam que a presença de lipídeos na dieta aumenta a biodisponibilidade do retinol [13] [106] [40]. Por causa da natureza lipossolúvel do retinol e porque sua absorção ocorre por difusão passiva, de maneira semelhante e conjuntamente à absorção do colesterol e de produtos da lipólise de triglicerídeos, e dessa forma, uma maior concentração de gordura ingerida com o retinol representa maior absorção intestinal [106] [13]. Para tanto, pequenas quantidades de lipídeos podem representar aumento do retinol sérico [61].

6.4 Desenvolvimento da Película Comestível

6.4.1 Desenvolvimento da Película Comestível

Houve formação de solução filmogênica (SF), transparente, incolor e inodora, de acordo com o esperado segundo relatos da literatura científica para películas elaboradas com amido[62]. Em relação aos componentes da película, escolheu-se o amido como biopolímero pois este é um dos polissacarídeos mais utilizados para obter películas biodegradáveis devido à sua capacidade de formar uma matriz contínua [24]. A formação da SF a partir de amidos é explicada pelo fenômeno de gelatinização. A estrutura granular semicristalina dos amidos apresenta uma ordem que é mantida devido à ligações de hidrogênio entre hidroxilas de polímeros adjacentes. Contudo, com o excesso de água e aumento da temperatura, esta estrutura é alterada de maneira irreversível e, conseqüentemente, a sua ordem molecular é perdida dando origem a uma matriz polimérica homogênea e amorfa, ou seja, a SF [74].

Apesar da excelente propriedade de formação de filme, comparativamente aos polímeros plásticos, os amidos formam películas com caráter hidrofílico e pobres propriedades mecânicas. Sendo assim, optou-se por acrescentar o glicerol, como agente plastificante, para incrementar as propriedades físicas e mecânicas, e também para retardar a retrogradação do revestimento. Este plastificante foi reportado na elaboração de diferentes revestimentos comestíveis por diferentes autores [62] [24] [74]. Para este fim, também óleo vegetais melhoram as propriedades mecânicas do filme. Contudo a quantidade de caNE não foi capaz de influenciar na formação da película.

O método de aspersão foi utilizado em detrimento ao método de imersão por dois motivos. Primeiramente, por possibilitar o controle da quantidade de solução filmogênica aplicada, e assim, a quantidade de acetato de retinol possivelmente veiculado, além disso, por ser o método usualmente utilizado na indústria.

6.4.2 Avaliação da Aplicação da Película Comestível

De maneira geral, as maçãs, independente do tratamento recebido, apresentaram boa aparência geral ao longo dos dez dias de observação. Os registros fotográficos estão nas figuras 21 e 22. O grupo de maçãs que receberam tratamento com solução filmogênica, independente da presença de nanossistemas, indicaram a formação de película invisível, sem formação de saliências ou rugosidade, indicando que a solução filmogênica foi adequada para o revestimento destas frutas.

Para análise qualitativa de brilho e cor, o dia 2 foi escolhido como referência, ao invés do dia 1, para que houvesse o tempo de secagem da película. Contudo, uma maçã do grupo tratado com SF e qsNP (grupo c da figura 21) ainda apresentava filme fresco em sua superfície, indicando que é necessário mais de um dia para a total secagem da película formada sob as condições utilizadas no presente trabalho.

Ainda pela análise qualitativa, observou-se que não houve aumento ou redução de brilho de nenhuma das maçãs dos grupos que receberam algum dos tratamentos em relação ao tratamento com água (controle), bem como qualquer alteração de cor. Também, após os 10 dias, não houve alteração de brilho ou cor de nenhum dos grupos em relação ao dia 2.

Ao verificar se os tratamentos influenciaram a perda de massa das maçãs ao longo de dez dias (figura 23), observa-se que o grupo de maçãs tratadas com SF, SF e caNE e caNE perderam mais massa do que as do grupo tratado com água, enquanto que os grupos tratados com SF e qsNP e qsNP foram aqueles com as menores perdas.

A variação de perda de massa (%) entre o primeiro e último dia do grupo de maçãs tratado com água foi de 0,65%. Já a variação de perda de massa (%) para o mesmo período dos grupos de maçãs tratados com SF, SF e caNE e caNE foi igual à 0,89, 0,77 e 0,68%, respectivamente, enquanto que os grupos de maçãs que receberam tratamento com SF e qsNP e qsNP apresentaram variação de 0,61 e 0,59%, respectivamente. Comparativamente ao grupo de maçãs que receberam tratamento com água, os grupos tratados com SF, SF e caNE

e caNE tiveram maior variação e os grupos tratados com SF e qsNP e qsNP apresentaram menor variação. De qualquer maneira as variações foram bastante pequenas, se considerada a massa total das maçãs e sendo sempre inferior a 1%.



Figura 21: Registro fotográfico das maçãs no dia 2 após os tratamentos com a) água b) solução filmogênica (SF) c) solução filmogênica e nanossistema de quitosana com acetato de retinol (SF e qsNP) d) nanossistema de quitosana com acetato de retinol (qsNP) e) solução filmogênica e nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (SF e caNE) f) nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (caNE).

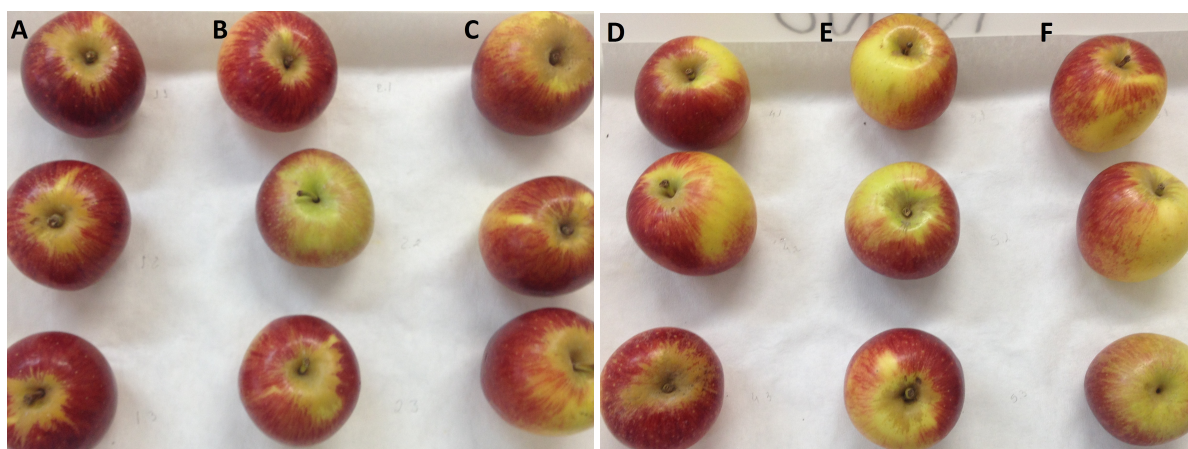


Figura 22: Registro fotográfico das maçãs no dia 10 após os tratamentos com a) água b) solução filmogênica (SF) c) solução filmogênica e nanossistema de quitosana com acetato de retinol (SF e qsNP) d) nanossistema de quitosana com acetato de retinol (qsNP) e) solução filmogênica e nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (SF e caNE) f) nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (caNE).

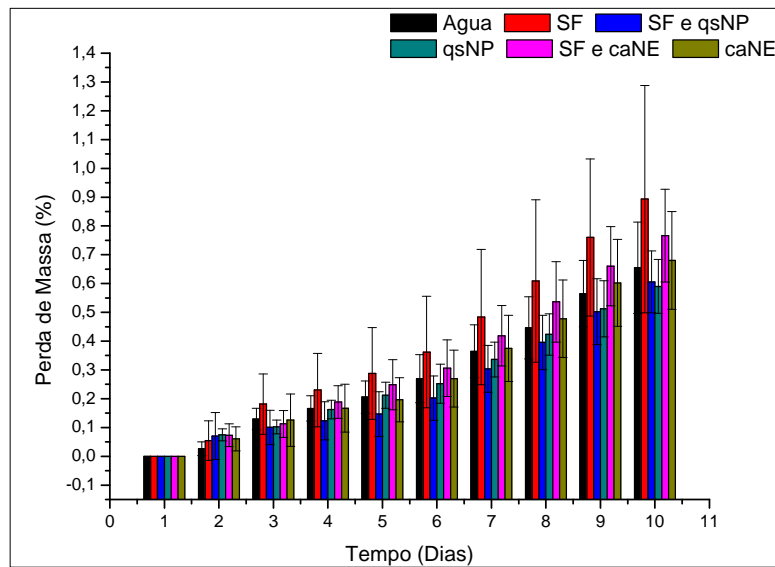


Figura 23: Valores de perda de massa (%) ao longo de 10 dias das maçãs tratadas com água, solução filmogênica (SF), solução filmogênica e nanossistema de quitosana com acetato de retinol (SF e qsNP), nanossistema de quitosana com acetato de retinol (qsNP), solução filmogênica e nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (SF e caNE) e nanoemulsão de óleo de canola com acetato de retinol (caNE).

A perda de massa acontece, principalmente, devido a perda de água. Esta perda está diretamente ligada à passagem de vapor d'água. Adicionalmente, podem ocorrer perdas de substâncias voláteis. Essas perdas resultam no murchamento das frutas e, conseqüentemente, na perda de suas características sensoriais. Se a película for capaz de reduzir essa perda de massa, esta promoverá um possível aumento da vida de prateleira da fruta revestida [112].

O grupo de maçãs tratadas com SF e qsNP e apenas qsNP apresentaram as menores perdas de massa (%), inclusive em relação ao grupo controle (apenas água). Uma possível explicação para este fato está na característica altamente hidrofílica da quitosana que, em ambiente refrigerado, pode conferir maior adsorção de água no revestimento resultando em uma diminuição da força motriz para a transferência de água do interior para o exterior do fruto; ou ainda a água adsorvida pelo revestimento incrementar a massa e interferir na pesagem e subestimando a perda de massa (%) [37].

Por fim, este trabalho não poderia deixar de levantar algumas considerações importantes sobre a qualidade nutricional das maçãs com acetato de retinol aprisionado em nanossistemas e veiculados pela película comestível.

Em relação a quantidade de vitamina A veiculada, considerando a quantidade de for-

mulação, tanto de caNE quanto de qsNP, utilizada no desenvolvimento das películas comestíveis, foram planejadas para que a quantidade de acetato de retinol veiculada seja o equivalente à 15 % da recomendação diária de 300 µg (= 45 µg), segundo a IDR (Recomendação de Ingestão Dietética) do Instituto de Medicina (IOM), para crianças de 1 à 3 anos [59]. Esse valor de 15%, atende aos critérios de adição de nutrientes essenciais para alimentos fortificados, estabelecido pela portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil.

Apesar da importância da vitamina A no metabolismo do corpo humano, o consumo elevado deste nutriente oriundo de alimentos de origem animal, alimentos fortificados ou suplementos diários pode ser tóxico [106]. Penniston e Tanumihardjo (2006) [89] em revisão sobre os efeitos tóxicos agudos e crônicos da vitamina A, destacam a sensibilidade das crianças à esse nutriente e esclarecem que a toxicidade aguda em crianças ocorre quando a ingestão de vitamina A, em um período de horas ou poucos dias, é 20 vezes maior que a RDA e a toxicidade crônica é de 100,000 µg em um período menor do que 6 meses.

Sendo assim, para que o consumo de maçã fortificada com 45 µg de acetato de retinol seja tóxico para uma criança de 1 à 3 anos de idade, seria preciso que fossem consumidas 133 maçãs em poucas horas ou alguns dias ou o equivalente à aproximadamente 2.222 maçãs em menos de 6 meses, para que este consumo represente toxicidade aguda e crônica, respectivamente. Dessa forma, entende-se que a quantidade de acetato de retinol, possivelmente veiculada pelas maçãs, não ofereceria efeito tóxico, apesar de serem necessários estudos futuros acerca da investigação da possível toxicidade desse alimento fortificado.

Outra consideração importante é em relação ao aumento do valor energético da fruta revestida devido ao amido presente na película. Considerando a quantidade de amido utilizada para a formulação da película (1 g em 100 mL), e que foram aspergidos 1 mL em cada maçã e tendo como parâmetro a média dos pesos de todas as maçãs verificado no primeiro dia do ensaio de perda de massa (%) (= 128,69 g), segundo cálculos realizados pela plataforma para cálculos de dieta Calcnut [107], houve aumento de 81,07 kcal para 81,11 kcal, o que não pode ser considerado relevante do ponto de vista nutricional.

7 Conclusões

- A análise qualitativa do acetato de retinol utilizado para a formação dos nanossistemas indicou que este estava sob a forma de pó, com coloração amarelada, com grânulos pequenos, em conformidade com a literatura científica e com relatório técnico do fornecedor. Esta amostra foi solúvel em água e etanol a 20, 50 e 70% e insolúvel nos óleos de soja, canola, tomate e azeite. Por espectrometria de massa, confirmou-se a identidade e presença de retinol, pela detecção da massa molecular deste considerando a perda da massa molecular do grupo ácido acético do acetato de retinol.
- Obteve-se uma nanoemulsão otimizada de óleo de canola com razão 0,1 de óleo de canola/Tween 80, emulsionada durante 120 segundos a uma velocidade de 43000 rpm. Esta apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de pouco mais que 220 nm, potencial ζ negativo que lhe confere instabilidade coloidal incipiente e polidispersão moderada. Por microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se que houve a formação de gotículas oleosas com classes de tamanhos diferentes e com formato esférico, típico de nanoemulsões óleo em água, isoladas e sem formação de agregados.
- Houve a formação de uma formulação constituída por nanopartículas e partículas de quitosana, elaboradas com taxa de gotejamento da fase orgânica a 1500 $\mu\text{L/h}$, sob fase aquosa mantida em agitação magnética constante de 1200 rpm e submetida ao ultraturrax por 120 segundos a uma velocidade de agitação de 43000 rpm. Esta formulação apresentou qsNP com diâmetro hidrodinâmico médio de 1000 nm, distribuídos em duas classes de tamanho, com diâmetros hidrodinâmicos de 100 e 1000 nm. Estas apresentaram potencial- ζ positivo, e, assim, apresentam comportamento coloidal altamente estável e são pouco polidispersas. Por microscopia de força atômica, confirmou-se a formação de duas subpopulações com tamanhos diferentes mostradas nos resultados obtidos por espectroscopia de fotocorrelação e foi possível visualizar que as qsNP, principalmente aquelas pertencentes à classe de menor diâmetro hidrodinâmico, são mais evidentes, não apresentam formato esférico bem definido e algumas chegam a ser disformes.
- A otimização dos processos de síntese das caNE e qsNP propiciaram a formação de nanoemulsão e nanopartículas de quitosana por dois métodos que foram reprodutíveis.

Os lotes, de cada um dos nanossistemas, apresentaram o mesmo perfil de diâmetro hidrodinâmico médio, estabilidade coloidal e polidispersão.

- A nanoemulsão permaneceu estável até 60 dias após a sua síntese, pois não houve alteração do seu tamanho indicando que não houve agregação ou dissociação de suas gotículas. A temperatura de armazenamento não interferiu na estabilidade coloidal. As qsNP permaneceram estáveis até 21 dias após a sua síntese. Apesar da estabilidade física, é necessário, em estudos futuros, avaliar o teor e a condição do ativo nanoaprisionado.
- Não foi possível verificar a eficiência de encapsulamento (%) da nanoemulsão devido à sua conformação física não permitir metodologia apropriada para esse cálculo; contudo, esta conformação sugere o nanoaprisionamento de 100% do ativo. Já a eficiência de encapsulação (%) das qsNP foi de 98,67%, valor condizente com o verificado por outros autores.
- No meio mimético gástrico, a liberação das qsNP foi mais expressiva enquanto que no meio mimético intestinal a taxa de liberação da caNE foi mais expressiva por liberar em meio mimético intestinal, local de absorção do acetato de retinol. Houve a interferência na leitura das absorbâncias de algum elemento constituinte das nanoestruturas. Sugere-se que o pH seja o mecanismo de disparo para a liberação dos ativos de ambos os nanossistemas. A nanoemulsão teve perfil de liberação favorável à proteção do ativo no estômago, e liberação no sítio de absorção deste, no intestino.
- Houve formação de solução filmogênica (SF), transparente, incolor e inodora. A SF apresentou fluidez que permitiu ser aplicada em maçãs por aspersão. As maçãs, independente do tratamento recebido, apresentaram boa aparência geral ao longo dos dez dias de observação. Estas não apresentaram alterações de brilho e cor em relação aquelas que somente foram tratadas com água. O grupo de maçãs revestidas com SF, SF e caNE e caNE teve a perda de massa (%) maior do que as do grupo tratado com água. Contudo, o grupo de maçãs tratadas com SF e qsNP e qsNP foram os com menores perdas de massa (%).

Referências

- [1] ABBASI, A., EMAM-DJOMEH, Z., MOUSAVI, M. A. E., AND DAVOODI, D. Stability of vitamin d₃ encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. *Food chemistry* 143 (2014), 379–383.
- [2] ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14, 1 (2009), 3–15.
- [3] ADAMS, F. C., AND BARBANTE, C. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013), 3–13.
- [4] AILA-SUÁREZ, S., PALMA-RODRÍGUEZ, H. M., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I., HERNÁNDEZ-URIBE, J. P., BELLO-PÉREZ, L. A., AND VARGAS-TORRES, A. Characterization of films made with chayote tuber and potato starches blending with cellulose nanoparticles. *Carbohydrate polymers* 98, 1 (2013), 102–107.
- [5] AMBRÓSIO, C. L. B., CAMPOS, F. D. A. C., FARO, Z. P. D., ET AL. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose a. *Rev. nutr* 19, 2 (2006), 233–243.
- [6] ANAIS, J., RAZZOUQ, N., CARVALHO, M., FERNANDEZ, C., ASTIER, A., PAUL, M., ASTIER, A., FESSI, H., AND LORINO, A. Development of α -tocopherol acetate nanoparticles: influence of preparative processes. *Drug development and industrial pharmacy* 35, 2 (2009), 216–223.
- [7] ASSIS, L. M. D., ZAVAREZE, E. D. R., PRENTICE-HERNANDEZ, C., AND SOARES, L. A. D. S. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology* 15, 2 (2012), 99–109.
- [8] AZEREDO, H., ET AL. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International* 42, 9 (2009), 1240–1253.
- [9] AZEREDO, H., MATTOSO, L. H. C., WOOD, D., WILLIAMS, T. G., AVENA-BUSTILLOS, R. J., AND MCHUGH, T. H. Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *Journal of Food science* 74, 5 (2009), N31–N35.

- [10] BILBAO SAINZ, C., AVENA-BUSTILLOS, R. J., WOOD, D. F., WILLIAMS, T. G., AND MCHUGH, T. H. Composite edible films based on hydroxypropyl methylcellulose reinforced with microcrystalline cellulose nanoparticles. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 6 (2010), 3753–3760.
- [11] BROWN, J., AND KUZMA, J. Hungry for information: Public attitudes toward food nanotechnology and labeling. *Review of Policy Research* 30, 5 (2013), 512–548.
- [12] CAMPOS, C. A., GERSCHENSON, L. N., AND FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology* 4, 6 (2011), 849–875.
- [13] CAMPOS, F. M., AND ROSADO, G. P. Novos fatores de conversão de carotenóides provitamínicos a1. *Ciências Tecnologia Alimentos, Campinas* 25, 3 (2005), 571–578.
- [14] CHANG, P. R., JIAN, R., ZHENG, P., YU, J., AND MA, X. Preparation and properties of glycerol plasticized-starch (gps)/cellulose nanoparticle (cn) composites. *Carbohydrate Polymers* 79, 2 (2010), 301–305.
- [15] CHAUDHRY, Q., AND CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends in Food Science & Technology* 22, 11 (2011), 595–603.
- [16] CHEN, C.-C., AND WAGNER, G. Vitamin e nanoparticle for beverage applications. *Chemical Engineering Research and Design* 82, 11 (2004), 1432–1437.
- [17] CHEN, H., AND YADA, R. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. *Trends in Food Science & Technology* 22, 11 (2011), 585–594.
- [18] CHEONG, J. N., TAN, C. P., MAN, Y. B. C., AND MISRAN, M. α -tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering* 89, 2 (2008), 204–209.
- [19] COLES, D., AND FREWER, L. Nanotechnology applied to european food production—a review of ethical and regulatory issues. *Trends in Food Science & Technology* 34, 1 (2013), 32–43.

- [20] CUSHEN, M., KERRY, J., MORRIS, M., CRUZ-ROMERO, M., AND CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry—recent developments, risks and regulation. *Trends in food science & technology* 24, 1 (2012), 30–46.
- [21] DAS, B. C., THAPA, P., KARKI, R., DAS, S., MAHAPATRA, S., LIU, T.-C., TORREGROZA, I., WALLACE, D. P., KAMBHAMPATI, S., VAN VELDHUIZEN, P., ET AL. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry* 22, 2 (2014), 673–683.
- [22] DE ATENÇÃO À SAÚDE BRASIL, S. Manual de condutas gerais do programa nacional de suplementação de vitamina a. *Ministério da Saúde* (2013).
- [23] DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI), A. B. Relatório de acompanhamento setorial: nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação.
- [24] DE MELLO LUVIELMO, M., AND LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. *Estudos Tecnológicos em Engenharia* 8, 1 (2012), 8–15.
- [25] DE MOURA, M. R., LOREVICE, M. V., MATTOSO, L. H., AND ZUCOLOTTO, V. Highly stable, edible cellulose films incorporating chitosan nanoparticles. *Journal of food science* 76, 2 (2011), N25–N29.
- [26] DONSI, F., SESSA, M., AND FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Journal of Biotechnology* 150 (2010), 67.
- [27] DUDKIEWICZ, A., TIEDE, K., LOESCHNER, K., JENSEN, L. H. S., JENSEN, E., WIERZBICKI, R., BOXALL, A., AND MOLHAVE, K. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30, 1 (2011), 28–43.
- [28] ELSABEE, M. Z., AND ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C* 33, 4 (2013), 1819–1841.
- [29] EMBUSCADO, M. E., AND HUBER, K. C. Edible films and coatings for food applications. *Springer* (2009).

- [30] FAKHREDDIN HOSSEINI, S., REZAEI, M., ZANDI, M., AND GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food chemistry* 136, 3 (2013), 1490–1495.
- [31] FALGUERA, V., QUINTERO, J. P., JIMÉNEZ, A., MUÑOZ, J. A., AND IBARZ, A. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology* 22, 6 (2011), 292–303.
- [32] FATHI, M., MOZAFARI, M., AND MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology* 23, 1 (2012), 13–27.
- [33] FERREIRA, M. D. *Colheita e beneficiamento de frutas e hortaliças*. Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008.
- [34] FESSI, H., PUISIEUX, F., AND DEVISSAGUET, J. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d’une substance sous forme de nanocapsules, a1 (1988) eur. *Pat* 87.
- [35] FEYNMAN, R. P. There’s plenty of room at the bottom. *Engineering and science* 23, 5 (1960), 22–36.
- [36] FISCHER, A. R., VAN DIJK, H., DE JONGE, J., ROWE, G., AND FREWER, L. J. Attitudes and attitudinal ambivalence change towards nanotechnology applied to food production. *Public Understanding of Science* 22, 7 (2013), 817–831.
- [37] FONSECA, J. P. C. G. Q. Revestimentos comestíveis à base de quitosano e cera de abelha: aplicação na conservação de uva de mesa (dissertação de mestrado). *Universidade de Lisboa: ISA* (2012).
- [38] FOR TESTING, A. S., AND (ASTM), M. Zeta potential of colloids in water and waste water standard. 4187.
- [39] FUENMAYORA, C. A., MASCHERONIA, E., COSIOA, M. S., PIERGIOVANNIA, L., BENEDETTIA, S., ORTENZIC, M., SCHIRALDIA, A., AND MANNINO, S. Encapsulation of r-(+)-limonene in edible electrospun nanofibers. *CHEMICAL ENGINEERING* 32 (2013).

- [40] FUSTINONI, A. M. Vitamina a no leite materno: influência do estado nutricional de lactantes e da composição do leite (dissertação de mestrado). *Universidade de Brasília* (2008).
- [41] GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R., AND DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 69, 1 (2008), 1–9.
- [42] GEORGE, J., ET AL. High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers* 87, 3 (2012), 2031–2037.
- [43] GIROUX, H. J., HOUDE, J., AND BRITTEN, M. Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by ph-cycling treatment. *Food Hydrocolloids* 24, 4 (2010), 341–346.
- [44] GONNET, M., LETHUAUT, L., AND BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release* 146, 3 (2010), 276–290.
- [45] GREINER, R., ET AL. Current and projected applications of nanotechnology in the food sector. *Nutrire-Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição* 34, 1 (2009), 243–260.
- [46] GRENHA, A. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of drug targeting* 20, 4 (2012), 291–300.
- [47] GRUÈRE, G. P. Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in oecd countries. *Food Policy* 37, 2 (2012), 191–198.
- [48] GUTIÉRREZ, F. J., ALBILLOS, S. M., CASAS-SANZ, E., CRUZ, Z., GARCÍA-ESTRADA, C., GARCÍA-GUERRA, A., GARCÍA-REVERTER, J., GARCÍA-SUÁREZ, M., GATÓN, P., GONZÁLEZ-FERRERO, C., ET AL. Methods for the nanoencapsulation of β -carotene in the food sector. *Trends in Food Science & Technology* 32, 2 (2013), 73–83.
- [49] GUTTOFF, M., SABERI, A. H., AND MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin d nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. *Food chemistry* 171 (2015), 117–122.

- [50] HENELYTA RIBEIRO, BOON SEANG CHU, S. I. M. N. Preparation of nanodispersions containing beta carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids* 22 (2008), 12–17.
- [51] HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., ALMENAR, E., OCIO, M. J., AND GAVARA, R. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria* and *Ananassa*). *Postharvest Biology and Technology* 39, 3 (2006), 247–253.
- [52] HEYDARI, A., ALEMZADEH, I., AND VOSSOUGH, M. Functional properties of biodegradable corn starch nanocomposites for food packaging applications. *Materials & Design* 50 (2013), 954–961.
- [53] HOTZ, C., LOECHL, C., LUBOWA, A., TUMWINE, J. K., NDEEZI, G., MASAWI, A. N., BAINGANA, R., CARRIQUIRY, A., DE BRAUW, A., MEENAKSHI, J. V., ET AL. Introduction of β -carotene-rich orange sweet potato in rural Uganda resulted in increased vitamin A intakes among children and women and improved vitamin A status among children. *The Journal of Nutrition* 142, 10 (2012), 1871–1880.
- [54] HU, B., PAN, C., SUN, Y., HOU, Z., YE, H., HU, B., AND ZENG, X. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 16 (2008), 7451–7458.
- [55] HUANG, C., AND WU, Y. State-led technological development: A case of China's nanotechnology development. *World Development* 40, 5 (2012), 970–982.
- [56] HUANG, Q. Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries. *Elsevier* (2012).
- [57] HUANG, Q., YU, H., AND RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science* 75, 1 (2010), R50–R57.
- [58] INITIATIVE, N. N. National nanotechnology initiative: Research and development leading to a revolution in technology and industry, supplement to president's FY 2010 budget, 2010.

- [59] INSTITUTE OF MEDICINE, F., AND BOARD, N. Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *National Academy Press* (2001).
- [60] IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry* 13, 10 (2011), 2638–2650.
- [61] JALAL, F., NESHEIM, M., AGUS, Z., SANJUR, D., AND HABICHT, J. Serum retinol concentrations in children are affected by food sources of beta-carotene, fat intake, and anthelmintic drug treatment. *The American journal of clinical nutrition* 68, 3 (1998), 623–629.
- [62] JIMÉNEZ, A., FABRA, M. J., TALENS, P., AND CHIRALT, A. Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology* 5, 6 (2012), 2058–2076.
- [63] JIN, L., YAN, S., SHI, B., BAO, H., GONG, J., GUO, X., AND LI, J. Effects of vitamin a on the milk performance, antioxidant functions and immune functions of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 192 (2014), 15–23.
- [64] KATEB, B., AND HEISS, J. D. *The Textbook of Nanoneuroscience and Nanoneurosurgery*. CRC Press, 2013.
- [65] KAYACI, F., AND UYAR, T. Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. *Carbohydrate polymers* 90, 1 (2012), 558–568.
- [66] KHOO, C. S. H., AND KNORR, D. Grand challenges in nutrition and food science technology. *Nutrition and Food Science Technology* 1 (2014), 4.
- [67] KIM, D.-G., CHOI, C., JEONG, Y.-I., JANG, M.-K., NAH, J.-W., KANG, S.-K., AND BANG, M.-S. All-trans retinoic acid-associated low molecular weight water-soluble chitosan nanoparticles based on ion complex. *Macromolecular Research* 14, 1 (2006), 66–72.
- [68] KIM, D.-G., JEONG, Y.-I., CHOI, C., ROH, S.-H., KANG, S.-K., JANG, M.-K., AND NAH, J.-W. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* 319, 1 (2006), 130–138.

- [69] KOVVURU, S. K., MAHITA, V. N., MANJUNATHA, B., AND BABU, B. S. Nanotechnology: The emerging science in dentistry. *J Orofac Res* 2 (2012), 33–6.
- [70] KUO, F., SUBRAMANIAN, B., KOTYLA, T., WILSON, T. A., YOGANATHAN, S., AND NICOLOSI, R. J. Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. *International journal of pharmaceutics* 363, 1 (2008), 206–213.
- [71] LAOUINI, A., FESSI, H., AND CHARCOSSET, C. Membrane emulsification: A promising alternative for vitamin e encapsulation within nano-emulsion. *Journal of Membrane Science* 423 (2012), 85–96.
- [72] LEACH, S., SCHWELL, M., JOCHIMS, H.-W., AND BAUMGÄRTEL, H. Vuv photophysics of acetic acid: Fragmentation, fluorescence and ionization in the 6–23ev region. *Chemical physics* 321, 1 (2006), 171–182.
- [73] LÓPEZ-VÁZQUEZ, E., BRUNNER, T. A., AND SIEGRIST, M. Perceived risks and benefits of nanotechnology applied to the food and packaging sector in méxico. *British Food Journal* 114, 2 (2012), 197–205.
- [74] MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., AND YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias* 31, 1 (2010), 137–156.
- [75] MARTINS, P. Nanotecnologia e meio ambiente para uma sociedade sustentável. *Estudios sociales (Hermosillo, Son.)* 17, 34 (2009), 293–311.
- [76] MAYER, S., WEISS, J., AND MCCLEMENTS, D. J. Vitamin e-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: Factors influencing droplet size and stability. *Journal of colloid and interface science* 402 (2013), 122–130.
- [77] MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8, 6 (2012), 1719–1729.
- [78] MCCOLLUM, E., AND DAVIS, M. The essential factors in the diet during growth. *Journal of Biological Chemistry* 23, 1 (1915), 231–246.

- [79] MCCOLLUM, E. V., AND DAVIS, M. The necessity of certain lipins in the diet during growth. *J Biol Chem* 15, 1 (1913), 167–75.
- [80] MORSY, M. K., KHALAF, H. H., SHAROBA, A. M., EL-TANAHI, H. H., AND CUTTER, C. N. Incorporation of essential oils and nanoparticles in pullulan films to control foodborne pathogens on meat and poultry products. *Journal of food science* 79, 4 (2014), M675–M684.
- [81] MÜLLER, C. M., LAURINDO, J. B., AND YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. *Carbohydrate Polymers* 77, 2 (2009), 293–299.
- [82] MULVANEY, P. Nanoscience vs nanotechnology defining the field. *ACS nano* 9, 3 (2015), 2215–2217.
- [83] MURA, S., CORRIAS, F., STARA, G., PICCININI, M., SECCHI, N., MARONGIU, D., INNOCENZI, P., IRUDAYARAJ, J., AND GREPPI, G. F. Innovative composite films of chitosan, methylcellulose, and nanoparticles. *Journal of food science* 76, 7 (2011), N54–N60.
- [84] MURANYI, P. Functional edible coatings for fresh food products. *J Food Process Technol* 4 (2013), e114.
- [85] NEETHIRAJAN, S., AND JAYAS, D. S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. *Food and bioprocess technology* 4, 1 (2011), 39–47.
- [86] ORGANIZATION, W. H. *The International Pharmacopoeia*, vol. 1. World Health Organization, 2006.
- [87] PAN, X., YAO, P., AND JIANG, M. Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-dextran and beta-carotene. *Journal of colloid and interface science* 315, 2 (2007), 456–463.
- [88] PARK, Y., SPIEGELMAN, D., HUNTER, D. J., ALBANES, D., BERGKVIST, L., BURING, J. E., FREUDENHEIM, J. L., GIOVANNUCCI, E., GOLDBOHM, R. A., HARNACK, L., ET AL. Intakes of vitamins a, c, and e and use of multiple vitamin supplements and

- risk of colon cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *Cancer Causes & Control* 21, 11 (2010), 1745–1757.
- [89] PENNISTON, K. L., AND TANUMIHARDJO, S. A. The acute and chronic toxic effects of vitamin a. *The American journal of clinical nutrition* 83, 2 (2006), 191–201.
- [90] POLSHETTIWAR, V., AND VARMA, R. S. Green chemistry by nano-catalysis. *Green Chemistry* 12, 5 (2010), 743–754.
- [91] RUNIA, T., HOP, W., DE RIJKE, Y., AND HINTZEN, R. Vitamin a is not associated with exacerbations in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 3, 1 (2014), 34–39.
- [92] SAILAJA, A., AMARESHWAR, P., AND CHAKRAVARTY, P. Different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application. *Int J Pharm Pharm Sci* 3, Suppl 2 (2011), 45–50.
- [93] SANTOS, M. L., MACHADO, A. V., ALVES, F. M. S., AND COSTA, A. P. L. D. M. Estudo físico-químico de maçã desidratada em secador convectivo. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 8, 1 (2013), 30–37.
- [94] SAUVANT, P., CANSELL, M., HADJ SASSI, A., AND ATGIE, C. Vitamin a enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. *Food Research International* 46, 2 (2012), 469–479.
- [95] SCHNETTLER, B., CRISÓSTOMO, G., SEPÚLVEDA, J., MORA, M., LOBOS, G., MIRANDA, H., AND GRUNERT, K. G. Food neophobia, nanotechnology and satisfaction with life. *Appetite* 69 (2013), 71–79.
- [96] SCHREIBER, R., TASCHLER, U., PREISS-LANDL, K., WONGSIRIROJ, N., ZIMMERMANN, R., AND LASS, A. Retinyl ester hydrolases and their roles in vitamin a homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821, 1 (2012), 113–123.
- [97] SEKHON, B. S. Food nanotechnology—an overview. *Nanotechnology, science and applications* 3 (2010), 1.

- [98] SHARMA, N., MISHRA, S., SHARMA, S., DESHPANDE, R. D., AND SHARMA, R. K. Preparation and optimization of nanoemulsions for targeting drug delivery. *Int. J. Drug Dev. Res* 5, 4 (2013), 0975–9344.
- [99] SHENG, F., CHOW, P. S., DONG, Y., AND TAN, R. B. Preparation of β -carotene nanoparticles by antisolvent precipitation under power ultrasound. *Journal of Nanoparticle Research* 16, 12 (2014), 1–9.
- [100] SILVA, H. D., CERQUEIRA, M. Â., AND VICENTE, A. A. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food and Bioprocess Technology* 5, 3 (2012), 854–867.
- [101] SIQUEIRA-BATISTA, R., MARIA-DA-SILVA, L., DE MEDEIROS SOUZA, R. R., AND PIRES-DO-PRADO, H. J. Nanociência e nanotecnologia como temáticas para discussão de ciência, tecnologia, sociedade e ambiente. *Ciência & Educação* 16, 2 (2010), 479–490.
- [102] SOUZA, A., BENZE, R., FERRÃO, E., DITCHFIELD, C., COELHO, A., AND TADINI, C. Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT-Food Science and Technology* 46, 1 (2012), 110–117.
- [103] TAN, C. P., AND NAKAJIMA, M. β -carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry* 92, 4 (2005), 661–671.
- [104] TANG, G., HU, Y., YIN, S.-A., WANG, Y., DALLAL, G. E., GRUSAK, M. A., AND RUSSELL, R. M. β -carotene in golden rice is as good as β -carotene in oil at providing vitamin a to children. *The American journal of clinical nutrition* 96, 3 (2012), 658–664.
- [105] TANUMIHARDJO, S. A. Vitamin a: biomarkers of nutrition for development. *The American journal of clinical nutrition* 94, 2 (2011), 658S–665S.
- [106] TANUMIHARDJO, S. A. Vitamin a and bone health: the balancing act. *Journal of Clinical Densitometry* 16, 4 (2013), 414–419.
- [107] TEREZA HELENA, L. M. Calcnut: plataforma para cálculo de dietas. *Departamento de Nutrição, Universidade de Brasília*.

- [108] THORNE-LYMAN, A. L., AND FAWZI, W. W. Vitamin a and carotenoids during pregnancy and maternal, neonatal and infant health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Paediatric and perinatal epidemiology* 26, s1 (2012), 36–54.
- [109] TORRES, T. A., GEBARA, K. S., AND STEFANELLO, T. B. Controle de qualidade da matéria-prima ácido retinóico. *Interbio* 4, 2 (2010).
- [110] TSUKADA, Y., HARA, K., BANDO, Y., HUANG, C., KOUSAKA, Y., KAWASHIMA, Y., MORISHITA, R., AND TSUJIMOTO, H. Particle size control of poly (dl-lactide-co-glycolide) nanospheres for sterile applications. *International journal of pharmaceutics* 370, 1 (2009), 196–201.
- [111] VAN BREEMEN, R. B., NIKOLIC, D., XU, X., XIONG, Y., VAN LIESHOUT, M., WEST, C. E., AND SCHILLING, A. B. Development of a method for quantitation of retinol and retinyl palmitate in human serum using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 794, 1 (1998), 245–251.
- [112] VICENTINO, S. L., FLORIANO, P. A., DRAGUNSKI, D. C., AND CAETANO, J. Filmes de amidos de mandioca modificados para recobrimento e conservação de uvas. *Quim. Nova* 34, 8 (2011), 1309–1314.
- [113] VINAS, P., BRAVO-BRAVO, M., LOPEZ-GARCÍA, I., AND HERNANDEZ-CÓRDOBA, M. Quantification of β -carotene, retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate in enriched fruit juices using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1275 (2013), 1–8.
- [114] YANG, X., LI, Q., WANG, H., HUANG, J., LIN, L., WANG, W., SUN, D., SU, Y., OPIYO, J. B., HONG, L., ET AL. Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of cinnamomum camphora leaf. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 5 (2010), 1589–1598.
- [115] YIN, L.-J., CHU, B.-S., KOBAYASHI, I., AND NAKAJIMA, M. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of β -carotene nanodispersions. *Food Hydrocolloids* 23, 6 (2009), 1617–1622.

- [116] YOSHIDA, K., SEKINE, T., MATSUZAKI, F., YANAKI, T., AND YAMAGUCHI, M. Stability of vitamin a in oil-in-water-in-oil-type multiple emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 2 (1999), 1–6.
- [117] YUAN, Y., GAO, Y., ZHAO, J., AND MAO, L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International* 41, 1 (2008), 61–68.

Apêndice 1

Tabela 16: Valores de *Z-Average*, Potencial- ζ e índice de polidispersividade verificados por espectroscopia de fotocorrelação e potencial Zeta de superfície nas nanoemulsões de óleo de canola e nas nanopartículas de quitosana e os grupos controle (sem retinol) verificados para as análises de microscopia de força atômica e eletrônica de transmissão (MFA e MET), nos testes de reprodutibilidade e estabilidade das nanoestruturas e na eficácia de encapsulação e taxa de liberação (diálise) do acetato de retinol.

Experimento	Amostra	Z-Average* (nm)	Potencial Zeta (mV)	PdI
MET	caNE	225,66 ± 1,45	-19,4 ± 0,6	0,571 ± 0,101
	caNEC	226,53 ± 3,61	-10,2 ± 0,3	0,861 ± 0,040
	qsNP	1031 ± 19,92	63,6 ± 0,6	0,258 ± 0,003
	qsNPC	756,53 ± 124,10	68,9 ± 1,6	0,789 ± 0,183
Estabilidade	caNE	224,20 ± 7,01	-32,0 ± 0,3	0,410 ± 0,013
	caNEC	2813,66 ± 377,21	-11,4 ± 0,3	0,707 ± 0,037
	qsNP	1104,33 ± 14,36	66,3 ± 1,5	0,286 ± 0,029
	qsNPC	942,70 ± 102,61	66,2 ± 4,5	0,647 ± 0,071
Eficácia	caNE	223,93 ± 11,61	-25,6 ± 0,4	0,463 ± 0,030
	caNEC	244,43 ± 23,62	-18,0 ± 0,9	0,719 ± 0,042
	qsNP	1284,66 ± 44,06	66,6 ± 0,3	0,390 ± 0,077
	qsNPC	810,66 ± 131,33	59,7 ± 1,4	0,838 ± 0,151
Diálise	caNE	320,23 ± 10,43	-28,4 ± 0,9	0,658 ± 0,101
	caNEC	500,8 ± 109,57	-19,3 ± 0,4	0,963 ± 0,062
	qsNP	997,96 ± 25,29	60,1 ± 10,2	0,439 ± 0,032
	qsNPC	1057,03 ± 131,09	47,2 ± 2,8	0,601 ± 0,073