

Renata Calegari Lino

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE METILCELULOSE
INCORPORADOS POR NANOPARTÍCULAS DE POLI- ϵ -
CAPROLACTONA/ β -CAROTENO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Florianópolis
2012

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

Lino, Renata Calegari
DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE METILCELULOSE INCORPORADOS
POR NANOPARTÍCULAS DE POLI-E-CAPROLACTONA/B-CAROTENO
[dissertação] / Renata Calegari Lino ; orientador, Pedro
Luiz Manique Barreto - Florianópolis, SC, 2012.
135 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Embalagens ativas. 3.
Antioxidantes. 4. Nanocápsulas. 5. Casting. I. Barreto,
Pedro Luiz Manique . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

Renata Calegari Lino

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE METILCELULOSE
INCORPORADOS POR NANOPARTÍCULAS DE POLI- ϵ -
CAPROLACTONA/ β -CAROTENO**

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

Florianópolis, 27 de Novembro de 2012.

Prof.^a Dr.^a Roseane Fett
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto
Orientador - UFSC

Prof.^a Dr.^a Renata Dias de Mello Castanho Amboni
UFSC

Prof.^a Dr.^a Roseane Fett
UFSC

Dr. Fabiano Cleber Bertoldi
EPAGRI

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro e Miguelina, e minha irmã Bruna, que eu tanto amo, quero agradecer a confiança, carinho, apoio e incentivo.

Ao Marcello Cunha Gaissler Donin, sempre otimista, ajudando nos momentos mais difíceis, agradeço por todo amor, suporte, compreensão e companheirismo!

Ao Professor Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, pela oportunidade, orientação e apoio concedido.

Ao grupo de pesquisa, Sabrina M. De Carvalho, Carolina M. Noronha, Cleonice Gonçalves, Gabriela Rocha, Caroline Floriani, Bruna Jummes e Matheus Maciel, amigos mais que importantes nesta caminhada, por todos os momentos que passamos juntos, por todas as ajudas, conversas, brincadeiras, ensinamentos, vocês serão sempre lembrados!

À Andréa Granada por toda paciência, disposição e ensinamentos sobre a técnica de nanoprecipitação e o método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao Laboratório de Óleos e Gorduras por ceder seus equipamentos e ajudar na metodologia da atividade antioxidante. Quero agradecer também as amigadas conquistadas Gisele, Paula e principalmente à Ana Cristina Pinheiro do Prado, amiga que muito me ensinou, ajudou, deu força nos momentos mais difíceis, meus sinceros agradecimentos.

Aos Laboratórios do Departamento de Ciência dos Alimentos, por ceder equipamentos, materiais e solventes.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC pelas análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Laboratório de Catálise Biomimética do Departamento de Química da UFSC, por ceder o Nano-zetasizer para as análises de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

Ao Professor Rui Zambiasi, por ceder o Laboratório de Cromatografia da UFPEL para execução das análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. E a todas meninas do Laboratório de Cromatografia da UFPEL, principalmente a Roseane D'Avila, por toda ajuda e hospitalidade ao me receber em sua casa em Pelotas.

A todos que ajudaram, incentivaram e conviveram comigo neste período, muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver biofilmes poliméricos incorporados por nanopartículas de β -caroteno, para avaliar a possibilidade de seu uso como embalagens ativas antioxidantes. Em um primeiro momento, desenvolveu-se nanopartículas de β -caroteno, pelo método de nanoprecipitação. Analisou-se a influência de três tipos de carreadores da substância ativa e três tipos de surfactantes lipofílicos sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas. Nanopartículas mais estáveis foram obtidas quando utilizou-se a combinação de lecitina de soja e triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico nas formulações. Posteriormente, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta para avaliar a influência da concentração de β -caroteno, lecitina de soja e triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico sobre as propriedades de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e recuperação, e assim otimizar as formulações de nanopartículas. As condições ótimas obtidas para concentração de β -caroteno, volume de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico e lecitina de soja foram, 0,2160 mg/ml, 232,42 μ L e 2,59 mg/ml, respectivamente. As formulações otimizadas foram caracterizadas quanto à morfologia das nanopartículas através da microscopia eletrônica de transmissão. Após otimização das formulações de nanopartículas, procedeu-se os estudos desenvolvendo biofilmes de metilcelulose incorporados por suspensões de nanopartículas de PCL/ β -caroteno, pelo método de *casting*. Resultados apontam que as propriedades mecânicas são significativamente ($P < 0,05$) afetadas pela inserção de nanopartículas a solução dos filmes, sendo que o aumento da concentração de nanopartículas diminuiu a tensão e o módulo de Young, porém elevou-se a elongação dos filmes, tornando-os mais elásticos. Os dados de transmitância apontam para um significativo aumento da barreira à radiação UV, pelos filmes incorporados por nanopartículas de β -caroteno, chegando a quase 90% de absorção da radiação UV pela matriz polimérica, quando utilizou-se 70% de soluções de nanopartículas nas soluções filmogênicas. Os filmes incorporados por suspensões de nanopartículas apresentaram coloração amarelo-alaranjada, sendo significativamente diferentes dos filmes contendo apenas metilcelulose. A liberação do β -caroteno dos filmes apresentou máximo de 7,68 μ g/ml, 9,31 μ g/ml e 10,93 μ g/ml por grama de filme, para filmes com 30, 50 e 70%, respectivamente, sendo este valor máximo atingido na 10^a hora de análise, para todos os filmes

estudados. Todos os filmes desenvolvidos apresentaram atividade antioxidante, sendo que os filmes contendo 70% de nanopartículas de β -caroteno apresentaram os maiores resultados de inibição dos radicais ABTS.

Palavras-chave: nanocápsulas, nanoprecipitação, metilcelulose, casting, embalagens ativas, filmes biodegradáveis.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop polymeric biofilms incorporated by β -carotene nanoparticles, to evaluate the possibility of its use as antioxidant active packaging. At first, it was developed β -carotene nanoparticles by nanoprecipitation method. We analyzed the influence of three types of active compound carrier and lipophilic surfactants on the physicochemical properties of the nanoparticles. More stable nanoparticles were obtained when we used a combination of soy lecithin and triglycerides of capric and caprylic acid in the formulations. Subsequently, we used the response surface methodology to evaluate the influence of the concentration of β -carotene, soybean lecithin and triglycerides of capric and caprylic acid on the properties of particle size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency and recovery, and thus optimize the nanoparticles formulation. The optimum conditions obtained for β -carotene concentration, triglycerides of capric and caprylic acid volume and soybean lecithin concentration were 0,2160 mg/ml, 232,42 μ L and 2,59 mg/ml, respectively. The optimized formulations were characterized by the morphology of nanoparticles through transmission electron microscopy. After optimize the nanoparticles formulations, proceeded studies developing methylcellulose biofilms incorporated by nanoparticles suspensions of PCL/ β -carotene by the casting method. Results show that mechanical properties are significantly ($P < 0,05$) affected by the insertion of nanoparticles on the film solution, with the increase in the nanoparticles concentration decreased strain and Young's modulus, but increased the elongation of the films, making the films more elastic. The transmittance data show a significant increase in UV radiation barrier by films incorporated with β -carotene nanoparticles, reaching nearly 90% of UV radiation absorption by the polymer matrix, when was used 70% of nanoparticles solutions in filmogenic solutions. The films incorporated by nanoparticles suspensions showed yellow-orange color, being significantly different from those films containing only methylcellulose. The β -carotene release from the films showed a maximum of 7,68 μ g/ml, 9,31 μ g/ml and 10,93 μ g/ml per gram of film, for films with 30, 50 and 70%, respectively, being reached this maximum value at the 10th hour of analysis for all films investigated. All developed films showed antioxidant activity, and the films containing 70% of β -carotene nanoparticles showed the highest ABTS radical inhibition.

Keywords: nanocapsules, nanoprecipitation, methylcellulose, casting, active packaging, biodegradable films.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** Representação esquemática de nanocápsulas (a e b) e nanoesferas poliméricas (c e d), onde: a) composto ativo dissolvido no núcleo oleoso e b) composto ativo adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) composto ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas e d) composto ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas 32
- Figura 2** Ilustração esquemática das fases do processo de formação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação 34
- Figura 3** Estrutura química da (a) ϵ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$. (b) Estrutura da poli(ϵ -caprolactona) representada pela sua unidade monomérica, a ϵ -caprolactona, com o anel aberto 38
- Figura 4** Estrutura dos carotenoides mais comuns 40
- Figura 5** Estrutura química e clivagem do β -caroteno 41
- Figura 6** Possíveis rotas de degradação do β -caroteno 44
- Figura 7** Representação das condições em uma partícula negativa com uma camada de íons positivos adsorvidos na camada adjacente, denominada camada de Stern. No plano de cisalhamento é localizado o potencial zeta 48
- Figura 8** Estrutura química da metilcelulose 55
- Figura 9** Diagrama do sólido de cor no espaço L^* , a^* , b^* 58
- Figura 10** O ângulo de contato, aqui ilustrado como o ângulo medido através do líquido, que é formado na junção do líquido, sólido, e fase gasosa (vapor) 60

CAPÍTULO 2

- Figura 1** Gráficos de superfície de resposta para variável dependente tamanho de partícula, em função das variáveis independentes concentração de lecitina de soja, concentração de β -caroteno e volume de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) 89
- Figura 2** Gráficos de superfície de resposta apresentando o comportamento do potencial zeta das nanocápsulas de β -caroteno quando submetidas a diferentes: (a) concentrações de lecitina de soja e

volume de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) e (b) concentrações de lecitina de soja e β -caroteno	90
Figura 3 Gráficos de superfície de resposta para a variável dependente índice de polidispersão (PDI) para nanocápsulas formuladas com (a) diferentes volumes de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) e diferentes concentrações de β -caroteno, (b) diferentes concentrações de lecitina de soja e diferentes volumes de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT)	91
Figura 4 Perfil unimodal típico de distribuição de tamanho das nanopartículas de β -caroteno formuladas com 2,5 mg/ml de lecitina de soja, 250 μ l triglicerídeos de ac. cáprico e caprílico e 0,2 mg/ml de β -caroteno	92
Figura 5 Gráfico de contorno apresentando o efeito das interações lecitina de soja e β -caroteno sobre a variável dependente eficiência de encapsulação	94
Figura 6 Gráficos de superfície de resposta para as variáveis (a) lecitina de soja e β -caroteno, (b) triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) e lecitina de soja e (c) triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) e β -caroteno sob a variável dependente eficiência de encapsulação	95
Figura 7 Gráficos superfície de resposta para a variável dependente recuperação para nanocápsulas formuladas com diferentes: (a) concentrações de β -caroteno e triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT); (b) concentrações de lecitina de soja e β -caroteno.	96
Figura 8 Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) obtidas para a formulação ótima de nanocápsulas de β -caroteno	97

CAPÍTULO 3

Figura 1 Gráficos da variação do índice de consistência com a temperatura para as soluções de MC, 30%, 50% e 70% de suspensões de nanopartículas	118
Figura 2 Concentração de β -caroteno liberado dos filmes para etanol 95% a 20°C	127

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Composição básica sugerida para produção de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação	35
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Variáveis independentes codificadas e não-codificadas usadas no planejamento MSR*	78
Tabela 2 Condições corrida cromatográfica para análise de β -caroteno	81
Tabela 3 Efeito do tipo de surfactante e tipo de agente carreador do composto ativo sobre o tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, avaliados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS)	84
Tabela 4 Valores experimentais e preditos para as variáveis dependentes tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas de β -caroteno obtidos por MSR	87
Tabela 5 Valores experimentais e preditos para as variáveis dependentes eficiência de encapsulação e recuperação de β -caroteno nas suspensões de nanocápsulas	93

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Valores de L_0^* , a_0^* e b_0^* para os padrões: PVC e PEBD	112
Tabela 2 Parâmetros reológicos do modelo Lei da potência, a diferentes temperaturas, para soluções de filmes com diferentes concentrações de nanopartículas, mantendo constante a concentração de metilcelulose (2%) em todas as soluções	116
Tabela 3 Dados de $\ln(CI)$ e índice de comportamento do escoamento para cada solução filmogênica a diferentes temperaturas	117
Tabela 4 Equações que descrevem o comportamento reológico, das soluções filmogênicas, dependentes do tempo	119
Tabela 5 Dados espessura e propriedades mecânicas dos filmes de metilcelulose puro (MC) e contendo nanopartículas de β -caroteno nas proporções de 30, 50 e 70% de nanopartículas adicionadas aos filmes	

Tabela 6 CIE L*a*b* valores e variação total de cor (ΔE) para filmes de metilcelulose puro e adicionados de nanopartículas de β -caroteno. Filmes de MC puro, PVC e PEBD foram usados como referência 123

Tabela 7 Características de transmissão de luz para filmes de metilcelulose puro (MC) e metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno 124

Tabela 8 Atividade antioxidante dos filmes de metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno em diferentes concentrações 125

Tabela 9 Valores de ângulo de contato e energia livre superficial dos filmes de metilcelulose pura (MC) e metilcelulose incorporados por 30, 50 e 70% de nanopartículas de β -caroteno 128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	Análise de variância
β -C	β -caroteno
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ΔE	Diferença total de cor
% E	Porcentagem alongação na quebra
% EE	Eficiência de encapsulção
EM	Módulo de elasticidade ou módulo de Young
γ^T	Energia livre superficial total
γ^d	Energia livre superficial dispersiva (apolar)
γ^p	Energia livre superficial polar
LS	Lecitina de soja
MC	Metilcelulose
MCT	Mistura de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MSR	Metodologia de superfície de resposta
NC	Nanocápsulas
nm	Nanômetro
NP	Nanopartículas poliméricas
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PDI	Índice de polidispersão
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PVC	Cloreto de polivinila
PZ	Potencial zeta
R^2	Coefficiente de regressão
rpm	Rotações por minuto
TP	Tamanho de partícula
τ	Tensão de cisalhamento
γ	Taxa de deformação
UR	Umidade relativa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	24
OBJETIVOS	28
CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
1.1 NANOPARTÍCULAS	32
1.1.1 Poli(ϵ -caprolactona)	39
1.1.2 β -caroteno	40
1.1.3 Caracterização físico-química das nanopartículas	47
1.1.3.1 Tamanho das nanopartículas	47
1.1.3.2 Potencial zeta das nanopartículas	48
1.2 BIOFILMES	50
1.2.1 Embalagens ativas	52
1.2.2 Metilcelulose	54
1.2.3 Propriedades dos Filmes	56
1.2.3.1 Propriedades Mecânicas	56
1.2.3.2 Propriedades Ópticas	57
1.2.3.3 Ângulo de contato e energia livre superficial	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
CAPÍTULO 2 DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(E-CAPROLACTONA) CONTENDO B-CAROTENO	73
2.1 INTRODUÇÃO	76
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	78
2.2.1 Material	78
2.2.2 Desenvolvimento das nanocápsulas de β -caroteno	78
2.2.3 Efeito do tipo de agente carreador do composto ativo e surfactante lipofílico sobre as propriedades das nanocápsulas	79
2.2.4 Otimização das formulações de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona/ β -caroteno utilizando a metodologia de superfície de resposta	80
2.2.5 Determinação do diâmetro médio, distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta por espectroscopia de correlação de fótons	81
2.2.6 Determinação da eficiência de encapsulação e recuperação de β -caroteno nas suspensões de nanocápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	82

2.2.7	Avaliação morfológica das nanopartículas	84
2.2.8	Análises estatísticas	84
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
2.3.1	Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta para escolha do melhor agente carreador do β -caroteno e melhor surfactante lipofílico	85
2.3.2	Planejamento experimental superfície de resposta para otimização das formulações de nanocápsulas	88
2.3.2.1	Tamanho médio de partícula	90
2.3.2.2	Potencial zeta	91
2.3.2.3	Índice de Polidispersão	93
2.3.2.4	Eficiência de encapsulação	96
2.3.2.5	Recuperação	98
2.3.3	Avaliação morfológica das nanopartículas otimizadas	100
2.4	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
	CAPÍTULO 3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE METILCELOSE CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE POLI(E-CAPROLACTONA) E B-CAROTENO	106
3.1	INTRODUÇÃO	109
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	111
3.2.1	Material	111
3.2.2	Desenvolvimento dos filmes de metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno/PCL.	111
3.2.3	Comportamento reológico das soluções filmogênicas	112
3.2.4	Propriedades mecânicas dos filmes	113
3.2.5	Avaliação da cor dos filmes	114
3.2.6	Transmissão da luz	115
3.2.7	Capacidade antioxidante de desativação dos radicais ABTS dos filmes nanoestruturados	115
3.2.8	Liberação do β -Caroteno a partir dos filmes de metilcelulose	116
3.2.9	Ângulo de contato e energia livre superficial	116
3.2.10	Solubilidade em água dos filmes	117

3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
3.3.1	Reologia das soluções	119
3.3.2	Propriedades mecânicas dos filmes	122
3.3.3	Avaliação da cor dos filmes	125
3.3.4	Transmissão da luz	126
3.3.5	Capacidade antioxidante de desativação dos radicais ABTS dos filmes nanoestruturados	128
3.3.6	Liberação de β -caroteno dos filmes de metilcelulose	129
3.3.7	Ângulo de contato e energia livre superficial	131
3.3.8	Solubilidade em água dos filmes	132
3.4	CONCLUSÃO	133
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

INTRODUÇÃO

O interesse por materiais de embalagens biodegradáveis para utilização como substitutos aos materiais poliméricos, vem ganhando atenção devido as preocupações acerca dos problemas ambientais gerados pelos materiais derivados de petróleo (GOUNGA, XU e WANG, 2007; KOKOSZKA et al., 2010; SALGADO et al., 2010; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010; AHMADI, SAREMINEZHAD e AZIZI, 2011; AKHTAR et al., 2012; MARTINS, CERQUEIRA e VICENTE, 2012; REDDY, JIANG e YANG, 2012).

A maioria dos materiais de embalagens, tradicionalmente utilizados para alimentos, são produzidos a partir de materiais não degradáveis, trazendo sérios problemas ambientais, devido ao acúmulo desordenado destes na natureza, além destes materiais consumirem combustíveis fósseis para sua produção (AZEREDO, 2009; SOZER e KOKINI, 2009). Este fator, que está diretamente relacionado com o aumento constante do preço do petróleo, combinado com as preocupações ambientais, chama a atenção dos pesquisadores para o desenvolvimento de tecnologias que substituam o consumo de combustíveis fósseis por processos sustentáveis e materiais de fontes renováveis (CORREA, 2008).

Em virtude disso, vários biopolímeros têm sido estudados para utilização como materiais de embalagens para alimentos, dentre eles destacam-se os polissacarídeos, os lipídeos e as proteínas. Estas biomoléculas apresentam-se promissoras, em razão de serem abundantes, renováveis, biodegradáveis, apresentarem baixo custo e capazes de formar uma matriz contínua (MALHOTRA e COUPLAND, 2004; AZEREDO, 2009; DENAVI et al., 2009; VIOTA et al., 2010; MURILLO-MARTÍNEZ et al., 2011).

Filmes e coberturas formulados a partir de polissacarídeos podem ser utilizados para estender a vida de prateleira de frutas, vegetais, carnes e produtos de confeitaria, por prevenir a desidratação, a oxidação, o escurecimento superficial, a difusão de óleos. Além da sua barreira protetora, recentemente estes filmes tem sido utilizados para fornecer um mecanismo de liberação de compostos ativos (LACROIX e LE TIEN, 2005; BEAULIEU et al., 2009). Os principais polissacarídeos usados na elaboração de biofilmes são metilcelulose, quitosana e hidroxipropilmetilcelulose (GOUNGA et al., 2007; KOKOSZKA et al., 2010; SALGADO et al., 2010; SIRIPATRAWAN et al., 2010; AHMADI et al., 2011; AKHTAR et al., 2012; MARTINS et al., 2012; REDDY et al., 2012). Filmes de ésteres de celulose, como metilcelulose

(MC) são geralmente flexíveis, transparentes, solúveis em água, inodoros, insípidos e resistentes a óleos e gorduras (AHMADI et al., 2011).

No entanto, o uso de biopolímeros tem sido limitado devido as suas pobres propriedades mecânicas e de barreira. Assim, suas propriedades necessitam ser melhoradas para que possam ser utilizados como substitutos aos tradicionais plásticos. (AZEREDO, 2009; SOZER et al., 2009).

O desenvolvimento de novas tecnologias para melhorar as propriedades dos filmes de embalagens ativas e revestimentos como, controle da liberação de compostos bioativos, resistência mecânica, resistência à água é um grande foco para pesquisas futuras. Neste sentido estudos apontam que as propriedades dos biofilmes podem ser melhoradas pela adição de compostos de reforço, formando então os chamados materiais compósitos (LACROIX et al., 2005; AZEREDO, 2009).

A maioria dos materiais compósitos apresenta pobres interações entre a matriz polimérica e o composto de reforço, no entanto, estas interações tendem a melhorar com a diminuição da dimensão do material preenchedor. Sabe-se que o uso de preenchedores com pelo menos uma dimensão nanométrica como, as nanopartículas, aumentam o desempenho do material resultante, devido a grande área superficial apresentada por elas, que favorece as interações entre o polímero e o material de reforço, produzindo os nanocompósitos (LACROIX et al., 2005; AZEREDO, 2009).

Além de nanoreforçadores, quando adicionados a filmes e revestimentos para alimentos, as nanopartículas podem ter outras funções, como veículos para diferentes substâncias, principalmente aditivos e suplementos alimentares, como flavorizantes, probióticos, nutracêuticos, pigmentos, antimicrobianos e antioxidantes. Sendo utilizados também para estabilizar a qualidade dos produtos durante o armazenamento, aumentando sua vida de prateleira (LACROIX et al., 2005; AZEREDO, 2009; ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2011).

A incorporação de antioxidantes em materiais para embalagens tem se tornado notório, pois a oxidação é um dos principais problemas que afetam a qualidade dos alimentos. Porém, os antioxidantes mais frequentemente utilizados em embalagens ativas são os sintéticos, butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT), devido a sua alta eficiência, estabilidade e baixo custo. Embora estes antioxidantes possam ser efetivamente utilizados em embalagens para alimentos,

existem preocupações quanto a seus aspectos toxicológicos (JONGJAREONRAK et al., 2008; SIRIPATRAWAN e NOIPHA, 2012). Devido a estes aspectos, inúmeras pesquisas estão sendo conduzidas empregando antioxidantes naturais como alternativa aos antioxidantes sintéticos, como incorporação de α -tocoferol em filmes de quitosana (MARTINS et al., 2012), α -tocoferol em filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) (GRACIANO-VERDUGO et al., 2010), uso de extrato de chá verde em filmes de quitosana (SIRIPATRAWAN et al., 2010), extrato natural de beterraba e cenoura em filmes de hidroxipropilmetilcelulose (AKHTAR et al., 2012).

O β -caroteno tem recebido considerável atenção, não só por ser precursor de vitamina A, mas também pelo seu papel como antioxidante (LÓPEZ-RUBIO e LAGARON, 2011). No entanto, a utilização industrial do β -caroteno torna-se difícil devido à sua instabilidade sob calor, luz e oxigênio, sendo sua degradação muito rápida em condições ambientes, apresentando assim baixa estabilidade quando comparado aos antioxidantes sintéticos (MATTEA et al., 2009; HOU et al., 2012). A fim de melhorar a estabilidade e solubilidade em água, os carotenóides podem ser dissolvidos na fase oleosa de nanoemulsões óleo-em-água podendo ser facilmente incorporados nos produtos alimentares (TAN e NAKAJIMA, 2005; HOU et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver filmes ativos de metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno e avaliar suas propriedades quando formulados com diferentes concentrações de nanopartículas. Para isso, inicialmente desenvolvemos as nanopartículas de β -caroteno, otimizando sua formulação.

Assim, O presente trabalho será apresentado na forma de capítulos, conforme apresentado a seguir:

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica dos principais temas abordados no trabalho.

Capítulo 2 – Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona/ β -caroteno.

Capítulo 3 – Desenvolvimento e caracterização de filmes de metilcelulose contendo nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona/ β -caroteno incorporados na matriz filmogênica.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar biofilmes de metilcelulose incorporados por nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona/ β -caroteno.

Objetivos específicos

- Desenvolver nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo β -caroteno pelo método de nanoprecipitação;
- Avaliar o efeito da natureza dos surfactantes e dos agentes carreadores do composto ativo, empregados nas formulações de nanocápsulas sobre o tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Utilização do Planejamento de Superfície de Resposta para otimizar as formulações de nanocápsulas;
- Caracterização do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta através de Espectroscopia de Absorção de Fótons;
- Quantificação de β -caroteno nas nanocápsulas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Determinação da eficiência de encapsulação e recuperação do β -caroteno;
- Caracterizar a morfologia das nanocápsulas por Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- Desenvolvimento de filmes de metilcelulose utilizando diferentes volumes de suspensões de nanocápsulas, pelo método de casting;
- Caracterização reológica das soluções filmogênicas;
- Avaliar as propriedades mecânicas dos filmes desenvolvidos com diferentes formulações de nanocápsulas;

- Determinar a influência da concentração de nanocápsulas sobre os parâmetros de cor e transmissão da luz;
- Caracterizar a liberação das moléculas de β -caroteno dos filmes de metilcelulose;
- Determinar atividade antioxidante dos filmes formulados.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas podem ser definidas como partículas coloidais sólidas de ordem nanométrica, com diâmetros variando entre 1 e 1000 nm. Nos últimos anos, o uso de nanopartículas vem crescendo consideravelmente, devido a características como aumento da solubilidade de compostos ativos, além de conferir maior estabilidade ao composto ativo na suspensão de nanopartículas e aumentar a absorção intracelular devido ao seu reduzido tamanho, estes sistemas nanoparticulados ainda apresentam-se promissores vetores de substâncias ativas devido a sua capacidade de liberação de compostos. E, a fundamental vantagem das nanopartículas em relação aos outros sistemas coloidais de liberação como lipossomas, microemulsões, está relacionada a sua ótima estabilidade cinética e morfologia rígida (SCHAFFAZICK et al., 2003; ANTON, 2008).

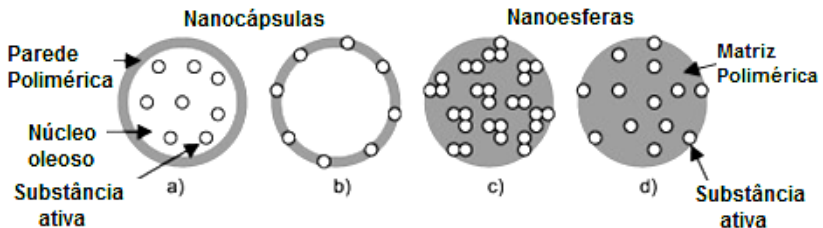
O principal desafio relacionado a formulação de nanopartículas é adaptar a escolha de seus constituintes ao objetivo final desejado. As nanopartículas podem ser desenvolvidas a partir de macromoléculas biodegradáveis ou não-biodegradáveis, incluindo polímeros, lipídeos, proteínas e materiais inorgânicos. A grande variedade de materiais que podem ser utilizados para o desenvolvimento das nanopartículas, resulta em sistemas de liberação com propriedades físico-químicas e aplicações diferentes (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Um importante fator que define o tipo da nanopartícula formulada é a forma como a substância ativa interage com a macromolécula. Assim, as nanopartículas podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas, conforme representado na Figura 1 (SCHAFFAZICK et al., 2003). As nanocápsulas exibem uma estrutura típica de casca-núcleo, onde o núcleo, frequentemente oleoso, é revestido pelo material polimérico, podendo o composto ativo estar dissolvido neste núcleo ou adsorvido à parede polimérica. O núcleo das nanocápsulas pode ser aquoso ou oleoso, e a escolha do tipo de núcleo vai depender da natureza do composto ativo (lipofílico ou hidrofílico) que se deseja encapsular, pois uma boa solubilidade do composto ativo no material do núcleo é necessário para se assegurar a formação de nanocápsulas; o composto ativo pode estar na forma líquida ou sólida, ou como dispersão molecular (FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI 2010).

Já as nanoesferas, não apresentam óleo em sua composição, assim o composto ativo pode estar disperso ou adsorvido na matriz polimérica,

acarretando em uma estrutura homogênea em toda a nanopartícula (SCHAFFAZICK et al., 2003; LETCHFORD e BURT, 2007).

Figura 1 Representação esquemática de nanocápsulas (a e b) e nanoesferas poliméricas (c e d), onde: a) composto ativo dissolvido no núcleo oleoso e b) composto ativo adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) composto ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas e d) composto ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.



Fonte: Adaptado de Schaffazick et al., 2003.

Ao longo das últimas décadas, inúmeras pesquisas tem sido desenvolvidas para estudar os processos de geração de nanopartículas, devido a variedade de campos de aplicação. Assim, o conhecimento dos processos de formulação de nanopartículas e suas potencialidades é essencial para atingir os objetivos finais.

Neste contexto, muitos métodos têm sido utilizados para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, dentre estes métodos, os mais utilizados para formulação de nanopartículas a partir de polímeros biodegradáveis são: nanoprecipitação (FESSI et al., 1989; LEO et al., 2004; KHAYATA et al., 2012), emulsificação com evaporação do solvente (TAN e NAKAJIMA, 2005; BYUN et al., 2011) bem como métodos combinados (MCCARRON, DONNELLY e MAROUF, 2006).

No método de emulsificação com evaporação do solvente as principais fases ficam imiscíveis durante todo o processo, sendo o solvente removido mais tarde por evaporação. Este método envolve duas etapas: a primeira etapa requer a emulsificação da solução polimérica na fase aquosa; durante a segunda etapa, o solvente utilizado para solubilizar o polímero é evaporado, induzindo a precipitação do polímero como nanoesferas (BYUN et al., 2011).

O método de nanoprecipitação, também chamado de deposição interfacial do polímero pré-formado ou método de deslocamento do solvente, desenvolvido por Fessi e colaboradores (1988), é um método

simples, rápido e facilmente reprodutível, e por esses motivos é o método mais utilizado para produção de nanocápsulas. Entre suas vantagens destacam-se também o baixo consumo de energia, e obtenção de nanopartículas com alta eficiência de encapsulação (RIBEIRO et al., 2008). Porém, este método é mais efetivo para nanoencapsular compostos lipofílicos (FESSI et al., 1989).

Segundo Fessi e colaboradores (1989), para síntese de nanocápsulas é necessário uma fase solvente e uma fase não-solvente.

A fase solvente consiste essencialmente de uma solução orgânica contendo a substância formadora de filme, em um solvente ou mistura de solventes, o composto ativo e o seu solvente, o óleo e um surfactante lipofílico. Os polímeros normalmente utilizados para a formação das nanocápsulas, através do método de nanoprecipitação, são os homopolímeros de poliéster, como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), devido às suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade (SAHOO et al., 2003; LETCHFORD e BURT, 2007; ANTON, 2008). O solvente orgânico necessita ser miscível em água e facilmente removido por evaporação, assim os solventes etanol, acetona ou cloreto de metileno, podem ser utilizados como solvente do polímero. Dentre estes solventes, a acetona é o solvente do polímero mais empregado neste método, devido a facilidade de remoção deste solvente da solução de nanocápsulas (RAO e GECKELER, 2011). Além da solução polimérica, em algumas formulações, principalmente quando se utiliza compostos ativos na forma sólida, é necessário preparar uma solução do composto ativo em um solvente orgânico. Este solvente necessita ser miscível em água, como acetona, com ou sem surfactante lipofílico. Os surfactantes lipofílicos preferidos são os ésteres de sorbitano (Span 60[®]) e os fosfolípidos, como as lecitinas (MORA-HUERTAS et al., 2010; VENTURINI et al., 2011). Além da substância ativa e do surfactante lipofílico, o núcleo das nanocápsulas é composto por um óleo, que deve ser miscível com o solvente orgânico. O critério para escolha do tipo de óleo é alta solubilidade do composto ativo no óleo, ausência de toxidade, baixa solubilidade do óleo no polímero e vice-versa, e ausência de risco de degradação do polímero (LIMAYEM et al., 2006). Os diferentes tipos de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico, são frequentemente utilizados devido a sua ampla solubilidade em diversas substâncias ativas. No entanto, outros óleos como ácido oléico, óleo de argan, óleo de soja e óleo de girassol, não são

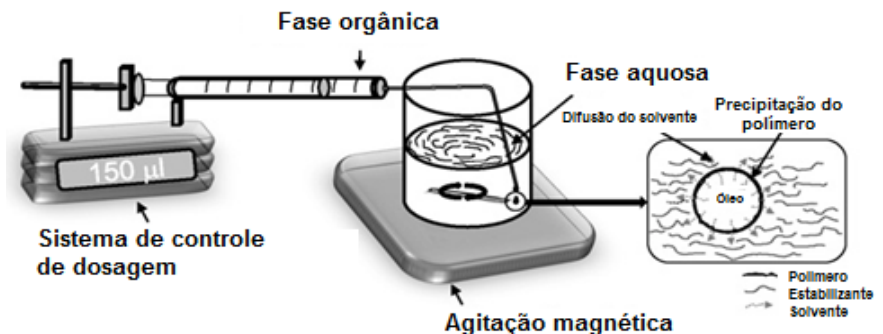
frequentemente utilizados, mas podem mesmo assim dar bons resultados (MORA-HUERTAS et al., 2010).

A fase não-solvente, também chamada de fase aquosa por utilizar normalmente água como não-solvente, porém também podem ser utilizados soluções tampão como não-solvente. Esta fase, frequentemente contém um surfactante hidrofílico, como o poloxamer. É possível produzir nanocápsulas sem a utilização de qualquer surfactante, no entanto, o poloxamer, um surfactante altamente solúvel em água, é indispensável para prevenir a coalescência dos colóides devido a alta tensão interfacial entre as fases orgânica e aquosa (FESSI et al., 1989; VENTURINI et al., 2011).

As nanocápsulas são obtidas como suspensões coloidais quando a fase orgânica é adicionada lentamente à fase aquosa, mantida sob agitação moderada, e agregados do polímero difundem-se em torno da gota de óleo formando as nanocápsulas, conforme apresentado na Figura 2 (LETCHEFORD e BURT, 2007; MORA-HUERTAS et al., 2010).

O processo de desenvolvimento das nanocápsulas, aparentemente simples, pode envolver um complexo fenômeno hidrodinâmico interfacial. O princípio básico do método de nanoprecipitação baseia-se na deposição interfacial de um polímero após a difusão do solvente da fase orgânica para a fase aquosa. A rápida difusão do solvente orgânico para a fase aquosa resulta na diminuição da tensão interfacial entre as duas fases, o qual aumenta a área superficial e conduz à formação de pequenas gotas de solvente orgânico. O método prossegue com a evaporação do solvente para a interface ar/água (FESSI, 1989; VENTURINI et al., 2011).

Figura 2 Ilustração esquemática das fases do processo de formação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.



Fonte: Adaptado de Mora-Huertas et al., 2010.

A origem do mecanismo de formação das nanocápsulas pode ser então explicado em termos de turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface, entre duas fases líquidas desequilibradas, envolvendo fluxo, difusão e processos superficiais. O processo pode então ser governado pelo bem conhecido efeito Marangoni, em que o movimento de uma interface é causado por variações longitudinais da tensão interfacial (FESSI et al., 1989).

As características das nanocápsulas são influenciadas pela natureza e concentração de seus componentes. Segundo Mora-Huertas e colaboradores (2010), a concentração recomendada para cada um dos componentes das fases orgânica e aquosa, necessária para produção de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação, é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Composição básica sugerida para produção de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação.

Material	Composição Sugerida
Substância Ativa	10-25 mg
Polímero	0,2-0,5% do solvente
Óleo	1,0-5,0% do solvente
Surfactante Lipofílico	0,2-0,5% do solvente
Solvente	25 mL
Agente estabilizante	0,2-0,5% do não-solvente
Não-solvente	50 ml

Fonte: Mora-Huertas, et al., 2010.

A determinação das características físico-químicas das suspensões de nanopartículas considerava-se complexa, devido ao tamanho reduzido das partículas e à diversidade de matérias-primas que as compõem, porém já existem métodos fáceis de se executar e com respostas imediatas. Assim, visando a sua aplicação é fundamental que características como tamanho e distribuição de partículas, potencial zeta, cinética de liberação do composto ativo a partir das nanopartículas, eficiência de encapsulação, além da avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento sejam conhecidas (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). O tamanho das nanocápsulas varia

geralmente entre 100 e 500 nm e depende de vários fatores: o método de preparação, a natureza e a concentração do polímero e da substância encapsulada, a concentração e o tipo de surfactantes, a proporção entre solvente orgânico e água, a concentração e o tipo de óleo na solução orgânica, além da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (LEGRAND et al., 1999).

Nesse contexto alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos avaliando o efeito dos constituintes das nanopartículas, obtidas pelo método de nanoprecipitação, sobre suas propriedades físico-químicas.

Stella e colaboradores (2007) prepararam nanopartículas poliméricas utilizando como composto ativo a Gemcitabina e seus derivados (4-(N)-Valeroylgemcitabina; 4-(N)-Lauroylgemcitabina; 4-(N)-Stearoylgemcitabina) e, avaliaram o efeito da natureza do composto ativo, através da lipofilicidade, sobre as características físico-químicas como tamanho de partícula e eficiência de encapsulação. Os resultados encontrados mostram claramente que a lipofilicidade do composto ativo possui influencia significativa sobre a eficiência de encapsulação, e que quanto maior a lipofilicidade do composto ativo maior a eficiência de encapsulação, em ambos nanocápsulas e nanoesferas de poli[aminopoli (etileno glicol)cianoacrilato-co-hexadecil cianoacrilato]. As nanocápsulas apresentaram distribuição de tamanho unimodal (índice de polidispersão $< 0,1$) somente para o derivado mais lipofílico da gemcitabina, o 4-(N)-stearoylgemcitabina. Já a natureza do composto ativo não apresentou influencia significativa sobre o tamanho das nanopartículas formuladas. Como o derivado 4-(N)-stearoylgemcitabina apresentou melhores resultados de eficiência de encapsulação, Stella e colaboradores (2007) prosseguiram os experimentos variando a concentração deste derivado, para avaliar a influência da concentração sobre os parâmetros de tamanho de partícula e potencial zeta. Neste estudo a concentração também não apresentou influência significativa sobre o tamanho médio de partícula. Com relação ao potencial zeta, o potencial zeta aumentou com aumento da concentração de 4-(N)-stearoylgemcitabina até 125 $\mu\text{g/ml}$ e depois diminuiu até concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Em outro estudo, Khayata e colaboradores (2012) desenvolveram nanocápsulas de poli-e-caprolactona utilizando como composto ativo a vitamina E e avaliaram o efeito da concentração do composto ativo sobre o tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Encontraram que o tamanho médio das partículas aumentou com o aumento do conteúdo de vitamin E e

atribuíram este resultado a alta viscosidade do α -tocoferol. Por outro lado o potencial zeta diminuiu com o aumento do conteúdo oleoso. Encontraram alta eficiência da encapsulação da vitamina E, onde atribuíram este comportamento à elevada lipofilicidade da vitamina E, onde a eficiência de encapsulação é geralmente proporcional à lipofilicidade do fármaco a ser encapsulado. Porém, não encontraram diferenças significativas para a eficiência de encapsulação quando utilizaram diferentes concentrações de vitamina E.

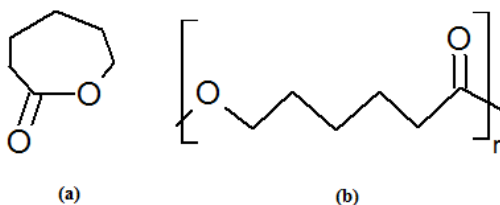
Neste mesmo estudo, Khayata e colaboradores (2012) avaliaram o efeito do tipo de óleo sobre as características físico-químicas das nanocápsulas formuladas. Três tipos de óleos foram testados: o óleo de ricino, óleo de sésamo, e Labrafac Hidro[®] e encontraram que maiores nanopartículas foram preparadas quando utilizou-se óleo de ricino, devido à maior viscosidade deste óleo em relação aos outros. Além disso, o índice de polidispersão aumentou quando a viscosidade do óleo foi aumentada. Este resultado foi semelhante ao relatado por Pohlmann et al. (2002), que também notaram que a baixa viscosidade reduziu a tensão interfacial e, como consequência, a emulsão preparada produziu partículas submicrométricas com baixa população de micropartículas; em caso de polímeros biodegradáveis há um aumento proporcional no diâmetro da partícula e no índice de polidispersão com um aumento da viscosidade do óleo. O potencial zeta foi negativamente carregado, devido à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero, sabendo que o surfactante utilizado (Tween[®] 80) é um agente estabilizante não-iônico. O valor mais baixo (-16 mV) foi obtido para as nanocápsulas formuladas sem adição de óleo à solução de vitamina E. A literatura relata que valores de potencial zeta inferiores a -10 mV permitem prever boa estabilidade coloidal devido à alta barreira energética entre as partículas (MORA-HUERTAS et al., 2010).

Outros estudos foram executados avaliando o efeito da concentração do polímero sobre o tamanho de partícula (LIMAYEM et al., 2006; BYUN et al., 2011; KHAYATA et al., 2012) e eficiência de encapsulação (BYUN et al., 2011), assim como natureza do polímero sobre o tamanho de partícula (DALENÇON et al., 1997; FURTADO et al., 2001b; POHLMANN et al., 2002; CAUCHETIER et al., 2003; SCHAFFAZICK et al. 2003; KHAYATA et al., 2012), potencial zeta (FURTADO et al., 2001a; KHAYATA et al., 2012) e eficiência de encapsulação (AMELLER et al., 2003; KHAYATA et al., 2012).

1.1.1 Poli(ϵ -caprolactona)

A poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um biopolíester, uma importante classe de polímeros biodegradáveis formados a partir da abertura do anel do monômero ϵ -caprolactona seguido por polimerização (SOZER e KOKINI, 2009). A Figura 3, apresenta a estrutura química do monômero ϵ -caprolactona e do polímero poli(ϵ -caprolactona).

Figura 3 Estrutura química da (a) ϵ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$. (b) Estrutura da poli(ϵ -caprolactona) representada pela sua unidade monomérica, a ϵ -caprolactona, com o anel aberto.



Fonte: Adaptado de NAIR e LAURENCIN, 2007.

A PCL possui baixa temperatura de fusão (55 a 60°C), é hidrofóbico e possui cristalinidade em torno de 50%, além de possuir habilidade de formar blendas miscíveis com uma grande variedade de polímeros e ser solúvel em uma grande variedade de solventes orgânicos, como diclorometano, clorofórmio, tetracloreto de carbono, benzeno e tolueno em temperatura ambiente. A PCL possui uma baixa solubilidade em acetona, dimetilformamida e acetonitrila, e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico. Bordes et al. (2010) estudaram a solubilidade de PCL's de diferentes massas molares em diversos solventes para a substituição do diclorometano em processos de microencapsulação. Khayata e colaboradores (2012) utilizaram acetona para solubilizar o polímero poli- ϵ -caprolactona, e obtiveram êxito na formação de nanopartículas de PCL/ α -tocoferol.

A poli- ϵ -caprolactona tem sido extensivamente estudada como substrato para biodegradação e como matrix em sistemas de liberação controlada de compostos ativos.

A PCL sofre degradação microbiana e enzimática, devido à hidrólise das suas ligações ésteres, principalmente em condições fisiológicas (como no corpo humano) e, portanto, tem recebido grande atenção para uso na liberação de compostos ativos. O uso da PCL é

particularmente interessante para o preparo de dispositivos de liberação controlada a longo prazo, devido a sua degradação mais lenta do que os poliácidoaláticos (CHANDRA e RUSTGI, 1998; KUMARI et al., 2010).

Nanopartículas de PCL são elaboradas principalmente pelos métodos de nanoprecipitação e evaporação do solvente (KUMARI et al., 2010).

Khayata e colaboradores (2012), estudaram o efeito da concentração de PCL sobre as propriedades físico-químicas de nanocápsulas de α -tocoferol, desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação. Encontraram que com o aumento do conteúdo de PCL de 50 para 200 mg, ocorreu um aumento no tamanho das partículas, com diminuição da área superficial e, como consequência da menor área superficial exposta, ocorreu uma diminuição no valor absoluto do potencial zeta.

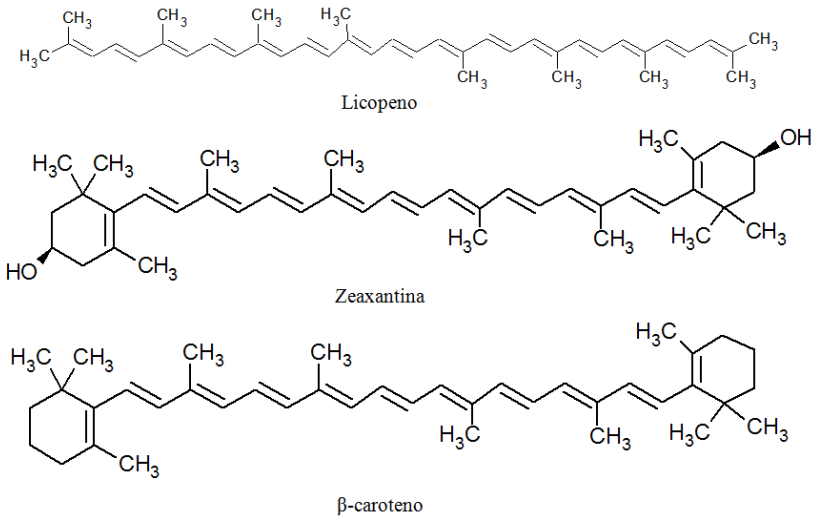
1.1.2 β -caroteno

Os carotenoides são pigmentos orgânicos encontrados nos cloroplastos de plantas e em alguns outros organismos fotossintéticos (GONNET et al., 2010). Mais de 600 compostos carotenóides foram identificados na natureza, e todos eles têm características moleculares comuns. A estrutura molecular básica, da maior parte dos carotenóides, consiste em uma cadeia poliisoprenóide, contendo 40 átomos de carbono e uma série de duplas ligações conjugadas, localizadas na parte central da molécula (CADENAS e PACKER, 2002).

Outra característica estrutural da maioria das moléculas de carotenoides é a presença de grupos terminais cíclicos. O licopeno possui "cadeia aberta" ou polienu acíclico, enquanto o β -caroteno é um carotenóide dicíclico com anéis β -ionona em ambas as extremidades da molécula (CADENAS e PACKER, 2002; GONNET et al. 2010).

Usualmente os carotenoides são separados em duas classes: carotenos que representam moléculas livres de oxigênio e as xantofilas que são hidroxicarotenóides e conseqüentemente menos hidrofóbicos que os carotenos. As principais xantofilas são luteína, zeaxantina e astaxantina. Os principais carotenos são α -caroteno, β -caroteno e licopeno. Na Figura 4, apresentamos a estrutura dos carotenoides mais comuns (CADENAS e PACKER, 2002; GONNET et al., 2010).

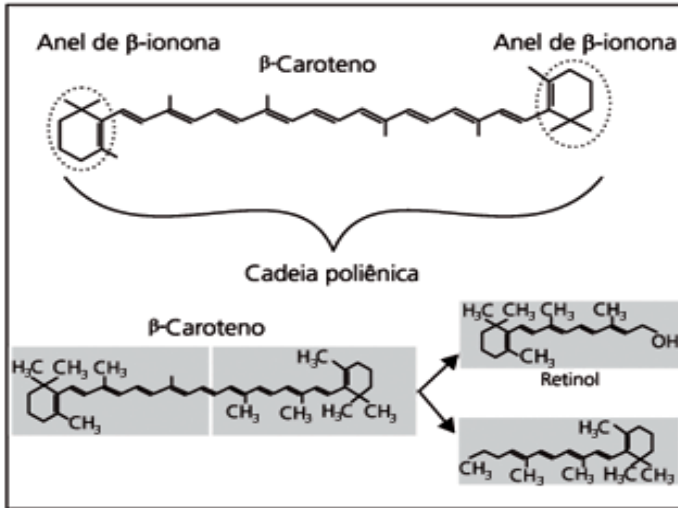
Figura 4 Estrutura dos carotenoides mais comuns.



Fonte: Adaptado de Cadenas e Packer, 2002.

O licopeno e o β -caroteno são exemplos de carotenoides que exibem simetria molecular interna, onde uma metade da molécula é idêntica a outra metade. Esta propriedade faz com que a clivagem central do β -caroteno, apresente potencial para produzir duas moléculas idênticas de retinol, Figura 5, atribuindo ao β -caroteno o mais alto potencial pró-vitamina A em comparação com qualquer outro carotenóide (CADENAS e PACKER, 2002; GONNET et al. 2010).

O β -caroteno ocorre na natureza, geralmente associado a um certo número de pigmentos quimicamente relacionados, e têm sido utilizados como corantes em alimentos durante muitos anos (SOCACIU, 2008).

Figura 5 Estrutura química e clivagem do β -caroteno.

Fonte: Ambrósio et al., 2006.

A maioria do β -caroteno hoje utilizado é fabricado através de síntese, resultando em uma molécula equivalente ao que se encontra na natureza. No entanto, várias fontes naturais estão disponíveis e são cada vez mais utilizadas para substituir a variante sintética (SOCACIU, 2008).

O sistema de ligações duplas conjugadas constitui o cromóforo de absorção da luz, que dá aos carotenoides sua coloração atraente, podendo apresentar coloração amarela, laranja ou vermelha, e fornece o espectro de absorção no visível, que serve como base para a sua identificação e quantificação. A cor permite que seja possível acompanhar as diferentes etapas da análise dos carotenoides. Perdas ou alterações na cor, em qualquer momento, durante a análise dá uma indicação imediata da degradação ou alteração estrutural (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

O espectro de ultravioleta e visível é a primeira ferramenta de diagnóstico para a identificação de carotenóides. O comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) e a forma do espectro (estrutura fina espectral) são característicos do cromóforo (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Os máximos de absorção, em função do número de ligações duplas conjugadas, variam entre 400 e 500 nm (CADENAS e PACKER, 2002).

Os carotenoides, devido a elevada insaturação da molécula, são propensos à isomerização e oxidação. A interconversão das formas geométricas dos carotenóides ocorre quando são expostos à luz e energia térmica, ou quando eles sofrem reações químicas, promovendo a isomerização dos *trans* carotenoides, sua configuração normal, para as formas *cis*. Isso resulta em perda de cor e da atividade pró-vitamina A. Em princípio, os carotenoides podem adotar um número enorme de diferentes configurações e conformações, devido à possibilidade de isomeria em torno de suas duplas ligações carbono-carbono e rotação das ligações simples. No entanto, os carotenoides vão se rearranjar estereoquimicamente e, finalmente, existir sob a forma preferida, de menor energia. Os carotenoides são mais estáveis quando as suas cadeias de polieno estão lineares, conformação *all-trans*, onde as ligações duplas estão em um mesmo plano e o impedimento estérico é mínimo. Os isômeros *cis* dos carotenoides são termodinamicamente menos estáveis do que os isômeros *trans* por causa da maior proximidade entre átomos de hidrogênio ou dos grupos metílicos resultantes da dupla ligação *cis* (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; CADENAS & PACKER, 2002).

Já a degradação oxidativa, a principal causa de perda dos carotenoides, depende da disponibilidade de oxigênio e é estimulada pela luz, enzimas, metais e co-oxidação com hidroperóxidos lipídicos. Os carotenoides apresentam diferente suscetibilidade a oxidação, ζ -caroteno, luteína, violaxantina são citados como os mais lábeis (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A oxidação do β -caroteno envolve a formação do 5,6-epóxido, o qual pode isomerizar para 5,8-epóxido (mutacromo). Oxidações induzidas por meio fotoquímico geram mutacromos como produto primário da degradação e, como produto final, compostos de baixo peso molecular (Figura 6) (DAMODARAN et al., 2010).

E, como consequência da formação destes compostos ocorre a perda total da cor e da atividade biológica (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Quando submetido a altas temperaturas, o β -caroteno também pode fragmentar formando compostos de baixa massa molecular (DAMODARAN et al., 2010).

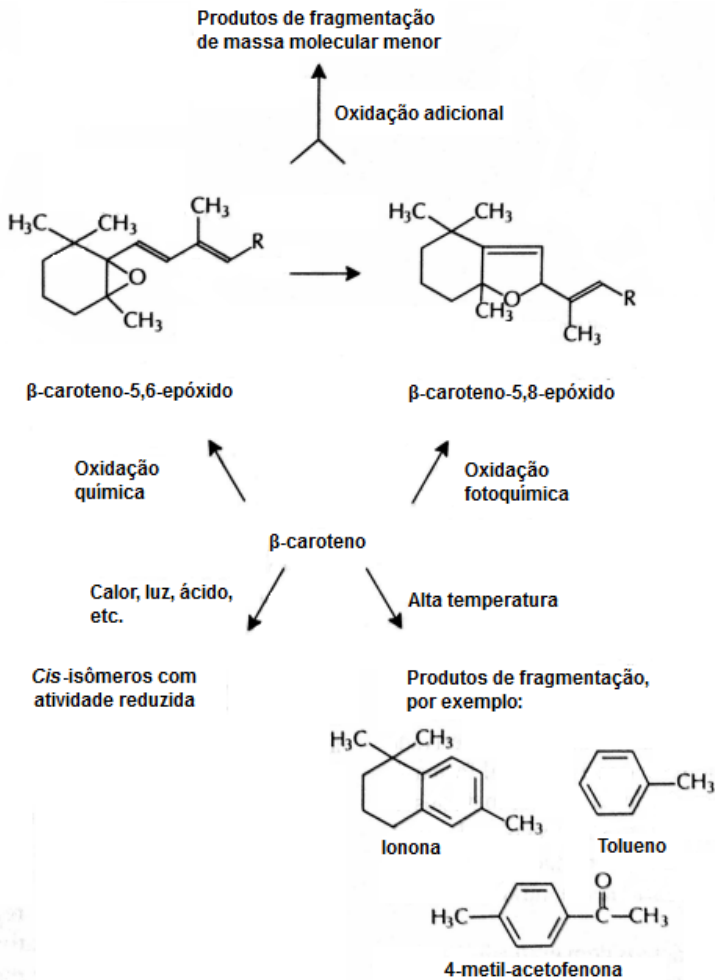
A atividade antioxidante dos carotenoides é atribuída, em grande parte, ao sistema de duplas ligações conjugadas presentes na molécula (CADENAS e PACKER, 2002; GONNET et al. 2010).

O β -caroteno tem a capacidade de agir como antioxidante em baixas concentrações de oxigênio ($< 0,2$ atm de O_2). O β -caroteno pode

agir como antioxidante por desativação do oxigênio singlete, radical hidroxila e superóxido, bem como por reação com radicais peroxil (ROO^{\bullet}). Esses radicais atacam o β -caroteno formando o chamado $\text{ROO-}\beta$ -caroteno $^{\bullet}$, no qual o radical peroxil liga-se à posição C^7 do β -caroteno, enquanto um par de elétrons desemparelhados é removido ao longo do sistema de ligações duplas conjugadas. O β -caroteno aparentemente não age como radical com ruptura da cadeia (doando H^{\bullet}), como fazem os antioxidantes fenólicos (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Com poucas exceções, os carotenóides são lipofílicos. Eles são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, tais como acetona, álcool, éter etílico, clorofórmio e acetato de etila. Carotenos são prontamente solúveis em éter de petróleo, hexano, e tolueno; xantofilas dissolvem melhor em metanol e etanol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Figura 6 Possíveis rotas de degradação do β -caroteno.



Fonte: Damodaran et al., 2010.

Para aumentar a solubilidade do β -caroteno e sua biodisponibilidade Ribeiro e colaboradores (2008) desenvolveram nanopartículas utilizando os biopolímeros PLA e PLGA, através do método de deslocamento do solvente.

Em outro estudo, Tan e Nakajima (2005), estudaram o efeito do tipo de surfactante não-iónico, ésteres de poliglicerol de ácidos graxos

(PGE), sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de β -caroteno preparadas pelo método de emulsificação/evaporação e, também sobre a estabilidade das suspensões de nanocápsulas ao longo do tempo de armazenagem, 12 semanas a 4°C. Os resultados encontrados mostraram que o uso dos PGEs foi eficaz para a preparação de nanodispersões, apresentando estreita distribuição de tamanho das partículas β -caroteno. O aumento no grau de polimerização do glicerol na molécula dos PGE levou-se a dispersões com partículas de menores dimensões e estabilidades mais elevadas. Além disso, o tamanho de partícula médio e estabilidade, das nanodispersões de β -caroteno, também foram afetados de forma significativa ($P < 0,05$), pelo tipo de ácido graxo ligado à porção glicerol do PGE. Em geral, a melhor estabilização foi obtida utilizando o monolaurato de decaglicerol.

Em estudo semelhante Yin e colaboradores (2009) compararam as características de formulações de nanopartículas de β -caroteno utilizando diferentes surfactantes. Prepararam formulações utilizando caseinato de sódio (SC), polioxietileno-20 monolaurato de sorbitano (Tween 20), monolaurato de decoglicerol (ML750) e éster de sacarose de ácidos graxos (L1695), bem como as combinações binárias de SC-ML750 e SC-L1695 utilizando a técnica de deslocamento de solvente. Os resultados mostraram que os surfactantes não só influenciaram o tamanho médio das partículas, como também a estabilidade química do β -caroteno encapsulado. Devido ao seu maior peso molecular, nanodispersões estabilizadas com caseinato de sódio apresentaram maior tamanho de partícula em comparação com as nanopartículas preparadas com surfactantes não-iônicos de menores moléculas, Tween 20, ML750 e L1695. A distribuição de tamanho das partículas formuladas utilizando o SC foi unimodal enquanto que, para as formulações utilizando os outros surfactantes, a distribuição de tamanho, foi bimodal. Contudo, β -caroteno nas nanodispersões estabilizadas com SC apresentaram maior estabilidade contra a oxidação lípida. Encontraram também que a estabilidade do β -caroteno nas nanodispersões estabilizadas com ML750 e L1695 pode ser melhorada com a presença do SC. Atribuíram estes resultados tanto a proteção física quanto a atividade antioxidante dos peptídeos do caseinato de sódio, que contribuíram para a inibir a oxidação do β -caroteno nas nanodispersões. Além deste fator, outra possível explicação para a degradação do β -caroteno nas nanodispersões durante o armazenamento está relacionada a influência da área superficial específica. Nanodispersões estabilizadas com SC apresentaram maior tamanho médio de partícula e, portanto, a menor

área de superfície específica. Esta foi uma das razões por que o β -caroteno nas nanodispersões estabilizadas com SC foram menos suscetíveis à oxidação. Quanto ao potencial zeta, as nanodispersões estabilizadas com SC apresentaram uma carga de superfície líquida de -32,8 mV a pH neutro. Surpreendentemente, a carga de superfície líquida das nanodispersões estabilizadas com Tween 20, ML750 e L1695 também foi negativa, embora todos eles sejam emulsificantes não-iônicos. O potencial zeta obtido para as nanopartículas utilizando Tween 20, ML750 e L1695 foi de -8,2, -17,6 e -30,9 mV, respectivamente.

1.1.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

1.1.3.1 Tamanho das nanopartículas

A determinação do diâmetro médio das nanopartículas é de fundamental importância, uma vez que o tamanho das partículas permite avaliar a tendência à agregação e sedimentação, por mudanças na distribuição do tamanho das partículas ao longo do tempo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Os métodos comumente utilizados para determinação do tamanho de partícula são microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração a laser (LD) e espectroscopia de correlação de fótons (PCS).

A espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também chamada de espalhamento de luz dinâmico (DLS), permite a determinação do tamanho das partículas através da análise do movimento difusivo destas em suspensão. As partículas presentes no sistema estão em constante deslocamento devido ao movimentos browniano, o que faz com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento. O movimento Browniano é o movimento de partículas devido à colisão aleatória com as moléculas do líquido que rodeiam a partícula. Partículas grandes movem-se mais lentamente que as pequenas, de forma que a taxa de flutuação da luz espalhada por elas também é mais lenta. A espectroscopia de correlação de fótons utiliza a taxa de mudança dessas flutuações da luz para determinar a distribuição de tamanho das partículas (MALVERN, 2012).

As vantagens na utilização da PCS em relação aos outros métodos de determinação de tamanho de partículas são baixo tempo requerido para realização das análises, fácil execução e custo relativamente baixo

dos equipamentos (MAGENHEIM e BENITA, 1991).

1.1.3.2 Potencial zeta das nanopartículas

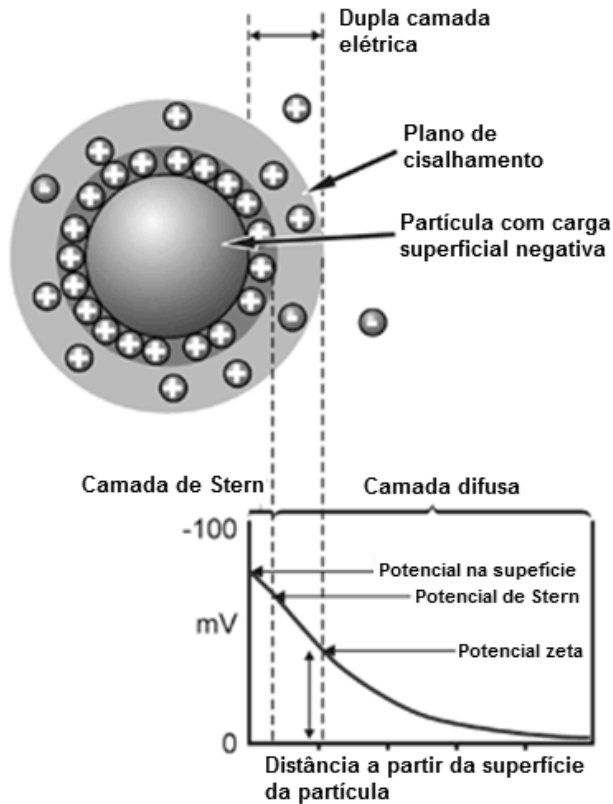
Muitas técnicas têm sido desenvolvidas e utilizadas para estudar a modificação da superfície de nanopartículas poliméricas (SOPPIMATH et al., 2001). Um método eficiente para avaliar este parâmetro é a determinação do potencial zeta (ζ) de superfícies aquosas contendo nanopartículas (LEGRAND et al., 1999).

As forças que interagem na superfície das nanopartículas e no líquido de dispersão são as que determinam seu comportamento. O desenvolvimento de uma carga líquida na superfície das partículas afeta a distribuição de íons na região interfacial circundante, que resulta em um aumento da concentração de contra-íons (íons de carga oposta à da partícula) perto da superfície da partícula (MALVERN, 2012).

Se uma partícula possui carga líquida negativa, ela faz com que os íons positivos em solução (chamados contra-íons) formem uma rígida camada ao redor de sua superfície; esta camada de contra-íons é conhecida como camada de Stern (Figura 7) (MALVERN, 2012).

A partícula negativa e sua atmosfera carregada positivamente produzem um potencial elétrico relativo na solução. Este potencial tem um valor máximo na superfície e diminui gradualmente com a distância, aproximando-se de zero fora da camada difusa. Outros íons positivos podem ser atraídos pela partícula negativa, mas estes agora são repelidos pela camada de Stern. Ocorre um equilíbrio dinâmico que resulta na formação de uma camada difusa de contra-íons, os quais diminuem conforme aumenta-se a distância da superfície da partícula. A camada difusa pode ser visualizada como uma atmosfera rodeando a partícula. Dentro da camada difusa há um limite teórico dentro do qual os íons e a partícula formam uma entidade estável. Quando uma partícula se move (por exemplo, devido à gravidade), os íons dentro do limite movem-se com ela, mas os íons além do limite não movem-se com a partícula. Esta fronteira onde unem-se a camada difusa e camada de Stern é chamada de plano de cisalhamento e potencial que existe neste limite é conhecido como o potencial Zeta (MALVERN, 2012).

Figura 7 Representação das condições em uma partícula negativa com uma camada de íons positivos adsorvidos na camada adjacente, denominada camada de Stern. No plano de cisalhamento é localizado o potencial zeta.



Fonte: Adaptado de Malvern, 2012.

A diferença de potencial e a distância desde a partícula é um indicador da força repulsiva das partículas em solução, em função da distância na qual estas forças operam. O potencial zeta pode ser uma maneira efetiva de controlar o comportamento de nanopartículas, já que indica mudanças no potencial de superfície e na força de repulsão entre as partículas (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; *apud* PEREIRA, 2006).

A medida de potencial zeta permite avaliar a estabilidade das dispersões coloidais. Em módulo, um valor de potencial zeta

relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003). Elevados valores de potencial zeta, acima de 30mV, positivos ou negativos, sugerem suspensões de nanocápsulas mais estáveis, devido a repulsão entre as partículas que previne sua agregação (MALVERN, 2012).

Os valores de potencial zeta podem ser positivos ou negativos, dependendo da natureza do polímero e do material usado para modificação de sua superfície (SOPPIMATH et al., 2001). Os fosfolípides, os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes que podem afetar o potencial zeta, por estarem envolvidos na formação do envoltório e/ou adsorvidos a ele. Enquanto polímeros e lecitinas favorecem uma carga negativa na interface, o poloxamer, um surfactante não-iônico tende a reduzir, em valor absoluto, o potencial zeta (LEGRAND et al., 1999 *apud* PEREIRA, 2006).

1.2 BIOFILMES

Os biofilmes são definidos como filmes finos, flexíveis, formados por uma camada contínua de biopolímeros como proteínas, polissacarídeos e lipídios (GONTARD, GUILBERT e CUQ, 1992). Os biofilmes também podem ser formados pela aplicação direta da solução filmogênica sobre a superfície do alimento, sendo assim chamados de coberturas comestíveis (KROCHTA e MULDER-JOHNSON, 1997).

Algumas possíveis propriedades funcionais dos biofilmes incluem: fornecer barreira à transferência de massa, como retardar a migração de umidade, o transporte de gases (O_2 , CO_2) e a migração de óleos e gorduras, podendo também servir como carreadores de ingredientes e aditivos alimentares (antioxidantes, bactericidas, pigmentos e aromas), com liberação controlada sobre o produto onde foi aplicado, além de oferecer proteção mecânica aos alimentos (PERESSINI et al., 2003).

As propriedades funcionais dos biofilmes são fortemente influenciadas por parâmetros como formulação, processo de formação do filme, características dos solventes e aditivos (GONTARD et al., 1992).

Os biofilmes podem ser formados por dois mecanismos principais: os chamados processos secos, como a extrusão termoplástica, estão baseados nas propriedades termoplásticas dos polímeros quando plastificados e aquecidos acima da sua temperatura de transição vítrea, em condições de baixo conteúdo de água. O processo úmido, em contraste, está baseado na dispersão ou solubilização dos biopolímeros em um solvente (água, etanol ou ácidos orgânicos) obtendo-se uma dispersão ou solução filmogênica. Alguns aditivos, como plastificantes e emulsificantes, podem ser usados. Após o preparo, estas soluções devem passar por uma operação de secagem para a formação dos filmes ou coberturas tipo *casting* (GONTARD et al., 1992; PERESSINI et al., 2003).

Filmes formados a partir de polissacarídeos e proteínas são esperados como sendo excelentes barreiras ao oxigênio devido ao empacotamento das moléculas, formando uma rede estrutural ordenada através de ligações de hidrogênio. No entanto comparado aos filmes sintéticos, a maior restrição no uso destes filmes como material prima para embalagem de alimentos é a sua alta solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água, devido a sua hidrofiliidade (KROCHTA e MULDER-JOHNSON, 1997).

Como regra geral, os filmes a partir de lipídeos são utilizados para reduzir a transmissão de água; polissacarídeos são usados para controlar a transmissão de oxigênio e outros gases, enquanto os filmes formulados com proteínas conferem estabilidade mecânica (KROCHTA e MULDER-JOHNSON, 1997).

Os polissacarídeos utilizados para filmes ou revestimentos comestíveis incluem os derivados de celulose, amido, derivados de pectina, extratos de algas, exsudado de gomas, gomas de fermentação microbiana e quitosana (KROCHTA e MULDER-JOHNSON, 1997). Polissacarídeos são, geralmente, muito hidrofílicos resultando em pobres propriedades de barreira ao vapor d'água e a gases. Embora os filmes poliméricos de polissacarídeos não proporcionem uma boa barreira contra o vapor de água, estes revestimentos podem agir como agentes de sacrifício, retardamento a perda de umidade a partir de produtos alimentares (BOURTOOM, 2008). Melhor uniformidade dos filmes, pode ser obtida quando surfactantes são adicionados. Esta estratégia também reduzirá a atividade de água superficial e por sua vez reduzirá a perda de água (HUBER e EMBUSCADO, 2009).

Uma importante característica no preparo de filmes para diversos alimentos, consiste em garantir que os filmes produzidos proporcionem

propriedades físicas e químicas necessárias para manter a transmissão de vários gases e líquidos, em doses iguais as que ocorrem dentro dos seus sistemas nativos. Assim, para que os biofilmes possam entrar em contato com alimentos devem possuir as seguintes características: não conter componentes tóxicos e alergênicos; fornecer estabilidade estrutural e prevenir danos mecânicos durante transporte, manuseio e exposição; possuir boa adesão a superfície do alimento a ser protegido, proporcionando uma cobertura uniforme; controlar a migração de água, tanto fora quanto dentro do alimento a ser protegido, para manter o conteúdo de água desejado; proporcionar semi-permeabilidade para manter o equilíbrio interno dos gases envolvidos na respiração aeróbia e anaeróbia, assim retardando a senescência; prevenir a perda ou absorção de componentes que estabilizem o aroma, flavor, características nutricionais e organolépticas necessárias para a aceitação do consumidor, enquanto não alterar o sabor e aparência; proporcionar estabilidade bioquímica e microbiológica na superfície, e ao mesmo tempo proteger contra contaminação, infestação por pragas, proliferação de microorganismos, e outros tipos de deterioração; manter ou melhorar os atributos sensoriais, como aparência e sabor do produto; servir como suporte para aditivos desejáveis, como saborizantes, aromatizantes, corantes, nutrientes e vitaminas. A incorporação de agentes anti-oxidantes e antimicrobianos podem ser limitados à superfície através do uso de filmes comestíveis, minimizando assim o custo e sabor indesejável, para isso os filmes devem ser facilmente produzidos e economicamente viáveis (HUBER e EMBUSCADO, 2009).

1.2.1 Embalagens ativas

Recentemente, tem havido uma crescente atenção sobre as embalagens ativas, que são um grupo de embalagens desenvolvidas para proteger e interagir com o produto, como forma de preservar a qualidade e segurança deste durante o armazenamento (SARANTÓPOULOS e MORAES, 2009).

Elas também podem ser definidas como embalagens em que elementos adicionais são deliberadamente incluídos no material estrutural da embalagem ou no espaço livre desta, como na forma de sachês, para melhorar seu desempenho (GONTARD, 1997; SARANTÓPOULOS e MORAES, 2009).

Existem vários mecanismos de atuação das embalagens ativas, dentre eles: absorção de oxigênio, absorção de etileno, absorção de odores, absorção de umidade, liberação de compostos antimicrobianos e liberação de compostos antioxidantes (GONTARD, 1997).

Dentre as vantagens do uso de embalagens ativas, destacam-se: maior durabilidade dos produtos embalados e a redução da necessidade de utilização de conservantes químicos (GONTARD, 1997; JONGJAREONRAK et al., 2008).

Embalagens liberando antioxidantes são uma espécie de sistema de conservação de alimentos, em que um antioxidante ou uma mistura de antioxidantes é incorporado na embalagem. A liberação de antioxidantes de forma controlada para o alimento contribui para o prolongamento da vida de prateleira do mesmo, uma vez que a oxidação é comumente iniciada na superfície do alimento, e a liberação de antioxidantes da embalagem é um promissor meio de proteger a superfície do alimento da rancificação (GONTARD, 1997; GRACIANO-VERDUGO et al., 2010).

Alguns autores relataram que os cereais de aveia embalados com alto nível (0,32%) de antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT) impregnados na embalagem de polietileno de alta densidade (PEAD) tiveram sua vida útil prolongada, em comparação com aqueles cereais embalados em embalagens de PEAD com baixos níveis de BHT (0,022%) e sem adição de BHT. A estabilidade ao armazenamento de óleo vegetal embalados com filmes plásticos com propriedades antioxidantes aumentou (GRACIANO-VERDUGO et al., 2010).

O crescente interesse na utilização de antioxidantes naturais em sistemas alimentícios, em substituição aos sintéticos, vem crescendo devido as preocupações a cerca das características toxicológicas atribuídas aos antioxidantes sintéticos. Jongjareonrak e colaboradores (2008) incorporaram altas concentrações de α -tocoferol em filmes de PEBD (polietileno de baixa densidade) e obtiveram alta inibição da oxidação do ácido linoléico em emulsões armazenadas em contato com o filme .

Pesquisas mais recentes tem indicado que o uso de filmes de PEBD incorporados com baixas concentrações de tocoferol (19-30 mg/g) são capazes de manter estáveis à oxidação óleos durante 16 semanas de estocagem a 30°C. Estas embalagens também podem ser implementadas eficazmente para uso em outros alimentos gordurosos suscetíveis a degradação lipídica (GRACIANO-VERDUGO et al., 2010).

1.2.2 Metilcelulose

Celulose, amido e seus constituintes são importantes matérias-primas para a produção de filmes. A celulose, o principal componente estrutural de plantas, é a fonte mais abundante de carboidratos complexos do mundo (PSOMIADOU et al., 1996).

A celulose é formada por unidades D-glicopiranosídicas, unidas por ligações β 1 \rightarrow 4 em uma cadeia longa e não ramificada, as quais levam a formação de uma cadeia linear (WHISTLER et al., 1997).

Devido a baixa solubilidade da celulose em solventes aquosos, muitos produtos derivados da celulose estão sendo desenvolvidos para superar a barreira da hidrofobicidade. Estes produtos, em termos químicos, podem ser classificados em celulose regenerada, precipitado de celulose e celulose microcristalina (PSOMIADOU et al., 1996).

Além da celulose nativa e microcristalina, muitos derivados de celulose, tais como ésteres ou éteres, são sintetizados para formar celulose com funções específicas (PSOMIADOU et al., 1996).

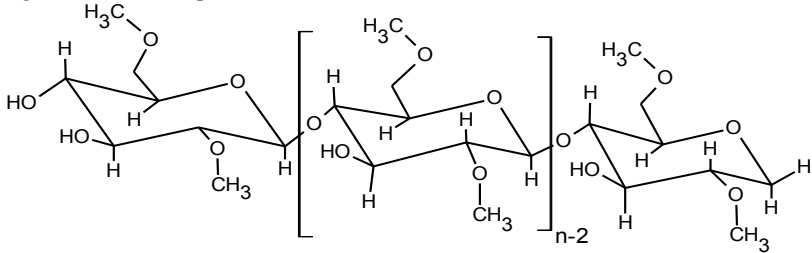
É precisamente a enorme variedade de opções estruturais oferecidas pelos éteres de celulose que muitos trabalhos sobre o desenvolvimento destes produtos tem sido realizados, em especial os relacionados com as tecnologias direcionadas a influenciar e caracterizar a distribuição de substituintes, para a obtenção de efeitos especiais, tais como associações hidrofóbicas, por meio de substituintes da cadeia alifática longa, aumentando ou diminuindo a biodegradabilidade destes produtos (PSOMIADOU et al., 1996).

Os derivados de celulose são polissacarídeos constituídos por cadeias lineares com unidades glicosídicas β (1-4) com substituintes metila, hidroxipropil ou carboxila (PINOTTI et al., 2007).

A maioria da produção de éter de celulose produzida comercialmente é representado por carboximetilcelulose (CMC) e metilcelulose (MC) (cerca de 83%) (PSOMIADOU et al., 1996).

A metilcelulose, Figura 8, é um importante éter de celulose, formada pelo tratamento alcalino da celulose (hidróxido de sódio 18%) seguida por reação com cloreto de metila, no qual os hidrogênios e os grupos hidroxilas da celulose são parcialmente substituídos por grupos alquila (metil) formando grupos éter metílicos (celulose-O-CH₃). O objetivo é modificar as características da celulose nativa, como aumentar sua solubilidade (PERESSINI et al., 2003; SONG et al., 2010).

Figura 8 Estrutura química da metilcelulose.



Fonte: Adaptado de Bourtoom, 2008.

A adição de poucos grupos éter distribuídos ao longo da cadeia aumenta a solubilidade em água, pois previnem associações intermoleculares características das celuloses, mas também diminui a hidratação da cadeia, pela substituição dos grupos hidroxilas, que se ligam à água, por grupos éter menos polares. Os grupos éter restringem a solvatação das cadeias a ponto de deixá-las no limite da solubilidade em água (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Em solução aquosa, são relatadas três interações intermoleculares possíveis para a metilcelulose: (1) ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas não modificados das cadeias de celulose, (2) pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas da celulose e moléculas de água e, (3) associações hidrofóbicas intermoleculares entre os grupos metila nas moléculas de MC. O efeito dessas interações dita o mecanismo de geleificação termorreversível. Soluções de metilcelulose aquosa sofrem geleificação térmica na faixa de temperatura de 50°C a 70°C (PINOTTI et al., 2007; TOMŠIĆ et al., 2008).

A MC possui muitas aplicações na indústria, principalmente na área de tintas, cosméticos, farmacêutica e alimentícia (WHISTLER et al., 1997; SONG et al., 2010)

Nos produtos de padaria e pastelaria a metilcelulose aumenta a absorção e retenção de água, enquanto confere um alto grau de resistência à absorção de óleo nos alimentos submetidos à fritura, pois a estrutura do gel produzida pela termogeificação confere barreira ao óleo. Em alguns alimentos dietéticos a metilcelulose atua como inibidor da sinerese e como agente espessante (WHISTLER et al., 1997; DAMODARAN et al., 2010).

Recentemente, a metilcelulose tem sido usada em misturas com proteínas para preparar filmes compósitos biodegradáveis utilizando o método de casting da solução, devido as suas excelentes propriedades formadoras de filmes, alta solubilidade e eficiente barreira ao oxigênio e a lipídeos (PINOTTI et al., 2007; SONG et al., 2009).

A metilcelulose possui excelente propriedade formadora de filme; os filmes são geralmente inodoro e sem sabor, são flexíveis e de força moderada, transparentes, resistentes à óleos e gorduras, solúveis em água, e apresentam moderada transmissão de oxigênio (KROCHTA e MULDER-JOHNSON, 1997).

A metilcelulose é a mais resistente à água e, a menos hidrofílica dos derivados de celulose no entanto, a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de metilcelulose é ainda relativamente alta (BOURTOOM, 2008).

1.2.3 Propriedades dos Filmes

1.2.3.1 Propriedades Mecânicas

O conhecimento das propriedades mecânicas de materiais poliméricos é de fundamental importância e interesse científico e tecnológico, devido aos requisitos e exigências que os diversos polímeros devem apresentar, já que destas dependem muitas das aplicações industriais. As propriedades mecânicas são aquelas que determinam a resposta destes materiais às influências mecânicas externas (CANEVAROLO et al., 2004).

Dentre as propriedades mecânicas dos filmes, têm particular importância a deformação elástica, que consiste na habilidade dos materiais em recuperar sua forma inicial após sofrer deformação, módulo de elasticidade (módulo de Young), que é a relação linear entre a tensão aplicada e a deformação sofrida e é determinado pela inclinação da curva tensão *vs* deformação na região elástica, entre outras, pois servem como base de comparação do desempenho mecânico dos diferentes polímeros (CANEVAROLO et al., 2004).

As características mecânicas devem ser suficientes para manter a integridade através das práticas de produção e manipulação porque qualquer dano ao filme, como perfurações e rasgos, danifica as propriedades de barreira e proteção. A quantificação de dados para as características mecânicas dos filmes é essencial para o dimensionamento

e desenho dos processos de embalagem e para que se alcance características desejáveis de aplicação específica (BARRETO, 2003).

As propriedades mecânicas dos filmes dependem da natureza do material filmogênico utilizado, do plastificante utilizado e, principalmente, da estrutura de coesão do filme, a qual está relacionada com a aptidão do polímero em formar fortes e/ou numerosas ligações a nível molecular entre duas cadeias poliméricas, dificultando, assim, sua separação quando submetido a forças mecânicas. Em suma, a nível macroscópico, as propriedades mecânicas dependem da formulação (macromolécula, solvente, plastificante), do processo de obtenção e do modo de aplicação (pulverização, suspensão, etc.) dos filmes (ROTTA, 2008).

1.2.3.2 Propriedades Ópticas

Entre as propriedades ópticas dos filmes, destacam-se a transparência ou capacidade do filme em atuar como filtro a determinados comprimentos de onda. A cor dos filmes é outro atributo que pode afetar à aceitabilidade do produto pelo consumidor.

Transparência

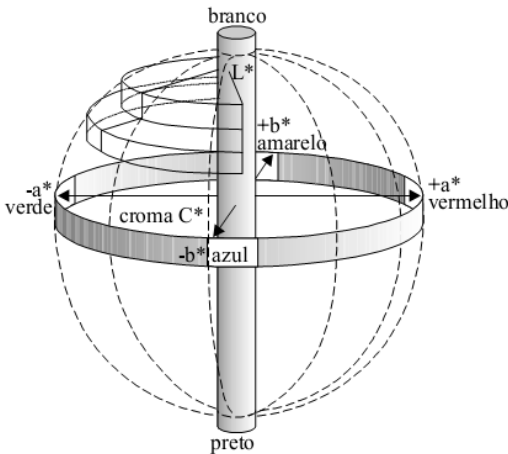
Uma das propriedades ópticas de grande interesse, quando se trata de embalagens para alimentos, é a transparência, medida através de transmitância da luz. A transparência está inversamente relacionada com a absorção/reflexão da luz. Um material não transparente pode absorver luz e/ou refleti-la.

Quanto mais transparente for um material, menos luz é absorvida e/ou refletida por ele. As matrizes poliméricas possuem capacidade de absorver luz na região do ultravioleta e em menor proporção na região do visível. O interesse em materiais opacos é de grande valia na área de embalagens para indústria alimentícia, pois muitos alimentos são instáveis na presença de luz, tornando assim a embalagem uma barreira natural, sem necessidade de uso de aditivos (GENNADIOS et al., 1996; ROTTA, 2008).

Análise Colorimétrica

A cor é um atributo de fundamental importância para um produto. A maioria dos trabalhos utilizam o sistema CIELab, que é um sistema subtrativo de cor proposto pela Commission Internationale L'Eclairage – CIE, e permite a especificação das percepções das cores em termos de um espaço tridimensional. A axial L^* , eixo central da luminosidade, que numa escala de 0 a 100, representa o percurso do espaço da cor desde o preto ao branco; a^* o eixo que representa a variação entre o verde (valores negativos) ao vermelho (valores positivos); e por fim o eixo b^* , que representa a variação de azul (valores negativos) e amarelo (valores positivos) conforme Figura 9 (HUNTERLAB, 2012).

Figura 9 Diagrama do sólido de cor no espaço L^* , a^* , b^* .



Fonte: Machado et al. 1997.

A tolerância instrumental é estabelecida em função dos limites de tolerância da visão humana, que deve ser traduzida em termos de ΔE^* . Para este parâmetro, a diferença entre duas cores, definida como ΔE^* , é calculada através da Equação:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

onde,

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*;$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*;$$

$\Delta b^* = b^* - b_0^*$, sendo L^* , a^* e b^* os valores de cor das amostras e L_0^* , a_0^* e b_0^* os valores de cor do padrão.

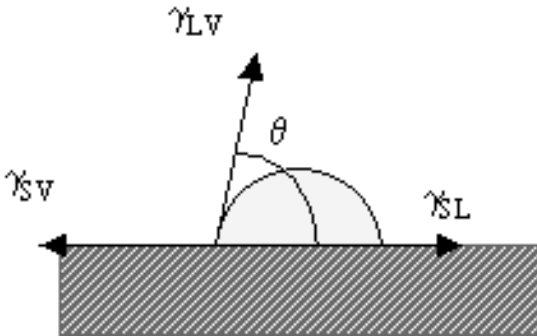
Como a diferença de cor é sempre da amostra menos padrão, então: se ΔL^* for (+) então amostra é mais clara e se ΔL^* for (-) então amostra é mais escura; se Δa^* for (+) então amostra é mais vermelha (menos verde) e se Δa^* for (-) então amostra é mais verde (menos vermelha); se Δb^* for (+) então amostra é mais amarela (menos azul) e se Δb^* for (-) então amostra é mais azul (menos amarela) (HUNTERLAB, 2012).

1.2.3.3 Ângulo de contato e energia livre superficial

O ângulo de contato (θ) é a medida da capacidade de um líquido de espalhar-se sobre uma superfície (BIOPHY RESEARCH, 2012). O método consiste em medir o ângulo entre a tangente de contorno da gota depositada sobre o sólido e a superfície deste sólido, na união Sólido-Líquido-Gás (Figura 10).

Quando uma gota de líquido é depositada sobre uma superfície sólida plana, o líquido pode formar uma gota sobre a superfície, ou pode se espalhar formando uma película. Um líquido quando possui forte afinidade pelo sólido, isto é, se a sua tensão superficial é menor do que a tensão superficial crítica da superfície irá maximizar o seu contacto (área interfacial) e espalhar-se formando uma película. Um líquido com afinidade muito mais fraca, isto é, quando a sua tensão superficial é superior a tensão superficial crítica, irá formar uma gota (SCHRAMM, 2005).

Figura 10 O ângulo de contato, aqui ilustrado como o ângulo medido através do líquido, que é formado na junção do líquido, sólido, e fase gasosa (vapor).



Fonte: Biophy Research, 2012.

Uma forma de visualizar a molhabilidade está na interação da água com superfícies sólidas. Neste caso, tem-se o conceito de hidrofobicidade e hidrofiliidade. A água possui caráter polar, quando a água apresenta com outra superfície um ângulo de contato menor que 90°, esta superfície é considerada hidrofílica, ou seja, possui uma boa interação com a água. Porém, se este ângulo de contato for maior que 90°, o material é considerado hidrofóbico, ou seja, tem baixa afinidade pela água.

Considerando que a tensão interfacial é definida no limite entre duas fases, o ângulo de contato é definido na junção de três fases. Três parâmetros influenciam a forma de gota na superfície sólida:

- Tensão interfacial Sólido-líquido $\gamma_{S/L}$
- Tensão interfacial Sólido-vapor $\gamma_{S/G}(\gamma_S)$
- Tensão interfacial Líquido-vapor $\gamma_{L/G}(\gamma_L)$, estes três parâmetros estão relacionados com o ângulo de contato através da equação de Young:

$$\gamma_{L/G} \cos\theta = \gamma_{S/G} - \gamma_{S/L} \quad (4)$$

Apenas $\gamma_{L/G}$ e θ são mensuráveis, assim equações adicionais são necessárias para determinar $\gamma_{S/L}$ e $\gamma_{S/G}$.

Vários modelos foram desenvolvidos para calcular esses parâmetros. O modelo de Owens e Wendt (1979) considera que energia de superfície pode ser expressa como:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (5)$$

onde:

- γ_s^d componente dispersiva (interações Lifshitz-Van der Waals)
- γ_s^p componente não dispersiva (interações polares, ácido-base de Lewis)

Assim, a equação entre os componentes de tensão e o ângulo de contato é dada por:

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_s^d}\sqrt{\gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p}\sqrt{\gamma_L^p} \quad (6)$$

Neste modelo, a medida do ângulo de contato de dois líquidos diferentes são necessários para calcular a energia de superfície (OWENS e WENDT, 1979).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, E.; SAREMINEZHAD, S.; AZIZI, M.H. The effect of ultrasound treatment on some properties of methylcellulose films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1399 – 1401, 2011.

AKHTAR, M.J.; JACQUOT, M.; JASNIEWSKI, J.; JACQUOT, C.; IMRAN, M.; JAMSHIDIAN, M.; PARIS, C.; DESOBRY, S. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1150 – 1158, 2012.

AMBROSIO, C.L.B.; CAMPOS, F. DE A.C.S. AND FARO, Z.P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 2, p. 233 – 243, 2006.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRATT, G.; RENOIR, J.M. Polyester-poly(ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonisation properties. **Pharm. Res.**, v. 20, p. 1063 – 1070, 2003.

ANTON, N. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185 – 199, 2008.

AZEREDO, H.M.C. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, p. 1240 – 1253, 2009.

BARRETO, P.L.M. Propriedades Físico-Químicas de Soluções Formadoras e de Filmes de Caseinato de Sódio Plastificados com Sorbitol; **Tese Doutorado**, 2003.

BEAULIEU, J.C.; PARK, H.S.; BALLEW MIMS, A.G.; KUK, M.S. Extension of green bell pepper shelf life using oilseed-derived lipid films from soapstock. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 271 – 275, 2009.

BIOPHY RESEARCH. Disponível em: http://www.biophyresearch.com/pdf/angle_uk.pdf. Acesso em Outubro 2012.

BORDES, C.; FRÉVILLE, V.; RUFFIN, E.; MAROTE, P.; GAUVRIT, J. Y.; BRIAÇON, S.; LANTÉRI, P. Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 236 – 243, 2010.

BOURTOOM, T. Review Article Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v. 15(3), p. 237 – 248, 2008.

BYUN, Y.; HWANG, J.B.; SUNG HWAN BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARKA, H.J.; WHITESIDE, S. Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 24 – 28, 2011.

CADENAS E. & PACKER L. Handbook of Antioxidants, 2nd edition. **Marcel Dekker Inc.**, New York, 2002.

CANEVAROLO Jr, S.V. Técnicas de caracterização de polímeros. **Editores Artliber** - São Paulo, 2004.

CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **Int. J. Pharm.**, v. 250, p. 273 –281, 2003.

CHANDRA, R. & RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, p 1273 – 1335, 1998.

CORREA, C.A. Bionanocompósitos e Novas Tendências em Engenharia de Biomassa. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, nº1, 2008.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical ReviewsTM in Therapeutic Carrier Systems**, v. 19, p. 99 – 134, 2002.

DALENÇON, F.; AMJAUD, Y.; LAFFORGUE, C.; DEROUIN, F.; FESSI, H. Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation

studies. **Int. J. Pharm.**, v. 153, p. 127 – 130, 1997.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. Química de Alimentos de Fennema. 4ª edição, 900p. – Porto Alegre: **Artmed**, 2010.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D.R.; AÑÓN, M.C.; SOBRAL, P.J.A.; MAURI, A.N.; MENEGALLI, F.C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 341 – 349, 2009.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent 274961 A1**, 20 July 1988.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm.**, v. 55, R1–R4, 1989.

FURTADO, V.C.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967 – 2979, 2001a.

FURTADO, V.C.; LEGRAND, P.; MORGAT, J.L.; VERT, M.; MYSIKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J.P.; BARRATT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. **Pharm. Res.**, v. 18, p. 1411 – 1419, 2001b.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; HANDA, M.A.; & FRONING, G.W. Mechanical properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, v. 61(3), p. 585 – 589, 1996.

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

GONTARD, N. Active packaging. In: SOBRAL, P.J.A.; CHUZEL, G., eds. **Workshop sobre biopolímeros**. Pirassununga, FZEA, p. 23 – 27, 1997.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 1, p. 206 – 211, 1992.

GOUNGA, M.E.; XU, S.-Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p. 521 – 530, 2007.

GRACIANO-VERDUGO, A.Z.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; CRUZ-ZÁRATE, P.; ISLAS-RUBIO, A.R.; SÁNCHEZ-VALDES, S.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A.; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, N.; GONZÁLEZ-RÍOS, H. Migration of α -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. **Food Research International**, v. 43, p. 1073 – 1078, 2010.

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

HUBER, K.C. & EMBUSCADO, M.E. Edible films and coatings for food application. Springer Science, New York. LCC 2009.

HUNTERLAB. Disponível em:
http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf. Acesso: Outubro, 2012.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 449 – 458, 2008.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; HAMBLETON, A.; LENART, A.; VOILLEY, A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 503 – 510, 2010.

KROCHTA, J.M. & MULDER-JOHNSTON, C.D. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51(2), p. 61 – 74, 1997.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1 – 18, 2010.

LACROIX, M.; LE TIEN, C. **Innovations in Food Packaging**. Cap. 20 Edible films and coatings from non-starch polysaccharides. Elsevier 2005.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. *S.T.P. Pharma sciences*, v. 9, n.5, p. 411 – 418, 1999.

LEO, E.; BRINA, B.; FORNI, F.; & VANDELLI, M. In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 133 – 141, 2004.

LETCHFORD, K. & BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259 – 269, 2007.

LIMAYEM, I.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **Int. J. Pharm**, v. 325, p. 124 – 131, 2006.

LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J.M. Improved incorporation and stabilisation of β -carotene in hydrocolloids using glycerol. **Food Chemistry**, v. 125, p. 997 – 1004, 2011.

MACHADO, P.P.; HOTZA, D.; PETTER, C.; BERGMANN, C.P. Controle de qualidade para revestimentos cerâmicos através da análise colorimétrica de superfície vidrada monocromática. **Cerâmica Industrial**, v. 2(3/4), p. 51 – 55, 1997.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1 (4), p. 221 – 241, 1991.

MALHOTRA, A.; COUPLAND, J.N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 101 – 108, 2004.

MALVERN INSTRUMENTS. Disponível em: <http://www.malvern.co.uk>. Acesso: Abril 2012.

MARTINS, J.T.; CERQUEIRA, M.A.; VICENTE, A.A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 220 – 227, 2012.

MATTEA, F.; MARTÍN, Á.; MATÍAS-GAGO, A. & COCERO, M. J. Supercritical anti-solvent precipitation from an emulsion: beta-carotene nanoparticle formation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51(2), p. 238 – 247, 2009.

MCCARRON, P., DONNELLY, R., & MAROUF, W. Celecoxib-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared using a novel and controllable combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, p. 480 – 498, 2006.

MURILLO-MARTÍNEZ, M.M.; PEDROZA-ISLAS, R.; LOBATO-CALLEROS, C.; MARTÍNEZ-FEREZ, A.; VERNON-CARTER, E.J. Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 577 – 585, 2011.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762–798, 2007.

OWENS, D.K.; WENDT, R.C. Journal Applications Polymer Science, v. 13, p. 1741, 1979.

PEREIRA, MAIRA ALVES. **Dissertação De Mestrado**. Nanocápsulas: Preparação, Caracterização E Marcação Com 99mct-Hmpao Para

Estudos De Biodistribuição Em Modelo Experimental De Inflamação. Belo Horizonte Faculdade De Farmácia - UFMG 2006.

PEREIRA, M.A.; MOSQUEIRA, V.C.F.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; RAMALDES, G.A.; CARDOSO, V.N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Techneium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 42 – 51, 2008.

PERESSINI, D.; BRAVIN, B.; LAPASIN, R.; RIZZOTTI, C.; SENSIDONI, A. Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 25 – 32, 2003.

PINOTTI, A.; GARCÍA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 66 – 72, 2007.

POHLMANN, A.R., WEISS, V., MERTINS, O., PESCE DA SILVERIA, N., GUTERRES, S.S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305 – 312, 2002.

PSOMIADOU, E.; ARVANITOYANNIS, I.; YAMAMOTO, N. Edible films made from natural resources; microcrystalline cellulose (MCC), methylcellulose (MC) and corn starch and polyols - Part 2. **Carbohydrate Polymers**, v. 31, p. 193 – 204, 1996.

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

REDDY, N.; JIANG, Q.; YANG, Y. Preparation and properties of peanut protein films crosslinked with citric acid. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 26 – 30, 2012.

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

ROTTA, J. Propriedades Fisico-Químicas de Filmes de Quitosana e Hidroxipropilmetil- celulose Plastificados com Sorbitol. **Dissertação Mestrado**, 2008.

SALGADO, P.R.; ORTIZ, S.E.M.; PETRUCCELLI, S.; MAURI, A.N. Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 525 – 533, 2010.

SAHOO, SK; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discov Today**, v. 8; p.1112 – 1120; 2003.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; MORAES, B.B. Embalagens Ativas e Inteligentes para Frutas e Hortaliças. **ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1. Janeiro/Fevereiro/Março – 2009.

SCHAFFAZICK, S.R., POHLMANN, A.R., DALLA-COSTA, T., GUTERRES, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501 – 505, 2003.

SCHRAMM, L.L. Emulsions, Foams, and Suspensions Fundamentals and Applications. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2005.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of na active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 770 – 775, 2010.

SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 102 – 108, 2012.

SLAVIN, M.; CHENG, Z.; LUTHER,M.; KENWORTHY, W.; LIANGLI YU, L. Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Maryland-grown soybean

lines with altered fatty acid profiles. **Food Chemistry**, v. 114, p. 20 – 27, 2009.

SOCACIU, C. Food Colorants Chemical and Functional Properties. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL – EUA, 2008.

SONG, Y.; GAO, L.; LI, L.; ZHENG, Q. Influence of gliadins on rheology of methylcellulose in 70% (v/v) aqueous ethanol. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 98 – 104, 2010.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Structure and properties of methylcellulose microfiber reinforced wheat gluten based green composites. **Industrial crops and products**, v. 29, p. 446 – 454, 2009.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, **Journal Controlled Release**, v. 70, p. 1 – 20, 2001.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Nanotechnology and its applications in the food sector. Illinois Agricultural Experiment Station, 211B Mumford Hall, 1301 W Gregory Drive, Urbana, IL 61801, USA. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n.2, 2009.

STELLA, B., ARPICCO, S., ROCCO, F., MARSAUD, V., RENOIR, J.M., CATTEL, L., COUVREUR, P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **Int. J. Pharm.**, v. 334, p. 71 – 77, 2007.

TAN, C.P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 661 – 671, 2005.

TEXEIRA, M., ALONSO, M.J., PINTO, M.M.M., BARBOSA, C. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 491 – 500, 2005.

TOMŠIĆ, M.; PROSSNIGG, F.; GLATTER, O. A thermoreversible double gel: Characterization of a methylcellulose and κ -carrageenan

mixed system in water by SAXS, DSC and rheology. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, p. 41 – 50, 2008.

VIOTA, J.L.; LOPEZ-VIOTA, M.; SAAKE, B.; STANAKLEINSCHKEK, K.; DELGADO, A.V. Organoclay particles as reinforcing agents in polysaccharide films. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 347, p. 74 –78, 2010.

WHISTLER, R.L.; DANIEL, J.R. Carbohidratos. In: **FENNEMA, O.R. Química de los alimentos**. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, p. 81 – 156, 1997.

YIN, LI-JUN; CHU, B-S.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of β -carotene nanodispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1617 – 1622, 2009.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M.L.; MERCADO-SILVA, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, E.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1362 – 1368, 2011.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(E-CAPROLACTONA) CONTENDO B-CAROTENO

2 Desenvolvimento de Nanocápsulas de Poli(ϵ -caprolactona) contendo β -caroteno

Resumo

As nanopartículas apresentam um importante papel quando se deseja proteger compostos bioativos de fatores externos como, temperatura, oxigênio e luz. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação, utilizando como parede polimérica um polímero biodegradável, a poli- ϵ -caprolactona. O composto ativo utilizado foi o β -caroteno, um composto antioxidante, precursor de vitamina A, termolábil, que desempenha importante papel na área de alimentos. Utilizou-se Pluronic[®] F68 como agente estabilizador hidrofílico. Avaliou-se a influência de três tipos de surfactantes lipofílicos e três tipos de agentes carreadores do composto ativo, no desenvolvimento das formulações de nanocápsulas, sob as propriedades de tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta, durante um período de 90 dias, objetivando-se o desenvolvimento de nanocápsulas mais estáveis ao longo do tempo. As formulações contendo lecitina de soja, como surfactante lipofílico e, a mistura de ácidos cáprico e caprílico (MCT), como óleo, apresentaram melhor estabilidade quando comparados as outras combinações de formulações utilizando, Span[™] 80 e Tween[®] 20 como surfactante lipofílico e, óleo de girassol e glicerol, como carreadores do composto ativo. Após a escolha da formulação mais estável, procedeu-se os experimentos utilizando a metodologia de superfície de resposta para avaliar a influência da concentração de lecitina de soja, volume de triglicérides de ácidos cáprico e caprílico e concentração de β -caroteno, sob o tamanho das partículas, potencial zeta, índice de polidispersão, recuperação e eficiência de encapsulação, otimizando assim as formulações. As formulações de nanocápsulas otimizadas apresentaram tamanho de partícula abaixo de 200 nm, com índice de polidispersão menores que 0,1 potencial zeta na faixa de -39 mV, e eficiência de encapsulação acima de 95%. Através das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, pode-se constatar que todas as formulações desenvolvidas foram capazes de formar nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação.

Palavras-chave: nanopartículas, β -caroteno, nanoprecipitação, eficiência de encapsulação, antioxidante.

2.1 INTRODUÇÃO

O β -caroteno tem recebido considerável atenção por ser o carotenoide mais encontrado nos alimentos. Sua importância é atribuída a sua alta atividade pró-vitamina A, além de apresentar atividade antioxidante. A propriedade antioxidante dos carotenóides está relacionada a sua capacidade de desativar o oxigênio singlete e desativar os radicais livres, devido ao sistema de dupla-ligações conjugadas presentes na molécula (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; YUAN et al., 2008; LÓPEZ-RUBIO e LAGARON, 2011).

Os carotenoides altamente insaturados estão propensos à isomerização e oxidação. Calor, luz, e ácidos promovem isomerização dos *trans* carotenóides, a sua configuração habitual, para as formas *cis*. Isso resulta em pequenas perdas de cor e da atividade pró-vitamina A. Já, a degradação oxidativa, a principal causa de perdas extensas de carotenóides, depende da disponibilidade de oxigênio e é estimulada pela luz, enzimas e metais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Assim, a utilização industrial do β -caroteno torna-se difícil devido à sua sensibilidade ao calor, pH, oxigênio e luz, sendo sua degradação muito rápida em condições ambientes, apresentando assim baixa estabilidade quando comparado aos antioxidantes sintéticos. Além disso, o β -caroteno é insolúvel em água, e apenas marginalmente solúvel em óleo à temperatura ambiente. Estas características tornam difícil a incorporação do β -caroteno em formulações de alimentos (YUAN et al., 2008; MATTEA et al., 2009; HOU, et al., 2012; PAZ et al., 2012).

A fim de melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e solubilidade em água, os carotenóides podem ser dissolvidos na fase de oleosa de nanoemulsões óleo-em-água podendo ser facilmente incorporados nos produtos alimentares (TAN e NAKAJIMA, 2005; YUAN et al., 2008; MARTINI, et al., 2010; HOU et al., 2012).

Neste contexto, a nanotecnologia surge como ferramenta para melhorar a solubilidade de tais ingredientes ativos e para aumentar a sua biodisponibilidade. Dentre os métodos de formação de nanopartículas, o método de nanoprecipitação, desenvolvido por Fessi, Puisieux e Devissaguet (1988), tem sido amplamente utilizado por ser um método simples, rápido, reprodutível e capaz de formar tanto nanoesferas como nanocápsulas. Para desenvolvimento de nanopartículas através do método de nanoprecipitação, necessita-se de três componentes básicos: o polímero (sintético, semi sintético ou natural), o solvente do polímero e

o não-solvente do polímero (FESSI et al., 1989; RAO e GECKELER, 2011).

Os polímeros frequentemente usados, para desenvolvimento de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação, são os poliésteres biodegradáveis, dentre eles destaca-se especialmente poli- ϵ -caprolactona (PCL), por ser biocompatível, e ser capaz de controlar a liberação de compostos, devido a sua alta permeabilidade a muitas substâncias ativas (RAO e GECKELER, 2011).

As características das nanopartículas poliméricas (NP) são influenciadas pela natureza e concentração dos seus componentes. Este ponto é de particular interesse, uma vez que as alterações nas propriedades físico-químicas das nanodispersões de β -caroteno podem afetar a utilização deste ingrediente ativo em formulações de alimentos (TAN e NAKAJIMA, 2005).

O objetivo deste estudo foi aplicar o método de nanoprecipitação para desenvolver nanocápsulas de β -caroteno com tamanho pequeno, baixo índice de polidispersão, alto potencial zeta, alta eficiência de encapsulação e alta recuperação.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

O β -caroteno (trans- β -Caroteno - MM 536,87 g/mol), com pureza de 93%, e o polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL - MM 70.000-90.000) foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO. USA). O surfactante aquoso Pluronic[®] F68 Pastille, copolímero condensado de óxido de etileno e óxido de propileno, da marca BASF Corporation, foi gentilmente doado pela empresa Foscher Solutions Provider (São Paulo, BR). Os compostos utilizados como agentes carreadores do composto ativo foram: óleo de girassol (BUNGE Alimentos S.A. Santa Catarina - Brasil), mistura de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (Palm Óleo - Malásia) e glicerol (CRQ - Cromato Produtos Químicos Ltda. São Paulo - Brasil). Lecitina de soja livre de gordura, com 70% de fosfatidilcolina, grau alimentício (LIPOID S75 – marca Lipoid GmbH - Ludwigshafen, Germany), foi obtida da empresa Lipid Ingredients & Technologies (São Paulo, Brasil). O surfactante polietileno glicolmonolaurato de sorbitano, Tween[®] 20, (Lafan). O tensoativo lipofílico, monooleato de sorbitano-Span[™] 80, assim como os reagentes, grau HPLC, acetato de etila, acetonitrila, e metanol, foram obtidos da Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO. USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico (VETEC).

2.2.2 Desenvolvimento das nanocápsulas de β -caroteno

Nanocápsulas de β -caroteno foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, seguindo procedimento desenvolvido por Fessi e colaboradores (1988) e usando concentrações sugeridas por Mora-Huertas, Fessi e Elaissari (2010). O polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) e o composto ativo, β -caroteno, foram dissolvidos em acetona, usando banho ultrassônico (Maxi Clean 1650 A- UNIQUE).

Após solubilização, todos os componentes da fase orgânica foram misturados lentamente, utilizando um agitador magnético. A solução orgânica resultante foi então adicionada gota a gota, usando uma pipeta de Pasteur, à fase aquosa contendo água Milli-Q[®] e o surfactante hidrofílico, Pluronic[®] F68, sob moderada agitação magnética, a 25 °C.

Com a adição da fase orgânica, a fase aquosa tornou-se imediatamente leitosa com opalescência alaranjada indicando a formação das nanocápsulas, onde a parede é constituída,

principalmente, pelo polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) e, o núcleo oleoso, formado pela solução de β -caroteno em óleo. A acetona, que rapidamente é difundida para a fase aquosa, é então removida por agitação sob ausência de luz, à temperatura ambiente (25 °C), “overnight” para total evaporação do solvente orgânico. Após total evaporação do solvente e concentração até volume final desejado, as soluções foram filtradas, utilizando filtro qualitativo o (Whatman N°1), para eliminar partículas maiores, como aglomerados e precipitados, que podem ser formados. Após a filtração, as formulações foram armazenadas em frasco âmbar e acondicionadas sob refrigeração (T = 5 °C) para utilização e análises posteriores.

2.2.2.1 Efeito do tipo de agente carreador do composto ativo e surfactante lipofílico sobre as propriedades das nanocápsulas

Três tipos de compostos foram utilizados como carreadores do β -caroteno: óleo de girassol, mistura de triglicérides de ácido cáprico/caprílico (MCT) e glicerol. Os surfactantes utilizados foram: SpanTM 80, Tween[®] 20 e lecitina de soja LIPOID S75. O tipo de carreador do composto ativo e surfactante lipofílico utilizado deve ser escolhido de acordo com o tipo de substância que se deseja encapsular. Os óleos agem como carreadores do composto ativo (β -caroteno), e quanto mais solúvel for o composto ativo no óleo, assegura-se a formação de nanocápsulas e não nanoesferas (MORA-HUERTAS et al., 2010). Soluções de nanopartículas foram preparadas com cada tipo de carreador, utilizando-se o mesmo volume para cada formulação. Cada formulação contendo os diferentes carreadores foram combinadas com cada tipo de surfactante lipofílico.

Formulações utilizando os surfactantes, SpanTM 80 e Tween[®] 20, não necessitam solubilização prévia, porém necessitou-se adição de acetona nestas formulações para manter constante o volume da fase orgânica, que neste trabalho foi mantido 50% do volume da fase aquosa. No entanto, para as formulações utilizando lecitina de soja LIPOID S75 (2,5 mg/ml), necessitou-se solubilização prévia, em uma mistura de acetona:etanol (60:40), utilizando banho ultrassônico, para então adiciona-lá aos outros componentes da fase orgânica. Todos os outros componentes foram mantidos constantes: 60 mg PCL, 500 μ g de β -caroteno, 25 mg Lecitina ou 30 mg de SpanTM 80 ou Tween[®] 20,

250 µL de agente carreador do composto ativo, 14,5 mL de acetona, 29 mL de água Milli-Q® e 290 mg de Pluronic®F68.

A otimização das formulações foi determinada pela medida do tamanho médio, índice de polidispersão, distribuição de tamanho, potencial zeta, observando-se visualmente a presença de agregados e separação de fases, durante o período analisado de 90 dias.

2.2.2.2 Otimização das formulações de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona/β-caroteno utilizando a metodologia de superfície de resposta

Após escolher o melhor surfactante e o melhor agente carreador, procedeu-se variando a concentração do composto ativo, surfactante lipofílico e volume de óleo para otimizar as formulações das nanocápsulas. Para isso, a metodologia de superfície de resposta foi utilizada. Avaliou-se a influência das variáveis independentes concentração de β-caroteno (X_{BC}), volume de triglicerídeos de ác. cáprico/caprílico (X_{MCT}) e concentração de lecitina de soja (X_{LS}) sobre as propriedades das nanocápsulas como tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão, rendimento e eficiência de encapsulação do β-caroteno. O planejamento Box-Behnken com três variáveis independentes, foi utilizado conforme planejamento exposto na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis independentes codificadas e não-codificadas usadas no planejamento MSR*.

Variável Independente	Código	Nível de Variação		
		-1	0	+1
β-caroteno (mg/ml)	X_1	0,1	0,2	0,3
MCT** (µl)	X_2	150	250	350
Lecitina de soja S75 (mg/ml)	X_3	2,0	2,5	3,0

*MSR = Metodologia Superfície de Resposta

**MCT = Triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico

Os dados foram ajustados a uma equação de segunda ordem (Eq. (1)), como uma função das variáveis independentes.

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (1)$$

onde b_n são os coeficientes de regressão constantes, Y_i variáveis dependentes (tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencia zeta, recuperação e eficiência de encapsulação) e X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas independentes, concentração de β -caroteno, volume de MCT e concentração de lecitina de soja, respectivamente.

Todas as análises estatísticas, incluindo a análise de variância (ANOVA) e os testes de comparação múltipla, foram realizadas utilizando o software *STATISTICA 7.0* (StatSoft, Inc., EUA).

Soluções de poli- ϵ -caprolactona 30 mg/mL, e soluções de β -caroteno 0,1, 0,2 e 0,3 mg/mL, foram solubilizadas utilizando-se acetona como solvente. As soluções de lecitina de soja 2,0, 2,5 e 3,0 mg/mL, foram dissolvidas em uma mistura de acetona:etanol (60:40), com auxílio de ultra-som. Os experimentos foram executados aleatoriamente.

A otimização das formulações foi determinada pela medida do tamanho médio, índice de polidispersão, distribuição de tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulação e recuperação.

2.2.5 Determinação do diâmetro médio, distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta por espectroscopia de correlação de fótons

O tamanho médio das partículas e a distribuição de tamanho das suspensões de nanocápsulas contendo β -caroteno foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons usando Nano-Zetasizer (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas a um ângulo fixo de 173° e temperatura 25°C . As amostras foram diluídas (1:100) em água MilliQ[®] e, filtradas através de um filtro de $0,8\ \mu\text{m}$ (Millex AA, Millipore, France). O tamanho de partícula das emulsões foi descrito pelo diâmetro médio e a distribuição de tamanho foi descrita pelo gráfico de distribuição de tamanho e pelo índice de polidispersão (PdI). O potencial zeta foi medido através da equação de Smoluchowski para mobilidade eletroforética das nanocápsulas. Cada medida foi realizada em triplicata, e os resultados foram processados com o software DTS versão 6.3.

2.2.6 Determinação da eficiência de encapsulação e recuperação de β -caroteno nas suspensões de nanocápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A eficiência de encapsulação foi determinada seguindo método utilizado por Khayata e colaboradores (2012), com pequenas modificações.

A concentração total de β -caroteno na suspensão de nanocápsulas (Ct) foi determinada após preparo das nanocápsulas e completa dissolução de 1,0 mL da solução de nanocápsulas, em acetona até volume de 10,0 mL. E, no sobrenadante obtido após separação das nanopartículas por ultrafiltração/centrifugação, empregando-se unidades de ultrafiltração de celulose regenerada (Amicon Ultra 0,5/30 kDa. Millipore, Irlanda), a 4500 rpm por 30 minutos (concentração do sobrenadante - Cs), obteve-se a concentração de β -caroteno que não foi encapsulado.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência constituído por um módulo de separação, equipado com uma bomba quaternária e um degaseificador (LC-20AT), um injetor automático (SIL-10A), um forno de coluna (CTO-20A) e um detector UV-visível a 450nm (SPD-M20A), controlados por uma estação de trabalho (CBM-20A), todos fabricados pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão). Utilizou-se coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 μ m x 4,6 mm x 150 mm) com fase estacionária octadecil e uma coluna de guarda CLC-GODS com fase estacionária de superfície octadecil, ambas acondicionadas em forno a 25°C (Waters Spherisorb®, Wilmington, EUA). A quantificação foi efetuada, conforme método descrito por Rodriguez-Amaya (2001), modificado por Zambiasi (1997) e Tiecher (2010), utilizando um sistema de eluição por gradiente de metanol, acetonitrila e acetato de etila, a uma taxa de vazão de 1,0 mL/min, conforme descrito na Tabela 2. Utilizou-se temperatura da coluna: mínima 25°C e máxima 35°C; volume de injeção: 25 μ L e, tempo de corrida 40 minutos.

Tabela 2 - Condições cromatográficas para análise de β -caroteno.

Tempo	Fase Móvel*	%
0	B	30
0	C	70
0	D	0
10	B	10
10	C	80
10	D	10
35	B	5
35	C	80
35	D	15
40	B	30
40	C	70
40	D	0

*B:Metanol; C:Acetonitrila; D:Acetato de Etila. Fonte: Tiecher, 2010.

O pico foi identificado por comparação com o tempo de retenção do padrão e quantificado por comparação com a curva de calibração externa para o padrão β -caroteno, Equação (2):

$$y = 4,4075e^{-0,08x} + 2,8316e^{-0,16x^2} \quad (R^2 = 0,9983) \quad (2)$$

A eficiência de encapsulação (%) foi estimada como sendo a diferença percentual entre a quantidade de substância ativa presente na suspensão após dissolução das partículas (C_t) e aquela encontrada no sobrenadante (C_s). A recuperação (%) de β -caroteno foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade inicialmente adicionada e aquela encontrada nas suspensões, conforme Equações 3 e 4.

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_i - C_t}{C_i} \times 100 \quad (4)$$

onde,

C_t é a concentração total de β -caroteno nas suspensões de nanocápsulas;

Cs é a concentração do sobrenadante;

Ci é a concentração inicial de β -caroteno adicionado as formulações de nanocápsulas.

2.2.7 Avaliação morfológica das nanopartículas

As suspensões de nanopartículas foram caracterizadas quanto à forma das partículas e homogeneidade da suspensão, através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). O microscópio utilizado foi o modelo JEOL JEM-1011 TEM, operando a voltagem de 80 kV e ampliação de 20.000 vezes. Uma gota da suspensão de nanopartículas (10 μ l) foi aplicada em um grid de carbono 200-mesh e secas à temperatura ambiente, para então serem analisadas no MET.

2.2.8 Análises estatísticas

Análises de variância (ANOVA) foram realizadas para avaliar diferenças significativas entre variáveis independentes. Para visualizar as relações entre as variáveis resposta e as variáveis independentes, o planejamento experimental superfície de resposta e os gráficos de contorno das equações de regressão polinomial ajustados foram gerados usando *STATISTICA 7.0*.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Determinação do tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta para escolha do melhor agente carreador do β -caroteno e melhor surfactante lipofílico

As análises de tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, foram executadas em cinco tempos diferentes, 1, 7, 14, 28 e 90 dias, sendo possível assim avaliar a estabilidade das suspensões de nanocápsulas ao longo do tempo.

Os resultados da análise de tamanho de partícula por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), apresentados na Tabela 3, indicam que o tamanho médio de partícula obtido para todos os sistemas desenvolvidos encontra-se entre 177,0 e 358,0 nm.

Os dados da análise ANOVA indicaram que nanopartículas formuladas com lecitina de soja apresentaram tamanhos de partículas significativamente ($P < 0,05$) menores, quando comparado às partículas formuladas com Tween 20 e Span 80, independente do tipo de carreador utilizado. Corroborando com os resultados encontrados por Tan e Nakajima (2005) e Yuan et al. (2008), que atribuíram a variação de tamanho das partículas formuladas com diferentes surfactantes à diferença de hidrofiliicidade dos surfactantes utilizados, sendo que, quanto maior a hidrofiliicidade do emulsificante maior a área superficial estabilizada pelo mesmo, devido a sua capacidade de envolver e estabilizar as partículas em emulsões do tipo óleo em água (O/A), resultando assim em partículas menores.

Tabela 3 - Efeito do tipo de surfactante e tipo de agente carreador do composto ativo sobre o tamanho de partícula (D), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta, avaliados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS).

Agentes Carreadores	Propriedades analisadas	Surfactantes		
		Lecitina de Soja	Span 80	Tween 20
MCT	D (nm)	214,06±	290,92±	332,14±
		2,16 ^{a, B*}	19,90 ^{b, A}	13,65 ^{c, B}
	PDI	0,141±	0,293±	0,298±
		0,010 ^{a, A}	0,063 ^{b, A}	0,072 ^{b, A}
ζ-Potencial (mV)	-26,40±	-29,02±	-25,06±	
	1,73 ^{ab, A}	2,48 ^{a, A}	2,97 ^{b, A}	
Óleo Girassol	D (nm)	233,72±	357,3±	329,52±
		4,41 ^{a, C}	21,27 ^{b, B}	21,33 ^{b, B}
	PDI	0,166±	0,281±	0,320±
		0,024 ^{a, A}	0,092 ^{ab, A}	0,091 ^{b, A}
ζ-Potencial (mV)	-33,42±	-30,82±	-26,66±	
	2,82 ^{b, B}	2,48 ^{ab, A}	2,35 ^{a, A}	
Glicerol	D (nm)	177,58±	302,2±	200,88±
		4,94 ^{a, A}	31,69 ^{c, A}	7,74 ^{b, A}
	PDI	0,165±	0,282±	0,205±
		0,033 ^{a, A}	0,072 ^{b, A}	0,042 ^{ab, A}
ζ-Potencial (mV)	-29,24±	-29,26±	-25,10±	
	2,55 ^{a, A}	2,83 ^{a, A}	1,85 ^{a, A}	

* Letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Letras sobrescritas maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas dos valores. n=5; SD: desvio padrão entre as cinco análises. Fonte: Autor, 2012.

Comparando as diferentes formulações, pode-se afirmar que o tipo de agente carreador do composto ativo, possui influência significativa ($P < 0,05$) sob o tamanho das partículas. Esta influencia sob o tamanho é atribuída às diferenças de hidrofobicidade, viscosidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas

(SCHAFFAZICK et al., 2003). Partículas utilizando glicerol apresentaram menores tamanhos quando comparadas com as partículas formuladas com MCT e óleo de girassol como agentes carreadores da molécula bioativa. Porém, as suspensões formuladas com glicerol, não foram estáveis ao longo dos 90 dias, além de apresentar separação de fases, observado visualmente.

Os valores do índice de polidispersão (PDI) encontrados indicam uma distribuição de tamanho de partícula estreita e unimodal ($PDI < 0,320$) para todas as nanopartículas formuladas. O índice de polidispersão, que varia de 0 a 1, indica a homogeneidade de tamanho das nanopartículas nas suspensões de nanocápsulas, quanto mais próximos a 0, mais homogênea é a distribuição de tamanho das nanocápsulas nas suspensões de nanopartículas (KHAYATA et al., 2012). Segundo Byun e colaboradores (2011), valores de PDI abaixo de 0,5 são considerados como uma boa distribuição de tamanho. Os valores de PDI encontrados para as formulações utilizando Tween 20 e Span 80 foram maiores do que os valores para as formulações contendo lecitina de soja. As formulações contendo lecitina de soja como tensoativo, apresentaram valores de PDI muito próximos a zero, menores que 0,166 e, significativamente ($P < 0,05$) diferentes dos valores encontrados para as outras formulações desenvolvidas.

Já a influência da natureza do agente carreador sobre o índice de polidispersão não foi significativo ($P < 0,05$), independente do tipo de surfactante utilizado. Assim como o potencial zeta, que também não apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) com a mudança do tipo de carreador na formulação. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Mosqueira e colaboradores (2000), que estudaram o efeito da natureza do óleo sobre os nanocápsulas de poli(d,l-láctido), e não encontraram diferenças significativas nos valores de potencial zeta, e atribuíram este comportamento a total encapsulação do óleo pelo polímero, não estando localizado na extremidade das nanocápsulas formuladas, em consequência não modificando o potencial zeta.

Os resultados do potencial zeta (Tabela 3) mostraram que todas as formulações de nanocápsulas exibiram potencial zeta negativo com valores que variaram entre $-25,06$ e $-33,42$ mV. Os valores de potencial zeta negativos obtidos são atribuídos principalmente à composição das formulações de nanocápsulas. Formulações utilizando lecitina de soja apresentaram os maiores valores absolutos de potencial zeta, devido a presença de fosfolípídeos negativamente carregados na molécula, que

contribuem com uma forte carga negativa na interface. Cargas negativas também são atribuídas à natureza hidrofóbica da PCL, pois podem ocorrer ionizações dos grupos carboxílicos na superfície deste poliéster, conferindo um potencial negativo à interface, corroborando para o potencial zeta negativo determinado para todas as nanocápsulas preparadas, independente do tipo de surfactante utilizado. Estes resultados estão de acordo com trabalhos descritos na literatura que afirmam que potencial zeta negativos são tipicamente observados nesses tipos de sistemas compostos por poliésteres (MOSQUEIRA et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003). De acordo com Schaffazick e colaboradores (2003), valores absolutos altos de potencial zeta são importantes para obter suspensões coloidais estáveis, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das partículas em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

As partículas formuladas utilizando a combinação lecitina de soja e mistura de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico, apresentaram tamanhos médio na faixa de 214,01 nm e distribuição de tamanho unimodal, com os menores valores de PDI (0,141), diferindo significativamente ($P < 0,05$) dos valores de PDI encontrado para os outros sistemas de nanopartículas testados. Além disso, durante todo o período analisado, estas formulações apresentaram menor variação nos valores de tamanho de partícula, potencial zeta e PDI. O que conferiu a estas partículas, ao final dos 90 dias de análise, maior estabilidade, que também pode ser conferida visualmente, pois estas suspensões de nanopartículas mantiveram a mesma aparência apresentada no dia 1, sem separação de fases ou presença de precipitados. Assim, a partir de dados de tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, a formulação contendo lecitina de soja e triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) foi selecionada para estudos posteriores.

2.3.2 Planejamento experimental superfície de resposta para otimização das formulações de nanocápsulas

Após a escolha do melhor surfactante e do agente carreador do composto, a metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para determinar as formulações ótimas para desenvolvimento de nanopartículas de PCL/ β -caroteno. O planejamento Box-Behnken com três variáveis independentes foi empregado. As variáveis independentes

analisadas foram: concentração de β -caroteno, volume de triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico (MCT) e concentração de lecitina de soja. Os valores das variáveis resposta potencial zeta, tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulação e recuperação obtidos para todos os experimentos são dados nas Tabelas 4 e 5. Os dados experimentais foram usados para calcular os coeficientes da equação polinomial quadrática, que foram utilizados para prever os valores de tamanho de partícula, potencial zeta, PDI, eficiência de encapsulação e recuperação (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Valores experimentais e preditos para as variáveis dependentes tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas de β -caroteno obtidos por MSR*.

Ensaio	Valores Decodificados**			Tamanho de partícula (nm)		Potencial Zeta (mV)		PDI	
	X_{BC}	X_{MCT}	X_{LS}	E***	P	E	P	E	P
1	0,1	150	2,5	195,3	192,8	-38,9	-39,6	0,099	0,094
2	0,3	150	2,5	177,7	178,7	-38,7	-39,8	0,121	0,116
3	0,1	350	2,5	211,2	210,2	-41,9	-40,8	0,080	0,086
4	0,3	350	2,5	211,0	213,4	-39,1	-38,4	0,099	0,104
5	0,1	250	2	194,8	195,9	-39,2	-38,7	0,046	0,052
6	0,3	250	2	194,7	192,4	-39,1	-38,2	0,094	0,101
7	0,1	250	3	193,2	195,5	-41,1	-42,0	0,097	0,090
8	0,3	250	3	189,2	188,0	-40,0	-40,5	0,087	0,081
9	0,2	150	2	185,9	187,2	-39,3	-39,1	0,118	0,116
10	0,2	350	2	213,8	213,7	-33,6	-35,2	0,099	0,087
11	0,2	150	3	185,1	185,2	-39,7	-38,1	0,094	0,106
12	0,2	350	3	212,0	210,7	-41,5	-41,7	0,113	0,115
13	0,2	250	2,5	186,9	192,2	-38,0	-39,1	0,082	0,087
14	0,2	250	2,5	194,5	192,2	-39,7	-39,1	0,082	0,087
15	0,2	250	2,5	195,0	192,2	-39,7	-39,1	0,096	0,087

*MSR = Metodologia Superfície de Resposta. ** X_{BC} = concentração da solução de β -caroteno (mg/mL); X_{MCT} = volume de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (μ L); X_{LS} = concentração da solução de lecitina de soja (mg/mL). *** E = dados experimentais; P = dados preditos. Fonte: Autor, 2012.

Os valores preditos estão em concordância com os valores experimentais obtidos a partir do planejamento superfície de resposta (RSM). Análises de variância (ANOVA) mostraram que o modelo polinomial quadrático representou adequadamente os dados experimentais com valores de R^2 para as respostas tamanho de partícula, potencial zeta, PDI, eficiência de encapsulação e recuperação de 0,959, 0,747, 0,846, 0,868 e 0,802, respectivamente.

2.3.2.1 Tamanho médio de partícula

O tamanho médio das nanocápsulas desenvolvidas variou entre 177,7 e 213,8 nm. A análise de variância ANOVA, foi utilizada para avaliar a significância dos coeficientes do modelo polinomial quadrático. A análise indicou que o tamanho das partículas foi afetado significativamente ($P < 0,05$) apenas pelo volume de óleo, efeito linear e quadrático.

Para gerar os gráficos de superfície de resposta, os efeitos não-significativos foram retirados do modelo, assim a equação que descreve o comportamento do tamanho de partícula em função das variáveis independentes ficou:

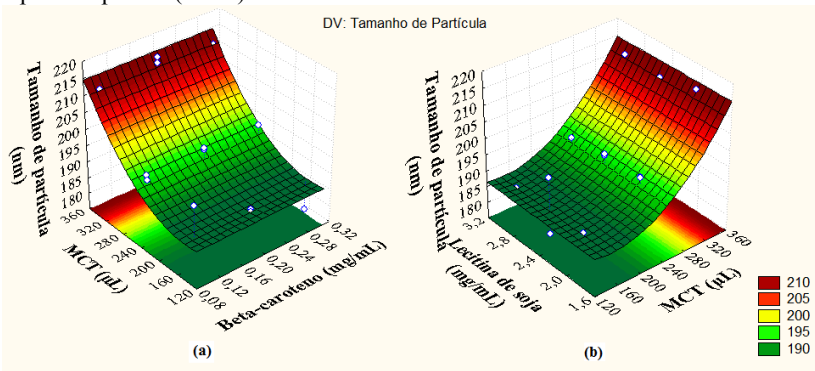
$$TP = 199,95 - 0,188X_{MCT} + 0,00064X_{MCT}^2 \quad (5)$$

A Figura 1(a) foi gerada variando a concentração de β -caroteno e o volume de óleo, mantendo a concentração de lecitina de soja constante a 2,5 mg/mL. Já, a Figura 1(b) variando a concentração de lecitina de soja e o volume de óleo. Como pode ser visualizado no gráfico de superfície de resposta, o tamanho de partícula aumenta com o aumento do volume de óleo. Dados concordantes com os encontrados por Yuan et al. (2008), onde utilizaram β -caroteno já na forma oleosa, para formar nanoemulsões, e o aumento da concentração de β -caroteno resultou em aumento no tamanho das nanopartículas formuladas, neste caso aumentava-se também o volume de óleo. Os outros fatores, lecitina de soja e β -caroteno, linear e quadrático, assim como as interações entre os fatores não apresentaram efeito significativo sobre o tamanho de partícula, neste sistema e nos níveis avaliados. Em contraste com os dados obtidos por Yuan e colaboradores (2008), quando estudaram nanoemulsões óleo-em-água de β -caroteno (30% em óleo de girassol) utilizando diferentes tipos de

Tween como surfactantes, e encontraram que a concentração de surfactantes possui efeito significativo sob o tamanho de partícula e, o aumento da concentração de surfactante geralmente resulta na diminuição do tamanho de partícula. Isso ocorre porque menores partículas possuem maiores áreas superficiais, o que exige mais emulsificantes para cobri-las.

Em outro estudo, Hentschel et al. (2008) encontraram, para nanocápsulas de β -caroteno, que o tamanho de partícula é fortemente afetado pela concentração de surfactante, neste caso o comportamento de distribuição de tamanho não foi unimodal, e o método de determinação do tamanho foi por difração a laser (LD).

Figura 1 Gráficos de superfície de resposta para variável dependente tamanho de partícula, em função das variáveis independentes: concentração de lecitina de soja, concentração de β -caroteno e volume de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT).



Fonte: Autor, 2012.

2.3.2.2 Potencial zeta

Para o potencial zeta, a análise de variância revelou que a variável lecitina de soja apresentou-se marginalmente significativa ($P = 0,0572$) sob esta resposta, assim como a interação linear da concentração de lecitina de soja e o volume de óleo ($P = 0,065$).

Utilizando os efeitos marginalmente significativos e ignorando os demais efeitos, a equação do modelo que descreve o potencial zeta, fica:

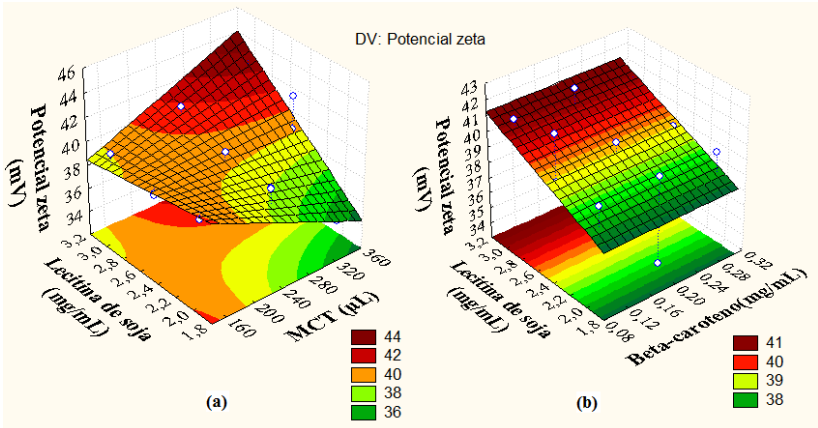
$$PZ = 55,96 - 0,944X_{MCT} - 6,60X_{LS} + 0,0375X_{MCT}X_{LS} \quad (6)$$

Pode-se visualizar a partir da Figura 2(a) que tanto para a combinação de níveis altos de Lecitina de soja e MCT, assim como para níveis baixos, maiores valores de potencial zeta são obtidos. Este comportamento pode estar relacionado com o aumento da área superficial, quando aumenta-se o conteúdo de óleo, devido ao aumento no tamanho da partícula, requerendo assim maior quantidade de surfactante para exercer a mesma força repulsiva, quando comparado a partículas menores.

O aumento da concentração de lecitina de soja resultou em maiores valores de potencial zeta, região vermelha como pode ser observado na Figura 2(b). Este comportamento pode ser atribuído a localização do surfactante na interface, e quando aumentamos a quantidade de lecitina de soja no sistema, estamos aumentando a quantidade de fosfolípidos negativamente carregados em solução, assim a intensidade das forças repulsivas aumenta, refletindo o aumento no potencial zeta.

Já a concentração de β -C não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) sob o potencial zeta, podendo-se atribuir este comportamento a total encapsulação do β -C pelo polímero, concordando com os dados encontrado por Mosqueira e colaboradores (2000).

Figura 2 Gráficos de superfície de resposta apresentando o comportamento do potencial zeta das nanocápsulas de β -caroteno quando submetidas a diferentes: (a) concentrações de lecitina de soja e volume de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) e (b) concentrações de lecitina de soja e β -caroteno.



Fonte: Autor, 2012.

2.3.2.3 Índice de Polidispersão

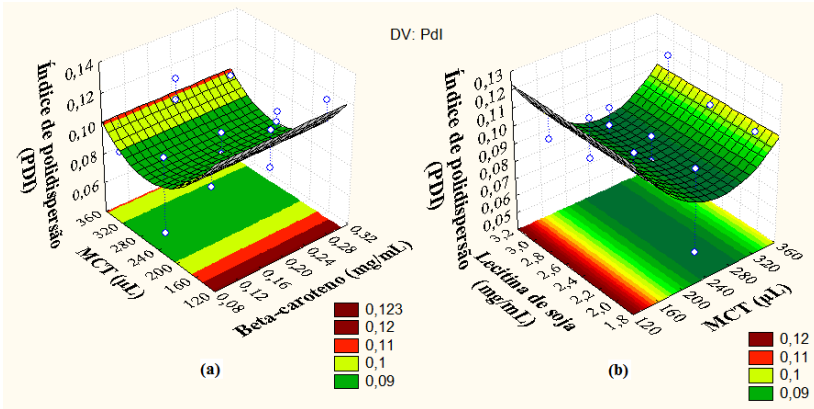
O índice de polidispersão das suspensões foi influenciado significativamente pelo termo quadrático do óleo ($P < 0,05$), enquanto os outros termos foram não-significativos ($P > 0,05$) sob o PDI.

Este comportamento pode ser explicado, fazendo-se uma analogia aos dados de tamanho de partícula, que também são influenciados pelo tipo de óleo, e quando altera-se o tamanho das partículas nas suspensões de nanocápsulas, a distribuição de tamanho também é alterada. Observa-se através dos gráficos de contorno e de superfície de resposta, Figura 3, que menores valores de PDI foram encontrados quando utilizou-se volume de óleo entre 230 e 290 μL , região verde escuro. Nesta faixa de volume de óleo, onde encontram-se os menores valores de PDI, também obtém-se menores tamanhos de partículas nas suspensões.

A equação de segunda ordem, ignorando os efeitos não significativos, para a variável dependente PDI é a seguinte:

$$PDI = 0,218 - 0,010X_{MCT} + 0,0000019X_{MCT}^2 \quad (7)$$

Figura 3 Gráficos de superfície de resposta para a variável dependente Índice de polidispersão (PDI) para nanocápsulas formuladas com (a) diferentes volumes de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) e diferentes concentrações de β -caroteno, (b) diferentes concentrações de lecitina de soja e diferentes volumes de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT).

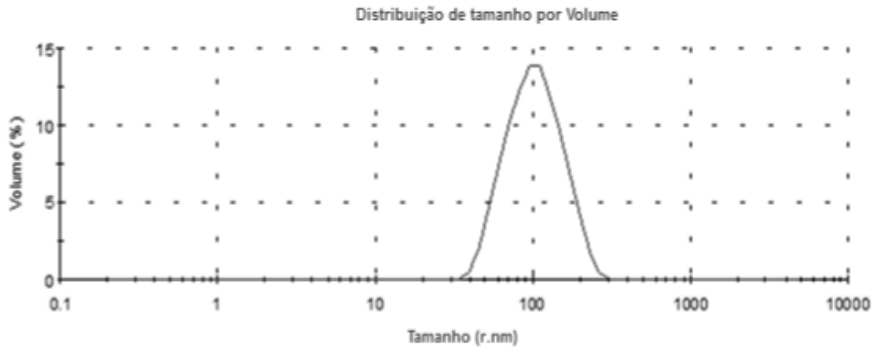


Fonte: Autor, 2012.

O diâmetro médio das partículas nas nanoemulsões variou entre 177,68 e 213,8 nm, com os índices de polidispersão (PDI) variando no intervalo de 0,046 - 0,121. Dados similares foram encontrados por Yuan e colaboradores (2008), para nanoemulsões de β -caroteno utilizando óleo de girassol e Tween 20, onde o tamanho médio de partícula variou entre 132 e 184 nm, com PDI aproximadamente no intervalo de 0,181 – 0,360.

Todas as formulações desenvolvidas apresentaram distribuição de tamanho das partículas unimodal e tipicamente estendido entre 30 e 300 (r.nm), como pode ser visualizado na Figura 4, perfil típico de distribuição de tamanho encontrado para as nanopartículas de β -caroteno.

Figura 4 Perfil unimodal típico de distribuição de tamanho das nanopartículas de β -caroteno formuladas com 2,5 mg/mL de lecitina de soja, 250 μ L de triglicerídeos de ac. cáprico e caprílico e 0,2 mg/mL de β -caroteno.



Fonte: Autor, 2012.

2.3.2.4 Eficiência de encapsulação

Todas as formulações testadas apresentaram alta eficiência de encapsulação, acima de 95%, como pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores experimentais e preditos para as variáveis dependentes eficiência de encapsulação e recuperação de β -caroteno nas suspensões de nanocápsulas.

Ensaio	Valores Decodificados*			Eficiência de encapsulação (%)		Recuperação (%)	
	X_{BC}	X_{MCT}	X_{LS}	E^{**}	P	E	P
1	0,1	150	2,5	99,03	98,8	45,00	41,53
2	0,3	150	2,5	100	100,06	32,00	32,00
3	0,1	350	2,5	100	99,94	41,36	41,37
4	0,3	350	2,5	100	100,04	26,88	30,36
5	0,1	250	2	95,71	96,32	28,00	32,27
6	0,3	250	2	98,89	99,4	23,04	23,84
7	0,1	250	3	100	99,49	36,80	36,00
8	0,3	250	3	98,18	97,57	28,16	23,89
9	0,2	150	2	100	99,43	28,80	28,01
10	0,2	350	2	100	99,45	26,88	22,61
11	0,2	150	3	99,09	99,64	21,12	25,39
12	0,2	350	3	100	100,57	28,20	29,00
13	0,2	250	2,5	100	100	23,04	25,89
14	0,2	250	2,5	100	100	30,00	25,89
15	0,2	250	2,5	100	100	24,64	25,89

* X_{BC} = concentração da solução de β -caroteno (mg/mL); X_{MCT} = volume de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (μ L); X_{LS} = concentração da solução de lecitina de soja (mg/mL). ** E = dados experimentais; P = dados preditos. Fonte: Autor, 2012.

Os valores obtidos neste trabalho concordam com a literatura, onde eficiências de encapsulação acima de 80% são esperados para nanopartículas desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação (Mora-Huertas, et al., 2010).

O efeito da interação lecitina de soja e β -caroteno foi significativo ($P = 0,017$) sob a variável dependente eficiência de encapsulação.

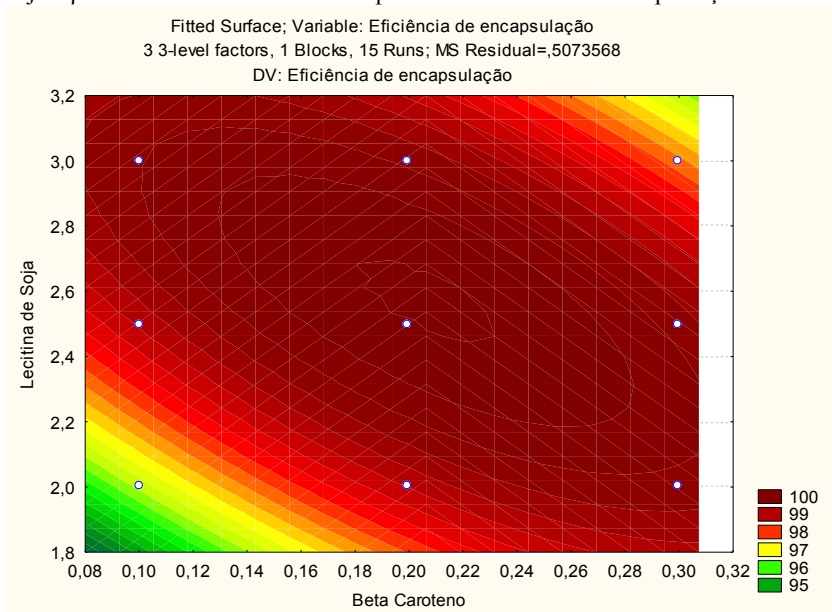
Quanto mais próximos aos pontos centrais de lecitina de soja (2,5 mg/ml) e β -caroteno (0,2 mg/ml), maiores valores de eficiência de encapsulação foram obtidas, como pode ser visualizado nos gráficos de contorno e de superfície de resposta, Figuras 5 e 6.

Paz e colaboradores (2012) também encontraram, para formulações de β -caroteno utilizando amido modificado como surfactante, que maiores concentrações de surfactante (100 g/L) foram requeridas para obter alta porcentagem de β -caroteno encapsulado.

No entanto, a concentração de óleo não apresentou efeito significativo sob a eficiência de encapsulação. Assim, a equação do modelo para %EE ignorando os efeitos não-significativos ($P > 0,05$), fica:

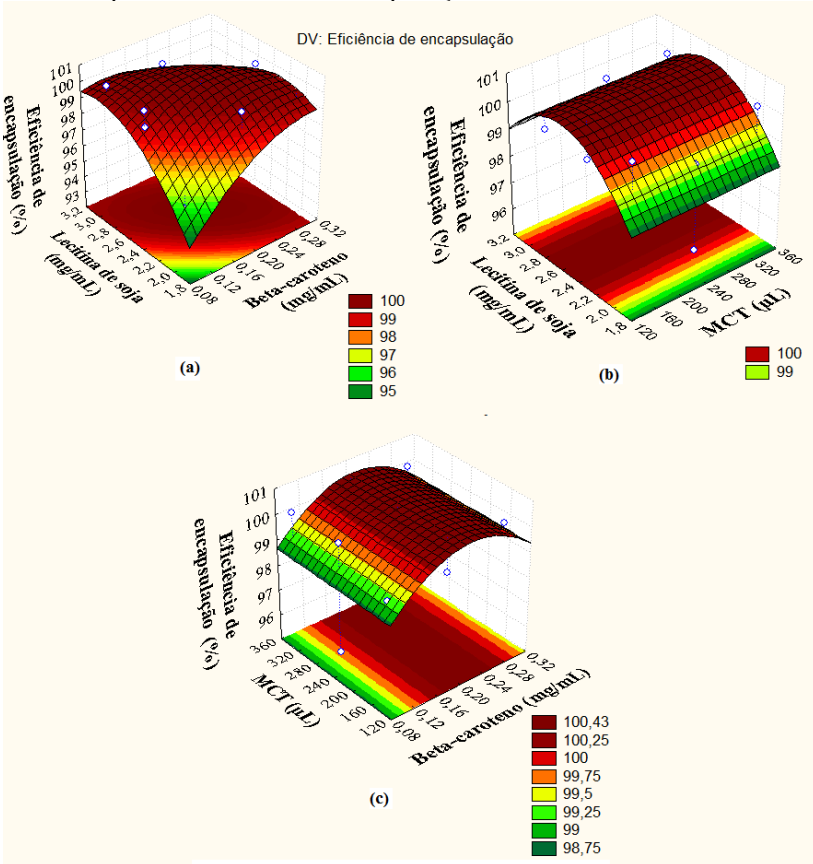
$$\%EE = 58,19 + 103,74X_{BC} - 96,05X_{BC}^2 + 24,58X_{LS} - 3,78X_{LS}^2 - 24,96X_{BC}X_{LS} \quad (8)$$

Figura 5 Gráfico de contorno apresentando o efeito das interações lecitina de soja e β -caroteno sobre a variável dependente eficiência de encapsulação.



Fonte: Autor, 2012.

Figura 6 Gráficos de superfície de resposta para as variáveis (a) lecitina de soja e β -caroteno, (b) triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) e lecitina de soja e (c) triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT) e β -caroteno sob a variável dependente eficiência de encapsulação.



Fonte: Autor, 2012.

2.3.2.5 Recuperação

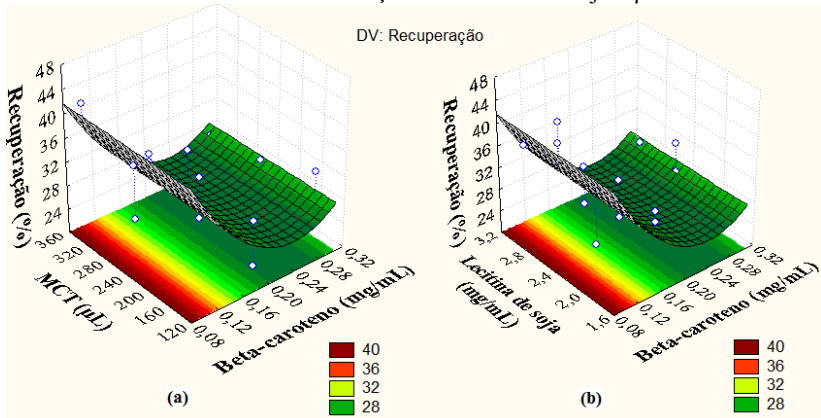
Para a variável dependente recuperação, tanto o óleo quanto a lecitina de soja, não foram fatores significativos, ao passo que a interação β -caroteno quadrático foi marginalmente significativo ($P = 0,053$). Assim, mantém-se no modelo os efeitos lineares e quadráticos do β -caroteno, conforme Equação 9:

$$\%R = 62,60 - 313,66X_{BC} + 655,78X_{BC}^2 \quad (9)$$

A Figura 7(a) foi gerada variando a concentração de β -caroteno e o volume de óleo, mantendo-se a concentração de surfactante constante. Mesmo comportamento foi apresentado quando se variou a concentração de β -caroteno e Lecitina de soja, mantendo-se o volume do óleo constante. Para níveis baixos de β -caroteno maior foi a recuperação deste composto das suspensões de nanocápsulas.

Para escolha da melhor formulação, levou-se em consideração as formulações que apresentaram maior recuperação do β -caroteno, maiores valores de eficiência de encapsulação, maior potencial zeta e baixos índices de polidispersão. Assim as condições ótimas obtidas para concentração de β -caroteno, volume de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico e lecitina de soja foram, 0,2160 mg/ml, 232,42 μ L e 2,59 mg/ml, respectivamente. Procedeu-se novamente a formação das nanocápsulas, conforme método descrito em 2.2, utilizando as condições ótimas obtidas. Estas novas formulações foram utilizadas para avaliação morfológica e utilização em trabalhos posteriores.

Figura 7 (a) Gráficos de superfície de resposta para a variável dependente recuperação para nanocápsulas formuladas com diferentes concentrações de β -caroteno e triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT); (b) nanocápsulas formuladas com diferentes concentrações de lecitina de soja e β -caroteno.

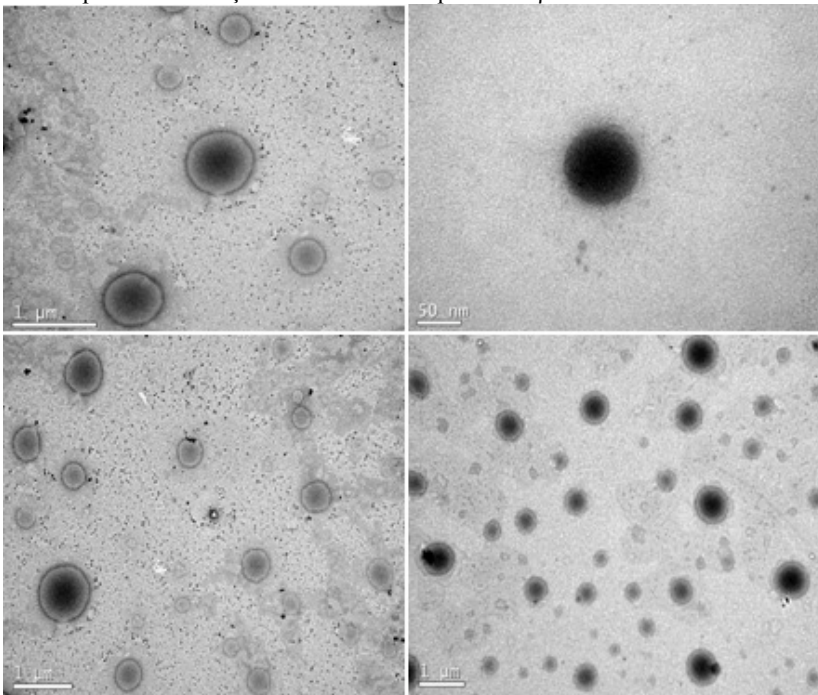


Fonte: Autor, 2012.

2.3.3 Avaliação morfológica das nanopartículas otimizadas

Através das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi possível afirmar que a formulação ótima desenvolvida foi capaz de formar nanocápsulas e não nanoesferas. Pode-se evidenciar, nitidamente, a presença de nanopartículas redondas, com um núcleo oleoso bem definido, circundado pela parede polimérica de poli- ϵ -caprolactona, como pode ser visualizado na Figura 8.

Figura 8 Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) obtidas para a formulação ótima de nanocápsulas de β -caroteno.



Fonte: Autor, 2012.

A distribuição das nanocápsulas na suspensão de nanopartículas, sem formação de aglomerados, também pode ser demonstrada. As imagens obtidas neste estudo foram muito

semelhantes as imagens obtidas por Khayata e colaboradores (2012), quando estudaram nanocápsulas de α -tocoferol/PCL.

Por meio das imagens anteriores, também se pode confirmar, que a distribuição de tamanho das nanocápsulas não é muito homogênea, diversos tamanhos de nanocápsulas podem ser verificadas, porém todas na faixa nanométrica, abaixo de $1\mu\text{m}$.

2.4 CONCLUSÃO

As análises realizadas demonstraram que as formulações contendo lecitina de soja e triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico foram mais estáveis quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. A partir da metodologia de superfície de resposta, pode-se obter as melhores formulações de nanopartículas, neste trabalho desejava-se obter formulações com alta eficiência de encapsulação, baixo PDI e altos valores de potencial zeta. Assim, a formulação ótima escolhida para β -caroteno, volume de triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico e lecitina de soja foi, 0,2160 mg/ml, 232,42 μ L e 2,59 mg/ml, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BYUN, Y.; HWANG, J.B.; BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARK, H.J.; WHITESIDE, S. Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly- ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. **LWT - Food Science e Technology**, vol. 44, p. 24 – 28, 2011.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent 274961 A1**, 20 July, 1988.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.H.; AMMOURY, N. AND BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, 55, R1-R4, 1989.

HENTSCHEL, A.; GRAMDORF, S.; MÜLLER, R.H.; KURZ, T. β -Carotene-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **Journal of Food Science**, vol. 73 (2), 2008.

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

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M.F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 423, p. 419 – 427, 2012.

LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J.M. Improved incorporation and stabilisation of β -carotene in hydrocolloids using glycerol. **Food Chemistry**, vol. 125, p. 997 – 1004, 2011.

MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; BONECHI, C.; LEONE, G.; TOGNAZZI, A.; CONSUMI, M.; MAGNANI, A.; ROSSI, C. Increasing photostability and water-solubility of carotenoids: Synthesis and characterization of β -carotene-humic acid complexes. **Journal of**

Photochemistry and Photobiology B: Biology, vol. 101, p. 355-361, 2010.

MATTEA, F., MARTÍN, Á., MATÍAS-GAGO, A., & COCERO, M.J. Supercritical anti-solvent precipitation from an emulsion: beta-carotene nanoparticle formation. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 51(2), p. 238-247, 2009.

MORA-HUERTAZ, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 385, p. 113 – 142, 2010.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(d,l-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal Pharmaceutical Science**, vol. 89 (5), p. 614 – 626, 2000.

PAZ, E.; MARTÍN, A.; ESTRELLA, A.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; MATIAS, A.A.; DUARTE, C.M.M.; COCERO, M.J. Formulation of β -carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-on-water emulsions for application as natural colorant. **Food Hydrocolloids**, vol. 26, p. 17 – 27, 2012.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Press, 64p. 2001.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade Físico-Química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, vol. 26, No.5, p. 726-737, 2003.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 278, p. 1 – 23, 2004.

TAN, C.P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, vol. 92, p. 661 – 671, 2005.

TIECHER, A. Efeito da radiação UV-C na expressão gênica e nas respostas bioquímico-fisiológicas em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.). **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 70p. 2010.

YEGIN, B.A.; LAMPRECHT, A. Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 320, p. 165 – 170, 2006.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, vol. 41, p. 61 – 68, 2008.

ZAMBIAZI, R. C. The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability. Foods and Nutritional Sciences Interdepartmental Program. University of Manitoba Winnipeg, Manitoba, Canada. 304 p. 1997.

ZHOU, ZHUXIAN. Rational Design of Surface Charge and Morphology Properties of Nanocarriers for Targeted Drug Delivery, Ph.D., Department of Chemical & Petroleum Engineering, August, 2011.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE METILCELOULOSE CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE POLI(E-CAPROLACTONA) E B-CAROTENO

3 Desenvolvimento e caracterização de filmes de metilcelulose contendo nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) e β -caroteno incorporados na matriz filmogênica.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar filmes ativos de metilcelulose utilizando diferentes concentrações de nanopartículas de β -caroteno. Avaliou-se o efeito da incorporação de nanopartículas sobre as propriedades reológicas da solução filmogênica assim como, o efeito da incorporação de nanopartículas sobre as propriedades dos filmes como: propriedades mecânicas, ópticas, atividade antioxidante, liberação do β -caroteno da matriz polimérica, solubilidade em água e ângulo de contato. Resultados apontam que as propriedades mecânicas são altamente afetadas pela adição de nanopartículas a solução dos filmes, sendo que o aumento da concentração de nanopartículas diminuiu o Módulo de Young, porém elevou-se a elongação dos filmes, mesmo assim, os valores obtidos para as propriedades mecânicas são satisfatórios. Com relação à transmissão da luz, a incorporação das nanopartículas de β -caroteno promoveu uma diminuição na porcentagem de transmitância dos raios ultravioleta através da matriz dos filmes, assim como da luz visível, com o aumento de nanopartículas incorporados aos filmes. E, a incorporação das nanopartículas acarretou a desativação dos radicais ABTS, demonstrando um aumento da atividade antioxidante com o aumento da concentração de nanopartículas. Estes resultados mostram que os filmes desenvolvidos podem ser utilizados como barreira protetora à oxidação.

Palavras-chave: Casting, Atividade antioxidante, Solubilidade, Propriedades ópticas; Propriedades mecânicas.

3.1 INTRODUÇÃO

Pesquisas utilizando biopolímeros como matéria prima para desenvolvimento de embalagens biodegradáveis vem ganhando atenção recentemente devido as preocupações a cerca dos problemas ambientais gerados pelos materiais derivados de petróleo (Gounga, Xu & Wang, 2007; Ahmadi, Sareminezhad & Azizi, 2011; Kokoszka, Debeaufort, Hambleton, Lenart & Voilley, 2010; Salgado, Ortiz, Petruccielli & Mauri, 2010; Siripatrawan & Harte, 2010; Akhtar et al., 2012; Martins, Cerqueira & Vicente, 2012; Reddy, Jiang & Yang, 2012). As principais macromoléculas usadas na elaboração de biofilmes são proteínas lipídeos e polissacarídeos, como metilcelulose, quitosana e hidroxipropilmetilcelulose (Gounga et al., 2007; Rotta et al., 2009; Ahmadi et al., 2011; Kokoszka et al., 2010; Salgado et al., 2010; Siripatrawan et al., 2010; Akhtar et al., 2012; Martins et al., 2012; Reddy et al., 2012). Estas biomoléculas se apresentam promissoras, em razão de serem abundantes, oriundas de fontes renováveis, biodegradáveis, apresentarem baixo custo e serem capazes de formar uma matriz contínua.

Filmes de ésteres de celulose, como metilcelulose (MC) são geralmente flexíveis, transparentes, solúveis em água, inodoro, insípido e resistentes a óleos e gorduras (Kester & Fennema, 1986; Ahmadi, et al., 2011). Além da sua barreira protetora, recentemente estes filmes tem sido utilizados para fornecer um mecanismo de contenção e liberação de compostos ativos (Lacroix & Le Tien, 2005; Beaulieu, Park, Ballew Mims & Kuk 2009).

A incorporação de antioxidantes em materiais para embalagens tem se tornado notório, pois a oxidação é um dos principais problemas que afetam a qualidade dos alimentos. Porém, os antioxidantes mais frequentemente utilizados em alimentos e em embalagens ativas são sintéticos, devido a sua alta eficiência, estabilidade e baixo custo. Embora estes antioxidantes possam ser efetivamente utilizados em embalagens para alimentos, existem preocupações quanto aos aspectos toxicológicos (Jongjareonrak, Benjakul, Visessaguan, & Tanaka, 2008; Siripatrawan & Noipha, 2012). Devido a estes aspectos, inúmeras pesquisas estão sendo conduzidas empregando antioxidantes naturais como alternativa aos antioxidantes sintéticos, como incorporação de α -tocoferol em filmes de quitosana, uso de extrato de chá verde em filmes de quitosana e extrato natural de beterraba e cenoura em filmes de

hidroxipropilmetilcelulose (Graciano-Verdugo et al., 2010; Siripatrawan et al., 2010; Martins et al., 2012; Akhtar et al., 2012).

O β -caroteno tem recebido considerável atenção, não só por ser precursor de vitamina A, mas também pelo seu papel como antioxidante (López-Rubio & Lagaron, 2011). No entanto, a utilização industrial do β -caroteno torna-se difícil devido à sua instabilidade sob calor, luz e oxigênio, sendo sua degradação muito rápida em condições ambientes, apresentando assim baixa estabilidade quando comparado aos antioxidantes sintéticos. (Mattea, Martin, Matías-Gago, & Cocero, 2009; Hou et al., 2012). A fim de melhorar a estabilidade e solubilidade em água, os carotenóides podem ser dissolvidos na fase oleosa de nanoemulsões óleo-em-água podendo ser facilmente incorporados nos produtos alimentares (Tan & Nakajima, 2005; Hou et al., 2012).

As nanopartículas quando adicionados a filmes e revestimentos para alimentos, podem ter outras funções, como veículos para diferentes substâncias, particularmente aditivos e suplementos alimentares, como flavorizantes, pigmentos, antimicrobianos e antioxidantes. Sendo utilizados também para estabilizar a qualidade dos produtos durante o armazenamento, aumentando sua vida de prateleira (Lacroix et al., 2005; Zambrano-Zaragoza, Mercado-Silva, Gutiérrez-Cortez, Castaño-Tostado & Quintanar-Guerrero, 2011).

Neste contexto, buscou-se desenvolver filmes biodegradáveis ativos de metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno e avaliar suas propriedades mecânicas, óticas, antioxidantes, estabilidade, etc., quando formulados com diferentes concentrações de nanopartículas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

Metilcelulose (MM \approx 88.000. Celulose, com substituição de metoxilas entre 27,5-31,5% (peso), β -caroteno sintético (*trans*- β -Caroteno - MM 536.87 g/mol), com pureza de 95%, Tipo I e o polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL - MM 70.000-90.000) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO. USA). O surfactante aquoso Pluronic[®] F68 Pastille, copolímero condensado de óxido de etileno e óxido de propileno, da marca BASF Corporation, foi gentilmente doado pela empresa Foscher Solutions Provider (São Paulo, BR). O óleo utilizado como agente carreador do composto ativo foi a mistura de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (Palm-Óleo - Malasya). Lecitina de Soja livre de gordura, com 70% de Fosfatidilcolina, grau alimentício (LIPOID S75), foi adquirida da empresa Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Acetona, etanol e todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico (VETEC).

3.2.2 Desenvolvimento dos filmes de metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno/PCL.

Nanopartículas de β -caroteno foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, seguindo procedimento desenvolvido por Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury and Benita (1989) e usando concentrações sugeridas por Mora-Huertas, Fessi & Elaissari (2010). Soluções de poli- ϵ -caprolactona 30mg/mL, e soluções de β -Caroteno 0,216 mg/mL foram solubilizadas utilizando acetona como solvente, com auxílio de banho ultrassônico (Maxi Clean 1650 A- UNIQUE). Lecitina de soja 2,59 mg/mL, foi dissolvida em uma mistura de acetona:etanol (60:40), com ajuda de ultra-som. Um volume de 232,42 μ L de óleo, triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (MCT), foi utilizado e todos estes componentes foram misturados e, a esta fase orgânica foi adicionada lentamente, com ajuda de uma pipeta de Pasteur, à fase aquosa contendo 1,0% (m/m) de Pluronic[®] F68 em água Milli-Q[®], sob moderada agitação magnética, a 25°C, com formação instantânea das nanopartículas. A acetona, que rapidamente é difundida para a fase aquosa, é então removida por agitação sob ausência de luz, à temperatura ambiente (25°C), “overnight” para total evaporação do solvente orgânico. Após total evaporação do solvente e concentração da

solução até volume final desejado (25ml), as soluções foram filtradas, utilizando filtro qualitativo (Whatman N°1), para eliminar partículas maiores, como aglomerados e precipitados, que podem se formar na solução. Após a filtração, as formulações foram armazenadas em frasco âmbar e acondicionadas sob refrigeração ($T = 5^{\circ}\text{C}$) para adição as soluções filmogênicas.

Para desenvolvimento dos filmes pelo método de *casting*, utilizou-se soluções aquosas de metilcelulose (2% m/v) e soluções de nanopartículas de β -Caroteno nas proporções de 100/0 (metilcelulose pura); 70/30; 50/50 e 30/70 (v/v) respectivamente. As soluções filmogênicas foram mantidas sob agitação magnética por 5 horas a 20°C , para perfeita homogeneização. Os filmes foram preparados colocando-se 10mL das soluções filmogênicas em placas de Petri de poliestireno até completa evaporação do solvente, em capela química fechada, sob abrigo da luz, a temperatura ambiente (25°C). Após esta etapa, os filmes foram armazenados no escuro para análises posteriores.

3.2.3 Comportamento reológico das soluções filmogênicas

As medidas reológicas das soluções filmogênicas de metilcelulose incorporadas por nanocápsulas, assim como das soluções de metilcelulose pura foram realizadas em diferentes temperaturas, 20°C , 25°C , 30°C e 35°C em um Reômetro *Brookfield RVDV-IIICP*, do tipo cilindros concêntricos, com modelo de *spindle* do tipo SSA, SC4-27. Utilizou-se reômetro equipado com um banho termoestatizado para controle da temperatura e acoplado a um computador para utilização do Software *Rheocalc 32*. Para cada medida 5 ml de solução foi cuidadosamente depositada no porta amostras do reômetro. Todas as amostras foram deixadas descansar por 10 min depois de colocadas no porta amostras para equilibrar a temperatura e induzir o stress de relaxamento. Medições de fluxo em estado estacionário foram realizadas para cada amostra em cada temperatura durante 20 min e os parâmetros reológicos (tensão de cisalhamento, a taxa de cisalhamento, a viscosidade aparente) foram obtidos a partir do software. As curvas de fluxo experimentais foram ajustados para o modelo de Lei da Potência, dado pela Equação 1:

$$\tau = k(\dot{\gamma})^n \quad (1)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), k é o índice consistência (Pa.sⁿ), $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação e n é o índice de comportamento do fluxo (adimensional). A influência da temperatura sobre a viscosidade das soluções, pode ser expressa por uma equação do tipo Arrhenius, envolvendo a temperatura absoluta (T), a constante universal dos gases (R) e a energia de ativação para a viscosidade (Ea):

$$k = k_T \exp\left(\frac{Ea}{RT}\right) \quad (2)$$

onde $k_t = e^{(b)}$, b = coeficiente linear; $Ea/R = a$, a = coeficiente angular da equação da reta obtida do gráfico $\ln(k)$ vs. ($1/T$). O efeito da temperatura e da taxa de deformação sobre a viscosidade pode ser combinada em uma simples equação (HARPER E EL SAHRIGI, 1965; apud STEFF, 1996):

$$\sigma = f(T, \dot{\gamma}) = k_T \exp\left(\frac{Ea}{RT}\right) (\dot{\gamma})^{\bar{n}} \quad (3)$$

onde \bar{n} é o valor médio do índice de comportamento de fluxo em todas as temperaturas.

3.2.4 Propriedades mecânicas dos filmes

Avaliou-se as propriedades mecânicas dos filmes de metilcelulose com diferentes concentrações de nanopartículas de β -caroteno (30, 50 e 70%, v/v), comparando-os aos filmes de metilcelulose pura (MC). As propriedades mecânicas determinadas foram tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade (módulo de Young). Os testes foram realizados usando um texturômetro TA.TX2-Plus (Stable Micro Systems - Inglaterra), conforme o método ASTM D882-95a (ASTM, 1995) que compreende a determinação das propriedades de tensão ou tração de plásticos em forma de folhas delgadas, incluindo filmes, com espessura menor que 1,0 mm. A força máxima de ruptura (N), deformação na ruptura (extensão no momento da ruptura, mm), e módulo de elasticidade (N/mm) foram calculadas através das curvas de força (N) vs deformação (mm) que foram registradas pelo software Expert[®].

Foram efetuadas 10 repetições de cada amostra, de dimensões: 50 mm de comprimento e 25 mm de largura. A espessura dos filmes foi medida com o auxílio de um micrômetro de mão eletrônico (*Digimess, 110.284*) com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0 – 25 mm. A separação inicial das garras e sua velocidade de afastamento foram de 50mm e 10mm/min, respectivamente. Antes das leituras, as amostras foram equilibradas durante uma semana a umidade relativa de $75 \pm 10 \%$, em dessecador com solução saturada de NaCl a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, estas mesmas condições foram mantidas durante a realização dos testes. As medidas foram efetuadas dentro de um tempo médio de 5 minutos para que as condições de temperatura e umidade relativa do ar não interferissem nos resultados experimentais.

3.2.5 Avaliação da cor dos filmes

Os parâmetros de cor dos filmes foram determinados através do sistema CIELAB, utilizando um colorímetro Minolta (CR 400; Osaka, Japan). No sistema CIELAB o parâmetro L^* é relatado como a luminosidade da amostra e varia de 0 (preto) a 100 (branco), a^* representa as variações da cor entre o (-) verde e o (+) vermelho e b^* representa as variações da cor entre (-) azul e (+) amarelo. Amostras circulares, com 2 cm de diâmetro, foram utilizadas para determinar os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , uma placa de porcelana branca foi tomada como padrão de calibração e como fundo para as medidas de cor dos filmes. Além do padrão branco, os filmes foram comparados com uma amostra de policloreto de vinila (PVC) transparente (Royal Pack[®]) e com polietileno de baixa densidade (PEBD) (Royal Pack[®]). No entanto, para avaliar as variações de cor entre os filmes e os padrões, utilizou-se a Equação 4.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

onde: $\Delta L^* = L^* - L_0^*$; $\Delta a^* = a^* - a_0^*$; $\Delta b^* = b^* - b_0^*$, sendo L^* , a^* e b^* os valores de cor das amostras e L_0^* , a_0^* e b_0^* os valores de cor do padrão metilcelulose pura, do PVC e do PEBD, cujos respectivos valores estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de L_0^* , a_0^* e b_0^* para os padrões: cloreto de polivinila (PVC) e polietileno de baixa densidade (PEBD).

Padrão	L_0^*	a_0^*	b_0^*
PVC	97,53	0,13	1,78
PEBD	97,66	0,11	1,99

Fonte: Autor, 2012.

3.2.6 Transmissão da luz

As medidas das propriedades de barreira dos filmes de metilcelulose (padrão) e metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno, contra a luz visível e a radiação ultravioleta (UV), foram realizadas no comprimento de onda de 210 nm (região ultravioleta) e 500 nm (região visível), utilizando o espectrofotômetro modelo U-2010 (Hitachi UV-Visível), segundo método proposto por Tang, Jiang, Wen e Yang (2005) e modificado por Rotta, Ozório, Kehrwald, Barra, Amboni e Barreto (2009). Os filmes foram cortadas de forma retangular (0,7 x 1,5 cm) e colocadas em uma cubeta de quartzo. A transparência relativa foi medida pela % de transmitância a 210 nm e 500 nm, enquanto a cubeta de quartzo vazia foi utilizada como controle. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.2.7 Capacidade antioxidante de desativação dos radicais ABTS dos filmes nanoestruturados

A atividade antioxidante dos filmes foi determinada pelo ensaio de descoloração do radical ABTS. A técnica para geração do radical ABTS ($ABTS^{\cdot+}$) envolve a produção direta do cromóforo azul/verde $ABTS^{\cdot+}$ através da reação entre persulfato de potássio e ABTS. A metodologia avalia a diminuição da absorbância do radical $ABTS^{\cdot+}$ a 734nm na presença de espécies antioxidantes.

A solução de $ABTS^{\cdot+}$ foi diluída com etanol para obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734nm (AKHTAR et al., 2012). Um volume de 60 μ L da solução contendo os filmes, 0,1g de filme em 4ml de etanol (95%), foram adicionadas a 2940 μ L da solução hidro-alcoolica de $ABTS^{\cdot+}$, vortexadas por 30s e, depois de 7 min no escuro, a absorbância a 734nm foi lida, em espectrofotômetro SP-2000UV da

marca BEL Photonics®. A porcentagem de inibição do radical foi calculada pela seguinte fórmula:

$$%I = (1 - A_f / A_0) \times 100 \quad (5)$$

onde, A_0 é a absorbância inicial e A_f é a absorbância final.

Os resultados foram expressos como atividade sequestradora de radicais livres do Trolox ($\mu\text{mol TEAC (Trolox equivalent)/g}$), onde os valores TEAC foram definidos como a razão entre as inclinações das retas, onde % I (porcentagem de inibição) *versus* concentração das amostras e Trolox foram plotados (MARTINI et al., 2010). Trolox foi usado como padrão ($15 \mu\text{M} = 0.13209 \text{ g}/500 \text{ mL}$).

3.2.8 Liberação do β -Caroteno a partir dos filmes de metilcelulose

Para estudar a liberação de β -C dos filmes para o alimento, seguiu-se o Acordo Europeu 82/711/EEC (EUROPEAN COMMUNITIES, 1982) e metodologia utilizada por Manzanarez-López e colaboradores (2011), onde o etanol puro pode ser utilizado como simulante da matriz alimentar. Cada filme foi cortado retangularmente ($3 \times 2 \text{ cm}$) e imerso em um frasco de vidro âmbar contendo 30 mL de etanol, durante 10 dias, sendo que no primeiro dia a concentração do composto ativo liberado foi analisada a cada hora, durante 10 horas, a temperatura ambiente de 25°C . As análises do β -C foram executadas utilizando um espectrofotômetro SP-2000UV, marca BEL Photonics, no comprimento de onda de 450 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Curvas de calibração do β -caroteno em etanol, entre 0,5 a 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foram necessárias para a quantificação. No gráfico plotou-se a Absorbância *vs.* Concentração conhecida de β -C. O gráfico foi linearizado e a equação da reta utilizada para determinar a concentração de β -C, para cada solução em que o filme foi imerso. Os experimentos foram executados em triplicata.

3.2.9 Ângulo de contato e energia livre superficial

O método utilizado para medir o ângulo de contato dos filmes de metilcelulose puro e metilcelulose incorporado por nanopartículas com

os líquidos padrões (água deionizada e diiodometano) foi o da gota sésil, onde, através de uma seringa, uma gota do líquido padrão é aplicada sobre a superfície dos filmes a ser caracterizada. O ângulo estático que esta gota realiza com a superfície, através da inclinação da tangente, é calculado. A média dos ângulos esquerdo e direito de cada gota é obtida para o valor do ângulo de contato. O equipamento utilizado foi o OCA 15EC (Filderstadt, Germany) com sistema processador de imagem de alta resolução Data Physics Instruments.

Uma gota de cada líquidos padrão, água deionizada ($\gamma^T = 72,8$ mN/m, $\gamma^d = 21,8$ mN/m, $\gamma^p = 51,0$ mN/m) e diiodometano ($\gamma^T = 50,8$ mN/m, $\gamma^d = 50,8$ mN/m, $\gamma^p = 0$ mN/m), com 5 μL e 0,8 μL , respectivamente foram utilizadas. A temperatura dos ensaios foi de 25°C e o tempo para as medidas do ângulo foi de 30 segundos após a gota ser depositada. A energia livre superficial e suas componentes (polar e dispersiva) foram calculadas pelo modelo de Owens-Wendt, conforme equação 6. Os ensaios foram feitos em triplicata.

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_S^d}\sqrt{\gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_S^p}\sqrt{\gamma_L^p} \quad (6)$$

onde: γ_S^d e γ_L^d componente dispersiva (interações Lifshitz-Van der Waals) e, γ_S^p e γ_L^p componente não dispersiva (interações polares, ácido-base de Lewis).

3.2.10 Solubilidade em água dos filmes

A medida da solubilidade em água dos filmes foi realizada em triplicata e determinada segundo método proposto por Gontard, Guilbert e Cuq (1992) e modificado por Rotta e colaboradores (2009). Utilizou-se amostras na forma de disco com 8,0 cm de diâmetro. As amostras foram secas em estufa a 105°C, até peso seco constante, para retirada da umidade. Em seguida, foram imersas em 100 mL de água destilada. O sistema foi agitado lenta e periodicamente por um período de 24 horas, a 25°C. Após este período, as amostras foram armazenadas em estufa, a 105°C, até peso constante, para se determinar a massa seca final da amostra (m_f). A solubilidade foi expressa em termos de massa solubilizada (MS), de acordo com a Equação 7.

$$\%MS = ((\text{massa}_{\text{inicial}} - \text{massa}_{\text{final}})/\text{massa}_{\text{inicial}}) \times 100 \quad (7)$$

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Reologia das soluções

Os parâmetros reológicos obtidos para as soluções filmogênicas com diferentes concentrações de nanopartículas, avaliados a diferentes temperaturas, são apresentados na Tabela 2.

À temperatura de 20°C as soluções de metilcelulose pura apresentaram menor valor de índice de consistência, observa-se que o índice de consistência, representado por *CI* ou *k*, aumenta com o aumento da concentração de nanopartículas de β -caroteno às soluções dos filmes. Os valores de índice de consistência para as formulações contendo concentrações de 30 e 50% de nanopartículas, não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$). Já o comportamento do fluxo a 20°C, tendeu a se afastar do comportamento Newtoniano ($n = 1$) com o aumento de nanopartículas à solução de metilcelulose.

Tabela 2 - Parâmetros reológicos do modelo Lei da potência, a diferentes temperaturas, para soluções de filmes com diferentes concentrações de nanopartículas, mantendo constante a concentração de metilcelulose (2%) em todas as soluções.

T (°C)	Soluções							
	MC		30%		50%		70%	
	k* (mPa.s ⁿ)	n	k (mPa.s ⁿ)	n	k (mPa.s ⁿ)	n	k (mPa.s ⁿ)	n
20	646,75± 23,41 ^a	0,7	767,45± 16,40 ^a	0,7	800,20± 0,57 ^a	0,7	888,65± 26,23 ^a	0,7
25	628,65± 70,92 ^a	0,7	628,55± 18,60 ^b	0,7	585,3± 34,22 ^b	0,7	668,45± 4,450 ^b	0,7
30	431,10± 28,99 ^b	0,8	578,90± 17,25 ^c	0,7	395,85± 7,99 ^c	0,8	485,35± 12,37 ^c	0,7
35	353,25± 18,74 ^c	0,8	482,65± 10,82 ^d	0,7	304,75± 1,48 ^d	0,8	339,85± 7,280 ^d	0,8

*k ou CI é o índice de consistência do fluido e n o índice de comportamento do escoamento do modelo Power Law, $\tau = k.D^n$. Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os valores ($P < 0,05$); MC= soluções de metilcelulose sem adição de nanopartículas. Fonte: Autor, 2012.

O aumento na temperatura, diminuiu o índice de consistência das soluções filmogênicas, independente da concentração de nanopartículas adicionadas. Todas as soluções apresentaram comportamento pseudoplástico, independente da concentração de nanopartículas e da temperatura estudada, pois apresentaram índice de escoamento do fluido

menor que a unidade ($n < 1$). O comportamento encontrado é característico de fluidos pseudoplásticos, onde o valor de n decresce com o aumento do conteúdo de sólidos, sendo pouco afetado pela temperatura. O índice de consistência (k) aumenta com o conteúdo de sólidos e geralmente decresce com o aumento da temperatura.

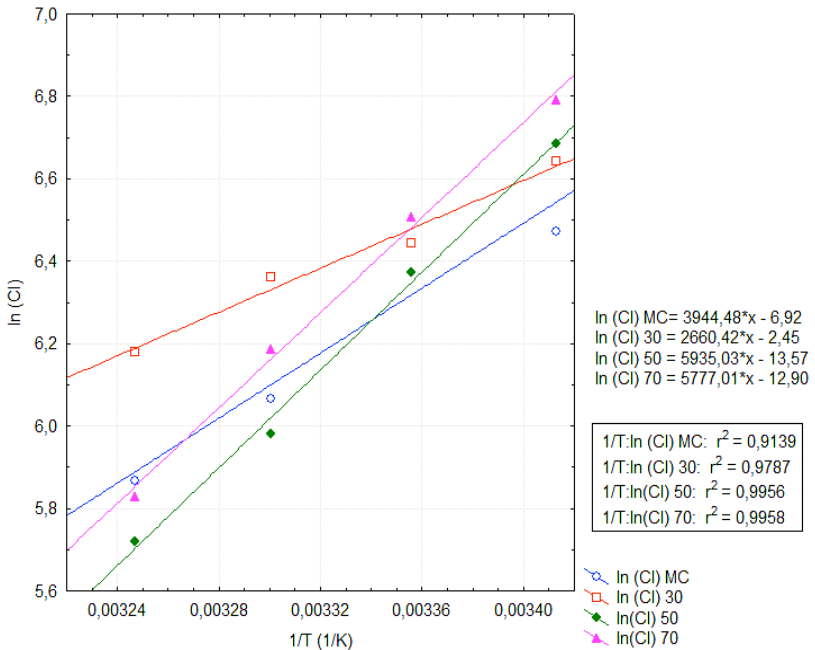
A partir da aplicação do modelo da Lei da potência, obteve-se os dados de $\ln(k)$ e n para cada temperatura (Tabela 3), e plotou-se gráficos ($\ln(k)$) vs. $(1/T)$, conforme Figura 1.

Tabela 3 - Dados de $\ln(k)$ e índice de comportamento do escoamento para cada solução filmogênica a diferentes temperaturas.

1/T = 1/K	T (°C)	ln (k)			
		MC	30%	50%	70%
0,00341	20	6,47	6,64	6,68	6,79
0,00336	25	6,44	6,44	6,37	6,51
0,00330	30	6,07	6,36	5,98	6,19
0,00325	35	5,87	6,18	5,72	5,83
n(t)		0,755	0,726	0,758	0,731

MC= soluções de metilcelulose sem adição de nanopartículas. Fonte: Autor, 2012.

Figura 1 Gráficos da variação do índice de consistência com a temperatura para as soluções de metilcelulose pura (MC), 30%, 50% e 70% de suspensões de nanopartículas.



Fonte: Autor, 2012.

Estes gráficos (Figura 2) foram plotados para todas as soluções, e a partir deles foi possível obter os coeficientes angulares (a) e coeficientes lineares (b), para construir as equações que descrevem a viscosidade das soluções filmogênicas, incorporadas por nanopartículas, em função do tempo e da taxa de deformação.

As equações são apresentadas na Tabela 4. Estas equações nos permitem prever o comportamento de fluxo dos sistemas em diferentes condições de tensão de cisalhamento e taxa de deformação em diferentes temperaturas.

A energia de ativação de fluxo (Ea) nos permite distinguir as soluções que sofrem maior variação da viscosidade aparente com a temperatura, assim, nas soluções filmogênicas contendo 70% e 50% de dispersão de nanopartículas ocorre uma maior variação da viscosidade com o aumento da temperatura, pois apresentaram os maiores valores de

Ea. Tal fato, deve-se, provavelmente ao maior teor de lipídeos (β -caroteno) nestes sistemas.

Tabela 4 - Equações que descrevem o comportamento reológico, das soluções filmogênicas, dependentes da temperatura.

Soluções	Equação do modelo para viscosidade aparente	R^2
MC*	$\sigma = 0,989E-03.e^{(3944,5/T)}. \dot{\gamma}^{0,755}$	0,914
30%	$\sigma = 90,88E-03.e^{(2660,4/T)}. \dot{\gamma}^{0,726}$	0,979
50%	$\sigma = 1,390E-06.e^{(5935,0/T)}. \dot{\gamma}^{0,758}$	0,996
70%	$\sigma = 2,450E-06.e^{(5777,0/T)}. \dot{\gamma}^{0,731}$	0,996

*MC: solução de metilcelulose sem adição de nanopartículas.

Fonte: Autor, 2012.

3.3.2 Propriedades mecânicas dos filmes

As propriedades mecânicas refletem a habilidade dos filmes em proteger a integridade dos alimentos. A informação quantitativa dos parâmetros mecânicos dos biofilmes é essencial para seu adequado desenvolvimento. A resistência à tração (ou, tensão na ruptura) é a tensão máxima que o filme pode suportar antes de romper. A elongação é geralmente determinada no ponto de ruptura, por isso também chamada de elongação na quebra, e é expressa como a medida da porcentagem de variação do comprimento original do corpo de prova. Módulo de elasticidade ou módulo de Young, que mede a rigidez intrínseca dos filmes, é a razão entre a tensão e elongação na região linear (MURILLO-MARTÍNEZ et al., 2011).

A inclusão de aditivos pode modificar as propriedades mecânicas de filmes comestíveis e coberturas, devido as mudanças físicas induzidas na estrutura da rede, resultante das alterações físico-químicas das interações polímero-polímero (EMBUSCADO e HUBER, 2009).

A espessura dos filmes é considerada um importante parâmetro, pois pode influenciar as propriedades de barreira dos filmes (AKHTAR et al, 2012). A natureza (hidrofílica ou hidrofóbica) da matriz polimérica e seus componentes afetam a espessura dos filmes através das interações químicas e físicas entre si. (SALMIERI e LACROIX, 2006; SEBTI et al., 2007).

A Tabela 5 mostra o efeito do aumento da concentração de

nanopartículas de β -caroteno nos filmes de metilcelulose, sobre os valores de espessura (mm), módulo de Young ou módulo de elasticidade (EM), tensão na ruptura (TS) e alongação na quebra (E, %) para os filmes equilibrados a $75 \pm 10\%$ UR e $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os valores de espessura variaram entre $0,0270 \pm 0,0040$ (MC) e $0,0557 \pm 0,0061$ (50%), conforme Tabela 5. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre os filmes de metilcelulose, que apresentaram a menor espessura, e os filmes contendo as nanopartículas. A espessura aumentou com o aumento da proporção de nanopartículas presentes nos filmes, isto é, os filmes com maior teor de nanopartículas apresentaram maior espessura, embora não tenha havido diferença estatística entre os filmes com 50% e 70% de nanopartículas. Além disso, os valores pequenos para os desvios padrões indicam uma excelente homogeneidade dos filmes. Park e Zhao (2004) também observaram que a espessura dos filmes aumentava com o aumento da concentração de sólidos (minerais e vitamina E) em filmes de quitosana. O aumento da espessura dos filmes pode ser um efeito combinado da presença de nanopartículas e dos surfactantes na matriz polimérica, que acarreta uma menor densidade de interações polímero-polímero, como se percebe na avaliação da tensão de ruptura, deformação na ruptura e módulo de Young.

Tabela 5 - Dados espessura e propriedades mecânicas dos filmes de metilcelulose puro (MC) e contendo nanopartículas de β -caroteno, nas proporções de 30, 50 e 70% de nanopartículas adicionadas aos filmes.

Filmes	Espessura (mm)	Módulo de Young (MPa)	Elongação (%)	Tensão na Ruptura (MPa)
MC	$0,0270 \pm 0,0040^c$	$1349,32 \pm 83,99^a$	$9,34 \pm 5,17^b$	$41,18 \pm 8,74^a$
30%	$0,0455 \pm 0,0051^b$	$556,49 \pm 89,20^b$	$13,76 \pm 7,24^b$	$19,49 \pm 5,02^b$
50%	$0,0557 \pm 0,0061^a$	$348,40 \pm 70,71^c$	$23,47 \pm 9,29^a$	$14,30 \pm 4,70^b$
70%	$0,0545 \pm 0,0066^a$	$286,01 \pm 44,46^c$	$29,24 \pm 6,28^a$	$13,64 \pm 2,29^b$

Valores são dados como média \pm desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) quando analisadas por Tukey. Fonte: Autor, 2012.

A partir da Tabela 5, pode-se observar que o módulo de Young (EM) dos filmes de MC diminuiu significativamente ($P < 0,05$) de 1349,32 para 556,49 MPa depois da adição de 30% nanopartículas de β -caroteno. A tensão na ruptura dos filmes de metilcelulose pura (MC) é

significativamente ($P < 0,05$) maior do que valores encontrados para os filmes adicionados de nanopartículas. Porém, independente da concentração de nanopartículas adicionada, a tensão na ruptura dos filmes não apresentou alterações significativas ($P < 0,05$).

Os resultados encontrados para os filmes de metilcelulose pura estão de acordo com a literatura. Pastor e colaboradores (2013) encontraram para filmes contendo apenas metilcelulose (2%) valores de 1604,0 MPa para o módulo de elasticidade, 66,0 MPa para tensão na ruptura e 15% de alongação (E%), quando analisados a condições de 75% UR e 25°C.

Observou-se um significativo aumento da deformação na ruptura dos filmes (E%), partindo de 9,34% para filmes de MC, chegando a 29,24 % de alongação quando adicionou-se 70% de nanopartículas β -caroteno, tornando os filmes mais alongáveis antes da ruptura. Este comportamento pode ser explicado, provavelmente, pela presença de surfactantes nas suspensões de nanopartículas, onde estes podem estar exercendo um papel plastificante entre as cadeias poliméricas, e o aumento das suspensões de nanopartículas aumenta a quantidade de surfactantes nas soluções filmogênicas, aumentando a alongação dos filmes, tornando-os menos quebradiços (menor módulo de Young) e com maior extensibilidade, porém com menor resistência a ruptura. Tanto para os valores de espessura como para módulo de Young e alongação, as amostras de filmes contendo 50% e 70% de dispersão de nanopartículas não apresentam diferença estatística entre si, porém são estatisticamente diferentes quando comparadas aos filmes de MC e com 30% de nanopartículas, embora os filmes com 70% tenham um menor módulo de Young e maior alongação na ruptura.

A adição de uma dispersão homogênea de nanopartículas em uma rede polimérica de metilcelulose pode ter acarretado uma menor interação entre as cadeias poliméricas, aumentando o espaço intercadeias, fato este observado na análise da espessura dos filmes, induzindo às alterações no Módulo de Young e alongação. Além disso, a presença de moléculas de surfactantes no meio podem ter exercido um efeito plastificante, aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas, induzindo uma maior alongação e menor módulo de Young.

Rodriguez e colaboradores (2006) também encontraram para filmes de amido utilizando como surfactante lecitina de soja, que o aumento da concentração de lecitina nos filmes diminuiu a força na ruptura, ao passo que aumentou a alongação dos filmes. E atribuíram este comportamento aos agentes tensoativos contidos nos filmes que

podem exercer uma ação plastificante, aumentando a mobilidade do polímero.

Segundo García (2000), os plastificantes diminuem as atrações intermoleculares entre cadeias poliméricas vizinhas e, como resultado, eles geram maior flexibilidade e mudanças significativas nas propriedades de barreira dos filmes formulados.

López-Rubio e Lagaron (2010) quando estudaram filmes de PCL incorporados por β -caroteno, encontraram que a adição do antioxidante ao biopoliéster alterou consideravelmente as propriedades mecânicas dos filmes formulados. Relataram, que um significativo efeito plastificante foi observado sobre a incorporação do antioxidante.

López-Rubio e Lagaron (2011) também encontraram este comportamento quando estudaram a adição de glicerol a filmes de proteína de soja e a filmes de proteína de soja com β -caroteno, onde o módulo de Young e a tensão na ruptura dos filmes diminuíram enquanto a % alongação dos filmes aumentou. Porém, quando utilizaram concentrado protéico do soro, as propriedades mecânicas dos filmes não foi alterada pela adição do antioxidante, indicando que as interações entre o biopoliímero e o β -caroteno foram provavelmente fracas.

3.3.3 Avaliação da cor dos filmes

O sistema CIELAB foi utilizado para caracterizar as mudanças de cor dos filmes utilizando diferentes concentrações de nanopartículas antioxidantes. A Tabela 6 apresenta os resultados dos parâmetros de cor, assim como a diferença de cor dos filmes desenvolvidos em relação aos filmes de metilcelulose pura (ΔE_{MC}), PVC (ΔE_{PVC}) e PEBD (ΔE_{PEBD}).

Quando se aumentou a quantidade de nanopartículas de β -caroteno incorporadas aos filmes de metilcelulose, as coordenadas L^* e a^* diminuíram, apresentando diferenças significativas ($P < 0,05$), indicando a diminuição da luminosidade e um ligeiro deslocamento da cor para o eixo do verde. A coordenada b^* aumentou significativamente ($P < 0,05$) com o aumento da concentração de nanopartículas de β -caroteno incorporadas aos filmes, indicando que os filmes tornaram-se amarelos. Este comportamento já era esperado, pois os carotenoides são conhecidos por conferir coloração que varia do amarelo ao vermelho. Assim, o aumento na quantidade de nanopartículas de β -caroteno, adicionadas às soluções filmogênicas também aumenta a intensidade da cor amarela dos filmes. Comportamento similar foi encontrado por

López-Rubio e colaboradores (2010) quando estudaram a incorporação de β -caroteno em filmes de PCL e PEBD, onde os filmes tornaram-se mais laranja-vermelho com a incorporação do β -caroteno.

Tabela 6 - CIE $L^*a^*b^*$ valores e variação total de cor (ΔE) para filmes de metilcelulose puro e adicionados de nanopartículas de β -caroteno. Filmes de metilcelulose puro, PVC e PEBD foram usados como referência.

Filmes	L^*	a^*	b^*	ΔE_{MC}^{**}	ΔE_{PVC}	ΔE_{PEBD}
*MC	97,29± 0,02 ^a	0,14± 0,005 ^a	1,81± 0,005 ^d	-	0,25	0,42
30%	96,42± 0,20 ^b	-2,52± 0,35 ^b	13,78± 1,82 ^c	12,28	12,33	12,14
50%	95,49± 0,05 ^c	-5,25± 0,17 ^c	31,60± 1,17 ^b	30,33	30,36	30,17
70%	94,77± 0,26 ^d	-6,35± 0,12 ^d	43,09± 2,31 ^a	41,86	41,90	41,70

Diferentes letras sobrescritas nas mesmas colunas indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Resultados são médias \pm desvio padrão, $n = 3$. *MC = filmes de metilcelulose pura. ** $\Delta E = ((\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2)^{0,5}$. Fonte: Autor, 2012.

As diferenças de cor entre os filmes de metilcelulose pura e PVC, assim como para o PEBD, apresentaram-se quase imperceptíveis ao olho humano. Porém, para os filmes contendo nanopartículas de β -caroteno, as diferenças de cor, quando comparados ao PVC e ao PEBD foram significativas ($P < 0,05$) e aumentaram com o aumento de nanopartículas adicionadas aos filmes.

3.3.4 Transmissão da luz

Filmes de metilcelulose com e sem β -caroteno apresentaram diferentes perfis de transmissão da luz visível (500 nm) e UV (210 nm). Os filmes contendo somente metilcelulose apresentaram uma alta transmissão da luz na região do visível e UV, porém com o aumento da concentração de nanopartículas de β -caroteno à matriz filmogênica, pode-se verificar que a transmitância dos filmes diminuiu drasticamente, aumentando a barreira dos filmes a luz UV e visível, evidenciando o caráter protetor dos filmes em ambos os comprimentos de onda.

Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram encontradas quando se adicionou nanopartículas de β -caroteno aos filmes. Porém, para os filmes formulados com 50 e 70% de nanopartículas não houve diferenças significativas para os valores de transmissão da luz, tanto na região do ultravioleta (500 nm), quanto para o visível (210 nm), como pode ser visualizado na Tabela 7.

A adição de 70% de nanopartículas aos filmes levou ao menor valor de transmitância na região do UV e visível. Como resultado, o baixo nível de transmissão na região do UV pode fazer dos filmes contendo nanopartículas de β -caroteno uma ótima barreira para prevenir a oxidação lipídica induzida pela radiação ultravioleta, apresentando assim grande importância para uso como embalagens para alimentos, onde as principais fontes de degradação são foto-oxidativas. Assim, o uso destes filmes biodegradáveis adicionados por nanopartículas, por absorverem esta radiação UV, tornam-se uma ótima alternativa para retardar a oxidação dos alimentos.

Tabela 7 - Características de transmissão de luz para filmes de metilcelulose puro (MC) e metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno

Composição Filmes	Transmitância 210nm	Transmitância 500nm
MC	40,73 \pm 0,929 ^a	82,37 \pm 0,981 ^a
30%	4,033 \pm 1,266 ^b	54,23 \pm 1,201 ^b
50%	1,167 \pm 0,723 ^c	33,77 \pm 1,185 ^c
70%	1,033 \pm 0,208 ^c	29,37 \pm 5,773 ^c

*Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna representam diferença significativa dos valores ($P < 0,05$).

Resultados são médias \pm desvio padrão, n = 3. Fonte: Autor, 2012.

Resultados semelhantes foram encontrados por Martins e colaboradores (2012), onde os baixos níveis de transmissão na região do UV, fazem dos filmes de quitosana adicionados por alfa-tocoferol uma excelente barreira a luz UV.

Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2012) também encontraram para filmes de gelatin de pele de peixe, que a incorporação de óleos essenciais diminuiu a transmissão da luz na região do UV e visível. Filmes controle, apresentaram transmissão da luz de 55,70% e 85,12%, na região do ultravioleta (280 nm) e visível (500 nm), respectivamente. A adição de óleo essencial de bergamota aumentou a propriedade de

barreira dos filmes, com valores de transmitância da luz de 15,17% (280 nm) e 66,98% (500 nm). Os resultados indicaram que todos os óleos essenciais adicionados aos filmes foram capazes de impedir a transmissão da luz.

3.3.5 Capacidade antioxidante de desativação dos radicais ABTS dos filmes nanoestruturados

A estabilidade antioxidante dos filmes de metilcelulose incorporados por diferentes concentrações de nanopartículas de β -caroteno foi avaliada. Todos os filmes desenvolvidos exibiram atividade antioxidante pois foram capazes de desativar os radicais ABTS^{•+}.

Os filmes desenvolvidos com 70% de nanopartículas de β -caroteno apresentaram capacidade antioxidante de desativação dos radicais ABTS significativamente ($P < 0,05$) maior quando comparado ao tratamento controle, contendo apenas metilcelulose. Os tratamentos intermediários contendo 30% e 50% de nanopartículas não apresentaram diferenças significativas a nível de 95% de confiança com relação ao controle (MC) e ao tratamento utilizando 70% de β -caroteno, como mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade antioxidante dos filmes de metilcelulose incorporados por nanopartículas de β -caroteno em diferentes concentrações.

% de nanopartículas nos filmes	Concentração de MC nos filmes (g/L)	Concentração de β -C nos filmes (mg β -C/g de filme)	% de inibição MC/ β -C	Trolox (μ mol TEAC/g de filme)
MC	20	0,0000 ^d	5,12 \pm 0,32 ^b	1,86 \pm 0,170 ^b
30%	20	0,0537 ^c	8,00 \pm 2,12 ^{ab}	3,38 \pm 1,115 ^{ab}
50%	20	0,0904 ^b	8,99 \pm 1,65 ^{ab}	3,90 \pm 0,866 ^{ab}
70%	20	0,1257 ^a	11,11 \pm 1,79 ^a	5,01 \pm 0,942 ^a

*Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna representam diferença significativa dos valores ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: Autor, 2012.

Estes baixos valores de inibição dos radicais ABTS podem ser atribuídos à característica do β -caroteno em regenerar outro antioxidante, e não a função de doar prótons como os antioxidantes primários. Mesmo assim, todos os filmes desenvolvidos apresentaram atividade antioxidante, podendo ser utilizados como matéria-prima para embalagens ativas antioxidantes.

Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2012) encontraram resultados semelhantes quando desenvolveram filmes antioxidantes de gelatina de pele de peixe incorporados por diferentes óleos essenciais cítricos. Os filmes controle, sem adição dos óleos essenciais, também apresentaram atividade desativadora dos radicais ABTS. Os filmes incorporados por óleo essencial de bergamota apresentaram maior atividade desativadora dos radicais ABTS, $4,33 \pm 0,59$ ($\mu\text{mol TEAC/g}$ filme seco), enquanto o valor de atividade antioxidante de desativação dos radicais ABTS para os filmes adicionados de óleo essencial de limão foi $2,54 \pm 0,33$ ($\mu\text{mol TEAC/g}$ filme seco).

3.3.6 Liberação de β -caroteno dos filmes de metilcelulose

A migração é um processo de transferência de massa através do qual substâncias de baixo peso molecular, inicialmente presentes na embalagem ou filme, são libertados para o produto, como resultado dos processos de dissolução, difusão e equilíbrio (CRANK, 1975; GRACIANO-VERDUGO et al., 2010). O etanol 95% é usualmente utilizado como simulante oleoso de alimentos gordurosos, óleos e gorduras devido a sua similar hidrofobicidade (AKHTAR et al., 2012).

Os perfis de liberação do β -caroteno a partir dos filmes de metilcelulose, com diferentes proporções de nanopartículas de β -caroteno, para o etanol 95% a 20°C, são apresentados na Figura 2, onde os resultados são expressos em função da concentração de β -caroteno liberado por grama de filme. Observa-se, a partir dos resultados obtidos, que o aumento da concentração de nanopartículas de β -caroteno nos filmes, também aumenta a quantidade de β -caroteno liberado. Os valores máximos de β -caroteno liberados foram de 7,68 $\mu\text{g/ml}$, 9,31 $\mu\text{g/ml}$ e 10,93 $\mu\text{g/ml}$ por grama de filme, para filmes com 30, 50 e 70% de nanopartículas, respectivamente.

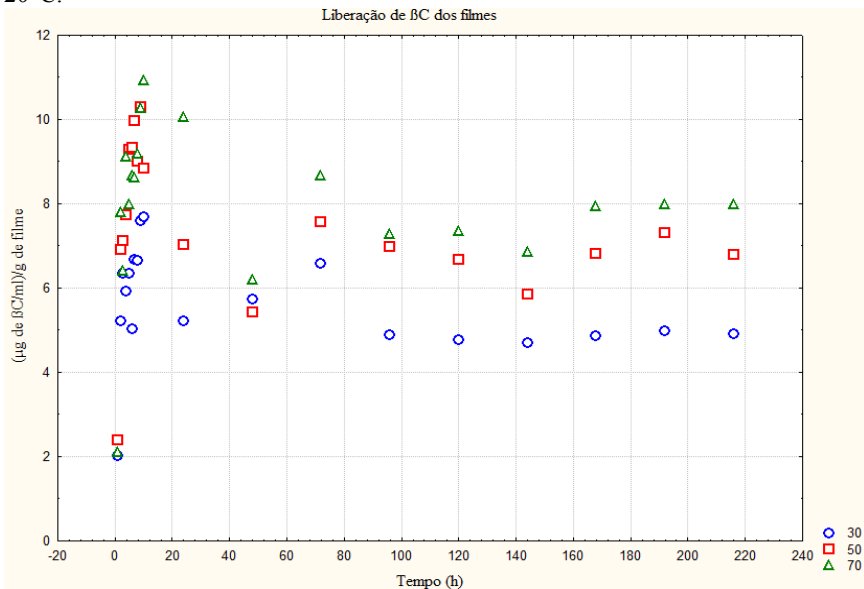
Os filmes adicionados de diferentes porcentagens de nanopartículas apresentaram o mesmo comportamento de liberação do β -caroteno, com a liberação atingindo seu máximo na 10^a hora de contato com o simulante e, a partir de 100 horas de liberação, pode-se observar que a liberação atingiu o equilíbrio. A liberação de altos níveis de β -caroteno foi rápida e este comportamento é atribuído a sua hidrofobicidade e alta afinidade pelo álcool 95%.

Mesmos perfis de liberação e gráficos de difusão foram encontrados por Gemili, Yemenicioğlu e Altınkaya (2010) quando

estudaram a liberação de ácido ascórbico e tirosina a partir de filmes de acetato de celulose durante 300 horas de análise.

Graciano-Verdugo e colaboradores (2010) encontraram diferenças significativas ($P < 0,05$) nos resultados de liberação de α -tocoferol dos filmes de PEBD incorporados por diferentes concentrações do antioxidante. A quantidade de antioxidante nos filmes diminuiu mais de 50% depois de 2 horas de contato com o óleo de milho, para todas as temperaturas analisadas; porém, no óleo o aumento da quantidade de antioxidante não foi mais de 10% do que o esperado no mesmo tempo. Durante a primeira semana, os filmes de PEBD ocorreu uma redução de 90% do conteúdo de α -tocoferol dos filmes, quando submetidos a temperatura de 20°C. Porém, o aumento máximo de α -tocoferol no óleo foi de 63% e 70%, para filmes incorporados por $19,07 \pm 0,55$ e $30,18 \pm 0,39$ mg de α -tocoferol por grama de filme, respectivamente. Atribuíram esta diferença à degradação do α -tocoferol quando em contato com os radicais livres presentes no óleo insaturado.

Figura 2: Concentração de β -caroteno liberada dos filmes para etanol (95%) a 20°C.



Fonte: Autor, 2012.

3.3.7 Ângulo de contato e energia livre superficial

O ângulo de contato é um indicador das propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas dos filmes. Os ângulos de contato assim como a energia livre superficial para todos os filmes de metilcelulose e metilcelulose incorporados por nanopartículas de PCL/ β -caroteno, estão listados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de ângulo de contato e energia livre superficial dos filmes de metilcelulose pura (MC) e metilcelulose incorporados por 30, 50 e 70% de nanopartículas de β -caroteno.

Filmes	Ângulo de contato (°)		Modelo Owens-Wendt		
	Água deionizada	Diiodometano	Energia Superficial Total (mN/M)	γ^{p*} (mN/M)	γ^d (mN/M)
MC	67,08± 1,66 ^a	54,90± 1,03 ^a	43,15	11,64	31,50
30%	51,64± 3,65 ^b	35,42± 1,65 ^b	58,09	16,25	41,83
50%	45,36± 2,50 ^c	31,99± 0,43 ^c	62,50	19,12	43,38
70%	37,24± 0,72 ^d	24,79± 2,51 ^d	68,41	22,18	46,23

γ^{p*} = componente polar e γ^d = componente dispersiva. Valores são dados como média \pm desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) quando analisados pelo teste de Tukey. Fonte: Autor, 2012.

A energia superficial total aumentou com o aumento da proporção de nanosuspensões na formulação dos filmes, mantendo-se constante a concentração de polímero. Tanto a energia superficial dispersiva (γ^d) como polar (γ^p) também aumentaram, em função da maior concentração de surfactantes na matriz do filme, devido a sua característica anfifílica apresentando grupos polares e apolares, contribuiu para um efeito de maior molhabilidade, tanto de líquidos polares, como a água, como de líquidos apolares (dispersivos) como o diiodometano.

No que diz respeito ao ângulo de contato, quando em contato com a água deionizada, os filmes de MC puro apresentaram-se mais hidrofóbicos do que os filmes incorporados por nanopartículas, e o aumento de suspensões de nanocápsulas nos filmes diminuiu o ângulo

de contato, tornando a gota de água mais espalhável, ou seja, filmes mais hidrofílicos.

No entanto, quando em contato com o diiodometano, os filmes de MC puros apresentaram o maior ângulo de contato, e quando adicionou-se nanosuspensões aos filmes o ângulo de contato diminuiu, confirmando o aumento da molhabilidade dos filmes também com solventes apolares, como pode ser visualizado na Figura 4.

De acordo com Rodríguez e colaboradores (2006) quando estudaram filmes de amido incorporados por diversos tipos de surfactantes, Tween 20, Span 80 e Lecitina de soja, os surfactantes aumentaram a propriedade de molhabilidade dos filmes por diminuir a tensão superficial.

3.3.8 Solubilidade em água dos filmes

A solubilidade em água dos filmes pode fornecer indicações sobre o comportamento de um filme em um meio aquoso, incluindo a sua resistência ou degradabilidade sob essas condições (NUNES et al., 2013).

A análise de solubilidade dos filmes foi realizada em um período de 24h. Durante este período foi acompanhado o comportamento dos filmes com diferentes proporções de nanopartículas de β -caroteno. Após 24h, todos os filmes analisados apresentaram-se totalmente solúveis, este comportamento pode ser atribuído a alta hidrofílicidade da metilcelulose. Estes resultados são desejáveis quando o objetivo é obter filmes biodegradáveis.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a encapsulação do β -caroteno foi uma eficiente ferramenta utilizada para facilitar a solubilização deste composto ativo na solução de metilcelulose. A adição das suspensões de nanopartículas proporcionou melhor homogeneidade da solução filmogênica, quando comparado a solução de metilcelulose pura e a solução de metilcelulose adicionada diretamente de β -caroteno .

Através do método de casting foi possível desenvolver filmes de metilcelulose incorporados por suspensões de nanopartículas, em escala de laboratório. Os resultados de análise mecânica nos mostraram que os filmes formulados apresentaram uma diminuição significativa na Força e no módulo de Young, quando se aumentou o conteúdo de nanopartículas em solução, porém filmes muito mais elásticos foram obtidos. Quanto aos parâmetros de cor, os filmes incorporados por nanopartículas de β -caroteno apresentaram coloração amarela. Com relação a transmissão da luz, pode-se inferir a partir dos dados que os filmes incorporados por nanopartículas de β -caroteno, apresentaram-se como uma efetiva barreira a radiação da luz UV.

Estes resultados nos levam a pensar em uma outra forma de aplicar estes filmes, não apenas como filmes para embalagens, devido a redução na resistência mecânica pela incorporação das nanopartículas antioxidantes e alta solubilidade destes filmes, mas também como coberturas para alimentos. Os filmes desenvolvidos poderiam ser utilizados como cobertura para oleaginosas, aumentando sua vida de prateleira, por retardar processos oxidativos, devido a característica de ser barreira a radiação UV e apresentar capacidade de desativação dos radicais ABTS. Assim, estes filmes podem ser promissores materiais para utilização como embalagens ativas, incluindo a conservação e extensão da vida de prateleira de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, E.; SAREMINEZHAD, S.; AZIZI, M.H. The effect of ultrasound treatment on some properties of methylcellulose films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1399 – 1401, 2011.

AKHTAR, M.J.; JACQUOT, M.; JASNIEWSKI, J.; JACQUOT, C.; IMRAN, M.; JAMSHIDIAN, M.; PARIS, C.; DESOBRY, S. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 1150 – 1158, 2012.

ASTM D882-95a. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM International**, Philadelphia, United States, 1995.

BEAULIEU, J.C.; PARK, H.S.; BALLEW MIMS, A.G.; KUK, M.S. Extension of green bell pepper shelf life using oilseed-derived lipid films from soapstock. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 271 – 275, 2009.

CRANK, J. *Mathematics of diffusion* (2nd ed.). London: Clarendon Press, 414 p, 1975.

EMBUSCADO, M.E.; HUBER, K.C. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer. 2009.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.PH.; AMMOURY, N. and BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, R1 – R4, 1989.

GARCÍA, M.A., MARTINO, M.N., ZARITZKY, N.E. Microstructural characterization of plasticized starch-based films. **Journal of Food Process Engineering**, v. 52 (4), p. 118– 124, 2000.

GEMILI, S.; YEMENICIOGLU, A.; ALTINKAYA, S.A. Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 325–332, 2010.

GOUNGA, M.E.; XU, S-Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p. 521 – 530, 2007.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 1, p. 206 – 211, 1992.

GRACIANO-VERDUGO, A.Z.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; CRUZ-ZÁRATE, P.; ISLAS-RUBIO, A.R.; SÁNCHEZ-VALDES, S.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A.; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, N.; GONZÁLEZ-RÍOS, H. Migration of α -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. **Food Research International**, v. 43, p. 1073 – 1078, 2010.

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

IVANOV, V.B.; SHLYAPINTOKH, V.Y. Stabilization of polymers against the effect of light by means of antioxidants. **Polymer Degradation and Stability**, v. 28 (3), p. 249 – 273, 1990.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSAGUAN, W.; TANAKA, M. Antioxidative Activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 449 – 458, 2008.

KESTER, J. J., & FENNEMA, O. Edible films and coatings: a review. **Food Technology** 47-59, 1986.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M.F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 419 – 427, 2012.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; HAMBLETON, A.; LENART, A.; VOILLEY, A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 503 – 510, 2010.

LACROIX, M.; LE TIEN, C. **Innovations in Food Packaging**. Cap. 20. Edible films and coatings from non-starch polysaccharides. Elsevier 2005.

- LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J.M. Improvement of UV stability and mechanical properties of biopolyesters through the addition of β -carotene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2162 – 2168, 2010.
- LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J.M. Improved incorporation and stabilisation of β -carotene in hydrocolloids using glycerol. **Food Chemistry**, v. 125, p. 997 – 1004, 2011.
- MANZANAREZ-LÓPEZ, F.; SOTO-VALDEZ, H.; AURAS, R.; PERALTA, E. Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 508 – 517, 2011.
- MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; BONECHI, C.; LEONE, G.; TOGNAZZI, A.; CONSUMI, M.; MAGNANI, A.; ROSSI, C. Increasing photostability and water-solubility of carotenoids: Synthesis and characterization of β -carotene-humic acid complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, p. 355 – 361, 2010.
- MARTINS, J.T.; CERQUEIRA, M.A.; VICENTE, A.A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 220 – 227, 2012.
- MATTEA, F., MARTÍN, Á., MATÍAS-GAGO, A., & COCERO, M. J. Supercritical anti-solvent precipitation from an emulsion: beta-carotene nanoparticle formation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51(2), p. 238 – 247, 2009.
- MORA-HUERTAZ, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113 – 142, 2010.
- MURILLO-MARTÍNEZ, M.M.; PEDROZA-ISLAS, R.; LOBATO-CALLEROS, C.; MARTÍNEZ-FEREZ, A.; VERNON-CARTER, E.J. Designing $W_1/O/W_2$ double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 577 – 585, 2011.
- NUNES, C.; MARICATO, E.; CUNHA, A.; NUNES, A.; LOPES DA SILVA, J.A.; COIMBRA, M.A. Chitosan-caffeic acid-genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. **Carbohydrate Polymers**, vol. 91, p. 236–243, 2013.

PARK, S. & ZHAO, Y. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1933 – 1939, 2004 .

REDDY, N.; JIANG, Q.; YANG, Y. Preparation and properties of peanut protein films crosslinked with citric acid. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 26 – 30, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Press, 64p. 2001.

RODRÍGUEZ, M., OSÉS, J., ZIANI, K., MATÉ, J.I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible film. **Food Research International**, v. 39, p.840–846, 2006.

ROTTA, J.; OZÓRIO, R.A.; KEHRWALD, A.M.; BARRA, G.M.O, AMBONI, R.D.M.C.; BARRETO, P.L.M. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 619 – 623, 2009.

SALGADO, P.R.; ORTIZ, S.E.M.; PETRUCCELLI, S.; MAURI, A.N. Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 525 – 533, 2010.

SALMIERI, S. & LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 10205 – 10214, 2006.

SEBTI, I.; CHOLLET, E.; DEGRAEVE, P.; NOEL, C. & PEYROL, E. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 693 – 699, 2007.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of na active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 770 – 775, 2010.

SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 102 – 108, 2012.

TAN, C.P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 661 – 671, 2005.

TANG, C.H.; JIANG, Y.; WEN, Q.B.; YANG, X.Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 296 – 307, 2005.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1571–1579, 2012.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M.L.; MERCADO-SILVA, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, E.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1362 – 1368, 2011.

ZHANQUN HOU, MAN ZHANG, BING LIU, QIULI YAN, FANG YUAN, DUOXIA XU, YANXIANG GAO. Effect of chitosan molecular weight on the stability and rheological properties of β -carotene emulsions stabilized by soybean soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 205 – 211, 2012.

