

Sabrina Matos de Carvalho

**INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS  
SÓLIDAS CONTENDO ALFA-TOCOFEROL EM FILMES DE  
ÁLCOOL POLIVINÍLICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.  
Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto.

Florianópolis  
2013

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

Carvalho, Sabrina Matos de

Incorporação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo alfa-tocoferol em filmes de álcool polivinílico / Sabrina Matos de Carvalho ; orientador, Pedro Luiz Manique Barreto - Florianópolis, SC, 2013.  
162 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de PósGraduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. -tocoferol. 3. Nanopartículas lipídicas sólidas. 4. Embalagem antioxidante. 5. Álcool polivinílico. I. Barreto, Pedro Luiz Manique. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de PósGraduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Sabrina Matos de Carvalho

**INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS  
SÓLIDAS CONTENDO ALFA-TOCOFEROL EM FILMES DE  
ÁLCOOL POLIVINÍLICO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 09 de agosto de 2013.

---

Prof.<sup>a</sup> Roseane Fett, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

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

---

Prof. Marcos Antônio Villetti, Dr.  
Universidade Federal de Santa Maria

---

Prof.<sup>a</sup> Sílvia Maria Martelli, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Prof. Marcos Antônio Segatto Silva, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Edna Regina Amante, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Luiz Henrique Beirão, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico este trabalho aos meus pais,  
Vera Lúcia Matos de Carvalho (*in  
memorian*) e José Carlito de Carvalho  
e a Carlos Dufour.



## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade.

À Capes pela bolsa concedida.

À Fapesc pelo financiamento.

Ao professor Dr. Pedro Luiz Manique Barreto pela oportunidade, orientação, confiança, incentivo e amizade.

Aos membros avaliadores, Dr. Marcos Antônio Villetti, Dra. Sílvia Maria Martelli, Dr. Marcos Antônio Segatto, Dra. Édna Regina Amante pela dedicação e pela contribuição, em especial ao Dr. Luiz Henrique Beirão pelo apoio, por me aceitar como orientada no início deste caminho.

A todos os (as) professores (as) do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pelo conhecimento compartilhado e pela infraestrutura disponibilizada, em especial à professora Dra. Édna Regina Amante (Laboratório de Frutas e Hortaliças) e ao professor Dr. Ernani Sant'Anna (Laboratório de Biotecnologia Alimentar).

Ao professor Dr. Paulo José Ogliari pela pronta ajuda na análise estatística.

Ao professor Dr. Josiel Barbosa Domingos por ceder gentilmente o equipamento Nanozetasizer e à equipe do Laboratório de Catálise Biomimética do Departamento de Química da UFSC, especialmente aos alunos Bruno e Welman, pela atenção e ajuda.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) pela infraestrutura disponibilizada e aos técnicos Luciano, Eliane e Renata pela ajuda prestada.

À Marly Silveira Soldi pela ajuda com as análises térmicas e ao Dr. Ismael Casagrande Bellettini pela ajuda com a análise de fluorescência e com Origin.

À Epagri, em especial ao Dr. Fabiano Bertoldi, pelo empréstimo do homogenizador de alta pressão.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial ao Bento Acácio e ao Sérgio Souza.

Aos amigos Regina Torres, Marcelo de Rezende, Eunice Ilha, Renata Ozório, Roberto Derner, Geisi Balsamo, Ana Cristina Prado, Valéria Limberger, Andressa Gazola e Cléia Canatto pelo incentivo e apoio.

Aos meus queridos (as) colegas e amigos (as) de laboratório, Carolina Noronha, Renata Lino, Vanessa Webber, Cleonice da Rosa, Matheus Maciel, Caroline Floriani, Gabriela Rocha, Bruna Jummes, Amanda Fernandes, Isabella da Silva e Ana Paula Zapelini pela ajuda, por estarem sempre perto, por dividirem seus conhecimentos, experiências, histórias de vida.

A todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho e,

À Deus, minha família e ao Carlos pelo incentivo, segurança, apoio e amor..

Muito obrigada!!!



*“Sê todo em cada coisa.  
Põe quanto és,  
No mínimo que fazes.”*  
Fernando Pessoa



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes poliméricos a base de álcool polivinílico incorporados com nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol e avaliar a possibilidade de seu uso como embalagens ativas antioxidantes para preservação de alimentos. As nanopartículas lipídicas contendo  $\alpha$ -tocoferol foram preparadas pela técnica da homogeneização à alta pressão. A metodologia de superfície de resposta foi empregada para avaliar a influência das concentrações de  $\alpha$ -tocoferol e dos surfactantes Lipoid S75 e Pluronic F68 sobre a recuperação total do  $\alpha$ -tocoferol, diâmetro médio de partícula e potencial zeta, a fim de se obter condições ótimas para o preparo das nanopartículas. Foram também avaliadas a estabilidade das dispersões através do diâmetro médio de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão e recuperação total do  $\alpha$ -tocoferol pelo período de 21 dias em temperaturas de 6, 20 e 40 °C. A formulação ótima foi caracterizada quanto à morfologia das partículas e através de análises de raios-X e calorimetria exploratória diferencial. As condições ótimas para a encapsulação do  $\alpha$ -tocoferol foram obtidas com 1,1% (m/v) de  $\alpha$ -tocoferol, 0,75% (m/v) de Lipoid S75 e 1,3% (m/v) de Pluronic F68, com valores experimentais de 75,4%, 214,5 nm e -41,9 mV para recuperação total do  $\alpha$ -tocoferol, diâmetro médio de partícula e potencial zeta, respectivamente. Esta preparação foi estável durante 21 dias de estocagem a 6 °C. O lipídeo sólido (behenato de glicerila) modificou sua natureza cristalina da forma  $\beta'$  polimórfica em sua forma pura para  $\alpha$  e  $\beta'$  polimórfica na forma de nanopartícula. Os filmes de álcool polivinílico foram desenvolvidos pela técnica de *casting* com a adição de três diferentes proporções de nanopartículas e foram caracterizados através de análise de fluorescência, transmissão de luz e opacidade, atividade antioxidante, liberação do  $\alpha$ -tocoferol em etanol 95%, bem como morfologia, espectroscopia no infravermelho, raios-X, propriedades térmicas, propriedades mecânicas e ângulo de contato. A adição de nanopartículas nos filmes de álcool polivinílico diminuiu significativamente a tensão na ruptura, o módulo de elasticidade e a elongação e aumentou a espessura dos mesmos, tornando os filmes menos rígidos e elásticos. Os filmes com nanopartículas se apresentaram mais hidrofílicos quando comparados com o filme controle. Foram observadas alta atividade antioxidante e propriedades de barreira contra a luz UV e visível. Além disso, houve uma liberação rápida e

sustentada do  $\alpha$ -tocoferol para o simulador de alimentos. O espectro no infravermelho e as análises térmicas dos filmes mostraram que a incorporação das nanopartículas com antioxidante afetou a estrutura química dos filmes com o estabelecimento de novas ligações químicas e diminuição da cristalinidade.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -Tocoferol. Nanopartículas lipídicas sólidas. Embalagem antioxidante. Álcool polivinílico.

## ABSTRACT

The aim of this study was to develop polymeric films based on poly (vinyl alcohol) incorporated with solid lipid nanoparticles containing  $\alpha$ -tocopherol and evaluate the possibility of their use as antioxidative packaging in food preservation. Lipid nanoparticles containing  $\alpha$ -tocopherol were prepared by homogenization at high pressure. The response surface methodology was used to evaluate the influence of the concentrations of  $\alpha$ -tocopherol and of the surfactants Lipoid S75 and Pluronic F68 on  $\alpha$ -tocopherol recovery rate, mean particle size and zeta potential, in order to obtain optimal conditions for preparation of nanoparticles. We also assessed the stability of dispersions from through mean particle size, zeta potential, polydispersity index, and  $\alpha$ -tocopherol recovery rate for 21 days at temperatures of 6, 20 and 40 °C. The optimal formulation was characterized as the morphology of the particles and through x-ray analysis and differential scanning calorimetry. The optimum conditions for the encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol were obtained at 1.1% (w/v) of  $\alpha$ -tocopherol, 0.75% (w/v) of Lipoid S75 and 1.3% (w/v) of Pluronic F68, and the experimental values of 75.4%, 214.5 nm, and -41.9 mV for  $\alpha$ -tocopherol recovery rate, mean particle size, and zeta potential, respectively. This preparation was stable during 21 days of storage at 6 °C. The solid lipid (glyceryl behenate) changed its crystalline nature of the  $\beta'$  polymorphic form in its pure form for  $\alpha$  and  $\beta'$  polymorphic form when nanoparticle. The poly (vinyl alcohol) films were developed by "casting" with the addition of three different ratios and the nanoparticles were characterized by fluorescence analysis, light transmission and opacity, antioxidant activity,  $\alpha$ -tocopherol release in fat food simulant, as well as morphology, infrared spectroscopy, X-ray, thermal properties, mechanical properties and contact angle. The addition of nanoparticles into films of poly (vinyl alcohol) significantly reduced stress, elastic modulus, and elongation and increased the thickness, making the films less rigid and elastic. Films with nanoparticles showed more hydrophilic compared to the control film. We observed a high antioxidant activity and barrier properties against UV and visible light. In addition, there was a burst and sustained release of  $\alpha$ -tocopherol in the food simulant. The infrared spectrum and thermal analysis of the films showed that incorporation of nanoparticles with antioxidant affected the chemical structure of the films with the establishment of new chemical bonds and decreased crystallinity.

**Keywords:**  $\alpha$ -tocopherol. Solid lipid nanoparticles. Antioxidant packaging. Polyvinyl alcohol.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** Estruturas dos tocoferóis (A) e tocotrienóis (B). 37
- Figura 2** Estrutura das nanoemulsões líquidas (à esquerda) e nanopartículas lipídicas sólidas (à direita) carregando um composto bioativo lipofílico, estabilizadas por uma camada de surfactante. 42
- Figura 3** Homogenizador de alta pressão APLAB-10 (Artepeças, Brasil). 43
- Figura 4** Estrutura química do PVA (A) parcialmente hidrolisado, (B) completamente hidrolisado. 49

### CAPÍTULO 2

- Figure 1** X-ray diffraction patterns of bulk Compritol® 888 CG ATO (A), lecithin (B),  $\alpha$ -TC-loaded SLN (C), and  $\alpha$ -TC-free SLN (D). 83
- Figure 2** DSC analysis of Compritol® 888 CG ATO (C), poloxamer 188 (D), and  $\alpha$ -TC-free SLN (B) and  $\alpha$ -TC-loaded SLN (A). 85
- Figure 3** Transmission electron microscopy (TEM) of an  $\alpha$ -TC-loaded SLN (left) and an  $\alpha$ -TC-free SLN (right). 87

### CAPÍTULO 3

- Figura 1** Espectros de fluorescência. A) Tocoferol degradado; B) filme de PVA controle, C) PV/TC-NL30, D) PV/TC-NL50 e E) PV/TC-NL70. 108
- Figura 2** Gráfico da emissão máxima em 326 nm. A) filme de PVA controle, B) PV/TC-NL30, C) PV/TC-NL50 e D) PV/TC-NL70. 109
- Figura 3** Atividade desativadora (%) do radical DPPH (%) para 1mg de filmes de PVA controle e PV/TC-NL 30, 50 e 70. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão (teste de Tukey). 111
- Figura 4** Atividade desativadora (%) do radical ABTS (%) para 1 mg de filmes de PVA controle e PV/TC-NL 30, 50 e 70. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão (teste de Tukey). 112
- Figura 5** Concentração de  $\alpha$ -Tocoferol liberada em etanol 95% a 20°C em função do tempo. 114

### CAPÍTULO 4

- Figura 1** Micrografias da superfície (coluna da esquerda) e seção transversal (coluna da direita) dos filmes: A) filme de PVA puro, B) PV/TC-NL 30, C) PV/TC-NL 50, D) PV/TC-NL 70. 136

<b>Figura 2</b> Espectro no infravermelho dos filmes controle de PVA (A), PV/TC-NL 30 (B), PV/TC-NL 50 (C) e PV/TC-NL 70 (D).	140
<b>Figura 3</b> Difractogramas dos filmes PVA controle (A), PV/TC-NL 30 (B), PV/TC-NL 50 (C), PV/TC-NL 70 (D) e $\alpha$ -TC-NLS (dentro).	143
<b>Figura 4</b> Curvas termogravimétricas dos filmes de PVA controle, PV/TC-NL 30, PV/TC-NL 50 e PV/TC-NL 70.	145
<b>Figura 5</b> Curvas de DSC dos filmes de PVA controle (A), PV/TC-NL 30 (B), PV/TC-NL 50 (C), PV/TC-NL 70 (D) e $\alpha$ -TC-NLS (dentro).	147



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

**Table 1** - Central composite design parameters obtained for various runs and experimental values of particle size,  $\alpha$ -tocopherol recovery rate, and zeta potential of  $\alpha$ -tocopherol-loaded SLNs. 76

**Table 2** - Analysis of variance of the regression coefficients of the fitted quadratic equations for the particle size (Y1),  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (Y2), and zeta potential (Y3) as a function of the independent variables. 80

**Table 3** - DSC parameters of bulk Compritol® 888 CG ATO,  $\alpha$ -TC-loaded SLNs, and  $\alpha$ -TC-free SLNs. 84

**Table 4** - PCS diameters (Z-ave), polydispersity index and zeta potential of developed  $\alpha$ -TC-free SLN and  $\alpha$ -TC-loaded-SLN formulations obtained on days 1, 7, 14 and 21 of storage at different temperatures (6, 20 and 40 °C). 89

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1** Características de transmissão de luz e opacidade para filmes controle e PV/TC-LN. 110

### CAPÍTULO 4

**Tabela 1** Ângulo de contato ( $^{\circ}$ ), energia livre superficial ( $\gamma$ ) dos filmes incorporados com  $\alpha$ -TC-NLS para os três diferentes líquidos. 137

**Tabela 2** Parâmetros termogravimétricos dos filmes de PVA. 144

**Tabela 3** Eventos endotérmicos dos filmes de PVA e PV/TC-NL. 148

**Tabela 4** Medidas de espessura, módulo de Young (EM), tensão na ruptura (TS) e alongação na ruptura (%E) dos filmes de PVA puro e incorporados com diferentes concentrações de  $\alpha$ -TC-NLS. 149



## LISTA DE ABREVIATURAS

% E	Porcentagem alongação na ruptura
$\alpha$ -TC	$\alpha$ -tocoferol/ <i><math>\alpha</math>-tocopherol</i>
$\alpha$ -TC-NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo $\alpha$ -TC
$\alpha$ -TC-loaded SLN	<i>Solid lipid nanoparticles loaded <math>\alpha</math>-TC</i>
ABTS	<i>2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
ANOVA	Análise de variância/ <i>analysis of variance</i>
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CCD	<i>Central composite design</i> /delineamento composto central
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Coef.	<i>Coefficient</i>
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> /Difração a laser
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> /calorimetria diferencial de varredura
EM	Módulo de elasticidade ou Módulo de Young
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HAP	Homogeneização em alta pressão
HPH	<i>High pressure homogenization</i>
IP	Índice de polidispersão
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
nm	<i>nanometer</i> /nanômetro
PCS	<i>Photon correlation spectroscopy</i> /espectroscopia de correlação de fótons
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PI	<i>Polydispersity index</i>
PLA	Poli(ácido lático)
PP	Polipropileno
PVA	Álcool polivinílico/ <i>poly (vinyl alcohol)</i>
PV/TC-NL	Filmes de PVA incorporados com $\alpha$ -TC-NLS
PV/TC-LN	<i>PVA films incorporating with <math>\alpha</math>-TC-loaded SLN</i>
$R^2$	Coefficient of determination
RMN	Ressonância magnética nuclear
RSM	<i>Response surface methodology</i>
SE	<i>Standart error</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>

SLN	<i>Solid lipid nanoparticles</i>
TBHQ	t-Butil-hidroquinona
TEAC	<i>Trolox equivalent</i>
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
TGA	Análise termogravimétrica
TS	Tensão na ruptura
UV	Ultravioleta
Z-ave	<i>Mean particle size</i> /diâmetro médio de partícula
$\gamma^d$	Energia livre superficial dispersiva (apolar)
$\gamma^p$	Energia livre superficial polar
$\gamma^T$	Energia livre superficial total
$\zeta$	<i>Zeta potential</i> /potencial zeta

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>30</b>
1.1 EMBALAGENS ATIVAS	32
1.2 EMBALAGENS ANTIOXIDANTES	33
1.3 $\alpha$ -TOCOFEROL	35
1.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	39
1.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA A PARTIR DAS NLS	46
1.6 ÁLCOOL POLIVINÍLICO	48
1.7 NANOCOMPÓSITOS	51
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 2 - OPTIMIZATION OF <math>\alpha</math>-TOCOPHEROL LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES BY CENTRAL COMPOSITE DESIGN</b>	<b>68</b>
1 INTRODUCTION	72
2 MATERIALS AND METHODS	73
<b>2.1 Materials</b>	<b>73</b>
<b>2.2 Preparation of <math>\alpha</math>-tocopherol-loaded SLNs</b>	<b>74</b>
<b>2.3 Experimental design optimization</b>	<b>74</b>
<b>2.4 Statistical analysis</b>	<b>75</b>
<b>2.5 Physical-chemical evaluations</b>	<b>77</b>
2.5.1 <i>Particle size, polydispersity index and zeta potential determination</i>	77
2.5.2 <i>Transmission electron microscopy (TEM)</i>	77
2.5.3 <i>Differential scanning calorimetry (DSC)</i>	77
2.5.4 <i>X-ray diffraction</i>	77
2.5.5 <i>Determination of <math>\alpha</math>-tocopherol content, recovery, and entrapment efficiency</i>	78
2.5.6 <i>Chromatographic Analysis</i>	78
2.5.7 <i>Stability studies</i>	79
3 RESULTS AND DISCUSSION	79
<b>3.1 Optimization of conditions for preparing <math>\alpha</math>-tocopherol-loaded SLNs</b>	<b>79</b>
<b>3.2 X-ray diffraction analysis</b>	<b>82</b>
<b>3.3 Differential scanning calorimetry (DSC)</b>	<b>84</b>
<b>3.4 Particle morphology</b>	<b>86</b>
<b>3.5 Stability studies</b>	<b>88</b>

4	CONCLUSION	90
	ACKNOWLEDGMENTS	91
	REFERENCES	91
	<b>CAPÍTULO 3 - ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE LIBERAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FILMES DE PVA INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS</b>	
	<b>CONTENDO <math>\alpha</math>-TOCOFEROL</b>	<b>96</b>
1	INTRODUÇÃO	100
2	MATERIAL E MÉTODOS	102
2.1	<b>Matérias-primas</b>	<b>102</b>
2.2	<b>Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas contendo <math>\alpha</math>-tocopherol</b>	<b>102</b>
2.3	<b>Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas contendo <math>\alpha</math>-tocopherol</b>	<b>103</b>
2.4	<b>Preparação dos filmes</b>	<b>103</b>
2.5	<b>Análise de fluorescência</b>	<b>104</b>
2.6	<b>Transmissão de luz e opacidade</b>	<b>104</b>
2.7	<b>Determinação da atividade antioxidante</b>	<b>104</b>
2.7.1	<i>Método DPPH</i>	105
2.7.2	<i>Método ABTS</i>	105
2.8	<b>Liberação do <math>\alpha</math>-TC a partir dos filmes de PVA incorporados com <math>\alpha</math>-TC-NLS</b>	<b>106</b>
2.9	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência</b>	<b>106</b>
2.10	<b>Análise estatística</b>	<b>107</b>
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
3.1	<b>Caracterização das <math>\alpha</math>-TC-NLS</b>	<b>107</b>
3.2	<b>Análise de fluorescência</b>	<b>107</b>
3.3	<b>Transmissão de luz e opacidade</b>	<b>109</b>
3.4	<b>Atividade antioxidante</b>	<b>110</b>
3.5	<b>Teste de liberação</b>	<b>113</b>
4	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	115
	<b>CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, MECÂNICA E TÉRMICA DE FILMES DE PVA INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO <math>\alpha</math>-TOCOFEROL</b>	<b>122</b>
1	INTRODUÇÃO	126
2	MATERIAL E MÉTODOS	128
2.1	<b>Matérias-primas</b>	<b>128</b>

<b>2.2</b>	<b>Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas contendo <math>\alpha</math>-tocopherol</b>	<b>128</b>
<b>2.3</b>	<b>Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas contendo <math>\alpha</math>-tocopherol</b>	<b>129</b>
<b>2.4</b>	<b>Preparação dos filmes</b>	<b>129</b>
<b>2.5</b>	<b>Análises estruturais dos filmes</b>	<b>130</b>
2.5.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	130
2.5.2	<i>Determinação do ângulo de contato</i>	130
2.5.3	<i>Determinação da energia livre superficial</i>	130
2.5.4	<i>Especroscopia no infravermelho</i>	131
2.5.5	<i>Difratometria de raios-X</i>	131
<b>2.6</b>	<b>Análises térmicas</b>	<b>132</b>
2.6.1	<i>Análise termogravimétrica</i>	132
2.6.2	<i>Calorimetria exploratória diferencial</i>	132
<b>2.7</b>	<b>Medidas de espessura dos filmes</b>	<b>132</b>
<b>2.8</b>	<b>Propriedades mecânicas</b>	<b>132</b>
<b>2.9</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>133</b>
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	133
<b>3.1</b>	<b>Caracterização das <math>\alpha</math>-TC-NLS</b>	<b>133</b>
<b>3.2</b>	<b>Análise morfológica</b>	<b>134</b>
<b>3.3</b>	<b>Determinação do ângulo de contato e da energia livre superficial</b>	<b>136</b>
<b>3.4</b>	<b>Especroscopia no infravermelho</b>	<b>138</b>
<b>3.5</b>	<b>Difratometria de raios-X</b>	<b>141</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise termogravimétrica</b>	<b>142</b>
<b>3.8</b>	<b>Propriedades mecânicas</b>	<b>147</b>
4	<b>CONCLUSÃO</b>	149
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>150</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>160</b>





## INTRODUÇÃO

A propriedade mais importante das embalagens destinadas para alimentos é a proteção efetiva do produto alimentício contra fatores externos até o momento do seu consumo. A preocupação dos consumidores e das indústrias com a qualidade e segurança dos alimentos levou ao desenvolvimento das embalagens ativas, as quais podem carrear compostos bioativos, que são liberados com a finalidade de proteger os alimentos das degradações químicas e microbiológicas (HAN, 2005; ROONEY, 2005).

No caso das embalagens adicionadas de antioxidantes, a liberação destes compostos nos alimentos tem a finalidade de prevenir e/ou retardar o processo de oxidação (HAN, 2005; LEE, 2005; WESSLING et al., 1999). O processo de oxidação, a principal causa de deterioração em alimentos à base de lipídeos, tem como consequência o desenvolvimento da rancidez oxidativa, caracterizada por modificações na cor, sabor e aroma do alimento, que levam geralmente à rejeição do produto, além da diminuição da qualidade nutricional com consequências importantes para a saúde (BREWER, 2011; NDHLALA; MOYO; VAN STADEN, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006; VAN AARDT et al., 2004; TUCKER, 2003). A oxidação pode ser retardada através da adição de antioxidantes naturais ou sintéticos, seja como aditivo alimentar, ou indiretamente pela difusão através do material da embalagem (TUCKER, 2003; VAN AARDT et al., 2004).

Os antioxidantes sintéticos e os naturais são amplamente utilizados em produtos alimentícios, no entanto, alguns antioxidantes sintéticos tornaram seu uso controverso devido aos potenciais efeitos adversos sobre a saúde humana. As fontes naturais de antioxidantes, tais como os tocoferóis, têm sido aplicadas extensivamente na indústria de alimentos (SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006), uma vez que são substâncias geralmente reconhecidas como seguras para os produtos alimentares (VERMEIREN et al., 1999; SOZER; KOKINI, 2009).

A vitamina E é um nutriente e antioxidante lipossolúvel que pode efetivamente eliminar os radicais peróxil lipídicos e atuar como sinergista com outros antioxidantes, tais como ácido ascórbico e carotenóides (BREWER, 2011; NDHLALA; MOYO; VAN STADEN, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010). A vitamina E possui vários isômeros, incluindo o  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TC), que é a forma mais abundante na natureza (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; BYUN et al.,

2011; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; HATANAKA et al., 2010). Esta forma é amplamente utilizada na suplementação de vitamina E e como um antioxidante pelas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; HATANAKA et al., 2010; YOO et al., 2006). No entanto, além de termolábeis e sensíveis à presença de oxigênio, o fato desses compostos serem insolúveis em água torna seu uso problemático nas formulações de alimentos e filmes para embalagens (CHEONG et al., 2008; WEISS et al., 2008; YOO et al., 2006; TAN; NAKAJIMA, 2005).

Neste contexto, a nanotecnologia oferece potencial para proteção de algumas propriedades dos compostos bioativos (KHAYATA et al., 2012; ZIANI; FANG; MCCLEMENTS, 2012; SOZER; KOKINI, 2009; CHEONG et al., 2008; WEISS et al., 2008; MOZAFARI et al., 2006; DINGLER et al., 1999). As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são partículas constituídas de lipídeos no estado sólido com diâmetro entre 50-1000 nm, as quais são dispersas em água ou soluções aquosas com surfactantes (MEHNERT; MÄDER, 2012).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) aumentam o potencial de aplicação dos compostos pelo aumento na biodisponibilidade dos mesmos e proteção às reações de degradação química e representam uma alternativa aos carreadores coloidais tradicionais para encapsulação de vitaminas, antioxidantes e outros compostos ativos lipossolúveis (SWATHI et al., 2010; TRUJILLO; WRIGHT, 2010; CHEONG et al., 2008; WEISS et al., 2008; MOZAFARI et al., 2006; SAUPE; RADES, 2006; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; DINGLER et al., 1999). De acordo com o acima exposto, o  $\alpha$ -TC pode ser um candidato para o encapsulamento em sistemas de NLS.

A produção de NLS é mais comumente realizada pelo método de homogeneização à alta pressão (HAP). HAP tem emergido como um método eficiente para a preparação de NLS e tem sido utilizado para emulsionar, dispersar, misturar e processar os produtos em várias áreas industriais, tais como produtos químicos e farmacêuticos, alimentícios e biotecnológicos (MEHNERT; MÄDER, 2012; SAUPE; RADES, 2006; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

As propriedades físico-químicas das NLS são controladas por muitos fatores, tais como a natureza e concentração dos lipídeos e surfactantes e concentração do composto ativo (SOUTO et al., 2011). Nestas situações, em que diversas variáveis podem influenciar as propriedades do sistema, a metodologia de superfície de resposta (RSM) se torna uma ferramenta adequada para avaliar as relações entre estas variáveis (fatores) e as propriedades (respostas), tornando possível

alcançar uma formulação adequada para preparação das partículas (CALADO; MONTGOMERY, 2003; BAS; BOYACI, 2007).

O composto ativo encapsulado na própria embalagem parece uma abordagem promissora, pela possibilidade de maior proteção e liberação dos mesmos de forma mais controlada (SOZER; KOKINI, 2009). As tendências atuais indicam crescimento na utilização de plásticos biodegradáveis com o aumento da disponibilidade de materiais adequados e pela demanda social e legislativa (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; TANG; ALAVI, 2011; SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010). No entanto, polímeros biodegradáveis a partir de fontes fósseis são comumente usados para aplicações em embalagens. Um exemplo deste tipo de polímero é o álcool polivinílico (PVA), um polímero solúvel em água que tem atraído o interesse para a produção de materiais plásticos ecológicos e tem sido utilizado em uma grande gama de aplicações industriais, comerciais, de alimentos e farmacêutica (TANG; ALAVI, 2011).

O objetivo do presente estudo foi determinar as condições ideais para produção das NLS contendo  $\alpha$ -tocoferol e incorporá-las em filmes de PVA, avaliando a influência da adição de diferentes proporções das NLS nas propriedades dos filmes. Primeiramente, o delineamento composto central (CCD) foi utilizado para investigar a influência da concentração dos surfactantes hidrofílico e lipofílico e da concentração de  $\alpha$ -tocoferol sobre o diâmetro médio das partículas, potencial zeta e taxa de recuperação de  $\alpha$ -tocoferol. A formulação escolhida como ideal foi avaliada por calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios-x, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e estudo de estabilidade. Em seguida, as NLS contendo o antioxidante foram adicionadas em diferentes proporções a filmes de PVA e caracterizadas por diferentes técnicas, a fim de avaliar a influência das nanopartículas sobre as propriedades térmicas, estruturais e mecânicas dos filmes, bem como avaliar sua capacidade antioxidante e perfil de liberação do  $\alpha$ -tocoferol.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol e incorporá-las em filmes de álcool polivinílico.

### Objetivos específicos

- Desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol pelo método de homogeneização à alta pressão;
- Utilizar o planejamento composto central para avaliar o efeito da concentração dos surfactantes lecitina de soja e poloxamer 188 e do composto ativo sobre as respostas: diâmetro médio de partícula, potencial zeta e taxa de recuperação do  $\alpha$ -tocoferol;
- Caracterizar a formulação com melhor combinação das respostas através das determinações do diâmetro de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação, taxa de recuperação do  $\alpha$ -tocoferol, bem como das análises de calorimetria exploratória diferencial, difração de raios-X e microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -TC, bem como da formulação controle (sem incorporação de  $\alpha$ -TC), através das determinações do diâmetro de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e taxa de recuperação do  $\alpha$ -tocoferol durante 21 dias em três diferentes temperaturas (6, 20 e 40 °C);
- Desenvolver filmes de álcool polivinílico utilizando diferentes proporções de nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol, pelo método de casting;
- Avaliar a influência das diferentes concentrações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol sobre a capacidade antioxidante, perfil de liberação do  $\alpha$ -tocoferol no simulante de alimentos e propriedades ópticas dos filmes de álcool polivinílico;

- Avaliar a estabilidade do  $\alpha$ -tocoferol nos diferentes filmes através da análise de fluorescência;
- Avaliar a influência das diferentes concentrações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol sobre as propriedades estruturais dos filmes, através da microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de infravermelho, difração de raios-X, ângulo de contato e energia livre superficial;
- Avaliar as propriedades térmicas dos diferentes filmes através da análise termogravimétrica e da análise de calorimetria exploratória diferencial;
- Caracterizar os filmes quanto às propriedades mecânicas.



**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**





## 1.1 EMBALAGENS ATIVAS

A evolução qualitativa da embalagem está diretamente relacionada com a evolução dos alimentos embalados e dos materiais utilizados para este fim. Nos países industrializados, a embalagem alimentar é responsável por metade do total de embalagens produzidas, o que se deve ao crescente aumento de alimentos pré-preparados e conservados, favorecendo a sua distribuição a distâncias maiores, bem como para exportação (ANDRADE, 2003).

As alterações químicas e microbiológicas na composição dos alimentos durante o transporte e armazenamento geralmente ocasionam uma diminuição da qualidade do produto (JONGJAREONRAK et al., 2008). A propriedade mais importante das embalagens é a proteção efetiva contra ações exteriores, fornecendo ao consumidor um alimento de qualidade igual aos produtos frescos ou mantendo a qualidade dos alimentos ao final do seu processamento (JONGJAREONRAK et al., 2008; ROONEY, 2005; ANDRADE, 2003; VERMEIREN; DEVLIEGHERE; DEVEBERE, 2002; AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000). Desse modo, uma embalagem aumenta a segurança do alimento, servindo como barreira às contaminações microbiológicas e químicas (AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000) e, além disso, cumpre importante papel de contenção, conveniência e comunicação aos consumidores (JAMSHIDIAN; TEHRANY; DESOBRY, 2012; ROBERTSON, 2010).

Nas embalagens convencionais, o material de embalagem deve ser compatível com o produto alimentar (ANDRADE, 2003) é selecionado de modo a possuir uma interação mínima com o alimento que acondiciona, constituindo barreiras inertes entre o alimento e o ambiente (AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000); a embalagem não deve transmitir aromas ou odores, assegurando as características sensoriais do alimento e nem possuir substâncias solúveis com efeitos tóxicos (ANDRADE, 2003). Entretanto, diversos sistemas de embalagem vêm sendo desenvolvidos visando a interação desejável com o alimento. Estes novos sistemas de embalagem foram denominados de “embalagens ativas”, termo aplicado pela primeira vez por Labuza (1987) (ROONEY, 2005) e definido por Rooney (1995) como uma embalagem inovadora que realiza algumas funções desejadas na preservação dos alimentos além de fornecer uma barreira contra o ambiente externo (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; JONGJAREONRAK et al., 2008; ROONEY, 2005; AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000). Entretanto, este termo não deve ser

confundido com "embalagens inteligentes", as quais informam ou comunicam ao consumidor as atuais condições dos alimentos ou registros de sua história (ROONEY, 2005). A pesquisa e desenvolvimento de embalagens ativas foram consolidados por Rooney (1995) e tem por objetivo aumentar a vida útil dos produtos embalados mantendo a sua qualidade, segurança e propriedades sensoriais, sem adição direta dos componentes ativos ao produto (CAMO et al., 2011; BYUN; KIM; WHITESIDE, 2010; ROONEY, 2005; VERMEIREN; DEVLIEGHERE; DEVEBERE, 2002). Isto reflete a preocupação dos consumidores pela qualidade e segurança dos alimentos (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000; ROONEY, 1995), os quais demonstram interesse crescente por produtos minimamente processados e sensorialmente similares aos alimentos *in natura* (AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000).

As embalagens ativas possuem várias funções adicionais, entre as quais está a absorção de compostos que favorecem a deterioração; a liberação de compostos, tais como antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, aromatizantes, corantes, condimentos e nutracêuticos, para o produto alimentício; e o monitoramento da vida útil (JAMSHIDIAN; TEHRANY; DESOBRY, 2012; CAMO et al., 2011; NORAJIT; KIM; RYU, 2010; AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000). A propriedade escolhida para a embalagem ativa é aquela mais crítica de determinado alimento, ou seja; que se constitui no fator limitante mais relevante para a qualidade e vida útil do mesmo, buscando ajustar as propriedades da embalagem para satisfazer as exigências do alimento (ROONEY, 2005).

As embalagens ativas estão ganhando o interesse de pesquisadores e da indústria devido ao seu potencial para fornecer e manter a qualidade dos alimentos, com os benefícios de segurança. Porém, de acordo com Camo et al. (2011) e Cooksey (2010) a evolução da embalagem ativa antimicrobiana tem sido amplamente relatada, mas estudos sobre embalagens ativas antioxidantes são mais raros.

## 1.2 EMBALAGENS ANTIOXIDANTES

O processo de oxidação representa a principal causa de deterioração em alimentos lipídicos, especialmente os que contêm ácidos graxos poli-insaturados, e tem como consequência o desenvolvimento da rancidez oxidativa, caracterizada pela diminuição da qualidade dos alimentos pelo aumento do desenvolvimento de ranço com a formação de sabores e odores estranhos (*off-flavors*), polimerização e outras reações que reduzem a vida útil, o valor nutritivo

e a qualidade sensorial do produto alimentar. Além disso, a oxidação está associada na patogênese de numerosas doenças e outras implicações, tais como câncer, doenças cardiovasculares, inflamatórias, processo de envelhecimento, entre outros (BREWER, 2011; NDHLALA; MOYO; VAN STADEN, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006; VAN AARDT et al., 2004; TUCKER, 2003; YOSHIDA; NIKI; NOGUCHI, 2003).

A rancidez oxidativa pode ser induzida por sistemas catalíticos como luz, temperatura, enzimas e metais, envolvendo a reação entre as cadeias insaturadas dos ácidos graxos presentes nos alimentos lipídicos com o oxigênio molecular via mecanismo autocatalítico, formando os produtos primários da oxidação, os hidroperóxidos, que não possuem sabores nem odores. Posteriormente, a degradação dos hidroperóxidos originam compostos carbonilados de massa molecular mais baixa, tais como os aldeídos, cetonas e álcoois, os quais apresentam limites de percepção muito baixos, responsáveis pelo odor desagradável dos produtos rançosos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; SHAHIDI; ZHONG, 2005; NOGALA-KALUCKA et al., 2005; HRAS et al., 2000).

A oxidação pode ser retardada através do controle da temperatura, luz, oxigênio, utilização de embalagens adequadas (MOZAFARI et al., 2006; GUPTA, 2000; HRAS et al., 2000) e a adição de antioxidantes naturais ou sintéticos (BREWER, 2011; NDHLALA; MOYO; VAN STADEN, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006; GUPTA, 2000; HRAS et al., 2000), seja como aditivo direto, ou indiretamente pela difusão através do material da embalagem (VAN AARDT et al., 2004; TUCKER, 2003). Com base neste conceito, os antioxidantes podem ser incorporados em filmes de embalagem e serem liberados para prevenir e/ou retardar o processo de oxidação em alimentos, contribuindo para a preservação da qualidade dos mesmos (BYUN; KIM; WHITESIDE, 2010; SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; LEE, 2005; HAN, 2005; VERMEIREN et al., 1999; WESSLING et al., 1999), sendo este o princípio básico do conceito de embalagem ativa antioxidante.

Uma vez que a oxidação é frequentemente iniciada na superfície do alimento, a embalagem antioxidante é um meio promissor para proteger a superfície deste da rancidez e prolongar a vida útil do produto alimentício (JONGJAREONRAK et al., 2008; LEE et al., 2004). O mecanismo proposto para atividade antioxidante a partir da embalagem ativa envolve, em um primeiro momento, a difusão do composto ativo através da matriz polimérica até sua sorção na superfície do produto embalado (LEE et al., 2004).

Os antioxidantes também têm sido usados nas áreas relacionadas à saúde, devido a sua habilidade em proteger os sistemas biológicos contra os danos causados pelos radicais livres, atuando na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças crônicas, como diferentes tipos de câncer, doenças cardiovasculares ateroscleróticas, obesidade, diabetes e disfunção cerebral (SHAHIDI; ZHONG, 2010; CASTRO et al., 2005).

Os antioxidantes podem ser classificados, de acordo com seu mecanismo de ação, em antioxidantes primários, os quais podem inibir ou interromper a reação em cadeia da oxidação pela doação de elétrons ou átomo de hidrogênio aos radicais livres, produzindo produtos estáveis; e antioxidantes secundários, os quais retardam o processo de oxidação por mecanismos diversos (MOZAFARI et al., 2006; SHAHIDI; ZHONG 2005).

Os antioxidantes primários incluem compostos fenólicos, tais como os tocoferóis, butilhidroxitolueno (BHT); butilhidroxianisol (BHA); galato de propila, de octila e de dodecila; *t*-butilhidroquinona (TBHQ). Os antioxidantes secundários atuam por uma variedade de mecanismos, tais como agentes quelantes de metais (ácidos cítrico, málico e tartárico), removedores de oxigênio (ácido ascórbico, palmitato de ascorbila), conversão de hidroperóxidos em espécies não radicais (fosfolipídios), absorção por radiação UV ou desativação do oxigênio singlete (carotenóides) (SHAHIDI; ZHONG 2010; MOZAFARI et al., 2006; SHAHIDI; ZHONG 2005).

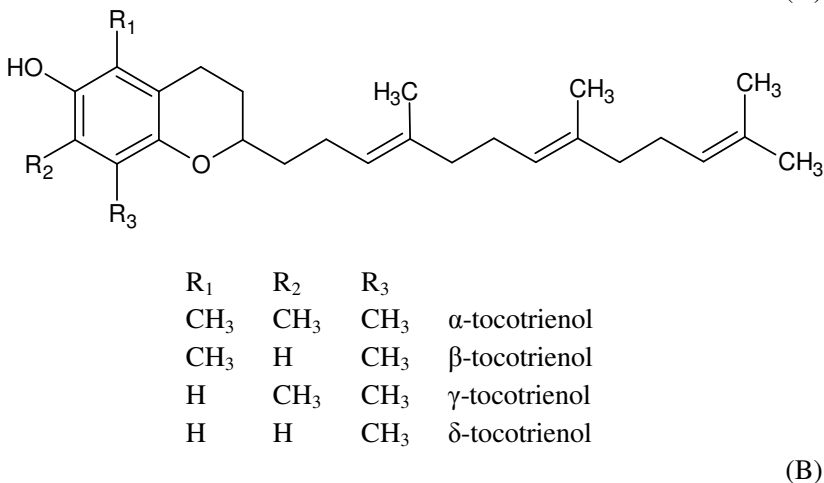
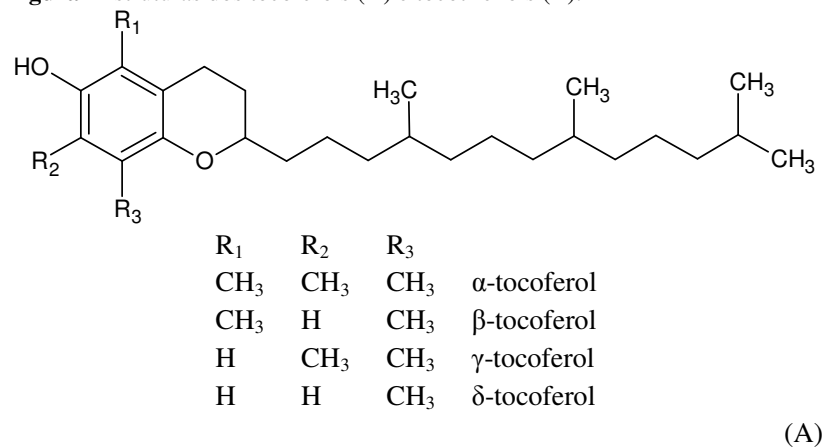
Os antioxidantes sintéticos e os naturais são amplamente utilizados em produtos alimentícios; no entanto, alguns antioxidantes sintéticos tornaram seu uso controverso devido aos potenciais efeitos adversos sobre a saúde humana. Assim, antioxidantes sintéticos como o BHA, BHT e TBHQ estão sendo substituídos extensivamente na indústria de alimentos por fontes naturais de antioxidantes (GARGIULO et al, 2013;. SHAHIDI; ZHONG, 2010; JONGJAREONRAK et al., 2008; YEN; YANG; MAU, 2008; MOZAFARI et al, 2006;. HAN, 2005), que são reconhecidos como substância segura para os produtos alimentares (SOZER; KOKINI, 2009; VERMEIREN et al, 1999).

### 1.3 $\alpha$ -TOCOFEROL

Evans e Bishop (1922) descreveram a vitamina E como um fator essencial para a reprodução normal em ratos. Em 1936 dois compostos ativos da vitamina E foram isolados de óleo de gérmen de trigo, designados  $\alpha$  e  $\beta$ -tocoferol, termo derivado das palavras gregas “tocos”

(parto), “phorein” (conceber) e “ol” (álcool). Mais tarde, dois tocoferóis,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol bem como os tocotrienóis foram isolados de óleos vegetais comestíveis (BRAMLEY et al., 2000; KAMAL-ELDIN; APPELQVIST, 1996), e hoje são conhecidos oito diferentes isômeros, sendo quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis (ZIANI; FANG; MCCLEMENTS, 2012; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; HATANAKA et al., 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2005; YOSHIDA; NIKI; NOGUCHI, 2003; BRAMLEY et al., 2000).

A molécula de vitamina E pode ser dividida em duas partes, um sistema aromático hidroxilado - um anel fenólico e um heterocíclico, chamado de anel cromanol - responsável por suas propriedades antioxidantes, e também uma cadeia lateral ramificada saturada com 16 carbonos (tocoferol) ou insaturada com três duplas ligações na cadeia lateral (tocotrienol), para a orientação da vitamina E na membrana lipídica. Os quatro tocoferóis e tocotrienóis diferem no número de grupamentos metila junto ao anel heterocíclico e são designados  $\alpha$  (5, 7, 8-trimetil),  $\beta$  (5, 7-dimetil),  $\gamma$  (7, 8-dimetil) e  $\delta$  (8-metil) (Figura 1) (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2005; MOORE et al., 2003; YOSHIDA; NIKI; NOGUCHI, 2003; KAMAL-ELDIN; APPELQVIST, 1996). A atividade e biodisponibilidade dos isômeros variam de acordo com suas estruturas e propriedades físico-químicas (HATANAKA et al., 2010).

**Figura 1** Estruturas dos tocoferóis (A) e tocotrienóis (B).

Fonte Shahidi e Zhong (2005).

A vitamina E é um nutriente que ocorre naturalmente em óleo de soja, outros óleos vegetais e destilados do processo de desodorização (SHAHIDI; ZHONG, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2005; EVANS; KODALI; ADDIS, 2002). Os tocoferóis estão presentes nos óleos vegetais poli-insaturados na forma livre (DIAZ et al, 2004; SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2000), nas oleaginosas, carnes e partes verdes dos vegetais superiores, enquanto os tocotrienóis são encontrados no gérmen e farelo de sementes e cereais e no óleo de palma (JAMSHIDIAN et al.,

2012; YOSHIDA; NIKI; NOGUCHI, 2003). Os  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferóis ocorrem como misturas em óleos vegetais e são os antioxidantes naturais mais importantes presentes nas gorduras (HRAS et al., 2000).

A atividade antioxidante dos tocoferóis é devida, principalmente, à sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, interrompendo a etapa de propagação da reação em cadeia (JAMSHIDIAN et al., 2012; SHAHIDI; ZHONG, 2010; BRAMLEY et al., 2000). Estes compostos previnem o desenvolvimento de doenças tais como: cardiovasculares, cânceres, processos inflamatórios, desordens neurológicas, degeneração macular relacionada com a idade, catarata, entre outras, além de possuir papel importante na manutenção do sistema imune (GAMBOA; GONÇALVES; GROSSO, 2011; SHUKAT; RELKIN, 2011; BRAMLEY et al., 2000), proteção das células da pele na prevenção contra o envelhecimento, tratamento de psoríase e dermatoses (BORODINA; GRIGORIEV; MARKVICHEVA, 2011).

Os tocoferóis são líquidos viscosos de cor geralmente amarela claro (sintéticos) ou marrom (concentrado natural). São solúveis em óleo e, portanto, totalmente solúveis em solventes lipofílicos e insolúveis em água (SHUKAT; RELKIN, 2011; SHAHIDI; ZHONG, 2005). O  $\alpha$ -TC é um composto lipossolúvel e o isômero mais abundante encontrado na natureza (BARBOSA-PEREIRA et al., 2013; JAMSHIDIAN et al., 2012; ZIANI; FANG; MCCLEMENTS, 2012; BYUN et al., 2011; MANZANAREZ-LÓPEZ et al., 2011; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010; YOSHIDA; NIKI; NOGUCHI, 2003; BRAMLEY et al., 2000), sendo amplamente utilizado como suplemento de vitamina E e como antioxidante pelas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; GAMBOA; GONÇALVES; GROSSO, 2011; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; HATANAKA et al., 2010; YOO et al., 2006).

Martins, Cerqueira e Vicente (2012) avaliaram os efeitos da adição de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TC) em filmes a base de quitosana e observaram um aumento da atividade antioxidante dos mesmos com uma inibição do radical DPPH de aproximadamente 97%, além de outros efeitos positivos nas propriedades do filme.

Manzanarez-Lopez et al. (2011) reportaram que a difusão de  $\alpha$ -TC através do filme de ácido polilático (PLA) para o óleo de soja foi capaz de retardar a indução da oxidação do mesmo quando estocado a 20 e 30 °C. Os autores sugeriram que o sistema PLA/ $\alpha$ -TC pode ser usado para proteção de óleos armazenados a temperatura ambiente.

Byun et al. (2010) também adicionaram  $\alpha$ -TC ao filme de PLA e obtiveram atividade de inibição do radical DPPH de 90,4%.

Graciano-Verdugo et al. (2010) determinaram a migração do  $\alpha$ -TC, adicionado a filme de polietileno de baixa densidade (PEBD), para o óleo de milho. Através do monitoramento do conteúdo de hexanal no óleo os pesquisadores observaram que os filmes adicionados de  $\alpha$ -TC se mantiveram estáveis pelo período aproximado de 16 semanas a 30 °C.

Granda-Restrepo et al. (2009) mostraram que a migração de  $\alpha$ -TC a partir de um filme multicamada (polietileno de alta densidade, etileno vinil álcool e polietileno de baixa densidade) foi capaz de retardar a oxidação lipídica de leite em pó integral, especialmente nas temperaturas de 30 e 40 °C.

Jongjareonrak et al. (2008) observaram que a oxidação de banha de porco foi prevenida de maneira eficaz quando coberta com filme de gelatina incorporado com BHT e  $\alpha$ -TC. De acordo com Wessling, Nielsen e Leufven (2000) a incorporação de alta concentração de  $\alpha$ -TC em filmes de LDPE foi necessária para inibir a oxidação de uma emulsão de ácido linoleico armazenada a 6 °C em contato com o filme.

Entretanto, o fato de estes compostos serem insolúveis em água torna seu uso problemático em formulações alimentícias (WEISS et al., 2008; YOO et al., 2006; TAN; NAKAJIMA, 2005), podendo acarretar em biodisponibilidade insuficiente (CHEONG et al., 2008). Além disso, o  $\alpha$ -TC é lentamente oxidado na presença de oxigênio, luz, temperaturas elevadas e metais, como a prata e ferro (GAMBOA; GONÇALVES; GROSSO, 2011).

Para contornar esta limitação, a nanotecnologia oferece para a indústria alimentícia o potencial para proteger e melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de compostos bioativos e lipofílicos, como o  $\alpha$ -tocoferol, através da nanoencapsulação dos mesmos (KHAYATA et al. 2012; ZIANI, FANG, MCCLEMENTS, 2012; SOZER; KOKINI, 2009; CHEONG et al., 2008; WEISS et al., 2008; MOZAFARI et al., 2006; DINGLER et al., 1999).

#### 1.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Os compostos com pouca ou nenhuma solubilidade em água apresentam desafios relacionados com suas tendências à agregação em ambientes aquosos, ocasionando limitada biodisponibilidade (TRUJILLO; WRIGHT, 2010). A nanotecnologia refere-se à pesquisa e desenvolvimento tecnológico em níveis atômicos, moleculares e macromoleculares com a finalidade de produzir e utilizar estruturas,



dispositivos e sistemas que tenham novas propriedades e funções devido ao seu tamanho em escala nanométrica (FARHANG, 2007).

Muitos métodos de encapsulação são utilizados para proteger os antioxidantes nos alimentos e a nanoencapsulação envolve a incorporação destes em pequenas cápsulas com diâmetros submicrométricos. Os sistemas de nanoencapsulação baseados em lipídeos estão entre as tecnologias de encapsulação mais promissoras em desenvolvimento na área de nanotecnologia e têm se mostrado adequados para a encapsulação de antioxidantes lipofílicos como os tocoferóis (MOZAFARI et al., 2006).

Dentre os sistemas carreadores coloidais tradicionais – nanoemulsões, nanosuspensões, lipossomas e micro- e nanopartículas poliméricas – as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) representam uma alternativa (HAO et al., 2011; SWATHI et al. 2010; MARCATO, 2009; SAUPE; RADES, 2006; FREITAS; MÜLLER, 1999; SCHWARZ; MEHNERT, 1997) para encapsulação de vitaminas, antioxidantes e outros compostos bioativos, uma vez que melhoram o potencial de aplicação dos compostos pelo aumento na biodisponibilidade dos mesmos e proteção das reações de degradação química (SWATHI et al., 2010; TRUJILLO; WRIGHT, 2010; CHEONG et al., 2008; WEISS et al., 2008; MOZAFARI et al., 2006; SAUPE; RADES, 2006; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; DINGLER et al., 1999).

As NLS foram introduzidas no início da década de 90 (HAO et al., 2011; NANJWADE et al., 2011; SWATHI et al. 2010; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SCHWARZ; MEHNERT, 1997) e tiveram a primeira formulação patenteada por Müller e Lucks em 1996 (SAUPE; RADES, 2006), quando estes pesquisadores desenvolveram um método de produção de NLS por homogeneização à alta pressão para encapsular, proteger e liberar componentes lipofílicos funcionais (HELGASON et al., 2009).

Estes sistemas de partículas, tipicamente com dimensões na faixa de 50-1000 nm (NANJWADE et al., 2011; VITORINO et al., 2011; KHERADMANDNIA et al., 2010; SINHA et al., 2010; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; ZUR MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998), são constituídos basicamente de uma matriz lipídica sólida (lipídeo sólido à temperatura ambiente), na qual o composto ativo está incorporado, de surfactante (s) e de água. Estes componentes são considerados biodegradáveis, fisiológicos e geralmente reconhecidos como seguros (GRAS - *generally recognized as safe*), o que diminui o risco de citotoxicidade (MEHNERT; MÄDER, 2012; SEVERINO;

ANDREANI; SANTANA, 2012; NANJWADE et al., 2011; VITORINO et al., 2011; KHERADMANDNIA et al., 2010; TRUJILLO; WRIGHT, 2010; SINHA et al., 2010; SWATHI et al. 2010; LOVEDAY; SINGH, 2008; WEISS et al., 2008; LAI et al., 2006; SAUPE; RADES, 2006; JENNING; LIPPACHER; GOHLA, 2002; ZUR MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998). Apresentam cerca de 10-100 vezes menos toxicidade do que as partículas poliméricas (MARCATO, 2009), permitindo seu uso através de diversas vias de administração, como oral, parentérica, dérmica, transdérmica, ocular, pulmonar e retal (WANG et al., 2012; FARBOUD; NASROLLAHI; TABBAKH, 2011; HAO et al., 2011; FANGUEIRO et al., 2012; VITORINO et al., 2011; KHERADMANDNIA et al., 2010; SINHA et al., 2010; SWATHI et al. 2010; SAUPE; RADES, 2006; WISSING; MÜLLER, 2003; DINGLER et al., 1999). O estudo como potenciais carreadores de pesticidas ecológicos para uso na agricultura também já foi reportado (LAI et al., 2006).

Segundo Mehnert e Mäder (2012), compostos ativos e fármacos com diferentes graus de lipofilicidade e estrutura geral têm sido estudados para incorporação em NLS, entre os quais estão oxazepam, diazepam, cortisona, betametasona, retinol, prednisolona, timolol, pilocarpina, progesterona, hidrocortisona, camptotecina, aciclovir, ciclosporina, vitamina E, tetracaína, entre outros.

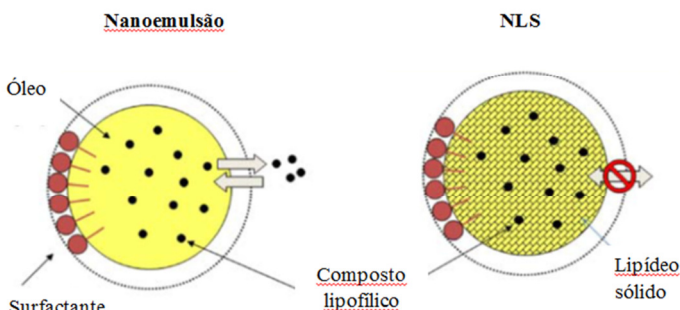
Além da excelente tolerabilidade e encapsulação de compostos ativos lipofílicos, outras vantagens das NLS frente a outros sistemas carreadores coloidais incluem encapsulação de compostos hidrofílicos (GHADIRI et al., 2011); proteção de ativos lábeis frente à degradação; estabilidade física, possibilidade de melhorar a eficiência de encapsulação e controlar a liberação do princípio ativo; capacidade de produção e esterilização das formulações em larga escala; a não utilização de solventes orgânicos dependente do método de escolha (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; MEHNERT; MÄDER, 2012; VITORINO et al., 2011; SINHA et al., 2010; SWATHI et al., 2010; TRUJILLO; WRIGHT, 2010; SAUPE; RADES, 2006) e matérias-primas e custos de produção relativamente baixos (NANJWADE et al., 2011; SINHA et al., 2010; SWATHI et al. 2010).

Na preparação das NLS, os parâmetros que influenciam nas características físico-químicas das partículas são tipo e concentração do lipídeo, tipo e concentração dos surfactantes hidrofílicos e lipofílicos, método utilizado para produção das mesmas e concentração do princípio ativo (SOUTO et al., 2011). Além disso, a capacidade desses sistemas de incorporar o ativo depende das características de solubilidade, da sua

miscibilidade no lipídeo fundido, estrutura química do lipídeo e das propriedades cristalinas lipídicas (Figura 2) (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

Muitos métodos de preparação das NLS estão descritos na literatura, incluindo microemulsificação, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, homogeneização à alta pressão, entre outros. Entretanto, o método mais viável para uma produção em larga escala é o método de homogeneização à alta pressão (HAP) (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; SWATHI et al., 2010; MARCATO, 2009; SAUPE; RADES, 2006; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

**Figura 2** Estrutura das nanoemulsões líquidas (à esquerda) e nanopartículas de lipídicas sólidas (à direita) carregando um composto bioativo lipofílico, estabilizadas por uma camada de surfactante.



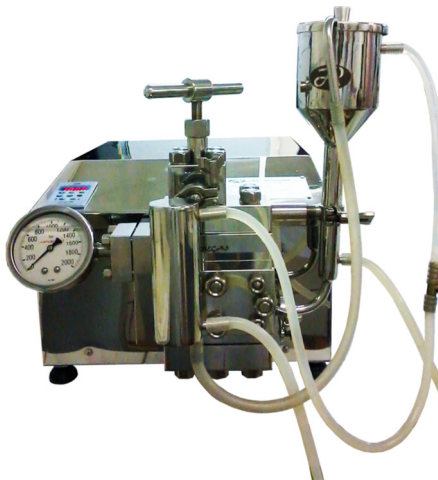
**Fonte** Weiss et al. (2008).

Este método tem emergido como uma técnica eficiente para a preparação de NLS e tem sido utilizado para emulsionar, dispersar, misturar e processar produtos em várias áreas da indústria, tais como química, farmacêutica, alimentícia e biotecnológica. HAP pode ser realizada em temperaturas elevadas, denominada HAP a quente, ou em temperaturas abaixo da ambiente, HAP a frio (MEHNERT; MÄDER, 2012; SAUPE; RADES, 2006; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000)

O método de homogeneização à alta pressão, a quente, proposto por Müller e Lucks (1996) constitui em um dos métodos para preparação de NLS por fusão-emulsificação, no qual ocorre a fusão prévia do lipídeo e a incorporação do princípio ativo por dissolução ou

por dispersão, formando a fase orgânica. Nesta fase é frequente incorporar fosfolipídeos, como a lecitina. A fase orgânica é então dispersa em uma fase aquosa contendo surfactante (s) do tipo O/A, formando uma pré-emulsão, que será transferida ao homogenizador de alta pressão. No homogenizador a pré-emulsão é submetida a uma pressão elevada (100-2000 bar) e forçada através de uma cavidade estreita (25-30  $\mu\text{m}$ ), sendo acelerada com alta velocidade (cerca de 1000  $\text{km.h}^{-1}$ ) a uma distância muito curta, ocorrendo colisões que formarão as nanopartículas. A nanodispersão obtida é resfriada à temperatura ambiente para cristalização do lipídeo e formação das partículas. Cada homogeneização corresponde a um ciclo e, na maioria dos casos, são suficientes entre 3 e 5 ciclos para alcançar o diâmetro desejado das partículas (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; MEHNERT; MÄDER, 2012; SINHA et al., 2010; SWATHI et al., 2010; WEISS et al., 2008; SOUTO et al., 2011; MARCATO, 2009; SAUPE; RADES, 2006). Na Figura 3 pode ser observado o homogenizador de alta pressão APLAB-10 (Artepeças, Brasil).

**Figura 3** Homogenizador de alta pressão APLAB-10 (Artepeças, Brasil).



**Fonte** autor (2013).

Alguns dos principais inconvenientes das NLS são as transições polimórficas que os lipídeos sólidos podem sofrer durante o armazenamento, uma vez que possuem estrutura cristalina, levando a formação de cristais perfeitos e expulsão do composto ativo, ou seja, limitando a capacidade de incorporação e induzindo à liberação

imprevisível do composto encapsulado que, em geral, situa-se no espaço entre as cadeias dos lipídeos. Para aplicação das NLS pela indústria torna-se necessário o controle do polimorfismo (SWATHI et al., 2010; HELGASON et al., 2009; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; HEURTAULT et al., 2003; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; FREITAS; MÜLLER, 1999).

O polimorfismo lipídico acontece devido aos numerosos graus de empacotamentos das cadeias laterais dos ácidos graxos em uma determinada organização das cadeias de hidrocarbonetos (SINHA et al., 2010; BUNJES; UNRUH, 2007; TEERANACHAIDEEKUL; MÜLLER; JUNYAPRASERT, 2007; MCGAULEY; MARANGONI, 2002). Os ácidos graxos de cadeia longa são os que frequentemente apresentam comportamento polimórfico e tendem a cristalizar em duas ou três diferentes formas,  $\alpha$  e  $\beta'$ , ou  $\alpha$ ,  $\beta'$  e  $\beta$ , respectivamente. A forma  $\alpha$  (hexagonal) é a mais desordenada e menos estável e a forma  $\beta$  (tricíclica) é a mais organizada e mais estável. As transformações de  $\alpha$  para  $\beta'$  (ortorrômbica) e desta para  $\beta$  ocorrem nesta ordem e são irreversíveis (SOUTO et al., 2011; MARCATO, 2009; BUNJES; UNRUH, 2007; LONG et al., 2006; SOUTO; MEHNERT; MÜLLER, 2006). Quanto mais estável a forma polimórfica ( $\beta$ ) adquirida pela dispersão durante a armazenagem, menor será sua estabilidade e a incorporação do princípio ativo (SOUTO et al., 2011).

O behenato de glicerila, uma mistura atomizada de mono-, di- e tribehenato de glicerila (18, 53 e 27% em peso, respectivamente), apresenta um ponto de fusão entre 69 e 74 °C (BRUBACH et al., 2007) e exibe polimorfismo complexo e dependente de diversos parâmetros, como taxa de cristalização e temperatura de estocagem. Compritol® 888 CG ATO (behenato de glicerila) é um produto comercial formado principalmente por ésteres de ácido behênico (C22) (> 83%), porém, outros ácidos graxos estão presentes (C16 < 3,0%, C18 < 5,0%, C20 < 10,0%, C22:1 < 1,0%, and C24 < 3,0%). Por serem lipídeos de composição mais complexa, sua forma polimórfica mais estável é a  $\beta'$  (desordem intermediária) o que confere grau de empacotamento lipídico menor, formação de cristais com mais imperfeições, e assim, com mais espaço para acomodar as moléculas do princípio ativo, impedindo que o mesmo seja expulso da partícula (PARASHAR et al., 2011; SOUTO et al., 2011; HEURTAULT; SCHUBER; FRISCH, 2010; SWATHI et al. 2010).

O tipo e a concentração de surfactantes presentes na formulação possuem papel importante nas características das NLS. Existe uma grande variedade de surfactantes iônicos e não-iônicos

(estereoquímicos), com diferentes massas moleculares, que tem sido utilizada para estabilizar as NLS. Entre os aniônicos estão os fosfolipídeos, tais como as lecitinas de soja e de ovo e a fosfatidilcolina. Os não-iônicos incluem os diferentes tipos de poloxamers (188, 182, 407, 908) e os polissorbatos (20, 60 e 80), e os anfifílicos, os sais biliares ou colatos (colato de sódio, glicocolato de sódio, taurocolato de sódio, desoxitaurocolato de sódio) (SWATHI et al. 2010; SAUPE; RADES, 2006; MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998); estes compostos influenciam no diâmetro da partícula e na estabilidade das dispersões alcançados ao final do processo de homogeneização. Concentrações suficientes de surfactantes atuam na diminuição da tensão interfacial e estabilizam superfícies formadas durante a homogeneização, levando a menores diâmetros de partícula (SOUTO et al., 2011; SWATHI et al. 2010; WEISS et al., 2008; BUNJES; KOCH; WESTESEN, 2000).

De acordo com Mehnert e Mäder (2012), as NLS estabilizadas com misturas de agentes tensoativos como Lipoid S75 (lecitina)/poloxamer 188 ou tyloxapol/lecitina têm mostrado menores diâmetros de partículas e maior estabilidade durante o armazenamento em comparação com as formulações contendo apenas um surfactante. Isto se deve às forças de interação repulsivas que os surfactantes iônicos (lecitina) fornecem - as cargas elétricas na superfície das partículas - que impedem a aproximação das partículas e consequente agregação, floculação e coalescência, mantendo o sistema num estado termodinâmico mais estável. Além disso, a escolha apropriada do surfactante ou combinação de surfactantes e a concentração adequada destes podem controlar o processo de cristalização (SOUTO et al., 2011; SWATHI et al. 2010; WEISS et al., 2008; BUNJES; KOCH; WESTESEN, 2000).

As NLS são um sistema complexo devido ao estado físico dos lipídeos. A caracterização apropriada das NLS se torna necessária para controle da qualidade do produto. A estabilidade das dispersões tem sido investigada intensivamente através da determinação do diâmetro das partículas, por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), difração a laser (DLS) e microscopia eletrônica; da carga elétrica, pela medida do potencial zeta (PCS); do grau de cristalinidade e modificação lipídica, por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X (DRX); coexistência de estruturas coloidais como micelas e lipossomas, por ressonância magnética nuclear (RMN) (MEHNERT; MÄDER, 2012; PARASHAR et al., 2011; SINHA et al., 2010; SWATHI et al. 2010; SAUPE; RADES, 2006; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000)

A espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também denominada como espalhamento dinâmico de luz, mede a flutuação de intensidade do espalhamento de luz causado pelo movimento das partículas. Este método é uma boa ferramenta para caracterização das nanopartículas, mas não é adequado para detecção de partículas maiores que 3  $\mu\text{m}$ , as quais podem ser detectadas por difração a laser (DLS). A microscopia eletrônica fornece informação direta sobre a forma das partículas; no entanto, algumas modificações podem ocorrer nas partículas em decorrência da preparação da amostra para análise morfológica (MEHNERT; MÄDER, 2012; SAUPE; RADES, 2006; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). O aumento do diâmetro das partículas está diretamente relacionado com o índice de recristalização do lipídeo (MARCATO, 2009).

A medida do potencial zeta é um indicativo da estabilidade das dispersões coloidais durante a estocagem. Os valores de potencial zeta maiores do que  $\pm 30$  mV indicam partículas altamente carregadas (negativa ou positivamente), proporcionando dispersões fisicamente estáveis devido a repulsão eletrostática imposta pelas cargas (MEHNERT; MÄDER, 2012; SAUPE; RADES, 2006; FREITAS; MÜLLER, 1999). Porém, este conceito não se aplica a sistemas que contêm estabilizantes estéricos, pois a adsorção dos mesmos diminui a valor de potencial zeta devido a modificações no plano de cisalhamento da partícula (MEHNERT; MÄDER, 2012; SWATHI et al. 2010; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

As medidas de cristalinidade e modificação lipídica são necessárias, pois estão intimamente relacionadas com a incorporação do composto ativo e sua taxa de liberação (MEHNERT; MÄDER, 2012; SAUPE; RADES, 2006). DSC e DRX são técnicas amplamente usadas para investigar o estado sólido dos lipídeos. DSC oferece informações sobre comportamento de fusão e cristalização dos constituintes sólidos e líquidos das partículas, e utiliza o fato de que diferentes modificações lipídicas possuem pontos de fusão e entalpias de fusão diferentes. Por meio da DRX podemos identificar compostos cristalinos específicos através da avaliação do comprimento dos espaçamentos curtos e longos dos cristais lipídicos (MEHNERT; MÄDER, 2012; DAS; CHAUDHURY, 2010; SWATHI et al. 2010; SAUPE; RADES, 2006; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

## 1.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA A PARTIR DAS NLS

Sistemas de liberação controlada foram primeiramente desenvolvidos e extensivamente utilizados em aplicações farmacêuticas e posteriormente em alimentos e embalagens (HWANG et al., 2013; GEMILI; YEMENICIOĞLU; ALTINKAYA, 2010). A liberação controlada pode ser definida como um método pelo qual fármacos, nutrientes e outros compostos ativos são disponibilizados, a partir da matriz encapsulante, em local e por períodos específicos, com uma taxa controlada de liberação, evitando a utilização não eficaz e a perda de compostos ativos durante as etapas de processamento. Quando realizados com sucesso, estes sistemas se constituem em uma das principais vantagens de sistemas micro e nanoparticulados (POTHAKAMURY; BARBOSA-CÁNOVAS, 1995; WEISS et al., 2008; AZEREDO, 2005).

Geralmente, a liberação de substâncias ativas a partir da matriz pode ser baseada em um ou em uma combinação de três diferentes mecanismos, a difusão, a erosão e o intumescimento; entretanto, os dois últimos ocorrem com mais frequência em carreadores hidrofílicos, tais como carboidratos e proteínas. Sendo assim, os modelos matemáticos com base no mecanismo de difusão são os discutidos para carreadores baseados em lipídeos (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012). Na liberação controlada por difusão o composto ativo é liberado por difusão através do polímero (sistema carreador), ou através dos poros pré-existentes na matriz (POTHAKAMURY; BARBOSA-CÁNOVAS, 1995).

O mecanismo de liberação por difusão pode ocorrer como transporte Fickiano, não Fickiano ou anômalo e transporte do tipo II (ordem zero). A equação simplificada (Equação 1), descrita por Higuchi (1961), é a forma mais conhecida para descrever a liberação de um composto ativo a partir de uma matriz.

$$\frac{M_t}{M_0} = K \cdot t^{1/2} \quad (1)$$

onde,  $M_t$  é a quantidade absoluta do composto ativo liberado por área no tempo  $t$ , e  $K$  é uma constante (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012).

Muitas variáveis podem influenciar a liberação do bioativo a partir do material encapsulante. Em geral, a taxa de liberação do composto ativo depende principalmente das interações entre o ativo e o material encapsulante. Porém, outras variáveis que podem influenciar na



liberação incluem a solubilidade e difusão do composto ativo no encapsulante, a degradação/erosão da matriz da nanopartícula, o polimorfismo do lipídeo, a geometria e o diâmetro das partículas, entre outros (WEISS et al., 2008; MOHANRAJ; CHEN, 2006; AZEREDO, 2005). A liberação pode ocorrer subitamente ou pode ser controlada por modificações nos parâmetros do processo que regulam o diâmetro das partículas, o volume ou diâmetro dos poros ou a área de superfície da nanopartícula (AZEREDO, 2005). Em muitos casos é observada a rápida liberação do composto ativo a partir das NLS.

Zur Mühlen, Schwarz e Mehnert (1998) incorporaram os fármacos tetracaína, etomidato e prednisolona em sistemas de NLS pelo método de HAP e avaliaram o perfil e o mecanismo de liberação dos ativos a partir deste nanocarreador. Os pesquisadores observaram uma rápida liberação inicial (100% em menos de 1 minuto) da tetracaína e etomidato, a qual foi atribuída ao aumento da superfície de contato das nanopartículas e a incorporação dos fármacos na parede das partículas. Por outro lado, a prednisolona mostrou uma liberação prolongada a partir das NLS (5 semanas). Estes dados demonstram que as NLS podem ser adequadas para formulações com liberação prolongada de ativos.

Kheradmandnia et al. (2010) incorporaram cetoprofeno em NLS utilizando cera de abelha e de carnaúba e investigaram o comportamento da liberação do fármaco neste sistema. Os autores observaram uma liberação rápida inicial durante a primeira hora seguida por uma liberação sustentada. A liberação inicial também foi justificada pelo diâmetro das nanopartículas, o qual aumentou a superfície de contato. Hao et al. (2011) avaliaram o comportamento de liberação *in vitro* de uma formulação de NLS incorporada com cloranfenicol, para uso oftálmico, e observaram também uma rápida liberação inicial do fármaco seguida por uma liberação prolongada (mais de 48 h).

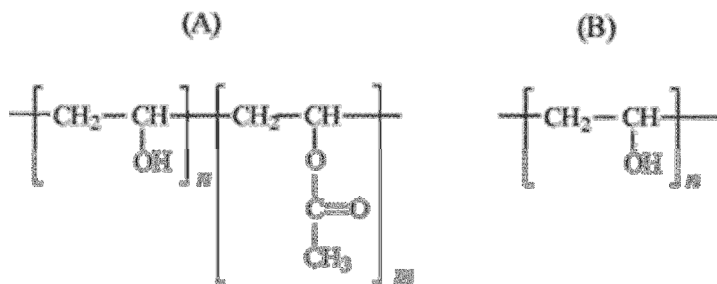
## 1.6 ÁLCOOL POLIVINÍLICO

Os polímeros sintéticos derivados do petróleo, tais como o poliestireno, polipropileno e polietileno, são amplamente utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica, na área biomédica e na agricultura. Porém, o fato de não serem degradáveis torna sua utilização crítica devido à poluição ambiental originada pela escassez de aterros, emissões durante a incineração e problemas relacionados ao ambiente marinho. Desta forma, nas últimas duas décadas têm sido estudadas e aplicadas alternativas para reduzir os resíduos sólidos produzidos pelos

plásticos derivados do petróleo. As tendências indicam um aumento na utilização dos materiais biodegradáveis, indicado pelo aumento da disponibilidade de materiais adequados e pela demanda social e legislativa (KUCHAIYAPHUM et al., 2013; THELLEN; CHENEY; RATTO, 2013; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; MARTINS, CERQUEIRA, VICENTE, 2012; TANG, ALAVI, 2011; SIRIPATRAWAN, HARTE, 2010). No entanto, alguns polímeros biodegradáveis podem ser provenientes de fontes fósseis e utilizados como materiais de embalagem biodegradáveis. Um exemplo deste tipo de polímero é o álcool polivinílico (THELLEN; CHENEY; RATTO, 2013; TANG; ALAVI, 2011; SIN et al., 2010).

O álcool polivinílico ou poli (álcool vinílico), PVA, é um polímero hidrofílico sintético reconhecido como biodegradável desde 1930 (KUCHAIYAPHUM et al., 2013; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; SILVA et al., 2013; ZHU et al., 2013; VERCELHEZE; MALI, 2012; TANG, ALAVI, 2011; SIN et al. 2010; ARANHA; LUCAS, 2001). O PVA foi sintetizado pela primeira vez por Herrman e Haehnel em 1924 através da hidrólise do poli (acetato de vinila) (THELLEN; CHENEY; RATTO, 2013; ARANHA; LUCAS, 2001). A preparação do PVA não é possível através da polimerização do álcool vinílico (monômero), pois este é um composto instável que se rearranja espontaneamente em acetaldeído (TANG; ALAVI, 2011; SOLOMONS; FRYHLE, 2001). Está disponível em grande variedade de graus de hidrólise (YAO et al., 2003), resultado da reação de hidrólise não completa, que depende da extensão da reação, sendo o PVA sempre um copolímero (Figura 4) (KUCHAIYAPHUM et al., 2013; TANG; ALAVI, 2011).

**Figura 4** Estrutura química do PVA (A) parcialmente hidrolisado, (B) completamente hidrolisado.



Fonte DeMerlis; Schoneker (2003).

As propriedades dos materiais à base de PVA dependem do grau de hidrólise e da massa molecular do mesmo, por exemplo, PVA parcialmente hidrolisado contém grupos acetato residuais que reduzem o grau de cristalinidade e o ponto de fusão das formulações, tornando o processamento mais fácil, com menor resistência e dissolução em água em menores temperaturas do que aqueles com base em PVA totalmente hidrolisado (TANG; ALAVI, 2011; ARANHA; LUCAS, 2001).

O PVA possui ampla aplicação na indústria devido às suas propriedades físicas e químicas, sendo considerado um polímero biocompatível, bioadesivo, não carcinogênico, não tóxico, com boa biodegradabilidade, (GUPTA; AGARWAL; ALAM, 2013; KUCHAIYAPHUM et al., 2013; SILVA et al., 2013; ZHU et al., 2013; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; TANG; ALAVI, 2011; CHEN et al., 2008a; CHEN et al., 2008b; IBRAHIM; EL-ZAWAWY; NASSAR, 2004; MANSUR; OREFICE; MANSUR, 2004), boa formação de filmes e fibras, resistência química, boas propriedades físicas e mecânicas, estabilidade térmica e fácil preparação (GUPTA; AGARWAL; ALAM, 2013; KUCHAIYAPHUM et al., 2013; SILVA et al., 2013; ZHU et al., 2013; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; TANG; ALAVI, 2011; SIN et al., 2010; CHEN et al., 2008a; CHEN et al., 2008b; IBRAHIM, EL-ZAWAWY; NASSAR, 2004). Estas características tornam o PVA adequado para utilizações nas áreas biomédica, farmacêutica, têxtil, de papel e alimentar, para produção de filmes para embalagem, de lentes de contato, revestimento de órgãos artificiais, carreador de fármacos, hidrogéis, processamento de papel e fibras e como estabilizante de emulsão (ZHU et al., 2013; SILVA et al., 2013; TANG; ALAVI, 2011; SIN et al., 2010; MANSUR; OREFICE; MANSUR, 2004; ARANHA; LUCAS, 2001).

A biodegradação envolve a degradação química e enzimática promovida por micro-organismos vivos (TUDORACHI et al., 2000). Apesar de ser um plástico biodegradável, o número de micro-organismos que degradam o PVA com eficiência é bastante limitado em comparação às espécies capazes de degradar poliésteres alifáticos, tais como PHA e PLA (THELLEN; CHENEY; RATTO, 2013; TANG; ALAVI, 2011; CHEN et al., 2008b). Além disso, o PVA possui custo superior quando comparado a outros polímeros. Para reduzir o custo e aumentar sua biodegradabilidade e desempenho, o PVA é muitas vezes modificado por combinação com outros polímeros (amido) ou preenchedores com dimensões nanométricas (nanopartículas) (TANG; ALAVI, 2011; IBRAHIM, EL-ZAWAWY; NASSAR, 2004).

## 1.7 NANOCOMPÓSITOS

A mistura de polímeros com preenchedores inorgânicos ou orgânicos com determinada geometria (fibras, flocos, esferas, partículas) são conhecidos como compósitos poliméricos. O PVA vem sendo adicionado na forma de blendas à polímeros naturais, especialmente o amido e a quitosana, com a finalidade de melhorar as propriedades destes e de melhorar a biodegradabilidade do PVA (PALMA-RODRIGUEZ et al., 2012; TANG; ALAVI, 2011; SIN et al., 2010; CHEN et al., 2008a; JAYASEKARA et al., 2004; TUDORACHI et al., 2000).

O uso de preenchedores com dimensões nanométricas (nanotubos, nanofibras de celulose, nanoesferas, nanocápsulas) produzem os denominados nanocompósitos poliméricos, os quais deverão exibir propriedades únicas. Os nanocompósitos poliméricos combinam propriedades dependentes do diâmetro das nanopartículas com as propriedades dos polímeros, tais como possibilidade de projeção em diferentes formas, estabilidade à longo prazo e processabilidade (AZEREDO, 2009; KULJANIN; DJOKOVIĆ; NEDELJKOVIĆ, 2006).

Uma dispersão uniforme de nanopartículas leva a um aumento da área interfacial e pode favorecer as interações entre a matriz polimérica e as nanopartículas. Sendo assim, a incorporação de nanopartículas com antioxidantes nas embalagens, além proteger os alimentos da degradação durante armazenamento, pode alterar a mobilidade das moléculas, o comportamento de relaxamento e modificar as propriedades mecânicas, térmicas e de barreira da embalagem e, assim, o desempenho do material resultante (ASSIS, 2012; AZEREDO, 2009; SOZER; KOKINI, 2009; FARHANG, 2007).

Muitos estudos de nanocompósitos utilizando PVA como matriz vêm sendo realizados. Os agentes de reforço variam entre nano-cristais (CHEN et al., 2008b), nanotubos de carbono (PROBST et al., 2004), montmorilonita (FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012), nanopartículas de prata (MBHELE et al., 2003) e de celulose (IBRAHIM; EL-ZAWAWY; NASSAR, 2010).

A influência das nanopartículas de prata sobre as propriedades do PVA foi estudada por Mbhele et al. (2003) e foi observado um aumento na estabilidade térmica, no módulo de elasticidade e na resistência do nanocompósito com o aumento no teor das nano-partículas, indicando reforço da matriz.

Chen et al. (2008b) reportaram a preparação e caracterização de nanocompósitos de nano-cristais de amido e PVA, mostrando

alterações nas propriedades físicas nas concentrações de 5 e 10% de nano-cristais.

Ibrahim, El-Zawawy e Nassar (2010) avaliaram o efeito de nanoesferas de celulose sobre as propriedades dos filmes de PVA e reportaram que a presença de 20% de nano-celulose na matriz de PVA aumentou a tensão de ruptura e a percentagem de alongação na ruptura, enquanto maior percentagem de nano-celulose diminuiu estes parâmetros, devido à alteração na estrutura morfológica do filme de PVA.

As propriedades físicas de biodegradabilidade de filmes baseados em amido de mandioca, montmorilonita e PVA foram estudadas por Faria, Vercelheze e Mali (2012), os quais concluíram que a adição da nano-argila esfoliada resultou em melhora na estabilidade em diferentes umidades, menor permeabilidade ao vapor de água, maior resistência e menor flexibilidade.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, I.N. Embalagem e a sua evolução na indústria alimentar. In: CASTRO, A.G.; POUZADA, A.S. **Embalagens para a Indústria Alimentar**. Lisboa: Instituto Piaget, 2003. Cap. 1, p. 17-30.

ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli (Álcool Vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: Avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 174-181, 2001.

ASSIS, L.M. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos, **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

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

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n.1, p. 89-97, 2005.

AZEREDO, H.M.C.; FARIA, A.F.; AZEREDO, A.M.C. Embalagens Ativas para Alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, 2000. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612000000300010](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612000000300010).

BARBOSA-PEREIRA, L.; CRUZ, J.M.; SENDÓN, R.; QUIRÓS, A.R.B.; ARES, A.; CASTRO-LÓPEZ, M.; ABAD, M.J.; MAROTO, J.; PASEIRO-LOSADA, P. Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. **Food Control**, v. 3, p. 236-243, 2013.

BAŞ, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836-845, 2007.

BORODINA T.; GRIGORIEV D.; MARKVICHEVA E. Vitamin E microspheres embedded within a biocompatible film for planar delivery. **Advanced Engineering Materials**, v. 13, n. 3, p. 123-130, 2011.

BRAMLEY, P.M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F.J.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H.E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P.J.A.; WAGNER, K-H. Vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 913-938, 2000.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221-247, 2011.

BRUBACH, J.B.; JANNIN, V.; MAHLER, B.; BOURGAUX, C.; LESSIEUR, P.; ROY, P.; OLLIVON, M. Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by x-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy. **International Journal Pharmaceutics**, v. 336, p. 248-256, 2007.

BUNJES, H.; KOCH, M.H.J.; WESTESEN, K. Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. **Langmuir**, v. 16, p. 5234-524, 2000.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, x-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 379-402, 2007.

BYUN, Y.; HWANG, J.B.; BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARK, H.J.; WHITESIDE, S.V. Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 24-28, 2011.

BYUN, Y.; KIM, Y.T.; WHITESIDE, S. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with  $\alpha$ -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 239-244, 2010.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de Experimentos usando Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CAMO, J.; LORÉS, A; DJENANE, D.; BELTRÁN, J.A.; RONCALÉS, P. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. **Meat Science**, v. 88, p. 174–178, 2011.

CASTRO, I.A.; MORAES BARROS, S.B.; LANFER MARQUEZ, U.M.; MOTIZUKI, M.; HIGASHI SAWADA, T.C. Optimizaction of the antioxidant capacity of a mixture of carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol in the development of a nutritional supplement. **Food Research International**. v. 38, p. 861-866, 2005.

CHEN, C-H.; WANG, F-Y.; MAO, C-F.; LIAO, W-T.; HSIEH, C-D. Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p.37-42, 2008a.

CHEN, Y.; CAO, X.; CHANG, P.R.; HUNEAULT, M.A. Comparative study on the films of poly(vinyl alcohol)/pea starch nanocrystals and poly(vinyl alcohol)/native pea starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 8-17, 2008b.

CHEONG, J.N.; TAN, C.P.; MAN, Y.B.C.; MISRAN, M.  $\alpha$ -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 204-209, 2008.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, p. 249-255, 2003.

COOKSEY, K. Active Packaging and the Shelf Life of Foods. In: ROBERTSON, G.L. Food packaging and shelf life: a practical guide. USA: CRC Press, 2010. Cap. 20, p. 367-382.

- DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62-76, 2011.
- DIAZ, T.G.; MERÁS, I.D.; CABANILLAS, A.G.; FRANCO, M.F.A. Voltammetric behavior and determination of tocopherols with partial least squares calibration: analysis in vegetable oil samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 231-238, 2004.
- DINGLER A.; BLUM, R.P.; NIEHUS, H.; MÜLLER, R.H.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>/lipopearls<sup>TM</sup>): A pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **Journal of Microencapsulation**. v. 16, p. 751-767, 1999.
- EVANS J.C.; KODALI, D.R.; ADDIS, P.B.; Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 47-51, 2002.
- FANGUEIRO, J.F.; MACEDO, A.S.; JOSE, S.; GARCIA, M.L.; SOUTO, S.B.; SOUTO, E. B. Thermodynamic behavior of lipid nanoparticles upon delivery of Vitamin E derivatives into the skin: in vitro studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, p. 275-282, 2012.
- FARBOUD, E.S.; NASROLLAHI, S.A.; TABBAKHI, Z. Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 611-617, 2011.
- FARHANG, B. Nanotechnology and lipids. **Lipid Technology**, v. 19, n. 6, p. 132-135, 2007.
- FARIA, F.O.; VERCELHEZE, A.E.S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 487-492, 2012.
- FATHI, M.; MOZAFARI, M.R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, n. 23, p. 13-27, 2012.



FREITAS, C.; MÜLLER, R.H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, p. 125-132, 1999.

GAMBOA, O.D.; GONÇALVES, L.G.; GROSSO, C.F. Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. **Procedia Food Science**, v. 1, p.1732-1739, 2011.

GARGIULO, N.; ATTIANESE, I.; BUONOCORE, G.G.; CAPUTO, D.; LAVORGNA, M.; MENSITIERI, G.; LAVORGNA, M.  $\alpha$ -Tocopherol release from active polymer films loaded with functionalized SBA-15 mesoporous sílica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 167, p. 10-15, 2013.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 2008. 511 p.

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

GHADIRI M.; VATANARA, A.; DOROUD, D.; NAJAFABADI, A.R. Paromomycin loaded solid lipid nanoparticles: Characterization of production parameters. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p. 617-623, 2011.

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

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  $\alpha$ -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. **Food Research International**, v. 43, p. 1073-1078, 2010.

GRANDA-RESTREPO, D.M.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; TRONCOSO-ROJAS, R.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; GÁMEZ-MEZA, N.; GRACIANO-VERDUGO, A.Z. Migration of  $\alpha$ -tocopherol

from an active multilayer film into whole milk powder. **Food Research International**, v. 42, p. 1396-1402, 2009.

GUPTA, B.; AGARWAL, R.; ALAM, M.S. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-polyethylene oxide-carboxymethyl cellulose blend membranes, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 2, p. 1301-1308, 2013.

GUPTA, M.K. Oil quality improvement through processing. In: O'BRIEN, R.D.; FARR, W.E.; WAN, P.J. **Introduction to fats and oils technology**. 2. ed. Champaign: AOCS press, 2000. p. 371-382.

HAMILTON, R. J.; KALU, C.; PRISK, E.; PADLEY, F. B.; PIERCE, H. Chemistry of free radicals in lipids. **Food Chemistry**, v. 60, p. 193-199, 1997.

HAN, J.H. New technologies in food packaging: overview. In: HAN, J.H. **Innovations in Food Packaging**. USA: Elsevier Science & Technology Books, 2005. Cap. 1, p. 03-11.

HAO, J.; FANG, X.; ZHOU, Y.; WANG, J.; GUO, F.; LI, F.; PENG, X. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 683-692, 2011.

HATANAKA, J.; CHIKAMORIA, H.; SATO, H.; UCHIDA, S.; DEBARI, K.; ONOUE, S.; YAMADA, S. Physicochemical and pharmacological characterization of  $\alpha$ -tocopherol-loaded nano-emulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, p. 188-193, 2010.

HELGASON, T.; AWAD, T.S.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D.J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, p. 75-81, 2009.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J-E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HEURTAULT, B.; SCHUBER, F.; FRISCH, B. Pharmaceutical Applications of Nanoparticle Carriers. In: BOISSEAU, P.; HOUDY, P.; LAHMANI, M. **Nanoscience**, USA: Baker and Taylor, 2010. Cap. 24, p. 1098-1119.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 71, p.229-233, 2000.

HWANG, S.W.; SHIM, J.K.; SELKE, S.; SOTO-VALDEZ, H.; MATUANA, L.; RUBINO, M.; AURAS, R. Migration of  $\alpha$ -tocopherol and resveratrol from poly(L-lactic acid)/starch blends films into ethanol. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 814-828, 2013.

IBRAHIM, M.M.; EL-ZAWAWY, W.K.; NASSAR, M.A. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/nanospherical cellulose particle films. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 694-699, 2010.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E.A.; DESOBRY, S. Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 445-455, 2012.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E.A.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.J.; CLEYMAND, F.; DESOBRY, S. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 380-389, 2012.

JAYASEKARA, R.; HARDING, I.; BOWATER, I.; CHRISTIE, G.B.Y.; LONERGAN, G.T. Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films. **Polymer Testing**, v. 23, p. 17-27, 2004.

JENNING, V.; LIPPACHER, A.; GOHLA, S.H. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2002.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin

films incorporated with BHT and  $\alpha$ -tocopherol. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 449-458, 2008.

KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L-A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, v. 31, n. 7, p. 671-701, 1996.

KHAYATA, N.; ABDELWAHEDA, 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.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine**, v. 6, p. 753-759, 2010.

KUCHAIYAPHUM, P.; PUNYODOM, W.; WATANESK, S.; WATANESK, R. Composition Optimization of Polyvinyl Alcohol/Rice Starch/Silk Fibroin-Blended Films for Improving Its Eco-Friendly Packaging Properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n.5, p. 2614-2620, 2013.

KULJANIN, J.; DJOKOVIĆ, M.I.; NEDELJKOVIĆ, J.M. Synthesis and characterization of nanocomposite of polyvinyl alcohol and lead sulfide nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 95, p. 67-71, 2006.

LAI, F.; WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H.; FADDA, A.M. Artemisia arborescens essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: Preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, p. E10-E18, 2006.

LEE, D.S. Packaging containing natural antimicrobial or antioxidative agents. In: HAN, J. H. **Innovations in Food Packaging USA**: Elsevier Science & Technology Books, 2005. Cap. 7, p. 108-122.

LEE, Y.S.; SHIN, H-S.; HAN, J-K.; LEE, M.; GIACIN, J.R. Effectiveness of antioxidant-impregnated film in retarding lipid

oxidation. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 84, p. 993-1000, 2004.

LONG, C.; ZHANG, L.; QIAN, Y. Preparation and crystal modification of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, p. 518-525, 2006.

LOVEDAY, S.M.; SINGH, H. Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 657-668, 2008.

MANSUR, H.S.; ORÉFICE, R.L.; MANSUR, A.A.P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 45, p. 7193-7202, 2004.

MANZANAREZ-LÓPEZ, F.; SOTO-VALDEZ, H.; AURAS, R.; PERALTA, E. Release of  $\alpha$ -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.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 01-37, 2009.

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

MBHELE, Z.H.; SALEMANE, M.G.; VAN SITTERT, C.G.C.E., NEDELJKOVIĆ, J.M.; DJOKOVIĆ, V.; LUYT, A.S. Fabrication and characterization of silver-polyvinyl alcohol nanocomposites. **Chemistry of Materials**, v. 15, p. 5019-5024, 2003.

MCGAULEY, S.E.; MARANGONI, A.G. Static crystallization behavior of cocoa butter and its relationship to network microstructure. In: MARANGONI, A.G., NARINE, S.S. **Physical Properties of Lipids**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. p. 85-124.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles – a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

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

MOORE, M.E.; HAN, I.Y.; ACTON, J.C.; OGALE, A.A.; BARMORE, C. R.; DAWSON, P.L. Effects of Antioxidants in polyethylene film on fresh beef color. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 99-104, 2003.

MOZAFARI, M.R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; SUNTRES, Z.E.; SINGH, H.J. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 86, p. 2038-2045, 2006.

MÜLLER, R.H.; LUCKS, J.S. inventors. "Azneistoffrager aus festen Lipidteilchen-feste Lipid Nanosphären (SLN)," Germany, march 1996. European Patent 0605497.

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

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 121-128, 2002.

NANJWADE, B.K.; PATEL, D.J.; UDHANI, R.A.; MANVI, F.V. Functions of lipids for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs, **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, p. 705-727, 2011.

NDHLALA, A.R.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? **Molecules**, v. 15, p. 6905-6930, 2010.

NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPSTRT-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; BUCHOWSKI, M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. **Food Chemistry**, v. 93, p. 227-235, 2005.

NORAJIT, K.; KIM, K.M.; RYU, G.H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 377-384, 2010.

O'BRIEN, R.D. Fats and oils processing. In: O'BRIEN, R.D., FARR, W.C., WAN, P.J. **Introduction to Fats and Oils Technology**. 2. ed. Champaign: AOCS Press, 2000.

PALMA-RODRÍGUEZ, H.M.; AGUIRRE-ÁLVAREZ, G.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.; BELLO-PÉREZ, L.A.; VARGAS-TORRES, A. Oxidized banana-starch-polyvinyl alcohol film: Partial characterization. **Starch/Stärke**, v. 64, p. 882-889, 2012.

PARASHAR K.A.; KAKDE D.; CHADHAR V. A review on Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled and targeted delivery of medicinal agents. **Current Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 02, p. 37-47, 2011.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.

POTHAKAMURY, U.R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Fundamental aspects of controlled release in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p. 397-406, 1995

PROBST, O.; MOORE, E.M.; RESASCO, D.E.; GRADY, B.P. Nucleation of polyvinyl alcohol crystallization by single-walled carbon nanotubes. **Polymer**, v. 45, p. 4437-4443, 2004.

ROBERTSON, G.L. Food Packaging and Shelf Life. In: ROBERTSON, G.L. **Food packaging and shelf life: A practical guide**. USA: CRC Press, 2010. Cap. 1, p. 1-16.

ROONEY, M.L. Introduction to active food packaging technologies. In: HAN, J.H. **Innovations in Food Packaging**. USA: Elsevier Science & Technology Books, 2005. Cap. 5, p. 63-79.

SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; DELGADO-ZAMARREÑO, M.M.; BUSTAMANTE-RANGEL, M.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J.

Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography-electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 881, p. 229-241, 2000.

SAUPE, A.; RADES, T. Solid lipid nanoparticle. In: MOZAFARI, M. R. **Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy**. Dordrecht: Springer, 2006. Cap. 03, p. 41-50.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, p. 171-179, 1997.

SEVERINO P.; ANDREANI T.; SANTANA A. M. Current state-of-art and new trends on lipid nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. **Journal of Drug Delivery**, (2012), <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2012/750891/abs/> (*in press*).

SHAHIDI, F., ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 112, p. 930-940, 2010.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: regulatory status. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil & Fat Products**. 6.ed., v.1. EUA: Wiley-Interscience, 2005. p. 491-510.

SHUKAT, R.; RELKIN, P. Lipid nanoparticles as vitamin matrix carriers in liquid food systems: On the role of high-pressure homogenisation, droplet size and adsorbed materials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 119-124, 2011.

SILVA, F.E.F.; DI-MEDEIROS, M.C.B.; BATISTA, K.A.; FERNANDES, K.F. PVA/Polysaccharides blended films: Mechanical properties. **Journal of Materials**, (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/413578> (*in press*).

SIN, L.T.; RAHMAN, W.A.W.A.; RAHMAT, A.R.; KHAN, M.I. Detection of synergistic interactions of polyvinyl alcohol-cassava starch blends through DSC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 224-226, 2010.



SINHA, V.R.; SRIVASTAVA, S.; GOEL, H.; JINDAL, V. Solid lipid nanoparticles (SLN'S): Trends and implications in drug targeting. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 212-238, 2010.

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

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**, 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 1, p. 399-400, 2001.

SOUTO, E.B.; MEHNERT, W.; MÜLLER, R.H. Polymorphic behaviour of Compritol®888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, p. 417-433, 2006.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; PINHO, S.C. Nanopartículas de lipídeos sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. **Química nova**, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 82-89, 2009.

SWATHI, G.; PRASANTHI, N.L.; MANIKIRAN, S.S.; RAMARAO, N. Solid lipid nanoparticles: Colloidal carrier systems for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, p. 01-16, 2010.

TAN, C.P., NAKAJIMA, M.  $\beta$ -Carotene nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 661-671, 2005.

TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 7-16, 2011.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC): Effects of formulation parameters on physicochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, p. 198-206, 2007.

- THELLEN, C.; CHENEY, S.; RATTO, J.A. Melt processing and characterization of polyvinyl alcohol and polyhydroxyalkanoate multilayer films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 3, p. 2314-2324, 2013.
- TRUJILLO, C.C.; WRIGHT, A.J. Properties and Stability of Solid Lipid Particle Dispersions Based on Canola Stearin and Poloxamer 188. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 715-730, 2010.
- TUCKER, G.S. Food biodeterioration and methods of preservation. In: COLES, R.; MCDOWELL, D.; KIRWAN, M. **Food Packaging Technology**. USA: CRC Press, 2003. p. 32-64.
- TUDORACHI, N.; CASCAVAL, C.N.; RUSU, M.; PRUTEANU, M. Testing of polyvinyl alcohol and starch mixtures as biodegradable polymeric materials. **Polymer Testing**, v. 19, p.785-799, 2000.
- VAN AARDT, M.; DUNCAN, S.E.; LONG, T.E.; O'KEEFE, S.F.; MARCY, J.E.; SIMS, S.R. Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: Thermogravimetric analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 587-591, 2004.
- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; VAN BEEST, M.; DE KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 77-86, 1999.
- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.163-171, 2002.
- VITORINO, C.; CARVALHO, F.A.; ALMEIDA, A.J.; SOUSA, J.J.; PAIS, A.A.C.C. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 117-130, 2011.
- WANASUNDARA, P.K.J.P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, technology and applications. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil & Fat Products**. 6. ed., v.1. USA: Wiley-Interscience, 2005. p. 431-489.

WANG, Y.; ZHU, L.; DONG, Z.; XIE, S.; CHEN, X.; LU, M.; WANG, X.; LI, X.; ZHOU, W. Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle suspensions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, p. 105-111, 2012.

WEISS, J.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J.; KRISTBERGSSON, K.; HELGASON, T.; AWAD, T. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. **Food Biophysics**, v. 3, p. 146-154, 2008.

WESSLING, C.; NIELSEN, T.; LEUFVÉN, A. The influence of  $\alpha$ -tocopherol concentration on the stability of linoleic acid and the properties of low-density polyethylene. **Packaging Technology and Science**, v. 13, p. 19-28, 2000.

WESSLING, C.; NIELSEN, T.; LEUFVÉN, A.; JÄGERSTAD, M. Retention of  $\alpha$ -tocopherol in low-density polyethylene (LDPE) and polypropylene (PP) in contact with foodstuffs and food-simulating liquids. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 79, p. 1635-1641, 1999.

WISSING, S.A; MÜLLER, R.H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 65-68, 2003.

YAO, L.; HAAS, T.W.; GUISEPPI-ELIE, A.; BOWLIN, G.L.; SIMPSON, D.G.; WNEK, G.E. Electrospinning and stabilization of fully hydrolyzed poly(vinyl alcohol) fibers. **Chemistry of Materials**, v. 15, p. 1860-1864, 2003.

YEN, M-T.; YANG, J-H.; MAU, J-L. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 840-844, 2008.

YOO, S-H.; SONG, Y-B.; CHANG, P-S.; LEE, H.G. Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, p. 25-30, 2006.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and

physical effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 123, p. 63-75, 2003.

ZHU, G.; WANG, F.; XU, K.; GAO, Q.; LIU, Y. Study on properties of poly(vinyl alcohol)/polyacrylonitrile blend film. **Polímeros**, v. 23, n. 2, p. 146-151, 2013.

ZIANI, K.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D.J. Encapsulation of functional lipophilic components in surfactant-based colloidal delivery systems: Vitamin E, vitamin D, and lemon oil. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1106-1112, 2012.

ZUR MÜHLEN, A., SCHWARZ, C., MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 149-155, 1998

.

**CAPÍTULO 2**  
**OPTIMIZATION OF  $\alpha$ -TOCOPHEROL LOADED SOLID LIPID**  
**NANOPARTICLES BY CENTRAL COMPOSITE DESIGN**



## ARTIGO PUBLICADO

DE CARVALHO, S.M.; NORONHA, C.M.; FLORIANI, C.L.; LINO, R.C.; ROCHA, G., BELLETTINI, I.C.; OGLIARI, P.J.; BARRETO, P.L.M. Optimization of  $\alpha$ -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 278-285, 2013.

## RESUMO

Sistemas de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidos utilizando a metodologia de superfície de resposta para otimizar o diâmetro médio das partículas, a taxa de recuperação do  $\alpha$ -tocoferol e o potencial zeta das NLS contendo  $\alpha$ -tocoferol. A formulação ótima de NLS contendo  $\alpha$ -tocoferol foi caracterizada através da difração de raios-X, da calorimetria exploratória diferencial, da morfologia e da estabilidade física. As condições ideais para preparação de NLS contendo  $\alpha$ -tocoferol forneceram diâmetro médio das partículas, taxa de recuperação do  $\alpha$ -tocoferol e potencial zeta de 214,5 nm, 75,4% e -41,9 mV, respectivamente; esta formulação foi estável durante o armazenamento a 6 °C por 21 dias. Além disso, o lipídeo sólido (behenato de glicerila) alterou a sua natureza cristalina da forma polimórfica  $\beta'$  do seu estado puro para as formas polimórficas  $\alpha$  e  $\beta'$  nas NLS.

**Palavras-chave:** metodologia de superfície de resposta; nanopartículas lipídicas sólidas; antioxidante; homogeneização à alta pressão.

## ABSTRACT

Solid lipid nanoparticle (SLN) systems were developed using response surface methodology to optimize the mean particle size,  $\alpha$ -tocopherol recovery rate and zeta potential of SLNs containing  $\alpha$ -tocopherol. The optimization of  $\alpha$ -tocopherol-loaded SLNs was characterized by x-ray diffraction analysis, differential scanning calorimetry, and the analysis of morphology and physical stability. The optimal conditions for an  $\alpha$ -tocopherol-loaded SLN preparation were the mean particle size,  $\alpha$ -tocopherol recovery rate and zeta potential of 214.5 nm, 75.4% and -41.9 mV, respectively; this preparation was stable during storage at 6°C for 21 days. Furthermore, the solid lipid (glyceryl behenate) changed its crystalline nature from the  $\beta'$  polymorphic form in the pure formulation to the  $\alpha$  and  $\beta'$  polymorphic forms in SLNs.

**Keywords:** surface response design; solid lipid nanoparticle; antioxidant; high-pressure homogenization.



## 1 Introduction

Oxidation processes are the major cause of deterioration in lipid-based foods, especially those containing polyunsaturated fats. This process decreases food quality by increasing the development of rancidity, off-flavor compounds, polymerization, reversion and other reactions that reduce the shelf life, nutritive value and sensory quality of the food product. In addition, oxidation is implicated in the pathogenesis of numerous chronic diseases. A method of protection against oxidation is the addition of antioxidants (Brewer, 2011; Ndhlala, et al., 2010; Shahidi and Zhong, 2010; Mozafari et al., 2006), either as direct additives or indirectly through diffusion from packaging material (van Aardt et al., 2004). Antioxidants play a major role in preventing or delaying oxidation of a substrate when present in low concentrations compared with an oxidizable substrate. Both synthetic and natural antioxidants are widely used in food products; however, some synthetic antioxidants have become controversial due to their potential adverse effects on human health. Natural sources of antioxidants, such as tocopherols and other compounds, have been extensively applied in the food industry (Shahidi and Zhong, 2010; Mozafari et al., 2006).

Vitamin E is a nutrient that occurs naturally in vegetable oils or in deodorizer distillates (Shahidi and Zhong, 2010; Evans et al., 2002). This fat-soluble antioxidant can effectively scavenge lipid peroxy radicals and act as a synergist with many other antioxidants (Byun et al, 2011; Ndhlala et al., 2010; Shahidi and Zhong, 2010; Yenilmez and Yazan, 2010). Vitamin E has several isomers, including  $\alpha$ -tocopherol, which is the most abundant form in nature (Byun et al, 2011; Gonnet et al., 2010; Hatanaka et al., 2010). This form is widely used in vitamin supplementation and as an antioxidant in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries (Gonnet et al., 2010; Hatanaka et al., 2010; Yoo et al., 2006). However, the fact that these compounds are insoluble in water has made their use problematic in food formulation (Weiss et al., 2008; Yoo et al., 2006; Tan and Nakajima, 2005); vitamin E is often present in food at levels below the therapeutic threshold and in forms with reduced or insufficient bioavailability (Cheong et al., 2008).

To overcome this limitation, nanotechnology offers the food industry the potential to significantly improve the solubility and bioavailability of many functional ingredients, including carotenoids, polyunsaturated fatty acids and numerous other compounds, such as  $\alpha$ -

tocopherol (Cheong et al., 2008; Mozafari et al., 2006; Weiss et al., 2008; Dingler et al., 1999).

Solid lipid nanoparticle (SLN) systems, introduced in 1991, are one of the most promising encapsulation technologies employed in the rapidly developing field of nanotechnology (Mozafari et al., 2006) and represent an alternative carrier system to traditional colloidal carriers, such as emulsions, liposomes, and polymeric micro- and nano-particles (Freitas and Müller, 1999).

The physicochemical properties of SLNs are controlled by many factors, such as the nature and relative amount of lipids and surfactants and the ratio of solid lipids to drugs in the formulation. Because the ingredients significantly affect the physicochemical properties and drug-release profiles of the nanoparticles, the design of an optimized formulation is an important aspect of SLN production (Mehnert and Mäder, 2012; Hao et al., 2011; Karn-orachai et al., 2012).

In these situations, where several variables may influence the system properties, response surface methodology (RSM) is an appropriate technique to evaluate the relationships between the response and independent variables and to optimize the processes or products (Calado and Montgomery, 2003; Bas and Boyacı, 2007); RSM requires less experimentation and provides estimates of the relative significance of different variables (Hao et al., 2011).

The purpose of this research was to determine the optimal conditions for  $\alpha$ -tocopherol-loaded SLNs produced by the high pressure homogenization (HPH). Central composite design (CCD) was used to investigate the influence of the surfactant concentrations and  $\alpha$ -tocopherol amount on the mean particle size, zeta potential, and  $\alpha$ -tocopherol recovery rate. Additionally, the optimized  $\alpha$ -tocopherol-loaded SLNs and the control formulation ( $\alpha$ -tocopherol-free SLN) were evaluated by differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction, transmission electron microscopy (TEM) analysis, and analysis of the physical stability to characterize the systems. The  $\alpha$ -tocopherol entrapment efficiency was determined for the optimized  $\alpha$ -tocopherol-loaded SLN formulation.

## **2 Materials and Methods**

### *2.1 Materials*

The solid lipid glyceryl behenate (Compritol® 888 CG ATO, melting point  $\sim 73$  °C) was obtained from Gatefossé (Saint-Priest,

France).  $\alpha$ -Tocopherol (98% purity HPLC grade) and methanol (HPLC grade) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Soya lecithin (LIPOID S 75, 68-73% phosphatidylcholine) was supplied by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Poloxamer 188 (Pluronic F68, 1800g/mol and 80% PEO) was kindly donated by BASF AG (Ludwigshafen, Germany). All other chemical reagents and solvents were of analytical grade and were used as received.

## 2.2 Preparation of $\alpha$ -tocopherol-loaded SLNs

$\alpha$ -Tocopherol-loaded SLNs ( $\alpha$ -TC-loaded SLNs) were prepared by the hot high homogenization technique (Müller et al., 2000) with a high-pressure homogenizer (APLAB-10, Artepeças, Brazil) at 500 bar. Compritol® 888 CG ATO (5.0%) was heated to 80-85 °C, and  $\alpha$ -tocopherol and soya lecithin were dispersed in the molten lipid to form the lipid phase (LP). The LP was dispersed in the hot surfactant (Pluronic F68) solution of distilled water and water phase (WP) using an Ultra-Turrax T25 (IKA, Germany) at 9000 rpm for 1 min. This pre-emulsion underwent seven high-pressure homogenization cycles. The dispersion obtained was cooled to 20 °C, filtered through an 8  $\mu$ m filter paper, and stored in dark bottles. The homogenization circuit was maintained at 85 °C by a water bath coupled to the machine, and the duration of the seven cycles was approximately 5 min. The different formulations produced are shown in Table 1.

## 2.3 Experimental design optimization

A resolution III  $2^{(7-1)}$  fractional factorial design was previously employed to select the most important independent variables (factors) that can influence the physicochemical properties of the SLNs. Next, response surface methodology using central composite design (CCD) with three independent variables was applied to determine the optimal levels for the mean particle size (Y1),  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (Y2), and zeta potential (Y3).

The selected factors were the active compound concentration ( $\alpha$ -tocopherol, %, X1), lipophilic surfactant concentration (soya lecithin, %, X2), and hydrophilic surfactant concentration (poloxamer 188, %, X3), which were studied at five different concentration levels: one central point (X1: 0.75%, X2 and X3: 1.0%), level 1 (X1: 1.0%, X2 and X3: 1.5%), level -1 (X1, X2 and X3: 0.50%), level  $\alpha$  (X1: 1.17%, X2 and X3: 1.84%), and level  $-\alpha$  (X1: 0.33%, X2 and X3: 0.16%). The alpha value (1.682) was obtained from the equation  $\pm \sqrt{3}$  for  $k = 3$  (three independent variables).

According to the CCD generated by the STATISTICA software (version 7.0, 2004 StatSoft, Inc., EUA), a total of 18 experiments, including 8 factorial points (levels -1 and +1), 6 axial points (levels  $\pm \alpha$ ), and 4 replicates at the central point for estimation of pure error, were performed (Table 1). All experiments were performed randomly and in blocks (two days) to minimize the effects of variability of the responses observed due to systematic errors.

A second-order polynomial equation was used to express the mean particle size (Y1),  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (Y2), and zeta potential (Y3) of the SLNs as a function of the assigned independent variables as follows (Eq. (1)):

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + \varepsilon \quad (1)$$

where Y represents the response variables,  $B_0$  is a constant,  $B_i$  represents the linear terms,  $B_{ii}$  represent the quadratic terms for one variable,  $B_{ij}$  represents the interaction terms ( $i = 1, 2, \text{ and } 3$  and  $j = 1, 2, \text{ and } 3$ ), and  $\varepsilon$  is the random error.

#### 2.4 Statistical analysis

The statistical data analysis was performed by the STATISTICA software (version 7.0, 2004 StatSoft, Inc., EUA). To fit the second order polynomial equation, the experimental data were analyzed by multiple linear regression using the analysis of variance (ANOVA) approach, and the statistical significance of each regression term was evaluated using the t-value from the pure error obtained from replicates at the central point. The p-values less than 0.05 were considered to be statistically significant. After determining the fit of the models, optimal conditions for the preparation of the SLNs were determined by solving the equation derived from the final quadratic model and by evaluating the RSM plots with restrictions on the responses of a minimum value of mean particle size and a maximum value of  $\alpha$ -tocopherol recovery and zeta potential. In addition, three optimized formulations were prepared to verify the response predicted by the equation, therefore evaluating the accuracy of the model.

**Table 1**

Central composite design parameters obtained for various runs and experimental values of particle size,  $\alpha$ -tocopherol recovery rate, and zeta potential of  $\alpha$ -tocopherol-loaded SLNs.

Run n <sup>o</sup>	Block	Assigned independent variables				Real independent variables					Responses		
		X1	X2	X3	$\alpha$ -Tocopherol concentration (%)*	Soya lecithin concentration (%)*	Poloxamer 188 concentration (%)*	Particle size (nm)	$\alpha$ -Tocopherol recovery rate(%)	Zeta potential			
1	Day 1	-1	-1	-1	0.5	0.5	0.5	459	74.2	-37.4			
2	Day 1	-1	-1	1	0.5	0.5	1.5	190	70.7	-36.3			
3	Day 1	-1	1	-1	0.5	1.5	0.5	324	73.4	-53.3			
4	Day 1	-1	1	1	0.5	1.5	1.5	213	74.2	-47.6			
5	Day 1	1	-1	-1	1.0	0.5	0.5	326	75.8	-38.7			
6	Day 1	1	-1	1	1.0	0.5	1.5	171	82.1	-31.4			
7	Day 1	1	1	-1	1.0	1.5	0.5	292	76	-51.9			
8	Day 1	1	1	1	1.0	1.5	1.5	224	76.4	-46.1			
9	Day 1	0	0	0	0.75	1.0	1.0	205	72.1	-45			
10	Day 1	0	0	0	0.75	1.0	1.0	215	74.5	-46.5			
11	Day 2	-1.682	0	0	0.33	1.0	1.0	230	69.2	-47			
12	Day 2	1.682	0	0	1.17	1.0	1.0	217	76.7	-45.6			
13	Day 2	0	-1.682	0	0.75	0.16	1.0	211	73.2	-30.2			
14	Day 2	0	1.682	0	0.75	1.84	1.0	268	58.5	-54.3			
15	Day 2	0	0	-1.682	0.75	1.0	0.16	615	71.3	-52.6			
16	Day 2	0	0	1.682	0.75	1.0	1.84	196	71.1	-40.6			
17	Day 2	0	0	0	0.75	1.0	1.0	217	74.2	-46.15			
18	Day 2	0	0	0	0.75	1.0	1.0	204	74	-47.8			

## 2.5 Physical-chemical evaluations

### 2.5.1 Particle size, polydispersity index and zeta potential determination

The mean particle size (Z-ave), polydispersity index (PI), and zeta potential ( $\zeta$ ) of the prepared SLNs were obtained by the photon correlation spectroscopy technique (PCS) using Zetasizer Nano Series equipment (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Samples were diluted appropriately with filtered Milli-Q<sup>®</sup> water, and the measurements were conducted at 25 °C and at a fixed angle of 173°. For the measurements of zeta potential, the diluted samples were placed in an electrophoretic cell.

### 2.5.2 Transmission electron microscopy (TEM)

The morphology of the optimized  $\alpha$ -TC-loaded SLNs and the control sample ( $\alpha$ -TC-free SLN) was investigated by TEM. The samples were diluted in ultrapure Milli-Q<sup>®</sup> water (1:2), and approximately 5  $\mu$ L of each sample was deposited on carbon-coated copper grids (200 mesh). After drying at room temperature, the grids were observed using a JEOL JEM-1011 microscope (Tokyo, Japan) operating at 80 kV.

### 2.5.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC thermograms were produced using a differential scanning calorimeter model DSC-50 (Shimadzu, Japan). Lyophilized  $\alpha$ -TC-loaded SLN optimized and  $\alpha$ -TC-free SLNs (4.7-5.3 mg) were weighed separately in aluminum pans and hermetically sealed. The individual components of the SLNs were analyzed as raw materials. Empty pans were used as a reference. The analysis was conducted under an inert nitrogen atmosphere at a flow rate of 50 mL.min<sup>-1</sup>, a temperature range of -50 to 120 °C, and a scanning rate of 5 °C.min<sup>-1</sup>.

### 2.5.4 X-ray diffraction

X-ray diffraction patterns were obtained using a Philips X'Pert X-ray diffractometer with a copper anode (Cu-K $\alpha$  radiation,  $\lambda$  = 0.15418 nm) equipped with a sample spinner operating at a current of 30 mA and a voltage of 40 kV. The measurements were performed at room temperature, scanning at 2 $\theta$  from 1° to 100°, with a 0.05° step size and 1.00 s step time.

### 2.5.5 Determination of $\alpha$ -tocopherol content, recovery, and entrapment efficiency

The  $\alpha$ -tocopherol content in the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs was determined after complete dissolution of 1.0 mL of the dispersion in 10.0 mL methanol. The mixture was sonicated for 30 min to extract the  $\alpha$ -tocopherol into the organic solution. Then, the dispersion was filtered, and the  $\alpha$ -tocopherol content of the solution was analyzed by HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Tokyo, Japan). The  $\alpha$ -tocopherol content was expressed in mg of  $\alpha$ -tocopherol/mL of dispersion. The  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (%) was estimated by comparing the total content of  $\alpha$ -tocopherol found in the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs with the initial content added to the formulations, as shown in Eq. (2):

$$\begin{aligned} \text{Recovery (\%)} \\ = 1.0 - \left( \frac{\text{Initial content of } \alpha\text{TC} - \text{Total content of } \alpha\text{TC}}{\text{Initial content of } \alpha\text{TC}} \right) \times 100 \end{aligned} \quad (2)$$

The entrapment efficiency (EE) was calculated as the difference between the total  $\alpha$ -tocopherol content in the  $\alpha$ -TC-loaded SLN dispersion and the free  $\alpha$ -tocopherol content obtained after the separation of the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs from the aqueous medium by a dispersion-ultrafiltration/centrifugation procedure using Amicon Ultra Centrifugal Filters with an Ultracel 30k membrane (Millipore, Ireland). The free  $\alpha$ -tocopherol concentration was then determined by HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Tokyo, Japan) analysis. The entrapment efficiency was calculated using the following Equation:

$$\text{Entrapment efficiency (\%)} = \left( \frac{\text{Total content of } \alpha\text{TC} - \text{Free content of } \alpha\text{TC}}{\text{Total content of } \alpha\text{TC}} \times 100 \right) \quad (3)$$

### 2.5.6 Chromatographic Analysis

HPLC separation was performed with a Shimadzu Liquid Chromatographer (Tokyo, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, an LC-20AT pump system, an SPD-M20A photodiode array detector, a CTO-20A oven, and an SIL-20A auto sampler. The analysis was conducted using a Shim-pack CLC-ODS (M) column (250 mm x 4.6 mm, I.D.; 5  $\mu$ m particle size; Shimadzu, Kyoto, Japan) protected by a guard cartridge system (Shim-pack CLC G-ODS; 12.5 x 4.6 mm; 5  $\mu$ m particle size; Shimadzu, Tokyo, Japan). The quantitative measurement of  $\alpha$ -tocopherol content was performed at  $\lambda = 292$  nm with a mobile phase of methanol:water (99:1) (v/v) at a flow rate of 1.0 mL

min<sup>-1</sup>. The analytical column was kept at 50 °C, and the injection volume was 20 µL. The data were stored and processed by a Workstation LC system (Tokyo, Japan).

The calibration curves of the peak area versus the  $\alpha$ -tocopherol concentration were linear in the concentration range of 0.2–1.0 mg/mL. The regression equation of the media calibration graph (n=3) was as follows:  $y = 8.10^6x + 44542$  ( $R^2=0.9998$ ).

### 2.5.7 Stability studies

The physicochemical stability of the optimized SLN formulation ( $\alpha$ -TC-loaded SLNs) and control formulation ( $\alpha$ -TC-free SLNs) was studied at different temperatures (6, 20 and 40 °C) for a period of 21 days. The samples were prepared, placed into 30 mL brown bottles, sealed, and stored. The mean particle size (Z-ave), the polydispersity index (PI), and zeta potential ( $\zeta$ ) of the samples were measured after 1, 7, 14 and 21 days. The  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (%) was measured after 1 and 21 days.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Optimization of conditions for preparing $\alpha$ -tocopherol-loaded SLNs

The three significant independent variables selected from the results obtained by fractional factorial design,  $\alpha$ -tocopherol concentration (%), X1), soya lecithin (%), X2) and poloxamer 188 (%), X3), were used to minimize the mean particle size response (Y1) and maximize the  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (Y2) and zeta potential (Y3) responses of the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs using the CCD.

As shown in Table 1, the values of the Y1, Y2 and Y3 responses were in the range of 171-615 nm, 58.5-82.1%, and -30.2 to -54.3 mV, respectively. The experimental data were used to calculate the regression coefficients of the quadratic polynomial equations, and the significance of each regression coefficient was statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA). To develop the model, the coefficients related to the independent variables with significant  $t$ -values ( $p \leq 0.05$ ) were used. A lower  $p$ -value indicates a higher significant effect of the independent variables on the responses. The calculated regression coefficients, standard errors,  $t$ -values and  $p$ -values for the Y1, Y2 and Y3 responses are shown in Table 2.



The adjusted model that describes the relationship between the independent variables and the mean particle size can be represented by Eq. (4):

$$Y_1 = 210.46 - 14.27X_1 + 0.21X_2 - 95.75X_3 + 65.5X_3^2 + 16.37X_1X_2 + 19.62X_1X_3 + 30.62X_2X_3 \quad (4)$$

where Y1 is the mean particle size response, and X1, X2, and X3 represent the  $\alpha$ -tocopherol, soya lecithin and poloxamer 188 concentrations, respectively. Although the soya lecithin concentration (X2) had no significant effect ( $p > 0.05$ , Table 2) on Y1, it was included in the model to ensure that the interactions with  $\alpha$ -tocopherol and poloxamer 188 concentrations (X1 and X3) were significant ( $p < 0.05$ , Table 2). The poloxamer 188 concentration (X3) had a greater effect on the response variable Y1. The negative coefficients of X1 and X3 indicate that the particle size decreased with increasing levels  $\alpha$ -tocopherol and poloxamer 188.

**Table 2**

Analysis of variance of the regression coefficients of the fitted quadratic equations for the particle size (Y1),  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (Y2), and zeta potential (Y3) as a function of the independent variables.

	Y1				Y2				Y3			
	Coef.	SE	t	p	Coef.	SE	t	p	Coef.	SE	t	p
Block	7.34	1.96	3.74	0.06438	-1.99	0.29	-6.95	0.02009	0.94	0.27	3.53	0.07183
B <sub>0</sub>	210.46	4.10	51.34	0.00038	73.63	0.60	122.33	0.00007	46.37	0.56	83.21	0.00014
B <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-14.27	2.22	-6.43	0.02334	2.23	0.33	6.83	0.02074	-0.65	0.30	-2.15	0.16466
B <sub>11</sub> X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1.16	2.31	0.50	0.66659	0.76	0.34	2.23	0.15567	-0.40	0.31	-1.26	0.33408
B <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0.21	2.22	0.09	0.93336	-2.01	0.33	-6.18	0.02516	7.00	0.30	23.21	0.00185
B <sub>22</sub> X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	6.81	2.31	2.94	0.09849	-1.75	0.34	-5.16	0.03553	-1.83	0.31	-5.82	0.02831
B <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	-95.75	2.22	-43.15	0.00054	0.27	0.33	0.82	0.49689	-2.93	0.30	-9.73	0.01040
B <sub>33</sub> X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	65.50	2.31	28.32	0.00124	0.14	0.34	0.41	0.72367	-0.29	0.31	-0.92	0.45259
B <sub>12</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	16.38	2.90	5.65	0.02995	-1.02	0.43	-2.41	0.13775	0.09	0.39	0.22	0.84494
B <sub>13</sub> X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	19.63	2.90	6.77	0.02114	1.17	0.43	2.76	0.11003	-0.79	0.39	-1.99	0.18381
B <sub>23</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	30.62	2.90	10.56	0.00884	-0.20	0.43	-0.47	0.68476	-0.39	0.39	-0.98	0.42924

SE = standard error

B<sub>0</sub> = constant, B<sub>i</sub> = Linear coefficient, B<sub>ij</sub> = Quadratic coefficients and

B<sub>ij</sub> = interaction coefficients (i = 1, 2, and 3 and j = 1, 2, and 3),

X<sub>1</sub> =  $\alpha$ -tocopherol concentration, X<sub>2</sub> soya lecithin concentration,

X<sub>3</sub> = poloxamer 188 concentration.

Values at  $p < 0.05$  were considered to be significant.

The adjusted model for  $\alpha$ -tocopherol recovery rate response variable (Y2) is represented by Eq. (5):

$$Y_2 = 73.63 + 2.23X_1 - 2.01X_2 - 1.75X_2^2 \quad (5)$$

where Y2 is the  $\alpha$ -tocopherol recovery rate response and X1 and X2 represent the  $\alpha$ -tocopherol and soya lecithin concentrations, respectively. As can be observed in Eq. (5), the soya lecithin concentration (X2) had a negative coefficient, i.e., a higher soya lecithin concentration led to a lower  $\alpha$ -tocopherol recovery rate, while a higher  $\alpha$ -tocopherol concentration (X1) led to a higher  $\alpha$ -tocopherol recovery rate. Poloxamer 188 concentration (X3) had not effect on Y2 response ( $p > 0.05$ , Table 2).

According to the regression coefficients calculated for the zeta potential response (Y3) (Table 2), the model can be represented by Eq. (6):

$$Y_3 = 46.37 + 7.00X_2 - 1.83X_2^2 - 2.93X_3 \quad (6)$$

where Y3 is the zeta potential response and X2 and X3 represent the soya lecithin and poloxamer 188 concentrations, respectively. The linear term soya lecithin (X2) most influenced the response variable Y3 ( $p < 0,002$ ), and the positive coefficient of these variables indicate that a linear increase in X2 concentration is directly proportional to an increase of the zeta potential. On the other hand, the poloxamer 188 concentration (X3) had a negative effect, i.e., the zeta potential value decreased linearly with increasing concentrations. Lecithin (phospholipids) and poloxamers have been shown to be the main components in formulations that can influence the zeta potential. The first factor provides a negative potential for interface because it is an anionic surfactant (Schaffazick et al., 2003), leading to electrostatic repulsion between particles and, thus, reducing the aggregation (Schaffazick et al., 2003; Müller et al., 2000). Poloxamers, which are non-ionic surfactants, tend to reduce the absolute value of this parameter (Schaffazick et al., 2003). However, all of the SLNs evaluated showed values above of 30 mV (in module), which is the minimum value necessary to ensure the stability of the particles (Marcato, 2009; Teeranachaideekul et al., 2007).

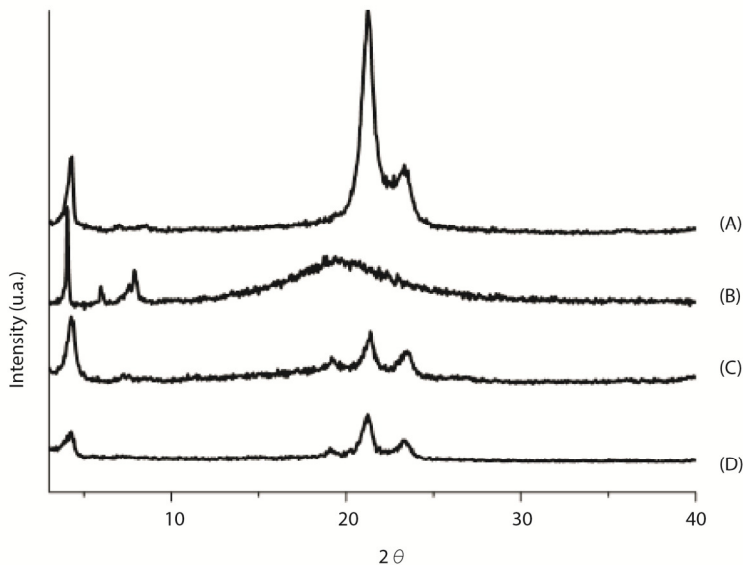
The coefficients of determination ( $R^2$ ) and adjusted  $R^2$  for Y1, Y2, and Y3 were calculated to be 0.94 and 0.88; 0.65 and 0.55; and 0.97 and 0.96, respectively, and the lack of fit was considered to be

marginally non-significant ( $p = 0.035$ ) for Y1 and was non-significant for Y2 ( $p = 0.118$ ) and Y3 ( $p = 0.414$ ), indicating that models appropriately explains the variability of the observed responses.

After finding the model that best represents each response, optimal conditions for the preparation of  $\alpha$ -TC-loaded SLNs were obtained by solving the equations, analyzing RSM plot analysis (data not shown), and improving or maintaining each response within the desired ranges. The optimum levels for the  $\alpha$ -tocopherol, soya lecithin, and poloxamer 188 concentrations were determined to be 1.1%, 0.75% and 1.3%, respectively. At these levels of independent variables, the predicted mean particle size,  $\alpha$ -tocopherol recovery rate, and zeta potential were calculated to be 165.8 nm, 78.0%, and -41 mV, respectively. To validate the experimental models, the optimized formulation was prepared in triplicate. The practical responses to mean particle size,  $\alpha$ -tocopherol recovery rate, and zeta potential were  $214.5 \pm 3.2$  nm,  $75.4 \pm 2.5$  % and  $-41.9 \pm 1.1$  mV, respectively. The entrapment efficiency for the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs in the optimal formulation was determined to be  $98.0 \pm 1.4$ %.

### 3.2 X-ray diffraction analysis

Glyceryl behenate is a mixture of mono-, di- and tri-behenates of glycerol (18 wt%, 53 wt% and 27 wt% in weight, respectively) that exhibits a complex polymorphism depending on many parameters, such as the crystallization rate or the temperature of storage. Compritol® 888 CG ATO is a solid lipid based mainly on glycerol esters of behenic acid (C22) (> 83%). However, other fatty acids (C16-C20) are also present (C16 < 3.0%, C18 < 5.0%, C20 < 10.0%, C22:1 < 1.0%, and C24 < 3.0%). Lipid polymorphism is due to the numerous possible lateral packing patterns of fatty acid chains in a particular organization of hydrocarbon chains (Sinha et al., 2010; Bunjes and Unruh, 2007; Teeranachaiidekul et al., 2007; McGauley and Marangoni, 2002). Polymorphic behavior is often displayed by long-chain compounds; in general, those compounds crystallize in two or three different phases,  $\alpha$  and  $\beta'$ , or  $\alpha$ ,  $\beta'$  and  $\beta$ , respectively (Marcato, 2009; Bunjes and Unruh, 2007; Long et al., 2006; Jores et al., 2003; Freitas and Müller, 1999).



**Fig. 1** X-ray diffraction patterns of bulk Compritol® 888 CG ATO (A), lecithin (B),  $\alpha$ -TC-loaded SLN (C), and  $\alpha$ -TC-free SLN (D).

The diffractograms of the bulk lipid, soya lecithin,  $\alpha$ -TC-loaded SLNs and  $\alpha$ -TC-free SLNs are shown in Figure 1. The  $\alpha$ -TC-free SLNs revealed a diffraction pattern very similar to bulk lipid, showing the sharp peaks at  $2\theta$  of  $21.23^\circ$  and  $23.30^\circ$ . These peaks correspond to short spacings of the chains at 0.42 and 0.38 nm, respectively, which is attributed to the  $\beta'$  polymorphic form of the solid lipid (Jores et al., 2003). The only differences between both curves are the intensity and the width of the peaks (resolution of the peaks), which depend on different factors, such as the amount of sample used and the particle size (Souto et al., 2006). For the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs, the sharp peaks at  $2\theta$  were at  $21.38^\circ$  and  $23.48^\circ$ , which correspond to short spacings at 0.415 and 0.38 nm representing  $\alpha$  and  $\beta'$  polymorphic forms, respectively (Sato, 1988; Chapman, 1962; Lutten, 1950). Moreover, the first sharp peak in the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs also had a slightly reduced intensity when compared to the  $\alpha$ -TC-free SLNs. These characteristics may be attributed to the incorporation of the active compound ( $\alpha$ -tocopherol) between parts of the crystal lattice of the lipid, leading to more imperfections in the crystals and making it more likely that the active

compound will remain entrapped in the lipid matrix during the shelf life (Gonzalez-Mira et al., 2011; Müller et al., 2002).

As shown in the X-ray analysis, measurements of crystallinity and lipid modification are necessary because these parameters are strongly correlated with drug incorporation and release rates (Saupe and Rades, 2006).

### 3.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC is widely used to investigate the solid state of a lipid; the basis of this method is the fact that different lipid modifications possess different melting points and melting enthalpies (Saupe and Rades, 2006; Mehnert and Mäder, 2001). DSC thermograms and endothermic events of the main raw materials used to formulate SLNs (glyceryl behenate and poloxamer 188), the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs and the  $\alpha$ -TC-free SLN samples are shown in Fig. 2 and Table 3.

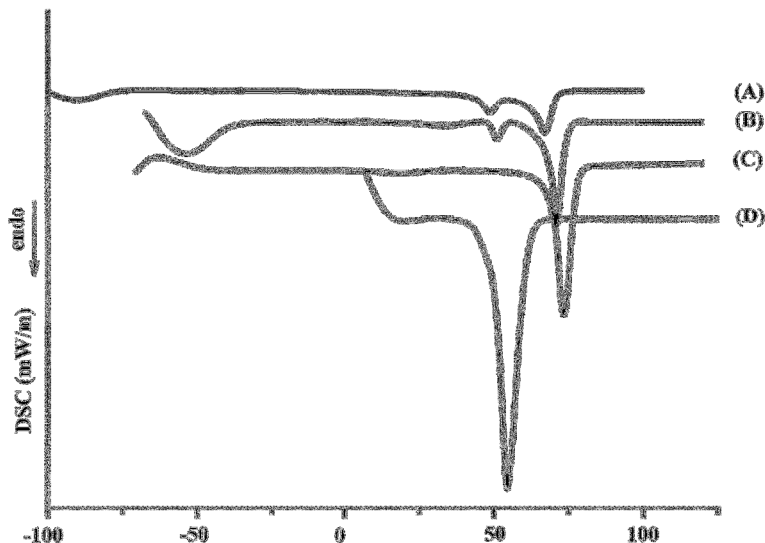
**Table 3**

DSC parameters of bulk Compritol® 888 CG ATO,  $\alpha$ -TC-loaded SLNs, and  $\alpha$ -TC-free SLNs.

Sample	Melting point (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Enthalpy (Jg <sup>-1</sup> )	CD (%)
Compritol® CG 888 ATO	73.38	68.45	78.77	74.37	100
$\alpha$ -TC-free SLNs	71.01	68.07	74.46	64.46	86.67
$\alpha$ -TC-loaded SLNs	67.00	59.13	73.25	53.85	72.41

CD (%): crystallinity degree

The Compritol® 888 ATO has a melting point ranging from 69 to 74 °C (Brubach et al., 2007). As shown in Fig. 2 (curve C), the bulk Compritol® 888 CG ATO exhibited a sharp endothermic event, related to the melting point, at 73.38 °C. Long et al. (2006), Souto et al. (2006), Freitas and Müller (1999), and zur Mühlen et al. (1998) reported the melting point of glyceryl behenate to be 71.6°C; 71.7°C; 72.2°C and 71.1°C, respectively; these temperatures are characteristic of the  $\beta'$  polymorphic form, which is considered to be the most stable form. These results are in agreement with those obtained with X-ray diffraction, which indicated the presence of the  $\beta'$  polymorphic form.



**Fig. 2** DSC analysis of Compritol® 888 CG ATO (C), poloxamer 188 (D), and  $\alpha$ -TC-free SLN (B) and  $\alpha$ -TC-loaded SLN (A).

The production of SLNs composed of glycerides with a heterogeneous composition, such as Compritol® 888 CG ATO, is associated with a melting point depression (zur Mühlen et al., 1998).  $\alpha$ -TC-free SLN and  $\alpha$ -TC-loaded SLN formulations using 5.0% (w/w) of Compritol® 888 CG ATO, 1.3% (w/w) of poloxamer 188, 0.75% (w/w) of soya lecithin and 1.1% (w/w) of  $\alpha$ -tocopherol led to a melting point depression, as shown in Table 3 and Fig. 2.  $\alpha$ -TC-free SLN and  $\alpha$ -TC-loaded SLN formulations showed two endothermic peaks at 50.9 and 71.01 °C (Fig. 2, curve B) and at 48.55 and 67.00 °C (Fig. 2, curve A), respectively. An increase in crystal order disturbance (lattice defects) led to a reduction of the onset, endset and melting temperatures. While the pure Compritol® CG 888 ATO exhibited the  $\beta'$  form, the addition of  $\alpha$ -tocopherol and surfactants led to a decrease in the crystallinity of the lipid nanoparticles (Table 3). The melting points (the latter endothermic peaks) observed for  $\alpha$ -TC-free SLNs and  $\alpha$ -TC-loaded SLNs were associated with the  $\beta'$  and  $\alpha$  melting forms, although the recorded melting point of the SLNs was slightly decreased in comparison to the one obtained for the bulk lipid (73.38 °C). In addition, the peaks of SLNs, mainly the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs, were broader and

shifted to the left when compared to the bulk Compritol® 888 CG ATO peak. The endothermic peaks at 50.9 °C ( $\alpha$ -TC-free SLNs) and 48.55 °C ( $\alpha$ -TC-loaded SLNs) are similar to the peaks of poloxamer 188.

A melting depression and broadening peaks are observed when transforming a bulk lipid into nanoparticle form because of the high specific surface area (the lower the particle size, the lower the melting point) or when interactions between solid lipid and liquid lipid and/or surfactants (Araújo et al., 2010; Han et al., 2008; zur Mühlen et al., 1998) occur during the production process, which can distort crystallization and result in a lower melting enthalpy (Sinha et al., 2010). Table 3 shows the enthalpy values for bulk Compritol® 888 CG ATO (74.37 J/g),  $\alpha$ -TC-free SLNs (64.46 J/g) and  $\alpha$ -TC-loaded SLNs (53.85J/g). The addition of  $\alpha$ -tocopherol to SLNs ( $\alpha$ -TC-loaded SLNs) reduced the enthalpy required to melt the lipid, and the crystallinity degree determined from the enthalpy of melting was as follows:

$$DC = \Delta H_m / \Delta H_m^0,$$

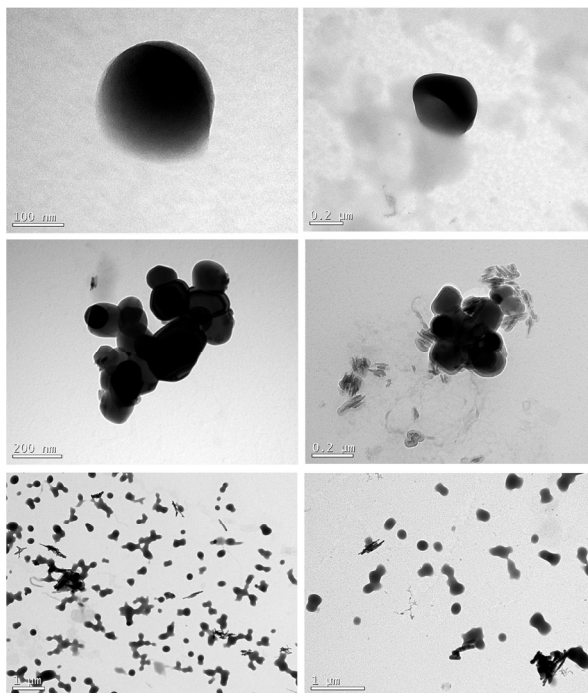
where  $\Delta H_m$  and  $\Delta H_m^0$  are the experimentally measured enthalpy of melting and the bulk enthalpy of melting, respectively (Chen and Hwang, 1995). The  $\alpha$ -TC-free SLNs (64.46 J/g) and  $\alpha$ -TC-loaded SLNs (53.85 J/g) showed a crystallinity degree of 86.67% and 72.41%, respectively. This energy reduction indicates an interaction of  $\alpha$ -tocopherol with the crystalline lipid matrix, which creates a more massive crystal order disturbance (lattice defects) and a decreased crystallinity degree that could allow enough space to accommodate  $\alpha$ -tocopherol molecules (Araújo et al., 2010; Fang et al., 2008; Long et al., 2006).

### 3.4 Particle morphology

TEM analysis was performed for the optimized formulation ( $\alpha$ -TC-loaded SLNs) and the control ( $\alpha$ -TC-free SLNs). The micrographs for the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs and  $\alpha$ -TC-free SLNs are shown in Fig. 3. The mean size of the  $\alpha$ -TC-loaded SLN (Fig. 3, left) and  $\alpha$ -TC-free SLN (Fig. 3, right) (215 and 297 nm, respectively) indicates that the particles had a nanometer size, similar to the sizes measured by photon correlation spectroscopy; furthermore, both SLNs had a similar spherical or near-spherical morphology. However, as can be observed in Fig. 3, both  $\alpha$ -TC-loaded SLNs (left, middle and bottom) and  $\alpha$ -TC-free SLNs (right, middle and bottom) displayed some agglomerations and crystallization of the lipid as evidenced by the presence of some lipid crystals, mainly in the  $\alpha$ -TC-free SLNs. As discussed by other

researchers, the shape change of SLNs is related to the crystal structure of the lipid matrix. Polymorphic transitions from  $\alpha$  to  $\beta'$  to  $\beta$  result in a transformation of the spherical shaped lipid crystals to elongated, needle shaped crystals (Helgason et al., 2009a, b). The presence of  $\alpha$ -TC appears to decrease the crystal formation, which is in agreement with the DSC and X-ray analysis discussed previously in this manuscript.

Moreover, the sample preparation for the TEM analyses, including sample drying for solvent removal, may cause modifications that can influence the particle shape (Müller et al., 2000), which may also explain the agglomeration present in the sample. The values of zeta potential for the freshly dispersed  $\alpha$ -TC-loaded SLNs and  $\alpha$ -TC-free SLNs were -41.9 and -46.9 mV, respectively. These values indicate appropriate electrostatic repulsion between the particles, which would prevent the agglomeration observed (Marcato, 2009; Teeranachaideekul et al., 2007; Schaffazick et al., 2003; Müller et al., 2000).



**Fig. 3** Transmission electron microscopy (TEM) of an  $\alpha$ -TC-loaded SLN (left) and an  $\alpha$ -TC-free SLN (right).



### 3.5 Stability studies

The mean particle size, polydispersity index (PI), zeta potential, and  $\alpha$ -tocopherol recovery rate were selected as reference parameters to evaluate the physicochemical stability of optimized  $\alpha$ -TC-loaded SLNs exposed to different temperatures (6, 20 and 40 °C) for 21 days (Table 4). The  $\alpha$ -TC-free SLN formulation was also studied to evaluate the effect of the addition of  $\alpha$ -tocopherol into the lipid matrix.

After production and during the cooling step, the SLNs were milky dispersions.  $\alpha$ -TC-loaded SLNs (freshly prepared, first day) had a smaller mean particle size and polydispersity index than the control sample ( $\alpha$ -TC-free SLNs), indicating a decrease in these parameters (Table 4) after the incorporation of  $\alpha$ -tocopherol into the solid matrix.  $\alpha$ -TC-free SLNs had a mean particle size of 297 nm; the mean diameter for the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs was 214.5 nm (first day). The polydispersity index was 0.5 (max. acceptable size distribution) for the  $\alpha$ -TC-free SLNs and 0.25 (narrow size distribution) for the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs. The zeta potential was lower when  $\alpha$ -tocopherol was added into the solid matrix and was -41.9 mV for the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs and -47.3 mV for the  $\alpha$ -TC-free SLNs. These values for the zeta potential were higher than 30 mV (in module), suggesting that these particles were likely to be electrochemically stable (Marcato, 2009; Teeranachaidekul et al., 2007).

Regarding the physical stability of SLN dispersions, the mean size of the  $\alpha$ -TC-free SLN formulation remained between 297 and 359 nm for the 21 days of the shelf life at 6 and 20 °C. The mean particle size increased slightly over time, and the PI values remained similar to the values from the first day (~0.5) for most samples, indicating a size distribution similar to the polydispersion distribution (Wu et al., 2011). For the  $\alpha$ -TC-loaded SLN formulation, the mean size ranged from 215 and 266 nm during the 21 days of shelf life at 6 and 20°C (unstable at 40°C), indicating only a slight particle size increase. The PI values were between 0.25 and 0.38 and did not exceed 0.28 for the samples stored at 6 °C.

**Table 4**

PCS diameters (Z-ave), polydispersity index and zeta potential of developed  $\alpha$ -TC-free SLN and  $\alpha$ -TC-loaded-SLN formulations obtained on days 1, 7, 14 and 21 of storage at different temperatures (6, 20 and 40 °C).

Sample/Day	Z-ave (nm)	PI	Zeta potential (mV)
<b><math>\alpha</math>-TC-free SLN</b>			
<b>Day 1</b>	297 ± 10.5	0.50 ± 0.03	-47.3 ± 0.72
<b>Day 7</b>			
6°C	310.9 ± 2.3	0.46 ± 0.05	-43.9 ± 1.48
20°C	316.7 ± 17.8	0.62 ± 0.04	-41.9 ± 0.35
40°C	*	*	-31.6 ± 0.71
<b>Day 14</b>			
6°C	314.7 ± 4.5	0.46 ± 0.01	-44.2 ± 0.64
20°C	337 ± 9.4	0.47 ± 0.01	-41.3 ± 2.05
40°C	*	*	-24.9 ± 0.49
<b>Day 21</b>			
6°C	329.5 ± 0.8	0.45 ± 0.04	-41.6 ± 1.98
20°C	359.3 ± 2.12	0.52 ± 0.02	-32.8 ± 2.76
40°C	*	*	-23.5 ± 3.68
<b><math>\alpha</math>-TC-loaded-SLN</b>			
<b>Day 1</b>	214.5 ± 3.2	0.25 ± 0.01	-41.9 ± 1.07
<b>Day 7</b>			
6°C	219.9 ± 3.7	0.26 ± 0.02	-36.6 ± 0.28
20°C	223.1 ± 13.0	0.26 ± 0.01	-30.1 ± 0.14
40°C	**	**	-32.0 ± 0.85
<b>Day 14</b>			
6°C	241.8 ± 6.6	0.26 ± 0.01	-37.1 ± 0.07
20°C	253.5 ± 7.6	0.37 ± 0.02	-31.8 ± 0.64
40°C	**	**	-32.2 ± 0.99
<b>Day 21</b>			
6°C	257.7 ± 5.94	0.28 ± 0.01	-37.7 ± 0.01
20°C	265.9 ± 10.6	0.38 ± 0.01	-31.0 ± 0.92
40°C	**	**	-32.7 ± 0.78

\*: unstable; \*\*: unstable and yellow supernatant.

Changes in the zeta potential were found over time during storage and at different temperatures for both investigated formulations. The high negative electrical charge (> 40 mV, in module) detected for the  $\alpha$ -TC-free SLN formulation remained until day 21 only for the samples stored at 6 °C. However, a more accentuated decrease in the zeta potential (-31.6 to -23.5 mV) was found for the  $\alpha$ -TC-free SLNs stored at 40 °C after 21 days. Freitas and Müller (1998) evaluated the effects of temperature on Compritol® 888 CG ATO SLNs stored at 8, 20 and 50

°C in the dark, and reported that storage at 50 °C induced rapid particle growth within 3 days. For the  $\alpha$ -TC-loaded SLNs, the zeta potential value ranged between -41.9 and -32.7 mV during the 21 days at different temperatures; the change in the values was smaller for the samples stored at 6 °C after 21 days (-41.9 to -36.6 mV). These results suggest that these dispersions were physically stable under storage temperature conditions of 6 and 20 °C. Thus, the presence of  $\alpha$ -tocopherol appeared to prevent aggregation at high temperatures until day 21; this finding is in agreement with the DSC and x-ray results, which indicated a crystallinity degree that decreased with the addition of  $\alpha$ -tocopherol.

The  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (%) was determined for the optimized SLN formulation ( $\alpha$ -TC-loaded SLN) after 1 and 21 days. On the first day, the recovery of  $\alpha$ -tocopherol was  $75.4 \pm 2.5$  %. After 21 days, the recoveries were  $75.3 \pm 1.9$ ,  $65.9 \pm 2.7$  and  $42 \pm 2.8$ % to samples storage at 6 °C, 20 °C and 40 °C, respectively. The samples storage at 40 °C showed intense yellow color after 7 days, probably due to  $\alpha$ -tocopherol degradation, explained to lower recovery of  $\alpha$ -tocopherol found in this temperature. Agreement with results of mean particle size, PI, zeta potential, and  $\alpha$ -tocopherol recovery rate (%), the best temperature of storage for  $\alpha$ -TC-loaded SLN optimized was at 6 °C.

#### 4 Conclusion

Solid lipid nanoparticles containing  $\alpha$ -tocopherol as a free radical scavenger prepared by the hot high homogenization technique were optimized and characterized. The lecithin concentration did not affect the mean particle size,  $\alpha$ -tocopherol recovery rate was not affected by the poloxamer concentration, and the zeta potential was not affected by the  $\alpha$ -tocopherol concentration. Models were developed and statistically analyzed to optimize the parameters of the solid lipid nanoparticle loaded with  $\alpha$ -tocopherol by the method used in the present study. The optimal conditions of 1.1% of  $\alpha$ -tocopherol, 0.75% of soy lecithin and 1.3% of poloxamer 188 were determined for the  $\alpha$ -TC-loaded SLN formulation with a mean particle size,  $\alpha$ -tocopherol recovery rate and zeta potential of 214.5 nm, 75.4 %, and - 41.9 mV, respectively. The x-ray diffraction analysis showed that  $\alpha$ -TC-loaded SLNs existed in both  $\alpha$  and  $\beta'$  polymorphic forms, while the  $\alpha$ -TC-free SLNs existed only in the  $\beta'$  polymorphic form. DSC thermograms revealed a melting point of

67°C for  $\alpha$ -TC-loaded SLNs and 71°C for  $\alpha$ -TC-free SLNs; the values could be attributed to Compritol. This finding is in agreement with the X-ray diffraction analysis regarding the lipid matrix polymorphism of SLNs. The  $\alpha$ -TC-loaded SLNs were physically stable during storage at 6 and 20°C for 21 days and were physically unstable at 40°C. The  $\alpha$ -tocopherol recovery rate for  $\alpha$ -TC-loaded SLNs was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced after 21 days of storage at temperatures of 20 and 40 °C; no changes were observed at a temperature of 6 °C. Based on these results, the storage of the  $\alpha$ -TC-loaded SLN formulation at 6 °C was selected for further research on future applications for food systems and/or active packaging.

## Acknowledgments

To CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESC (Fundação de Apoio a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina), LACBIO/ UFSC (Laboratório de Catálise Biomimética – Universidade Federal de Santa Catarina), LCME/UFSC (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal de Santa Catarina), EPAGRI/SC (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), and BASF for their support.

## References

- Araújo, J., Gonzalez-Mira, E., Egea, M.A., García, M.L., Souto, E.B., 2010. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. *Int. J. Pharm.* 393, 168-176.
- Baş, D., Boyacı, İ. H., 2007. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78, 836-845.
- Brewer, M.S., 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 221-247.
- Brubach J.B., Jannin, V., Mahler, B., Bourgaux, C., Lessieur, P., Roy, P., Ollivon, M., 2007. Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 336, 248-256.
- Bunjes, H., Unruh, T., 2007. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Delivery Rev.* 59, 379-402.

- Byun, Y., Hwang, J.B., Bang, S.H., Darby, D., Cooksey, K., Dawson, P.L., Park, H.J., Whiteside, S.V., 2011. Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *Food Sci. Technol.* 44, 24-28.
- Calado, V., Montgomery, D.C., 2003. Planejamento de Experimentos usando Statistica, E-Papers Serviços Editoriais, Rio de Janeiro.
- Chapman, D., 1962. The polymorphism of glycerides. *Chem. Rev.* 62, 433-456.
- Chen, H.-L., Hwang, J.C., 1995. Some comments on the degree of crystallinity defined by the enthalpy of melting. *Polymer.* 36, 4355-4357.
- Cheong, J.N., Tan, C.P., Man, Y.B.C., Misran, M., 2008.  $\alpha$ -Tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *J. Food Eng.* 89, 204-209.
- Dingler A., Blum, R.P., Niehus, H., Müller, R.H., Gohla, S., 1999. Solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>/lipopearls<sup>TM</sup>): a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. *J. Microencapsul.* 16, 751-767.
- Evans J.C., Kodali, D.R., Addis, P.B., 2002. Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 47-51.
- Fang, J.-Y., Fang, C.-L., Liu, C.-H., Su, Y.-H., 2008. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 633-640.
- Freitas, C., Müller, R.H., 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 125-132.
- Freitas, C., Müller, R.H., 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN<sup>TM</sup>) dispersions. *Int. J. Pharm.* 168, 221-229.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., Bourry, F., 2010. New trend in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Control. Release* 146, 276-290.
- Gonzalez-Mira, E., Egea, M.A., Souto, E.B., Calpena, A.C., García, M.L., 2011. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology* 22, 1-15.
- Han, F., Li, S., Yin, R., Liu, H., Xu, L., 2008. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf. A.* 315, 210-216.

- Hao, J., Fang, X., Zhou, Y., Wang, J., Guo, F., Li, F., Peng, X., 2011. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design. *Int. J. Nanomed.* 6, 683-692.
- Hatanaka, J., Chikamoria, H., Sato, H., Uchida, S., Debari, K., Onoue, S., Yamada, S., 2010. Physicochemical and pharmacological characterization of  $\alpha$ -tocopherol-loaded nano-emulsion system. *Int. J. Pharm.* 396, 188-193.
- Helgason, T., Awad, T.S., Kristbergsson, K., Decker, E.A., McClements, D.J., Weiss J., 2009a. Impact of surfactant properties on oxidative stability of  $\beta$ -carotene encapsulated within solid lipid nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8033-8040.
- Helgason, T., Awad, T.S., Kristbergsson, K., McClements, D.J., Weiss, J., 2009b. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Colloid Interface Sci.* 334, 75-81.
- Jores, K., Mehnert, W., Mäder, K., 2003. Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. *Pharm. Res.* 20, 1274-1283.
- Karn-orachai, K., Ruktanonchai, U., Smith, S.M., 2012. Effect of surfactant on characteristics of solid lipid nanoparticles (SLN). *Adv. Mater. Res.* 364, 313-316.
- Long, C., Zhang, L., Qian, Y., 2006. Preparation and crystal modification of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles. *Chin. J. Chem. Eng.* 14, 518-525.
- Lutton, E.S., 1950. Review of the polymorphism of saturated even glycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 27, 276-281.
- Marcato, P.D., 2009. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Rev. Eletr. Farm.* 6, 01-37.
- McGauley, S.E., Marangoni, A.G., 2002. Static crystallization behavior of cocoa butter and its relationship to network microstructure, in: Marangoni, A.G., Narine, S.S. (Eds.), *Physical Properties of Lipids*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 85-124.
- Mehnert, W., Mäder, K., 2012. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 83-101.
- Mehnert, W., Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165-196.
- Mozafari, M.R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z.E., Singh, H.J., 2006. Recent trends in the lipid-based

- nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2038-2045.
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161-177.
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 242, 121-128.
- Ndhlala, A.R., Moyo, M., Van Staden, J., 2010. Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* 15, 6905-6930.
- Sato K., 1988. Crystallization of fats and fatty acids, in: Garti, N., Sato, K. (Eds.), *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids (Surfactant Science Series)*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 267-303.
- Saupe, A., Rades, T., 2006. Solid lipid nanoparticle, in: Mozafari, M. R. (Eds.), *Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy*. Springer, Dordrecht, pp. 41-50.
- Schaffazick, S.R., Guterres, S.S., Freitas, L. de L., Pohlmann, A.R., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova.* 26, 726-737.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2010. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 930-940.
- Sinha, V.R., Srivastava, S., Goel, H., Jindal, V., 2010. Solid lipid nanoparticles (SLN'S): trends and implications in drug targeting. *Int. J. Adv. Pharm. Sci.* 1, 212-238.
- Souto, E.B., Mehnert, W., Müller, R.H., 2006. Polymorphic behaviour of Compritol®888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. *J. Microencapsul.* 23, 417-433.
- Tan, C.P., Nakajima, M., 2005.  $\beta$ -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chem.* 92, 661-671.
- Teeranachaiidekul, V., Müller, R.H., Junyaprasert, V.B., 2007. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC): effects of formulation parameters on physicochemical stability. *Int. J. Pharm.* 340, 198-206.
- van Aardt, M., Duncan, S.E., Long, T.E., O'Keefe, S.F., Marcy, J.E., Sims, S.R., 2004. Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: thermogravimetric analysis. *J. Agric. Food Chem.* 52, 587-591.

- Weiss, J., Decker, E.A., McClements, D.J., Kristbergsson, K., Helgason, T. and Awad, T., 2008. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophys.* 3, 146-154.
- Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W., 2011. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 456-469.
- Yenilmez, E., Yazan, Y., 2010. Release of vitamin E from different topical colloidal delivery systems and their in vitro-in vivo evaluation. *Turk. J. Pharm. Sci.* 7, 167-188.
- Yoo, S-H., Song, Y-B., Chang, P-S., Lee, H.G., 2006. Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 38, 25-30.
- zur Mühlen, A., Schwarz, C., Mehnert, W., 1998. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 149-155.



**CAPÍTULO 3**  
**ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE LIBERAÇÃO E**  
**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FILMES DE PVA**  
**INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS**  
**SÓLIDAS CONTENDO  $\alpha$ -TOCOFEROL**



## RESUMO

Foram desenvolvidos filmes com capacidade antioxidante baseados em poli (álcool vinílico) (PVA) e nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TC-NLS). Os filmes de PVA incorporados com  $\alpha$ -TC-NLS em três diferentes proporções (30, 50 e 70%) foram preparados pelo método de *casting*. As propriedades de emissão de fluorescência, de transmissão de luz e opacidade, a atividade antioxidante e a liberação do  $\alpha$ -tocoferol dos filmes foram estudadas. Os filmes de PVA adicionados de  $\alpha$ -TC-NLS mostraram atividade antioxidante elevada, excelentes propriedades de barreira contra a luz UV e visível e intensidade de fluorescência estável durante 12 semanas de estudo. Foi observada uma liberação rápida de  $\alpha$ -TC para o simulador de alimentos lipídicos.

**Palavras-chave:** Embalagem ativa. Nanoencapsulação. Polímero biodegradável. Antioxidante natural.

## ABSTRACT

Antioxidant films based in poly (vinyl alcohol) (PVA) and  $\alpha$ -tocopherol-loaded SLN ( $\alpha$ -TC-loaded SLN) were developed. PVA and  $\alpha$ -TC-loaded SLN films in three different proportions were prepared by casting method. The fluorescence analysis, light transmission and opacity, antioxidant activity and release of  $\alpha$ -tocopherol of the films were studied. PVA films added  $\alpha$ -TC-loaded SLN showed a great antioxidant activity and excellent barrier properties against UV and visible light. The PVA films showing similar emission of fluorescence intensity and good stability during the 12 weeks of study. In addition, it was observed a burst release of  $\alpha$ -TC to food simulant.

**Keywords:** Active package. Nanoencapsulation. Biodegradable polymer. Natural antioxidant.

## 1 INTRODUÇÃO

A embalagem, além de sua função primária, servindo como barreira ao ambiente externo até o consumo do produto alimentício, pode desempenhar outras funções importantes, tais como prevenção e/ou inibição do processo de oxidação dos alimentos embalados, atuando como embalagem ativa com propriedades antioxidantes. Neste conceito, antioxidantes podem ser incorporados na embalagem e serem liberados para cumprir esta função (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; SOZER; KOKINI, 2009; LEE, 2005; HAN, 2005; WESSLING et al., 1999). O processo de oxidação, a principal causa de deterioração em alimentos à base de lipídeos, reduz a qualidade dos alimentos pelo desenvolvimento da rancidez oxidativa, formação de compostos que modificam o sabor, o aroma e a cor dos alimentos, polimerização e outras reações que reduzem a vida útil, o valor nutritivo e a qualidade sensorial do produto alimentar (BREWER, 2011; NDHLALA; MOYO; VAN STADEN, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006; VAN AARDT et al., 2004; TUCKER, 2003).

Os antioxidantes sintéticos e os naturais são amplamente utilizados em produtos alimentícios; entretanto, alguns antioxidantes sintéticos tornaram seu uso controverso devido aos potenciais efeitos adversos sobre a saúde humana. As fontes naturais de antioxidantes, tais como os tocoferóis, têm sido aplicadas extensivamente na indústria de alimentícia (SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006), uma vez que são substâncias reconhecidas como seguras para os alimentos (VERMEIREN et al., 1999; SOZER; KOKINI, 2009).

A vitamina E possui vários isômeros, incluindo o  $\alpha$ -tocoferol, que é a forma mais abundante e biologicamente ativa na natureza (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; BYUN et al., 2011; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; HATANAKA et al., 2010).  $\alpha$ -Tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que atua efetivamente no sequestro de radicais lipídicos e podem atuar como sinergistas com outros antioxidantes (BYUN et al., 2011; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; NDHLALA; MOYO; VAN STADEN, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010; YENÍLMEZ; YAZAN, 2010). No entanto, o fato desses compostos serem insolúveis em água torna seu uso problemático nas formulações de alimentos e filmes para embalagens (WEISS et al., 2008; YOO et al., 2006; TAN; NAKAJIMA, 2005). Desta forma, a nanotecnologia oferece a possibilidade de melhorar as propriedades dos compostos bioativos, tais como liberação, solubilidade

e biodisponibilidade (SOZER; KOKINI, 2009; CHEONG et al., 2008; WEISS et al., 2008; MOZAFARI et al., 2006).

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), introduzidas em 1991, são uma das mais promissoras tecnologias de encapsulamento em crescente desenvolvimento na área de nanotecnologia; possuem núcleo composto por lipídeo sólido a temperatura ambiente, no qual o composto bioativo está integrado (MEHNERT; MÄDER, 2012; KHERADMANDNIA et al., 2010; SINHA et al., 2010; SWATHI et al., 2010), e os lipídeos e as substâncias que estabilizam as NLS são fisiológicos, biodegradáveis e geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) (MEHNERT; MÄDER, 2012; SAUPE; RADES, 2006). O  $\alpha$ -tocoferol é um composto lipofílico e, por isso, um candidato adequado para o encapsulamento em sistemas de NLS (FANGUEIRO et al., 2012; YENILMEZ; YAZAN, 2010; CHEONG et al., 2008).

O uso de compostos ativos encapsulados e incorporados na própria embalagem parece uma abordagem promissora, pela possibilidade de maior proteção e liberação dos mesmos (SOZER; KOKINI, 2009). A liberação do  $\alpha$ -tocoferol a partir da embalagem depende de diversos fatores. Wessling et al. (1999) reportaram que a retenção do  $\alpha$ -tocoferol foi influenciada pelo tipo de polímero bem como teor de gordura, álcoois e ácidos orgânicos no produto alimentar.

As tendências atuais indicam um crescimento na utilização de plásticos biodegradáveis em decorrência do aumento da disponibilidade de materiais adequados e pela pressão da sociedade e da legislação (KUCHAIYAPHUM et al., 2013; THELLEN; CHENEY; RATTO, 2013; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; MARTINS, CERQUEIRA, VICENTE, 2012; TANG, ALAVI, 2011; SIRIPATRAWAN, HARTE, 2010). Polímeros biodegradáveis a partir de fontes fósseis são comumente usados para aplicações em embalagens. Um exemplo deste tipo de polímero é o álcool polivinílico (PVA) (TANG; ALAVI, 2011), um polímero solúvel em água que tem atraído interesse para a produção de materiais plásticos ecológicos e tem sido utilizado em grande variedade de aplicações nas áreas biomédica, farmacêutica, têxtil, de papel e alimentar (ZHU et al., 2013; SILVA et al., 2013; TANG; ALAVI, 2011; SIN et al., 2010; MANSUR; OREFICE; MANSUR, 2004; ARANHA; LUCAS, 2001).

O objetivo deste estudo foi desenvolver filmes de PVA incorporados com nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol e caracterizá-los quanto a estabilidade, transparência, capacidade antioxidante e propriedades de liberação em simulador de alimentos

lipídicos em função das diferentes proporções de nanopartículas adicionadas aos filmes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 *Matérias-primas*

O álcool polivinílico (PVA) (grau de hidrólise entre 86,5-89,5% e ponto de fusão entre 160-240 °C) foi obtido da Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, Brasil). O lipídeo sólido behenato de glicerila (Compritol® 888 CG ATO, ponto de fusão de 73 °C) foi obtido da Gatefossé (Saint-Priest, França). O  $\alpha$ -tocoferol (98%, grau de pureza HPLC), o metanol (grau de pureza HPLC), o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e o radical ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). A lecitina de soja (LIPOID S75, 68-73% de fosfatidilcolina, marca Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemanha) foi adquirida da empresa Lipid Ingredients & Technologies (São Paulo, Brasil). O poloxamer 188 (Pluronic® F68 Pastille - BASF AG, Ludwigshafen, Alemanha) foi gentilmente doado pela empresa Foscher Solutions Provider (São Paulo, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e usados como recebido.

### 2.2 *Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas contendo $\alpha$ -tocopherol*

As nanopartículas lipídicas sólidas incorporadas com  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TC-NLS) foram preparadas pela técnica de homogeneização à alta pressão, a quente (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000), de acordo com de Carvalho et al. (2013). O lipídeo sólido Compritol® 888 CG ATO (5,0% m/m), foi aquecido a 80-85 °C para ocasionar sua completa fusão; o  $\alpha$ -TC (1,1% m/m) e a lecitina de soja (0,75% m/m) foram dissolvidos no lipídeo fundido para formar a fase lipídica (FL). A fase aquosa (FA), consistindo em uma solução de Poloxamer 188 (1,3% m/m), a quente, foi vertida sobre a FL sob agitação de 9000 rpm, usando Ultra-Turrax T25 (IKA, Alemanha), durante 1 minuto, formando a pré-emulsão. A pré-emulsão foi adicionada ao homogeneizador (APLAB-10, Artepeças, Brasil), aplicando a pressão de 500 bar. Após 7 ciclos de homogeneização (cinco minutos), a dispersão foi resfriada a 20 °C, para formação das nanopartículas lipídicas sólidas, filtrada através de um papel de filtro de 8  $\mu$ m e transferida para frascos âmbar. A temperatura do sistema de homogeneização foi mantida a 85 °C, através de banho termoestabilizado.

### 2.3 Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas contendo $\alpha$ -tocopherol

O diâmetro médio (Z-ave), o índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta ( $\zeta$ ) das  $\alpha$ -TC-NLS foram determinados através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*), utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As amostras foram apropriadamente diluídas em água Milli-Q<sup>®</sup> e as medidas foram realizadas na temperatura de 25 °C, com um ângulo de detecção de 173°. O conteúdo total de  $\alpha$ -tocopherol nas NLS foi determinado após completa dissolução de 1,0 mL das dispersões em 10,0 mL de metanol. A mistura foi submetida durante 30 minutos ao banho ultrassom para a extração do  $\alpha$ -tocopherol das NLS. Após, a solução foi filtrada e o  $\alpha$ -tocopherol foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, LC-20AT, Shimadzu, Quioto, Japão). O rendimento de  $\alpha$ -tocoferol (%) foi estimado comparando o conteúdo total de  $\alpha$ -tocopherol encontrado na dispersão com o conteúdo inicial adicionado a formulação, de acordo com a Equação 1. O conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol foi expresso em mg de  $\alpha$ -tocoferol.mL<sup>-1</sup> de dispersão.

$$\text{Recuperação(\%)} = 1.0 - \left( \frac{\text{concentração total de } \alpha - \text{TC} - \text{concentração inicial de } \alpha - \text{TC}}{\text{concentração inicial de } \alpha - \text{TC}} \right) \quad (1)$$

### 2.4 Preparação dos filmes

Para o desenvolvimento dos filmes pelo método de *casting*, as soluções formadoras de filmes foram preparadas pela dissolução de PVA em água na temperatura de  $97 \pm 3,0$  °C. As soluções de PVA foram resfriadas a temperatura ambiente e as  $\alpha$ -TC-NLS foram incorporadas para obter as concentrações finais de 0, 30, 50, e 70% (w/w) de  $\alpha$ -TC-NLS e 1,5% (w/v) de PVA. O filme controle (sem adição de  $\alpha$ -TC-NLS) e os filmes adicionados de  $\alpha$ -TC-NLS (PV/TC-NL 30, 50 e 70) foram preparados a  $20 \pm 2$  °C, sob agitação magnética. Em seguida, uma quantidade de 12 g das soluções filmogênicas foram espalhadas e moldadas em placas de Petri de poliestireno (90 mm de diâmetro). As placas foram armazenadas a temperatura de  $20 \pm 2$  °C, sobre superfície nivelada, em capela de exaustão, até completa secagem. Os filmes secos foram removidos manualmente das placas com a ajuda de espátula e armazenados em dessecador (0% umidade relativa) para posterior caracterização.



### 2.5 Análise de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram realizados através do espectrômetro de fluorescência Hitachi modelo F-4500 (Tóquio, Japão). Os filmes de PVA puro e os PV/TC-NL30, 50 e 70 foram recortados em tamanhos retangulares de 2,0 x 3,5 cm para que encaixassem no porta amostra. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 2,5 nm. As amostras foram excitadas em 290 nm e os espectros de emissão foram obtidos de 300 to 450 nm. As medidas foram realizadas com três replicatas durante 90 dias.

### 2.6 Transmissão de luz e opacidade

Para as medidas de transmissão de luz e opacidade, os filmes controle e os PV/TC-NL30, 50 e 70 foram recortados, em triplicata, em tamanhos retangulares para que encaixassem na cubeta de quartzo. A transmissão de luz através dos filmes foi medida pela exposição dos filmes contra a radiação ultravioleta (UV) e a luz visível nos comprimentos de onda de 210 e 320 nm (região ultravioleta) e 500 e 620 nm (região visível), utilizando o espectrofotômetro UV-visível Hitachi modelo U-1800 (Tóquio, Japão). A opacidade dos filmes foi determinada de acordo com o método usado por Park, Je e Kim (2004), através da leitura da absorbância dos filmes no comprimento de onda de 600 nm usando espectrofotômetro UV-visível Hitachi modelo U-1800 (Tóquio, Japão). A opacidade foi calculada através da Equação 2.

$$O = \frac{Abs_{600}}{x} \quad (2)$$

onde  $Abs_{600}$  representa o valor da absorbância em 600 nm e  $x$  a espessura dos filmes (mm). De acordo com esta equação, valores altos de  $O$  indicam menos transparência e maior o grau de opacidade. Uma cubeta vazia (controle) foi utilizada como referência. A espessura dos filmes foi medida utilizando o micrômetro digital DIGIMESS 110.284 (São Paulo, Brazil) com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0-25 mm.

### 2.7 Determinação da atividade antioxidante

A capacidade dos filmes de inibir radicais livres foi avaliada através dos ensaios de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. As amostras de filmes foram preparadas da mesma forma para os dois ensaios.

Aproximadamente 100 mg de cada filme (controle e PV/TC-NLS 30, 50 e 70) foram recortados em pequenas peças e agitados em vortex durante 3 minutos com 5 mL de etanol 95%. A mistura ficou em repouso durante 3 h a 25 °C para extração do antioxidante e então novamente agitada por outros três minutos.

### 2.7.1 Método DPPH

O ensaio utilizando o radical DPPH foi realizado de acordo com Byun, Kim e Whiteside (2010), com algumas modificações. Após a preparação do radical (0,1 mM DPPH em etanol 80%) foi realizada a leitura inicial (controle) no comprimento de onda de 515 nm. Em seguida, uma alíquota da solução etanólica contendo os filmes (100 µL da diluição 1:20), foi misturada com 2,9 mL do radical DPPH. A mistura foi agitada e as amostras foram mantidas ao abrigo de luz por 30 minutos. Após, a absorbância das amostras foi medida a 515 nm usando o espectrofotômetro UV-visível Hitachi modelo U-1800 (Tóquio, Japão). O ensaio foi realizado em triplicata e a atividade antioxidante dos filmes foi expressa em percentagem de inibição do radical DPPH (RSA %) para 1 mg de filme e foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$RSA (\%) = \left( 1 - \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde  $Abs_{controle}$  representa a absorbância do radical DPPH e  $Abs_{amostra}$  representa a absorbância da amostra.

### 2.7.2 Método ABTS

O ensaio usando o radical ( $ABTS_{\cdot}^{+}$ ) foi realizado de acordo com Re et al. (1999). O radical  $ABTS_{\cdot}^{+}$  foi preparado pela reação da solução estoque de  $ABTS_{\cdot}^{+}$  (7 mM ABTS) com a solução de persulfato de potássio (2,45 mM), seguida do armazenamento desta por 12-16 h antes do uso. Após, a solução de radical  $ABTS_{\cdot}^{+}$  foi diluída com etanol (96°) para obter uma absorbância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. Uma alíquota de 60µL (diluição 1:20) da solução contendo os filmes foi adicionada a 2940 µL da solução radical de  $ABTS_{\cdot}^{+}$  e agitadas em vortex por 30 segundos e, após 7 minutos no escuro, a absorbância a 754 nm foi lida usando o espectrofotômetro UV-visível Hitachi modelo U-1800 (Tóquio, Japão). O ensaio foi realizado em triplicata e a atividade antioxidante dos filmes foi expressa como atividade sequestradora de radicais livres do Trolox [ $\mu\text{mol TEAC (Trolox equivalent).g}^{-1}$ ], onde os

valores TEAC foram definidos como a razão entre as inclinações das retas, onde % I (percentagem de inibição) *versus* concentração das amostras e Trolox foram plotados. Trolox foi usado como padrão (15  $\mu\text{M}$  = 0,13209 g/500 mL).

### 2.8 Liberação do $\alpha$ -TC a partir dos filmes de PVA incorporados com $\alpha$ -TC-NLS

As condições do ensaio da liberação do  $\alpha$ -TC a partir dos filmes PV/TC-NL foram baseadas na Diretiva 82/711/CEE (*European Communities*, 1982). Neste estudo, o etanol a 95% foi utilizado como simulador de alimentos lipídicos (simulador D), uma vez que o  $\alpha$ -tocoferol é um antioxidante com características hidrofóbicas.

O ensaio foi realizado diariamente durante 10 dias. As amostras de cada filme (20 peças de 2 x 2,5 cm) foram pesadas previamente e colocadas em frascos de vidro âmbar contendo 30 mL de etanol a 95%. Os frascos foram hermeticamente selados e alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram injetados na coluna de HPLC (Shimadzu Liquid chromatographer, Tóquio, Japão) para medir a liberação de  $\alpha$ -TC no tempo. Estas medidas foram realizadas em duplicata. O gráfico de liberação foi expresso como concentração de  $\alpha$ -TC em um tempo particular.

### 2.9 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Tóquio, Japão) equipado por um sistema controlador (CBM-20A), um sistema de bomba e um degaseificador (LC-20AT), um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), um forno (CTO-20A) e um injetor automático (SIL-20A). A fase estacionária consistiu de uma coluna  $\text{C}_{18}$  monomérica CLC-ODS (5  $\mu\text{m}$  x 250mm x 4,6 mm) (Shim-pack, Shimadzu, Quioto, Japão) protegida por uma pré-coluna CLC G-ODS (5  $\mu\text{m}$  x 12,5 mm x 4,6 mm) (Shim-pack, Shimadzu, Tóquio, Japão).

A determinação quantitativa do  $\alpha$ -tocoferol foi realizada em  $\lambda = 292$  nm utilizando como fase móvel a metanol:água (99:1) (v/v) em uma taxa de fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna analítica foi mantida a 50 °C e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ . Os dados foram armazenados e processados por *Workstation LC system* (Tóquio, Japão). As curvas de calibração da área do pico *versus* a concentração de  $\alpha$ -tocoferol foram lineares na faixa entre 0,2-1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. A equação de regressão do gráfico de calibração (n = 3) foi:  $y = 8,10^6x + 44542$  ( $R^2=0,9998$ ).

### 2.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software STATISTICA (versão 7.0, 2004 StatSoft Inc. EUA). Análise de variância e o teste de Tukey foram realizados para determinar as diferenças significativas. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de cada tratamento. Os valores de  $p$  menores que 0.05 foram considerados significativamente diferentes estatisticamente.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização das $\alpha$ -TC-NLS

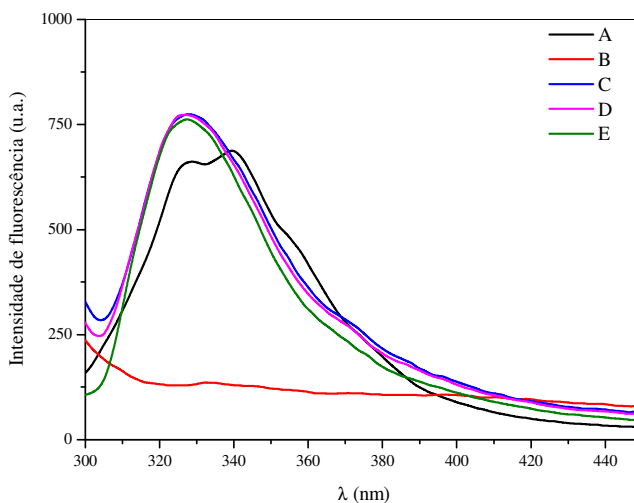
As propriedades físico-químicas das NLS são controladas por muitos fatores, tais como natureza e quantidade dos lipídeos e surfactantes e concentração do composto ativo na formulação (MEHNERT; MÁDER, 2012). Os valores médios de diâmetro de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta ( $\zeta$ ) para as  $\alpha$ -TC-NLS foram  $214,5 \pm 3,2$  nm;  $0,25 \pm 0,01$  and  $-41,9 \pm 1,1$  mV, respectivamente. Fangueiro et al. (2011) reportaram valores de Z-ave, IP e  $\zeta$  de 303,8 nm; 0,094 e  $-42,3$  mV, respectivamente, para NLS incorporadas com  $\alpha$ -TC pelo método de HAP. Dingler et al. (1999) também encontraram a mesma faixa de Z-ave (235 nm) para NLS contendo  $\alpha$ -TC produzidas por HAP. O valor de IP foi de 0,25, indicando uma distribuição de tamanho estreita. O valor do potencial zeta foi maior do que 30 mV (em módulo), sugerindo que esta dispersão foi eletroquimicamente estável (MARCATO, 2009; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007). A taxa de recuperação do  $\alpha$ -TC foi de  $75.4 \pm 2.5\%$  da massa adicionada inicialmente às NLS (1.1% m/v), isto é, a concentração final de  $\alpha$ -TC nas NLS foi de 0,83%.

### 3.2 Análise de fluorescência

A análise de fluorescência foi realizada para avaliar a estabilidade do  $\alpha$ -TC encapsulado e incorporado nos filmes durante 12 semanas. A Figura 1 ilustra os espectros de fluorescência do filme de PVA puro e dos filmes PV/TC-LN 30, 50 e 70 após o armazenamento por 90 dias. Uma solução com  $\alpha$ -TC degradado (Figura 1A) foi usada para mostrar a mudança da curva de fluorescência após a degradação. Um pico em 326 nm foi observado em todos os filmes adicionados de  $\alpha$ -TC-NLS (Figura 1 C, D e E), o qual representa a emissão de fluorescência máxima do  $\alpha$ -TC (KAGAN; QUINN, 1988), e não se parece com a curva de fluorescência do  $\alpha$ -TC degradado, mostrando que o  $\alpha$ -TC não sofreu

degradação quando encapsulado nas NLS e incorporado na matriz de PVA. Nenhum fenômeno de fluorescência foi observado no filme de PVA puro (Figura 1B) nos comprimentos de onda observados (300 a 450 nm), indicando que o PVA não teve influência na intensidade de fluorescência do  $\alpha$ -TC.

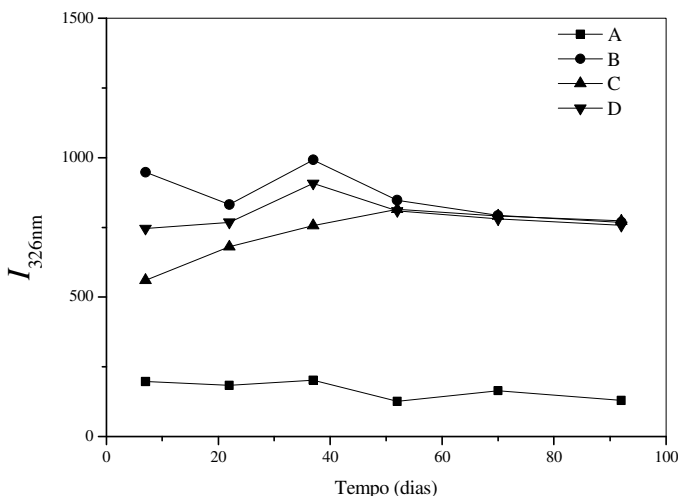
**Figura 1** Espectros de fluorescência. A) Tocoferol degradado; B) filme de PVA controle, C) PV/TC-NL30, D) PV/TC-NL50 e E) PV/TC-NL70.



**Fonte** autor (2013).

A Figura 2 ilustra o gráfico da emissão máxima em 326 nm em função do tempo, a fim de verificar a estabilidade do  $\alpha$ -TC ( $\alpha$ -TC-NLS) adicionado aos filmes de PVA em diferentes concentrações. Os filmes de PVA incorporados com 30, 50 e 70% de  $\alpha$ -TC-NLS (Figura 1B, C e D) apresentaram faixa de intensidade de fluorescência semelhante e constante durante as 12 semanas do estudo. A diferença de concentração de  $\alpha$ -TC nos filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70 não afetou os resultados da intensidade de fluorescência. Esses resultados demonstram que o  $\alpha$ -TC nanoencapsulado e incorporado na matriz polimérica se manteve estável nas condições de armazenamento durante 12 semanas.

**Figura 2** Gráfico da emissão máxima em 326 nm. A) filme de PVA controle, B) PV/TC-NL30, C) PV/TC-NL50 e D) PV/TC-NL70.



**Fonte** autor (2013).

### 3.3 Transmissão de luz e opacidade

Os filmes adicionados de  $\alpha$ -TC-NLS apresentaram coloração ligeiramente amarelada (aspecto visual), diferentemente do filme de PVA puro (transparente) e esta característica está relacionada com uma modificação da propriedade de barreira à luz. Para confirmar isso, a análise espectroscópica dos filmes nos comprimentos de onda de 210, 320, 500 e 620 nm foi realizada (Tabela 1).

Todos os filmes PV/TC-NL exibiram uma redução na transmissão da radiação UV, especialmente no comprimento de onda de 210 nm. Nos filmes PV/TC-NL (30, 50 e 70) houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) no percentual da transmitância em comparação ao filme controle (PVA puro), porém não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os filmes PV/TC-NL30, 50 e 70 neste comprimento de onda. Em 320 nm a transmissão da radiação UV diminuiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes PV/TC-NL e destes em relação ao filme controle. Nos comprimentos de onda do visível (500 e 620 nm), todos os filmes PV/TC-NL mostraram níveis de transmissão de luz significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que o filme de PVA puro, ocorrendo diminuição

da transmissão da luz visível quando a concentração de  $\alpha$ -TC-NLS foi adicionada ao filme de PVA.

**Tabela 1** Características de transmissão de luz e opacidade para filmes controle e PV/TC-LN.

Filme	Transmissão de Luz				Opacidade (%)
	Transmitância (%)				
	210 nm	320 nm	500 nm	620 nm	
PVA					
(controle)	24,6 ± 0,30 <sup>a</sup>	85,9 ± 0,98 <sup>a</sup>	91,10 ± 1,75 <sup>a</sup>	89,7 ± 0,85 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,07 <sup>a</sup>
PV/TC-NL30	0,5 ± 0,00 <sup>b</sup>	35,3 ± 0,91 <sup>b</sup>	65,06 ± 0,95 <sup>b</sup>	71,3 ± 0,56 <sup>b</sup>	1,82 ± 0,07 <sup>b</sup>
PV/TC-NL50	0,5 ± 0,00 <sup>b</sup>	11,2 ± 0,42 <sup>c</sup>	48,80 ± 3,39 <sup>c</sup>	45,8 ± 0,42 <sup>c</sup>	2,43 ± 0,40 <sup>c</sup>
PV/TC-NL70	0,5 ± 0,00 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,56 <sup>d</sup>	31,40 ± 1,08 <sup>d</sup>	36,9 ± 0,52 <sup>d</sup>	3,09 ± 0,02 <sup>d</sup>

Valores apresentados como média ± desvio-padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna representam diferença significativa dos valores ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Como pode ser observado na Tabela 1, a adição de  $\alpha$ -TC-NLS aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a opacidade dos filmes PV/TC-LN, especialmente na concentração de 70%. O filme de PVA perdeu a sua aparência transparente e incolor quando foi incorporado com  $\alpha$ -TC-NLS; no entanto, os filmes resultantes adquiriram melhora das propriedades de barreira à luz UV e visível, o que poderia ser uma maneira de proteger os produtos alimentares, evitando a oxidação lipídica do alimento induzida pela luz (NÚÑEZ-FLORES et al., 2013). Estes resultados indicam que os filmes PV/TC-NL são adequados para serem usados como material de embalagem.

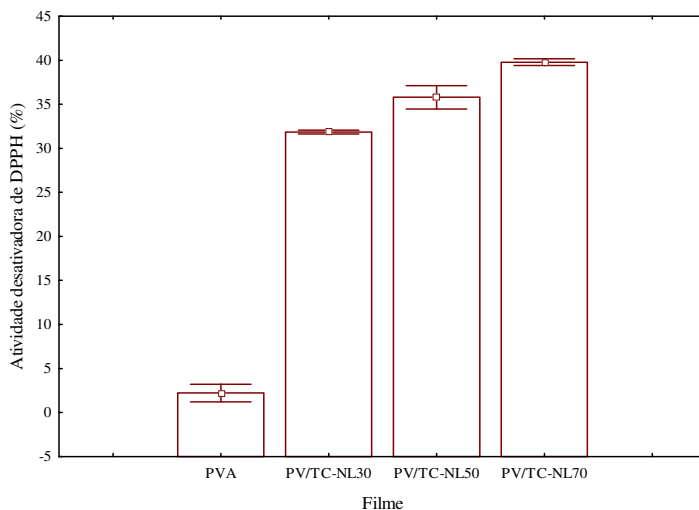
Martins, Cerqueira e Vicente (2012) relataram que um aumento da concentração de  $\alpha$ -TC em filme levou a uma melhora da barreira à luz UV e visível. Wessling, Nielsen e Leufvén (2000) mostraram que o filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) contendo  $\alpha$ -TC ofereceu proteção UV em relação ao filme sem  $\alpha$ -TC. Manzanarez-Lopez et al. (2011) também reportaram que os filmes de ácido polilático (PLA) com adição de  $\alpha$ -TC poderiam proteger os produtos alimentares contra a luz UV.

### 3.4 Atividade antioxidante

Os radicais DPPH e ABTS têm sido amplamente utilizados para avaliar a capacidade dos compostos ativos como desativadores de radicais livres ou doadores de hidrogênio. A capacidade de desativação destes radicais pelos filmes de PVA puro e incorporados com  $\alpha$ -TC-NLS foi determinada por métodos de DPPH e ABTS e está apresentada nas Figuras 3 e 4.

O filme de PVA controle apresentou atividade desativadora de radicais de  $2,2 \pm 1,0\%$  e  $4,9 \pm 4,4$  TEAC  $\mu\text{Mol.g}^{-1}$  para os ensaios de DPPH e ABTS, respectivamente. Como esperado, a incorporação de  $\alpha$ -TC-NLSs nos filmes ocasionou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da atividade antioxidante dos filmes de PVA. Para o ensaio DPPH os filmes PV/TC-NL exibiram capacidade de desativação do radical, com valores de  $31,8 \pm 0,2$ ;  $35,8 \pm 1,4$  e  $39,8 \pm 0,4\%$  em 1 mg de filme para as amostras PV/TC-NL 30, 50 e 70, respectivamente. O mesmo pode ser observado para o ensaio de ABTS, em que os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70 obtiveram os valores de capacidade antioxidante de  $278,4 \pm 6,0$ ;  $337,4 \pm 6,7$  e  $401,1 \pm 19,0$  TEAC  $\mu\text{Mol.g}^{-1}$ , respectivamente, em 1 mg de filme. Estes resultados mostraram que a atividade desativadora dos radicais DPPH e ABTS pelos filmes aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de  $\alpha$ -TC-NLS, uma vez que o filme PV/TC-NL 70 exibiu a atividade antioxidante mais elevada para ambos os métodos.

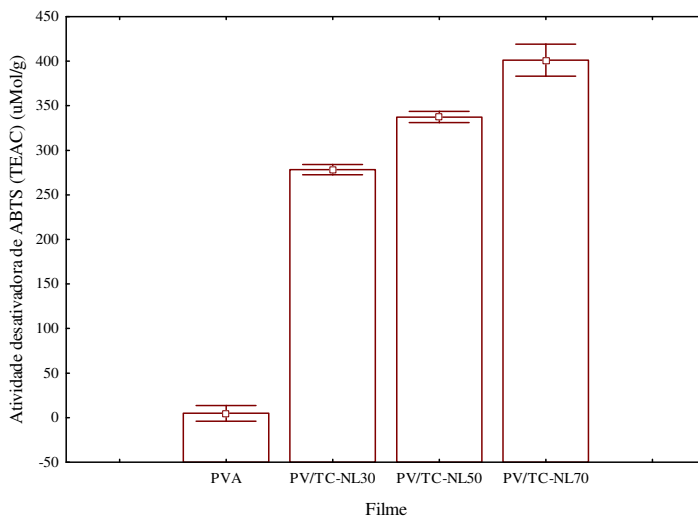
**Figura 3** Atividade desativadora (%) do radical DPPH (%) para 1mg de filmes de PVA controle e PV/TC-NL 30, 50 e 70. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão (teste de Tukey).



Fonte autor (2013).



**Figura 4** Atividade desativadora (%) do radical ABTS (%) para 1 mg de filmes de PVA controle e PV/TC-NL 30, 50 e 70. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão (teste de Tukey).



**Fonte** autor (2013).

No estudo realizado por Graciano-Verdugo et al. (2010), a estabilidade oxidativa do óleo de milho foi mantida pela migração  $\alpha$ -TC através do filme de PEBD, quando avaliada pelo teor de hexanal. Manzanarez-Lopez et al. (2011) relataram que a difusão de  $\alpha$ -TC para o óleo de soja foi capaz de diminuir o período de indução da oxidação no filme de ácido polilático (PLA). Martins, Cerqueira e Vicente (2012) avaliaram os efeitos da incorporação de  $\alpha$ -TC em filmes à base de quitosana e reportaram que a capacidade antioxidante foi maior quando o  $\alpha$ -TC estava presente nos filmes, os quais exibiram valores de atividade de desativação de radicais de cerca de 97,0%. Byun et al. (2010) obtiveram o valor de atividade desativadora do radical DPPH de 90,4% em filmes de PLA adicionados com  $\alpha$ -TC. Nestes dois últimos trabalhos, a massa do filme utilizada no ensaio foi de 100 mg, ou seja, uma massa de 100 vezes maior do que a utilizada no presente trabalho, o que demonstra que os filmes PV/TC-NL possuem atividade antioxidante superior em comparação com os trabalhos relatados. Isto pode ser devido ao fato de o  $\alpha$ -TC ser um antioxidante hidrofóbico encapsulado em uma matriz hidrofóbica (behenato de glicerila), ou seja, possui uma

maior afinidade pelo etanol (usado na preparação da amostra) do que pela matriz polimérica (PVA), uma vez que esta é hidrofílica.

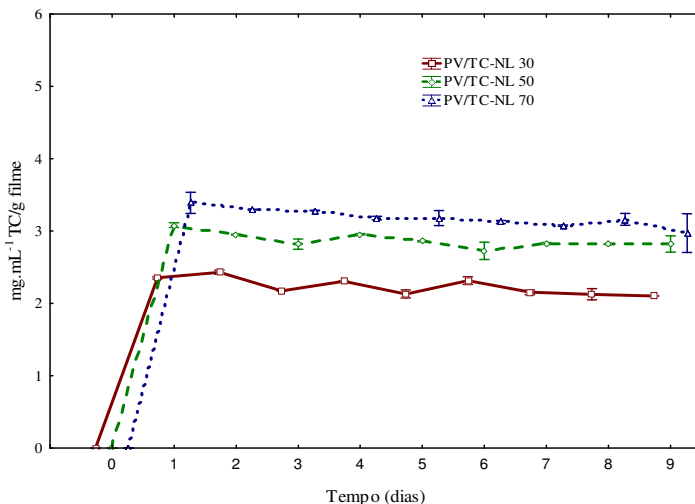
### 3.5 Teste de liberação

A Figura 5 ilustra o perfil de liberação do  $\alpha$ -TC a partir dos filmes PV/TC-NL para o etanol 95% durante 10 dias. No primeiro dia foram liberados  $95,3 \pm 0,71$ ;  $76,4 \pm 3,9$  e  $58,8 \pm 2,7\%$  do total de  $\alpha$ -TC a partir dos filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70, respectivamente. Nos dias posteriores, não houve aumento na concentração do  $\alpha$ -TC liberado pelos filmes PV/TC-NL 50 e 70, ou seja, a concentração total de  $\alpha$ -TC inicialmente adicionada a estes filmes não foi liberada até o final de 10 dias de contato destes com a solução de etanol a 95%. Para o filme PV/TC-NL 30 houve uma liberação de  $98,4 \pm 1,1\%$  no segundo dia, próximo do total adicionado inicialmente. No entanto, a taxa de liberação do  $\alpha$ -TC aumentou com o aumento da percentagem de  $\alpha$ -TC-NLS adicionado aos filmes PV/TC-NL, o que explica a maior atividade antioxidante do filme PV/TC-NL 70 (Figura 3 e 4).

O etanol 95% é recomendado pela Comissão Européia (Diretiva 82/711/CEE, European Communities, 1982) como simulador de gorduras, óleos e outros alimentos lipídicos; o etanol 95% é totalmente solúvel em água, porém proporciona um ambiente hidrofóbico. O fato de o  $\alpha$ -TC também possuir características hidrofóbicas sugere que a taxa de liberação do mesmo para este simulador pode ocorrer rapidamente.

Um estado estacionário parece ter sido desenvolvido entre o  $\alpha$ -TC transferido através do filme para o etanol a 95% e a migração natural do  $\alpha$ -TC a partir do etanol 95% para o filme (WESSLING et al., 1998). Como a solubilidade do  $\alpha$ -TC em etanol 95% foi maior do que a sua liberação total, pode ser sugerido que houve uma mobilidade restrita do  $\alpha$ -TC através da matriz de PVA, limitando a sua liberação total no filme com maior concentração de  $\alpha$ -TC-NLS (50 e 70%). Outra possível explicação para este comportamento pode estar relacionada com um efeito pró-oxidante do  $\alpha$ -TC em concentrações elevadas (GRACIANO-VERDUGO et al., 2010).

**Figura 5** Concentração de  $\alpha$ -Tocoferol liberada em etanol 95% a temperatura ambiente em função do tempo.



**Fonte** autor (2013).

Wessling et al. (1998, 1999) também observaram uma rápida perda de  $\alpha$ -TC a partir do filme de LDPE em contato com etanol 95%. Yenilmez e Yazan (2010) reportaram que 99,99% de vitamina E foi liberada a partir do sistema de NLS após 240 minutos, utilizando behenato de glicerila como encapsulante e etanol como solução simuladora. Manzanarez-Lopez et al. (2011) avaliaram a liberação de  $\alpha$ -TC a partir de filmes de PLA em etanol e observaram um comportamento de Fick, com equilíbrio alcançado em cerca de 5 dias, com uma liberação de 26,9% a 23 ° C.

Por outro lado, Gargiulo et al. (2013) investigaram o efeito da adsorção de  $\alpha$ -TC no filme de LDPE funcionalizado e não funcionalizado com sílica no controle da liberação do  $\alpha$ -TC para o etanol 96% a 25 ° C e relataram que para o filme funcionalizado com sílica a difusão do  $\alpha$ -TC diminuiu significativamente. Nesse caso, a difusão do etanol para dentro dos poros do sistema modificado levou mais tempo. Siró et al. (2006) avaliaram a liberação de  $\alpha$ -TC a partir de duas formulações de filmes de PEBD - com e sem a complexação com beta-ciclodextrina - e mostraram que a complexação com beta-ciclodextrina foi uma ferramenta eficaz para controlar a liberação de  $\alpha$ -TC.

Para as aplicações em embalagem de alimentos, a rápida velocidade inicial de liberação do antioxidante, como no presente estudo, pode inibir o período de indução da oxidação na fase inicial do armazenamento. A elevada quantidade de antioxidante na superfície do alimento pode resultar num aumento da taxa de difusão para os alimentos, devido à elevada concentração (SIRÓ et al., 2006)

#### 4 CONCLUSÃO

Filmes de PVA incorporados com concentrações diferentes de  $\alpha$ -TC-NLS (30, 50 e 70%) foram produzidos, sendo que o  $\alpha$ -TC apresentou boa estabilidade durante 12 semanas através da análise de fluorescência. O filme de PVA puro se mostrou totalmente transparente; esta transparência diminuiu enquanto a coloração amarela aparente aumentou com o aumento da concentração de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes. Estas características refletiram nos parâmetros de transmissão de luz (UV/visível), opacidade e atividade antioxidante, uma vez que quanto maior a concentração de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes menor foi a transmissão de luz e maiores foram a opacidade e a atividade antioxidante dos filmes ( $p < 0,05$ ). Sendo assim, além do efeito antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol nanoencapsulado (Figuras 3 e 4), este efeito pode ser potencializado pela propriedade de barreira à luz, tanto no comprimento de onda do ultravioleta como na região do visível nos filmes PV/TC-NL.

Todos os filmes PV/TC-NL mostraram uma liberação rápida inicial e, após, um estado de equilíbrio foi desenvolvido. Apenas no filme PV/TC-NL 30 liberou quase todo o conteúdo do  $\alpha$ -TC inicialmente adicionado ( $98,4 \pm 1,1\%$ ). A mobilidade restrita do  $\alpha$ -TC na matriz de PVA ou um efeito pró-oxidante do  $\alpha$ -TC em concentrações elevadas pode ter limitado a liberação total de  $\alpha$ -TC nos filmes com uma maior teor de  $\alpha$ -TC-NLS (50 e 70). A liberação rápida inicial do antioxidante não era o resultado esperado, contudo pode contribuir para a inibição da etapa de iniciação da oxidação que ocorre na fase inicial do armazenamento.

#### REFERÊNCIAS

ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli (Álcool Vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: Avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 174-181, 2001.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221-247, 2011.

BYUN, Y.; HWANG, J.B.; BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARK, H.J.; WHITESIDE, S.V. Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 24-28, 2011.

BYUN, Y.; KIM, Y.T.; WHITESIDE, S. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with  $\alpha$ -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 239-244, 2010.

CHEONG, J.N.; TAN, C.P.; MAN, Y.B.C.; MISRAN, M.  $\alpha$ -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 204-209, 2008.

DINGLER A.; BLUM, R.P.; NIEHUS, H.; MÜLLER, R.H.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>/lipopearls<sup>TM</sup>): A pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **Journal of Microencapsulation**. v. 16, p. 751-767, 1999.

DIRECTIVE 82/711/EEC Commission Directive of 18 October 1982, laying down the basic rules necessary for testing migration of the constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**. L. 297.

FANGUEIRO, J.F.; MACEDO, A.S.; JOSE, S.; GARCIA, M.L.; SOUTO, S.B.; SOUTO, E. B. Thermodynamic behavior of lipid nanoparticles upon delivery of Vitamin E derivatives into the skin: in vitro studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, p. 275-282, 2012.

FARIA, F.O.; VERCELHEZE, A.E.S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 487-492, 2012.

GARGIULO, N.; ATTIANESE, I.; BUONOCORE, G.G.; CAPUTO, D.; LAVORGNA, M.; MENSITIERI, G.; LAVORGNA, M.  $\alpha$ -

Tocopherol release from active polymer films loaded with functionalized SBA-15 mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 167, p. 10-15, 2013.

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

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  $\alpha$ -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. **Food Research International**, v. 43, p. 1073-1078, 2010.

HAN, J.H. New technologies in food packaging: overview. In: HAN, J.H. **Innovations in Food Packaging**. USA: Elsevier Science & Technology Books, 2005. Cap. 1, p. 03-11.

HATANAKA, J.; CHIKAMORIA, H.; SATO, H.; UCHIDA, S.; DEBARI, K.; ONOUE, S.; YAMADA, S. Physicochemical and pharmacological characterization of  $\alpha$ -tocopherol-loaded nano-emulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, p. 188-193, 2010.

KAGAN, V.E.; QUINN, P.J. The interaction of  $\alpha$ -tocopherol and homologues with shorter hydrocarbon chains phospholipid bilayer dispersions: A fluorescence probe study. **European Journal of Biochemistry**, v. 171, p.661-667, 1988.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine**, v. 6, p. 753-759, 2010.

KUCHAIYAPHUM, P.; PUNYODOM, W.; WATANESK, S.; WATANESK, R. Composition Optimization of Polyvinyl Alcohol/Rice Starch/Silk Fibroin-Blended Films for Improving Its Eco-Friendly Packaging Properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n.5, p. 2614-2620, 2013.

LEE, D.S. Packaging containing natural antimicrobial or antioxidative agentes. In: HAN, J. H. **Innovations in Food Packaging USA**: Elsevier Science & Technology Books, 2005. Cap. 7, p. 108-122.

MANSUR, H.S.; ORÉFICE, R.L.; MANSUR, A.A.P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 45, p. 7193-7202, 2004.

MANZANAREZ-LÓPEZ, F.; SOTO-VALDEZ, H.; AURAS, R.; PERALTA, E. Release of  $\alpha$ -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.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 01-37, 2009.

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

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

MOZAFARI, M.R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; SUNTRES, Z.E.; SINGH, H.J. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 86, p. 2038-2045, 2006.

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

NDHLALA, A.R.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? **Molecules**, v. 15, p. 6905-6930, 2010.

NÚÑEZ-FLORES, R.; GIMÉNEZ, B.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p.163-172, 2013.

PARK, P.; JE, J.; KIM, S. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 17-22, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p.1231-1237, 1999.

SAUPE, A.; RADES, T. Solid lipid nanoparticle. In: MOZAFARI, M. R. **Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy**. Dordrecht: Springer, 2006. Cap. 03, p. 41-50.

SHAHIDI, F., ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 930-940, 2010.

SILVA, F.E.F.; DI-MEDEIROS, M.C.B.; BATISTA, K.A.; FERNANDES, K.F. PVA/Polysaccharides blended films: Mechanical properties. **Journal of Materials**, (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/413578> (*in press*).

SIN, L.T.; RAHMAN, W.A.W.A.; RAHMAT, A.R.; KHAN, M.I. Detection of synergistic interactions of polyvinyl alcohol–cassava starch blends through DSC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 224-226, 2010.

SINHA, V.R.; SRIVASTAVA, S.; GOEL, H.; JINDAL, V. Solid lipid nanoparticles (SLN'S): Trends and implications in drug targeting. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 212-238, 2010.

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



SIRÓ, I.; FENYVESI, É., SZENTE, L.; DE MEULENAER, B.; DEVLIEGHERE, F.; ORGOVÁNYI, J.; SÉNYI, J.; BARTA, J. Release of alpha-tocopherol from antioxidative low density polyethylene film into fatty food simulant: Influence of complexation in beta-cyclodextrin. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 845-853, 2006.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 82-89, 2009.

SWATHI, G.; PRASANTHI, N.L.; MANIKIRAN, S.S.; RAMARAO, N. Solid lipid nanoparticles: Colloidal carrier systems for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, p. 01-16, 2010.

TAN, C.P., NAKAJIMA, M.  $\beta$ -Carotene nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 661-671, 2005.

TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 7-16, 2011.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC): Effects of formulation parameters on physicochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, p. 198-206, 2007.

THELLEN, C.; CHENEY, S.; RATTO, J.A. Melt processing and characterization of polyvinyl alcohol and polyhydroxyalkanoate multilayer films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 3, p. 2314-2324, 2013.

TUCKER, G.S. Food biodeterioration and methods of preservation. In: COLES, R.; MCDOWELL, D.; KIRWAN, M. **Food Packaging Technology**. USA: CRC Press, 2003. p. 32-64.

VAN AARDT, M.; DUNCAN, S.E.; LONG, T.E.; O'KEEFE, S.F.; MARCY, J.E.; SIMS, S.R. Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: Thermogravimetric analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 587-591, 2004.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN BEEST, M.; DE KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 77-86, 1999.

WEISS, J.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J.; KRISTBERGSSON, K.; HELGASON, T.; AWAD, T. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. **Food Biophysics**, v. 3, p. 146-154, 2008.

WESSLING, C.; NIELSEN, T.; LEUFVÉN, A. The influence of  $\alpha$ -tocopherol concentration on the stability of linoleic acid and the properties of low-density polyethylene. **Packaging Technology and Science**, v. 13, p. 19-28, 2000.

WESSLING, C.; NIELSEN, T.; LEUFVÉN, A.; JÄGERSTAD, M. Mobility of  $\alpha$ -tocopherol and BHT in LDPE in contact with fatty food simulants. **Food Additives and Contaminants**, v.15, n.6, p.709-715, 1998.

WESSLING, C.; NIELSEN, T.; LEUFVÉN, A.; JÄGERSTAD, M. Retention of  $\alpha$ -tocopherol in low-density polyethylene (LDPE) and polypropylene (PP) in contact with foodstuffs and food-simulating liquids. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 79, p. 1635-1641, 1999.

YENİLMEZ, E., YAZAN, Y. Release of vitamin E from different topical colloidal delivery systems and their in vitro-in vivo evaluation. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 167-188, 2010.

YOO, S-H.; SONG, Y-B.; CHANG, P-S.; LEE, H.G. Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, p. 25-30, 2006.

ZHU, G.; WANG, F.; XU, K.; GAO, Q.; LIU, Y. Study on properties of poly(vinyl alcohol)/polyacrylonitrile blend film. **Polímeros**, v. 23, n. 2, p. 146-151, 2013.

**CAPÍTULO 4**  
**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, MECÂNICA E TÉRMICA**  
**DE FILMES DE PVA INCORPORADOS COM**  
**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO  $\alpha$ -**  
**TOCOFEROL**



## RESUMO

Nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TC-NLS) foram incorporadas em filmes de álcool polivinílico (PVA) nas concentrações de 30, 50 e 70%, para investigar os seus efeitos sobre as propriedades estruturais, mecânicas e térmicas do PVA. A adição de  $\alpha$ -TC-NLS aumentou o ângulo de contato do filme de PVA até a concentração de 50% e reduziu a polaridade do filme. A microscopia eletrônica de varredura confirmou que a morfologia da superfície e da seção transversal do filme de PVA foi influenciada pela adição de  $\alpha$ -TC-NLS nos parâmetros rugosidade e volume. A incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS diminuiu o grau de cristalinidade e aumentou a estabilidade térmica dos filmes de PVA. Além disso, reduziu o módulo de Young, a tensão na ruptura e a elongação na ruptura, devido ao efeito plastificante das NLS nos filmes, ocasionado pela presença de surfactantes na formulação. Os espectros de infravermelho mostraram que a incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS afetou a estrutura química de filmes de PVA com o estabelecimento de novas ligações químicas.

**Palavras-chave:** Embalagem antioxidante. Nanoencapsulação. Polímero biodegradável. Nanocompósito. Propriedades físico-químicas.

## ABSTRACT

Solid lipid nanoparticles containing  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TC-loaded SLN) were added to poly (vinyl alcohol) (PVA) film at concentrations of 30, 50, and 70% to investigate their effects on the structural, mechanical, and thermal properties of PVA. Up to a 50% concentration of  $\alpha$ -TC-loaded SLN increased the contact angle of the PVA film and decreased the film polarity. Scanning electronic microscopy confirmed that the PVA film surface and cross-section microstructure were influenced by the addition of  $\alpha$ -TC-loaded SLN in terms of roughness and volume parameters. The addition of  $\alpha$ -TC-loaded SLN decreased the crystallinity degree and increased the thermal stability of the PVA film. Moreover, the  $\alpha$ -TC-loaded SLN reduced the Young's modulus, tensile strength, and elongation at break of the PVA, due to the plasticant effect of the  $\alpha$ -TC-loaded SLN in the PVA film, caused by surfactants in the formulation. Infrared spectra showed that the incorporation of  $\alpha$ -TC-loaded SLN affected the chemical structure of PVA-based films through the establishment of new chemical bonds.

**Keywords:** Antioxidant package. Nanoencapsulation. Biodegradable polymer. Nanocomposite. Physicochemical properties.

## 1 INTRODUÇÃO

A deterioração em alimentos à base de lipídeos, causada pelo processo de oxidação, reduz a qualidade dos alimentos pelo desenvolvimento da rancidez oxidativa, formação de compostos que modificam o sabor, o aroma e a cor dos alimentos, polimerização e outras reações que reduzem a vida útil, o valor nutritivo e a qualidade sensorial do produto alimentar (BREWER, 2011; NDHLALA; MOYO; VAN STADEN, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006; VAN AARDT et al., 2004; TUCKER, 2003).

A prevenção do processo de oxidação através da adição de antioxidantes, seja como aditivo direto, ou indiretamente através da difusão a partir da embalagem, é amplamente utilizada na indústria alimentar (SHAHIDI; ZHONG, 2010; TUCKER, 2003; VAN AARDT et al., 2004). Neste contexto, os antioxidantes podem ser incorporados em filmes para embalagens, denominadas embalagens ativas, sendo liberados para prevenir e/ou retardar a formação de compostos indesejáveis nos alimentos (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; SOZER; KOKINI, 2009; LEE, 2005; HAN, 2005; VERMEIREN et al., 1999; WESSLING et al., 1999), além da função primária da embalagem de atuar na proteção do produto alimentício, servindo como barreira ao ambiente externo, até o momento de seu consumo (HAN, 2005).

Devido ao recente conceito de que a embalagem de alimentos deve ser de origem natural e, portanto, ecológica, a substituição dos componentes químicos sintéticos adicionados às mesmas pelos naturais é esperada pelos consumidores. Assim, antioxidantes sintéticos, tais como BHA, BHT e TBHQ, foram substituídos por misturas de tocoferóis, ácido ascórbico (GARGIULO et al., 2013; SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006; HAN, 2005), entre outras substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) para os produtos alimentícios (SOZER; KOKINI, 2009; VERMEIREN et al., 1999). O  $\alpha$ -tocoferol é o isômero mais abundante e biologicamente ativo da vitamina E (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; BYUN et al., 2011; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; HATANAKA et al., 2010). No entanto, o fato deste composto ser pouco solúvel ou insolúvel em água torna seu uso problemático em formulações para alimentos e/ou filmes para embalagem (WEISS et al., 2008; YOO et al., 2006; TAN; NAKAJIMA, 2005). Para superar esta limitação, a nanotecnologia oferece potencial para melhorar as propriedades deste composto bioativo, tais como as propriedades de liberação, de

solubilidade e de biodisponibilidade (SOZER; KOKINI, 2009; CHEONG et al., 2008; WEISS et al., 2008; MOZAFARI et al., 2006).

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), introduzidas em 1991, são uma das mais promissoras tecnologias de encapsulamento em crescente desenvolvimento na área de nanotecnologia; possuem núcleo composto por lipídeo sólido a temperatura ambiente, no qual o composto bioativo está integrado (MEHNERT; MÄDER, 2012; KHERADMANDNIA et al., 2010; SINHA et al., 2010; SWATHI et al., 2010) e, os lipídeos e as substâncias que estabilizam as NLS são fisiológicas, biodegradáveis e geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) (MEHNERT; MÄDER, 2012; SAUPE; RADES, 2006). O  $\alpha$ -tocoferol é um composto lipofílico e, por isso, um candidato adequado para o encapsulamento em sistemas de NLS (FANGUEIRO et al., 2012; YENILMEZ; YAZAN, 2010; CHEONG et al., 2008).

Além disso, as pesquisas sobre embalagens ativas tem-se concentrado na adição destes compostos naturais aos materiais de embalagem biodegradáveis (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010). As tendências atuais indicam um crescimento na utilização de plásticos biodegradáveis em decorrência do aumento da disponibilidade de materiais adequados e pela pressão da sociedade e da legislação (KUCHAIYAPHUM et al., 2013; THELLEN; CHENEY; RATTO, 2013; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; TANG; ALAVI, 2011; SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010).

Os polímeros biodegradáveis a partir de fontes fósseis são comumente usados para aplicações em embalagens. Um exemplo deste tipo de polímero é o álcool polivinílico (PVA) (TANG; ALAVI, 2011), um polímero solúvel em água que tem atraído renovado interesse para a produção de materiais plásticos ecológicos e tem sido utilizado em grande variedade de aplicações nas áreas biomédica, farmacêutica, têxtil, de papel e alimentar (ZHU et al., 2013; SILVA et al., 2013; TANG; ALAVI, 2011; SIN et al., 2010; MANSUR; OREFICE; MANSUR, 2004; ARANHA; LUCAS, 2001). A incorporação de nanopartículas com antioxidantes, além de proteger o alimento na embalagem, deverá modificar as propriedades dos filmes, uma vez que o uso de dimensões nanométricas podem favorecer as interações do preenchedor com a matriz e o desempenho do material resultante (AZEREDO, 2009; SOZER; KOKINI, 2009).

O objetivo deste estudo foi desenvolver filmes de PVA incorporados com diferentes concentrações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol para serem utilizados em embalagens



ativas e avaliar a influência dessas nanopartículas nas propriedades mecânicas, térmicas e estruturais dos filmes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 *Matérias-primas*

O álcool polivinílico (PVA) (grau de hidrólise entre 86,5 e 89,5% e ponto de fusão entre 160-240 °C) foi obtido da Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, Brasil). O lipídeo sólido behenato de glicerila (Compritol® 888 CG ATO, ponto de fusão de ~ 73 °C) foi obtido da Gatefossé (Saint-Priest, França). O  $\alpha$ -tocoferol (98%, grau de pureza HPLC) e o metanol (grau de pureza HPLC) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). A lecitina de soja (LIPOID S75, 68-73% de fosfatidilcolina, marca Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemanha) foi adquirida da empresa Lipid Ingredients & Technologies (São Paulo, Brasil). O Poloxamer 188 (Pluronic® F68 Pastille - BASF AG, Ludwigshafen, Alemanha) foi gentilmente doado pela empresa Foscher Solutions Provider (São Paulo, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e usados como recebido.

### 2.2 *Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas contendo $\alpha$ -tocoferol*

As nanopartículas lipídicas sólidas incorporadas com  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TC-NLS) foram preparadas pela técnica de homogeneização em alta pressão, a quente (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). O lipídeo sólido, Compritol® 888 CG ATO, foi aquecido a 80-85 °C para ocasionar sua completa fusão, e o  $\alpha$ -TC (1,1%) e a lecitina de soja (0,75%) foram dissolvidos no lipídeo fundido para formar a fase lipídica (FL). A fase aquosa (FA), consistindo em uma solução de poloxamer 188 (1,3%), a quente, foi vertida sobre a FL sob agitação de 9000 rpm, usando Ultra-Turrax T25 (IKA, Alemanha), durante 1 minuto, formando a pré-emulsão. A pré-emulsão foi adicionada ao homogeneizador (APLAB-10, Artepeças, Brasil), aplicando a pressão de 500 bar. Após 7 ciclos de homogeneização, a dispersão foi resfriada a 20 °C, para formação das nanopartículas lipídicas sólidas, filtrada através de um papel de filtro de 8  $\mu$ m e transferida para frascos âmbar. O homogeneizador encamisado foi aquecido previamente através de banho-maria acoplado ao mesmo. A duração dos 7 ciclos foi de aproximadamente 5 minutos.

### 2.3 Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas contendo $\alpha$ -tocopherol

O diâmetro médio (Z-ave), o índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta ( $\zeta$ ) das  $\alpha$ -TC-NLS foram determinados através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*), utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As amostras foram apropriadamente diluídas em água Milli-Q<sup>®</sup> e as medidas foram realizadas na temperatura de 25 °C, com um ângulo de detecção de 173 °. O conteúdo total de  $\alpha$ -tocopherol nas NLS foi determinado após completa dissolução de 1,0 mL das dispersões em 10,0 mL de metanol. A mistura foi submetida durante 30 minutos ao banho ultrassom para a extração do  $\alpha$ -tocopherol das NLS. Após, a solução foi filtrada e o  $\alpha$ -tocopherol foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, LC-20AT, Shimadzu, Quioto, Japão). O rendimento de  $\alpha$ -tocoferol (%) foi estimado comparando o conteúdo total de  $\alpha$ -tocopherol encontrado na dispersão com o conteúdo inicial adicionado a formulação, de acordo com a Equação 1. O conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol foi expresso em mg de  $\alpha$ -tocoferol.mL<sup>-1</sup> de dispersão.

$$\text{Recuperação}(\%) = 1.0 - \left( \frac{\text{concentração inicial de } \alpha\text{TC} - \text{concentração total de } \alpha\text{TC}}{\text{concentração inicial de } \alpha\text{TC}} \right) \times 100(1)$$

### 2.4 Preparação dos filmes

Para o desenvolvimento dos filmes pelo método de *casting*, as soluções formadoras de filmes foram preparadas pela dissolução de uma quantidade específica de PVA em água na temperatura de  $97 \pm 3,0$  °C. As soluções foram resfriadas a temperatura ambiente e as  $\alpha$ -TC-NLS foram incorporadas para obter as concentrações finais de 0, 30, 50, and 70% (w/w) de  $\alpha$ -TC-NLS e 1,5% (w/v) de PVA. O filme controle (sem adição de  $\alpha$ -TC-NLS) e os filmes adicionados de  $\alpha$ -TC-NLS (PV/TC-NL 30, 50, and 70) foram preparados a  $20 \pm 2$  °C, sob agitação magnética. Após, uma quantidade de 12 g das soluções filmogênicas foram espalhadas e moldadas em placas de petri de poliestireno (90 mm de diâmetro). As placas foram armazenadas a temperatura de  $20 \pm 2$  °C, sobre superfície nivelada, até completa secagem. Os filmes secos foram removidos manualmente das placas com a ajuda de espátula e armazenados em dessecador (0% UR) para posterior caracterização.

## 2.5 Análises estruturais dos filmes

### 2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise microestrutural da superfície e da seção transversal dos filmes foi realizada usando o microscópio eletrônico JEOL JSM-6390LV (Tóquio, Japão). As amostras dos filmes foram fixadas em suportes de cobre (*stubs*) usando fita dupla-face e então recobertas com uma fina camada de ouro de 30 nm em recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica, EUA). Para as observações da seção transversal, os filmes foram previamente fraturados por imersão em nitrogênio líquido. As amostras foram observadas usando uma voltagem de 10 kV. Este estudo foi realizado em parceria com o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 2.5.2 Determinação do ângulo de contato

O ângulo de contato dos filmes controle e PV/TC/NL 30, 50 e 70 foi obtido a 25 °C utilizando o equipamento OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), com sistema processador de imagem de alta resolução Data Physics Instruments. A temperatura dos ensaios foi ambiente e o volume dos líquidos depositados sobre a superfície de cada filme foi de 5  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$  e 0,8  $\mu\text{L}$  para água deionizada, formamida e diiodometano, respectivamente. As medidas do ângulo estático foram automatizadas e os dados apresentados correspondem ao valor da média final.

### 2.5.3 Determinação da energia livre superficial

A energia livre superficial e seus componentes (polar e dispersivo) nos filmes controle e PV/TC/NL 30, 50 e 70 foram calculadas pelo modelo de Owens-Wendt, geralmente utilizado para sólidos com baixa energia superficial, tais como os polímeros. Esses pesquisadores provaram que a energia livre superficial total de um sólido,  $\gamma_S$ , pode ser expressa como a soma do componente dispersivo,  $\gamma_L^d$ , e polar,  $\gamma_L^p$ , (Equação 2). A equação de Owens-Wendt (Equação 3) aplica os dados dos líquidos polares e não polares, com componentes dispersivos,  $\gamma_L^d$ , e polares  $\gamma_L^p$  conhecidos, da energia livre superficial total e do ângulo de contacto,  $\theta$  (JAMSHIDIAN et al., 2012).

$$\gamma_S^T = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad (2)$$

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left( \sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \right) \quad (3)$$

onde  $\gamma_L$  é a tensão superficial do líquido.

Para esta medida, três diferentes líquidos, água deionizada ( $\gamma^T = 72.8$  mN/m,  $\gamma^d = 21.8$  mN/m,  $\gamma^p = 51.0$  mN/m), diiodometano ( $\gamma^T = 50.8$  mN/m,  $\gamma^d = 50.8$  mN/m,  $\gamma^p = 0$  mN/m) e formamida ( $\gamma^T = 58.0$  mN/m,  $\gamma^d = 39.0$  mN/m,  $\gamma^p = 19.0$  mN/m) foram testados para cada filme.

#### 2.5.4 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IR) foi realizada para observar as interações estruturais dos filmes de PVA incorporados com  $\alpha$ -TC-NLS. Os espectros no infravermelho foram obtidos na região entre 4500 e 500  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$  utilizando o método 166 KBr e o espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige 21, com 40 varreduras e precisão de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Todas as leituras foram realizadas a temperatura ambiente.

#### 2.5.5 Difratomia de raios-X

As análises de difratometria de raios-X foram obtidas usando o difratômetro Philips modelo X'Pert, com ânodo de cobre (radiação  $\text{Cu-K}\alpha$ ,  $\lambda = 0.15418$  nm) equipado com um porta-amostra giratório e operando a uma corrente de 30 mA e voltagem de 40 kV. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente, no ângulo  $2\theta$ , entre 2° e 120°, em intervalos de 0,02° a cada 1,00 s.

## 2.6 Análises térmicas

### 2.6.1 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi usada para avaliar a estabilidade térmica e a degradação dos filmes de PVA puro e PV/TC-NL 30, 50 e 70 utilizando o equipamento TGA-50 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). As amostras de filmes (5 - 16 mg) foram aquecidas com taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup> de 20 a 700 °C, em atmosfera de nitrogênio e fluxo 50 mL.min<sup>-1</sup>.

### 2.6.2 Calorimetria exploratória diferencial

Os termogramas da análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidos usando o equipamento DSC-50 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). O filme controle e todos os PV/TC-NL foram pesados (5 - 10 mg) separadamente em cápsulas de alumínio e hermeticamente selados. As análises foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>, nas temperaturas entre -15 e 250 °C, com uma razão de aquecimento de 5 °C.min<sup>-1</sup>. Cápsulas vazias foram usadas como referência. O grau de cristalinidade (GC) foi determinado a partir do valor de entalpia de fusão (Equação 4).

$$GC (\%) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \times 100 \quad (4)$$

onde  $\Delta H_f$  and  $\Delta H_f^0$  são as medidas experimentais de entalpia de fusão e a entalpia de fusão do PVA 100% cristalino (138.6 J.g<sup>-1</sup>), respectivamente (BAHETI; MILITKI, 2013; YAO et al., 2003; PEPPAS; MONGIA, 1997).

## 2.7 Medidas de espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi medida utilizando o micrômetro digital DIGIMESS 110.284 (São Paulo, Brazil) com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0-25 mm. As medidas de espessura foram conduzidas em 10 replicatas de cada tipo de filme e foram tomadas aleatoriamente 5 medidas de cada replicata.

## 2.8 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes, incluindo tensão na ruptura (TS), deformação na ruptura (% E) e módulo de elasticidade ou módulo de Young (EM) foram obtidos usando o texturômetro TA.TX2-

Plus (Stable Micro Systems - Inglaterra), controlado pelo software *Exponent Stable Micro System*, com célula de carga de 50 kgf, 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. As dimensões dos corpos de prova foram de 50 mm de comprimento e 25,4 mm de largura e foram efetuadas aproximadamente 10 repetições de cada amostra. Antes das leituras, as amostras foram equilibradas durante uma semana a umidade relativa de 57 %, em dessecador com solução saturada de brometo de sódio (NaBr) a  $25 \pm 2$  °C. 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.

### 2.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software STATISTICA (versão 7.0, 2004 StatSoft Inc. EUA). Análise de variância e o teste de Tukey foram realizados para determinar as diferenças significativas. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de cada tratamento. Os valores de  $p$  menores que 0.05 foram considerados significativamente diferentes estatisticamente.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização das $\alpha$ -TC-NLS

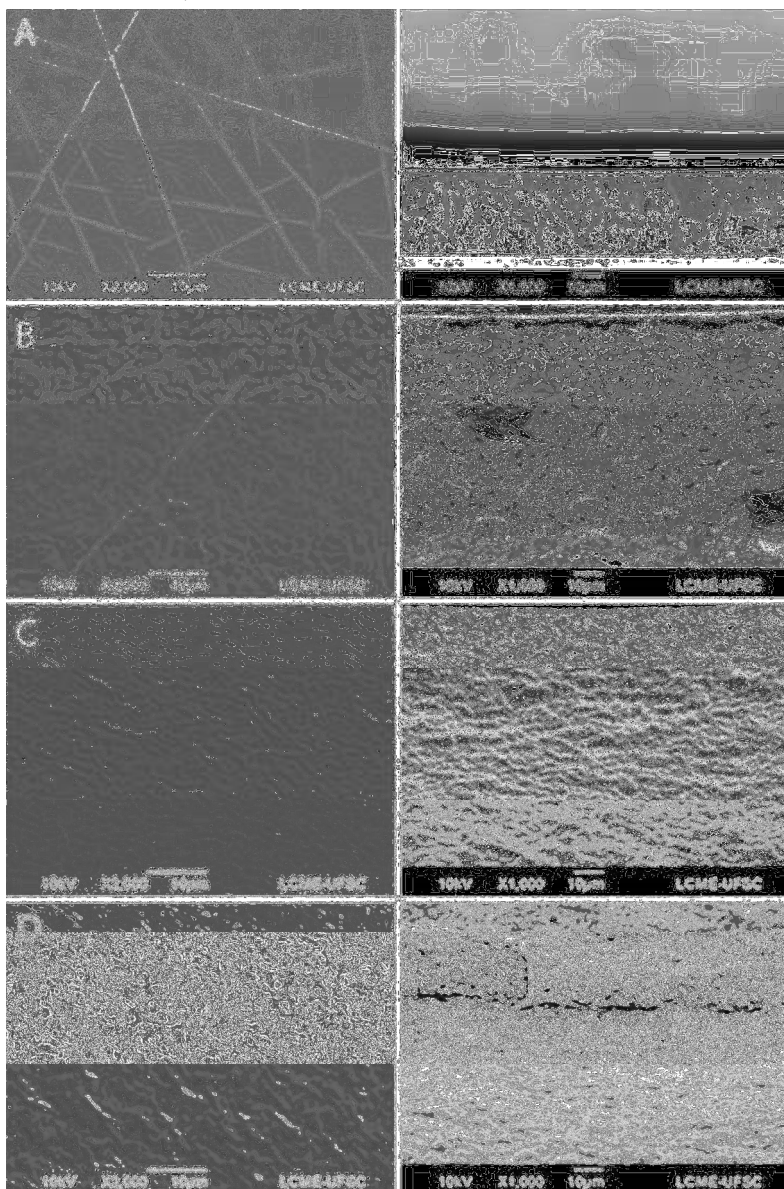
As propriedades físico-químicas das NLS são controladas por muitos fatores, tais como natureza e quantidade dos lipídeos e surfactantes e concentração do composto ativo na formulação (MEHNERT; MÄDER, 2012). Os valores de diâmetro de partícula, ( $Z$ -ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta ( $\zeta$ ) para as  $\alpha$ -TC-NLS foram  $214,5 \pm 3,2$  nm;  $0,25 \pm 0,01$  and  $-41,9 \pm 1,1$  mV, respectivamente.

### 3.2 Análise morfológica

As micrografias eletrônicas de varredura (Figura 1) mostram a morfologia da superfície e da seção transversal dos filmes de PVA puro e adicionados de concentrações diferentes de  $\alpha$ -TC-NLS (PV/NL TC 30, 50, e 70). O filme controle, somente com PVA, mostra matriz mais homogênea e compacta (à esquerda, A) do que os filmes PV/TC NL 30 (à esquerda, B), PV/TC NL 50 (à esquerda, C) e PV/TC NL 70 (à esquerda, D). No entanto, não foram observadas agregações e separações de fase na superfície dos mesmos (à esquerda, B-D). Estes resultados parecem indicar que as  $\alpha$ -TC-NLS dispersaram homogeneamente na matriz de PVA. Entre os filmes PV/TC-NL, o PV/TC-NL 50 parece apresentar superfície mais homogênea enquanto o PV/TC-NL 70 apresenta maior rugosidade e alguns glóbulos pequenos.

A seção transversal (Figura 1) do filme de PVA puro (à direita, A) se mostrou mais suave e compacta e menos espessa do que os filmes PV/TC-NL (à direita, B-D), os quais apresentaram matriz menos coesa, aumento de volume e zonas descontínuas. O aumento no volume dos filmes adicionados de  $\alpha$ -TC-NLS se refletiu nos valores das medidas da espessura dos mesmos (Tabela 4), os quais aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes. Estas observações nos filmes PV/TC-NL foram maiores para o filme PV/TC-NL 70 e podem ser explicadas pela maior quantidade de surfactante no mesmo, uma vez que possui a maior concentração de  $\alpha$ -TC-NLS. No estudo realizado por Andreuccetti et al. (2011), filmes de gelatina contendo lecitina apresentaram características semelhantes na seção transversal, o que foi relacionado com a distribuição e agregação molecular das moléculas hidrofóbicas durante o processo de secagem do filme.

**Figura 1** Micrografias da superfície (coluna da esquerda) e seção transversal (coluna da direita) dos filmes: A) filme de PVA puro, B) PV/TC-NL 30, C) PV/TC-NL 50, D) PV/TC-NL 70.



Fonte autor (2013).



### 3.3 Determinação do ângulo de contato e da energia livre superficial

A medida do ângulo de contato de líquidos com diferentes polaridades e a superfície da amostra pode indicar a hidrofiliicidade ou hidrofobicidade dos filmes. Para valores do ângulo de contato com a água inferiores a 90 °C, a superfície é considerada hidrofílica e superiores a 90 °C, hidrofóbica (FENG et al., 2003). A Tabela 1 mostra ângulos de contato com a água, o diiodometano e a formamida, a energia livre superficial total e os componentes polar e dispersivo dos filmes de PVA puro e PV/TC-NLS.

**Tabela 1** Ângulo de contato (°), energia livre superficial ( $\gamma$ ) dos filmes incorporados com  $\alpha$ -TC-NLS para os três diferentes líquidos.

Filme	Ângulo de contato (°)			Owens-Wendt		
	Água	Diiodometano	Formamida	$\gamma^T$ (mN/m)	$\gamma^p$ (mN/m)	$\gamma^d$ (mN/m)
PVA (controle)	73,8±2,09 <sup>a</sup>	35,2 ± 3,04 <sup>a</sup>	65,2±0,40 <sup>a</sup>	40,78	5,48	35,30
PV/TC-NL 30	96,2±1,06 <sup>b</sup>	56,0 ± 1,98 <sup>b</sup>	78,3±1,79 <sup>b</sup>	29,35	0,88	28,48
PV/TC-NL 50	88,2±2,28 <sup>c</sup>	69,9 ± 1,47 <sup>c</sup>	73,4±1,48 <sup>b</sup>	26,47	4,57	21,89
PV/TC-NL 70	65,9±4,02 <sup>a</sup>	82,8 ± 0,01 <sup>d</sup>	67,9±1,84 <sup>a</sup>	34,89	21,04	13,85

$\gamma^T$ : energia livre superficial total;  $\gamma^d$ : componente dispersivo;  $\gamma^p$ : componente polar. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando analisados pelo teste de Tukey.

De acordo com Feng et al. (2003), o PVA é uma molécula anfifílica composta por grupamentos hidrofílicos (-OH) e hidrofóbicos (-CH<sub>2</sub>-), apresentando ângulo de contato com a água de apenas 72,1  $\pm$  1,1 ° nos filmes com superfícies lisas. Ângulo de contato com a água semelhante foi encontrado em 73,8  $\pm$  2,09 ° para o filme de PVA puro (Tabela 1). A adição de  $\alpha$ -TC-NLS aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) este valor para os filmes PV/TC-NL 30 e 50 (96,2  $\pm$  1,06 ° e 88,2 °  $\pm$  2,28, respectivamente), indicando que as superfícies desses dois filmes foram mais hidrofóbicas, especialmente no filme PV/TC-NL 30, no qual o ângulo de contato com a água foi superior a 90 °. No entanto, o valor do ângulo de contato com a água no filme PV/TC-NL 70 (65,9  $\pm$  4,02 °) não foi significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) do filme controle, ou seja, quando a concentração de  $\alpha$ -TC-NLS aumenta nos filmes de PVA o ângulo de contato com a água aumenta e, em seguida, diminui. Os resultados indicam que existiu um ângulo de contato máximo com a água com a adição de 30 e 50% de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes de PVA. A diminuição do ângulo de contato com a água do filme PV/TC-NL 70 pode ser o resultado da reorientação de grupos funcionais polares em relação à superfície, o que implica neste filme ser mais hidrofílico que

os demais (CHEN et al., 2008a). O surfactante hidrofílico (Pluronic<sup>®</sup> F68) está presente nas  $\alpha$ -TC-NLS e uma maior proporção desta formulação está presente no filme PV/TC-NL 70, o que pode ter contribuído para estas características.

Qiu, Rahman e Matsuyama (2008) avaliaram os ângulos de contato com a água na superfície de membranas feitas com blendas poliméricas de poli (vinil butiral) (PVB) e PVB/Pluronic F127 e observaram que a adição de Pluronic F127 à membrana de PVB fez com que o ângulo de contato se tornasse menor. Quando a concentração de Pluronic F127 foi de 5% m/v, o ângulo de contato com a água foi de cerca de 10 ° menor do que sem a adição Pluronic F127, nas mesmas condições de preparação, tornando a membrana mais hidrofílica. Segundo Qiu, Rahman e Matsuyama (2008), o ângulo de contato também pode ser afetado por diferentes porosidades e pela rugosidade. Como pode ser visto na análise da superfície e da seção transversal dos filmes (Figura 1), realizada por MEV, o filme PV/TC-NL 70 (Figura 1-D) apresenta matriz mais descontínua e porosa do que as outras amostras de filmes, refletida pela maior espessura em relação aos demais (0,149 mm, Tabela 4). A maior concentração de surfactante presente neste filme pode ter contribuído para a formação destas características microscópicas e macroscópicas, uma vez que a mistura de PVA e  $\alpha$ -TC-NLS, durante a preparação das soluções filmogênicas, foi realizada por meio de agitação, o que sugere que a possível incorporação de ar pode ter sido estabilizada com mais eficiência no filme PV/TC- NL 70 do que nos demais.

O ângulo de contato que o filme de PVA formou com o diiodometano (Tabela 1) foi de  $35,2 \pm 3,04$  °. O filme de PVA puro mostrou seu caráter anfifílico, se apresentando mais hidrofóbico que os filmes PV/TC-NL. Para formamida, um líquido de polaridade intermediária, os ângulos de contato de todos os filmes se situaram entre os valores encontrados para a água e para o diiodometano (Tabela 1).

Em relação à energia livre superficial total, os valores seguiram o mesmo padrão dos ângulos de contato com a água, ou seja, os filmes controle de PVA e PV/TC-NL 70 se mostraram semelhantes e diferiram dos filmes PV/TC-NL 30 e 50. O PVA, sendo anfifílico, apresentou os maiores valores de energia livre superficial total e de componente dispersivo em comparação com os filmes PV/TC-NL. O filme PV/TC-NL 70 se mostrou mais hidrofílico do que os filmes PV/TC-NL 30 e 50, mostrando maior energia livre superficial total e componente polar (FENG et al., 2003). Os filmes PV/TC-NL 30 e 50 revelaram valores menores para o componente polar e valores maiores para o componente

dispersivo do que o filme PV/TC-NL 70.

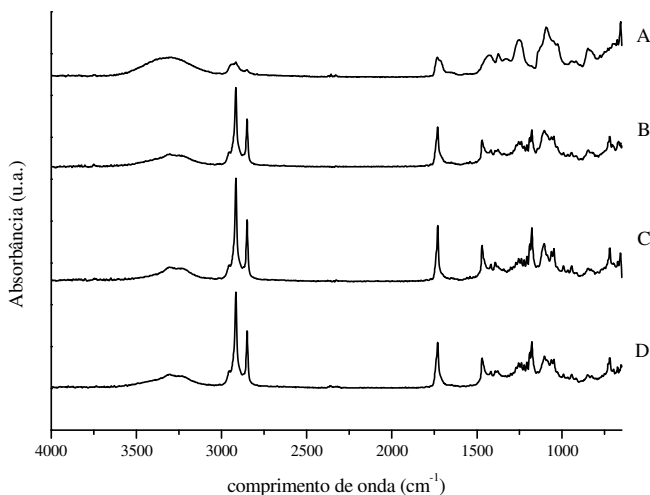
### 3.4 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho dos filmes controle de PVA e dos adicionados de diferentes concentrações de  $\alpha$ -TC-NLS (PV/TC-NL 30, 50 e 70) estão apresentados na Figura 2.

O espectro do filme de PVA puro (Figura 2-A) mostra uma banda larga de absorção característica em  $3294\text{ cm}^{-1}$  referente à presença de água no filme e ao estiramento  $\text{-OH}$ , atribuída às ligações de hidrogênio dos grupamentos hidroxila do PVA (GUPTA; AGARWAL; ALAM, 2013; SEMSARZADEH; GHALEI, 2013; IBRAHIM; EL-ZAWAWY; NASSAR, 2010; SUO et al., 2010; CHEN et al., 2008b; MANSUR; ORÉFICE; MANSUR, 2004). Para os filmes PV/TC-NL 30, 50, 70 (Figuras 2 B, C e D, respectivamente) a banda que representa o estiramento  $\text{-OH}$  apareceu em  $3301\text{ cm}^{-1}$  e parece ser menos ampla do que no filme de PVA puro, o que pode ser devido à interação entre as  $\alpha$ -TC-NLS e os grupamentos  $\text{-OH}$  do PVA.

Bandas características foram observadas para o filme de PVA puro em  $2916$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  correspondentes ao estiramento  $\text{C-H}$  dos alcanos (SEMSARZADEH; GHALEI, 2013; GUPTA; AGARWAL; ALAM, 2013; IBRAHIM; EL-ZAWAWY; NASSAR, 2010; SUO et al., 2010; JAYASEKARA et al., 2004; MANSUR; ORÉFICE; MANSUR, 2004). Os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70 mostraram bandas mais intensas em  $2916$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  do que as observadas no filme de PVA puro. Este aumento da intensidade das bandas com a adição  $\alpha$ -TC-NLS pode ser atribuído à composição das partículas, o que proporcionou um maior número de grupamentos  $\text{C-H}$ , presentes nas cadeias alifáticas dos ácidos graxos. Além disso, Kuligowski et al. (2008) reportaram no espectro de lecitina (presente na formulação das  $\alpha$ -TC-NLS) uma banda característica para alcano correspondente a vibração simétrica  $\text{CH}_2$  em  $2854\text{ cm}^{-1}$ , o que também pode ter contribuído para estes aumentos nos picos.

**Figura 2** Espectro no infravermelho dos filmes controle de PVA (A), PV/TC-NL 30 (B), PV/TC-NL 50 (C) e PV/TC-NL 70 (D).



Fonte autor (2013).

Segundo Ibrahim, El-Zawawy e Nassar (2010) a banda em  $1428\text{ cm}^{-1}$ , observada no filme de PVA, também pode ser devida ao estiramento C–H e Semsarzadeh e Ghalei (2013) atribuem a banda em  $1375\text{ cm}^{-1}$  aos grupamentos  $\text{CH}_2$ . Como pode ser observado nos espectros dos filmes PV/TC-NL, existem bandas relacionadas em  $1469\text{ cm}^{-1}$  e em torno de  $1380\text{ cm}^{-1}$ . No entanto, Gargiulo et al. (2013) relataram que a presença de  $\alpha$ -TC em filmes apresentou uma banda adicional em  $1465\text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação angular simétrica no plano de grupos fenil, metilênicos e cadeia alquílica e uma banda em  $1388\text{ cm}^{-1}$  associada com a deformação simétrica de grupamento metila do  $\alpha$ -TC. Além disso, Brubach et al. (2007) encontraram no espectro do lipídeo behenato de glicerila (presente na formulação das  $\alpha$ -TC-NLS) as bandas em  $1464$  e  $1472\text{ cm}^{-1}$  atribuídas à deformação angular simétrica de grupos  $\text{CH}_2$ .

As bandas de absorção em  $1732$  e  $1714$ , e  $1093\text{ cm}^{-1}$  no espectro do PVA puro podem ser atribuídas à vibração de estiramento  $\text{C}=\text{O}$  e  $\text{C}-\text{O}$  dos grupos acetato residuais da fabricação do PVA a partir de hidrólise do poli (acetato de vinila) (SEMSARZADEH; GHALEI, 2013; GUPTA; AGARWAL; ALAM, 2013; CHEN et al., 2008b;

JAYASEKARA et al., 2004). Um aumento na intensidade foi observado no pico de absorção em  $1732\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C} = \text{O}$  de éster) nos filmes PV/TC-NL 30, 50, e 70. Nos espectros de lecitina a vibração do estiramento da carbonila ocorre entre  $1400$  e  $1800\text{ cm}^{-1}$  ( $1736\text{ cm}^{-1}$ ) (ANDREUCCETTI et al., 2011; KULIGOWSKI et al., 2008), o que pode ter contribuído o aumento deste picos nos filmes PV/TC-NL. O pico em  $1714\text{ cm}^{-1}$  não está presente nos filmes PV/TC-NL. De acordo com Gupta, Agarwal e Alam (2013) e Mansur, Oréface e Mansur (2004), a banda em  $1093\text{ cm}^{-1}$  ( $1090\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ ) se deve à matriz cristalina do PVA e tem sido utilizada como uma ferramenta para avaliação da estrutura deste, uma vez que o PVA é um polímero semi-cristalino sintético capaz de formar alguns domínios dependendo dos parâmetros de processamento. Os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70 revelaram um pico relacionado em  $1103\text{ cm}^{-1}$ , com uma ligeira diminuição da intensidade da banda, o que indica que os filmes de PVA adicionados  $\alpha$ -TC-NLS apresentaram diminuição da matriz cristalina (SIRIWATCHARAPIBOON; TINNARAT; SUPAPHOL, 2013).

Uma banda intensa em  $1253\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao grupamento acetila ( $\text{C} = \text{O}$ ) presente na cadeia principal do PVA (IBRAHIM; EL-ZAWAWY; NASSAR, 2010) e foi representado por uma banda menos intensa em  $1255\text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos filmes PV/TC-NL. O pico relacionado ao estiramento  $\text{C}-\text{O}$  em  $848\text{ cm}^{-1}$  se mostrou mais intenso para o PVA puro do que para os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70 (SUO e al., 2010).

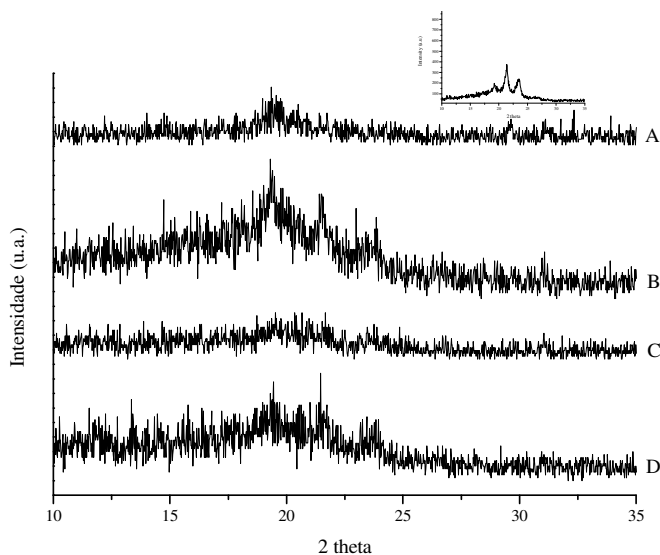
Os filmes de PVA incorporados com  $\alpha$ -TC-NLS mostraram um novo pico intenso em  $1178\text{ cm}^{-1}$ . Segundo Martins, Cerqueira e Vicente (2012) e Graciano-Verdugo et al. (2006), bandas entre  $800$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  aparecem quando o  $\alpha$ -TC é adicionado ao filme e pode estar relacionado com a vibração dos grupos OH do grupo fenol presente na estrutura do  $\alpha$ -TC. Uma vez que o grupo fenol está presente apenas nas moléculas  $\alpha$ -TC, a presença deste pico é uma evidência clara da incorporação de  $\alpha$ -TC na matriz do filme de PVA. Um aumento proporcional na absorvância desta banda foi observado quando a concentração de  $\alpha$ -TC aumentou nos filmes (GRACIANO-VERDUGO et al., 2006); no entanto, a intensidade destas bandas nos filmes com 50 e 70% de  $\alpha$ -TC-NLS não diferiram entre si, mas se mostraram mais intensas do que no filme PV/TC-NL 30. Novos picos com pouca intensidade entre  $1240$  e  $2260\text{ cm}^{-1}$  e em torno de  $1050\text{ cm}^{-1}$  podem ser também devido às vibrações características dos espectros nos infravermelhos dos grupos  $\text{PO}_2$  e  $\text{P}-\text{O}-\text{C}$  da lecitina (ANDREUCCETTI et al., 2011; KULIGOWSKI et al., 2008).

### 3.5 Difractometria de raios-X

Os difratogramas dos filmes de PVA puro e dos filmes adicionados de diferentes concentrações de  $\alpha$ -TC-NLS estão apresentados na Figura 3. Para o filme de PVA puro (Figura 3-A) o principal pico de difratometria foi em  $2\theta = 19,35^\circ$ , o qual é característico de domínios cristalinos do PVA (FARIA et al., 2012; CHEN et al., 2008a; JAYASEKARA et al., 2004; MANSUR; ORÉFICE; MANSUR, 2004) e corresponde a distância interplanar de 0,46 nm.

PV/TC-NL 30, 50 e 70 revelaram um padrão de difração com três picos característicos em  $2\theta = 19,31, 21,49$  e  $23,85^\circ$ ;  $19,53, 21,67$  e  $23,75^\circ$ ;  $19,45, 21,47$  e  $23,95^\circ$ , respectivamente. O primeiro pico, para todos os filmes PV/TC-NL, se mostrou semelhante ao pico encontrado para o filme de PVA controle e corresponde às distâncias interplanares de 0,46 nm para os filmes PV/TC-NL 30 e 70 e 0,45 nm para o filme PV/TC-NL 50. O segundo e terceiro picos correspondem aos observados em prévio estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa para as  $\alpha$ -TC-NLS, os quais foram  $2\theta = 21,38^\circ$  e  $23,48^\circ$  (Figura 3, dentro) (DE CARVALHO et al., 2013) e correspondem às distâncias interplanares de 0,415 e 0,38 nm, representando as formas  $\alpha$  e  $\beta'$  polimórficas do behenato de glicerila, respectivamente (SATO, 1988; CHAPMAN, 1962; LUTTON, 1950). Para todos os filmes PV/TC-NL (30, 50 e 70) as distâncias interplanares para o segundo e terceiro picos foram de 0,41e 0,37 nm, indicando deslocamentos dos ângulos e modificações na estrutura cristalina em relação às  $\alpha$ -TC-NLS.

**Figura 3** Difratogramas dos filmes PVA controle (A), PV/TC-NL 30 (B), PV/TC-NL 50 (C), PV/TC-NL 70 (D) e  $\alpha$ -TC-NLS (dentro).



**Fonte** autor (2013).

Sendo assim, foram encontradas alterações na intensidade e na largura dos picos, especialmente no filme PV/TC-NL 50, o qual mostrou picos com menor intensidade do que os filmes PV/TC-NL 30 e 70, indicando melhor miscibilidade entre o PVA e  $\alpha$ -TC-NLS e características amorfas do filme 50, como também demonstrado na análise morfológica dos filmes (item 3.2).

### 3.6 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica permite avaliar as modificações ocorridas nas massas dos filmes com o aumento da temperatura (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012). A TGA foi realizada para determinar a estabilidade térmica do filme de PVA puro e dos filmes adicionados de  $\alpha$ -TC-NLS, considerando a possibilidade de utilizá-los como embalagens para alimentos, uma vez que os mesmos podem ser submetidos a processos térmicos durante a preparação e/ou processamento (BARRETO, 2003). A Tabela 2 mostra as temperaturas dos eventos e as perdas de massa correspondentes e a Figura 4 apresenta as curvas termogravimétricas para todos os filmes.

**Tabela 2** Parâmetros termogravimétricos dos filmes de PVA.

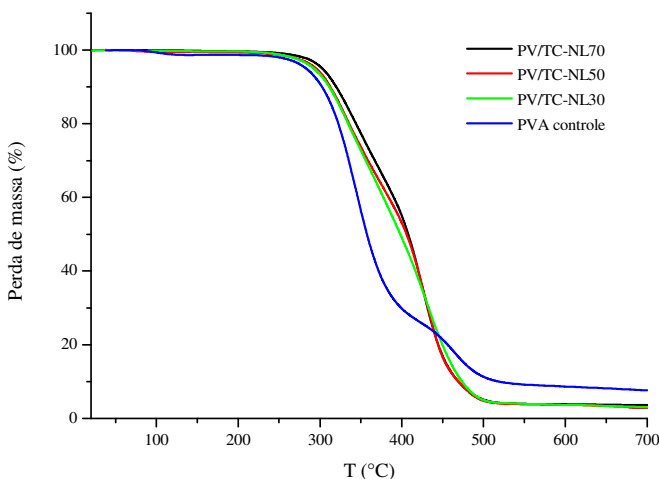
PVA (controle)		PV/TC-NL 30		PV/TC-NL 50		PV/TC-NL 70	
T (°C)	PM (%)	T (°C)	PM (%)	T (°C)	PM (%)	T (°C)	PM (%)
101,68	1,30	71,51	0,279	73,98	0,551	79,87	0,383
344,66	72,40	334,13	19,52	330,86	17,20	347,82	21,33
463,52	18,54	431,68	77,04	430,40	79,30	425,51	74,64
MR							
(700 °C)	7,69 %		3,11%		2,91%		3,68%

MR: Massa residual; PM (%): perda de massa; T (°C): temperatura.

O filme de PVA puro (Tabela 2, Figura 4-A) apresentou três eventos térmicos e, conseqüentemente, três estágios de decomposição. O primeiro estágio ocorreu em torno de 75-125 °C (101,68 °C) e pode ser atribuído à evaporação da água presente no filme (até 100 °C) ou associado com a perda das ligações intra- e intermoleculares da água (acima de 100 °C) (BAHETI; MILITKI, 2013; CHEN et al., 2008a; SREEDHAR et al., 2005) relacionados com a natureza hidrofílica do PVA. O segundo estágio de decomposição em torno de 300-380 °C (344,66 °C) está relacionado à degradação térmica da molécula de PVA, a qual envolve reações para eliminar os grupamentos O-H dos grupos laterais e a cisão das principais cadeias. O terceiro estágio, entre 430-500 °C (463,52 °C) é devido aos subprodutos gerados pelo PVA durante o processo de degradação térmica (SIRIWATCHARAPIBOON; TINNARAT; SUPAPHOL, 2013; CHEN et al., 2008a). Resultados semelhantes foram encontrados por Chen et al. (2008a) e Siritwatcharapiboon, Tinnarat e Supaphol (2013), os quais também reportaram três estágios de perda de massa para o PVA, sendo a primeira, segunda e terceira regiões em torno de 50-150 °C, 200-350 °C e 400-500 °C, respectivamente. Por outro lado, Baheti e Militki (2013) e Sreedhar et al. (2005) reportaram somente duas regiões de perda de massa entre 80-140 °C e entre 260-350 °C, e em 200 °C e em 382 °C, respectivamente, associando a região em torno de 300 °C com a degradação térmica total do PVA.



**Figura 4** Curvas termogravimétricas dos filmes de PVA controle, PV/TC-NL 30, PV/TC-NL 50 e PV/TC-NL 70.



**Fonte** autor (2013).

Os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70 também apresentaram três estágios de perda de massa (Tabela 1, Figura 4 B-C). O primeiro estágio ocorreu em 71,51 °C (64-84 °C), 73,98 °C (55-91 °C) e 79,87 °C (67-130 °C), respectivamente, resultado do processo de evaporação. O segundo estágio está associado com a principal perda de massa do PVA, entretanto, os filmes PV/TC-NL mostraram um pico com menor perda de massa, como pode ser visto na Tabela 1 e na Figura 4, os quais parecem fundir com o terceiro estágio. O terceiro estágio ocorreu nas temperaturas de 431,68 °C (320-470 °C), 430,40 °C (350-465 °C) e 425,91 °C (350-463 °C) para os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70, respectivamente, os quais estão associados com o terceiro estágio de degradação do PVA. A presença das  $\alpha$ -TC-NLS influenciou o comportamento térmico dos filmes de PVA. A maior temperatura de degradação do filme de PVA puro foi em cerca de 350 °C, na qual a perda de massa do mesmo foi de 72,4%, enquanto para os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70 a maior temperatura de degradação foi em torno de 430 °C com uma perda de massa em torno de 75%. Esta acentuação na estabilidade térmica pode ser devido as fortes ligações de hidrogênio entre as  $\alpha$ -TC-NLS e a matriz de PVA. Martins, Cerqueira, Vicente

(2012) reportaram um pico de perda de massa acima de 380 °C em filmes contendo  $\alpha$ -TC, associado com a decomposição das estruturas aromáticas deste.

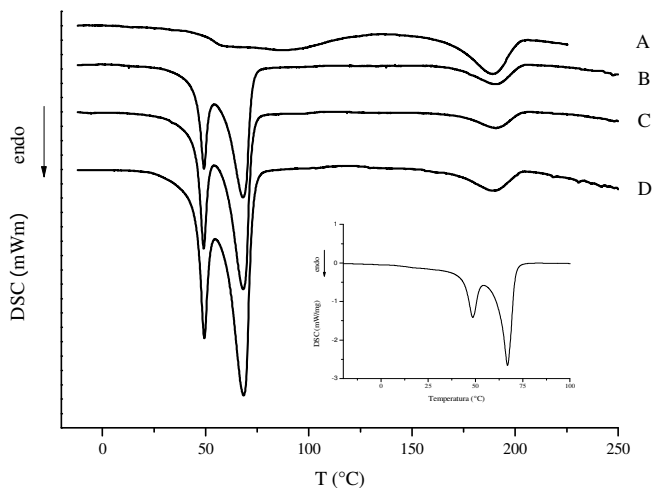
A percentagem de massa residual na temperatura de 700 °C do filme de PVA controle foi de 7,69 %. O PVA é preparado pela hidrólise parcial ou completa do poli (acetato de vinila) para remoção dos grupos acetato (TANG; ALAVI, 2011). Assim, de acordo com Sreedhar et al. (2005) os resíduos são macromoléculas da estrutura de polieno e Holland e Hay (2001) reportaram que existe a formação de vinil éster pelo rearranjo durante a degradação térmica.

Para os filmes de PV/TC/LN 30, 50 e 70 as massas residuais em 700 °C foram de 3,11; 2,91 e 3,68 %, respectivamente. Estes resultados indicam que os filmes PV/TC-NL perderam de duas a três vezes mais massa do que o filme de PVA puro. Por outro lado, a principal perda de massa do PVA puro ocorreu em torno de 350 °C enquanto a principal perda de massa dos filmes PV/TC-NL ocorreu em torno de 430 °C, indicando que a mistura de PV/TC-NL é termicamente mais estável.

### 3.6 Calorimetria exploratória diferencial

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi usada para medir a entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) e a temperatura de fusão ( $T_f$ ) dos filmes.  $\Delta H_f$  e  $T_f$  podem estar associados com a cristalinidade dos filmes (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012). Os termogramas e os eventos endotéricos do filme de PVA puro e dos filmes incorporados com  $\alpha$ -TC-NLS em diferentes concentrações podem ser visualizados na Figura 5 e Tabela 3.

**Figura 5** Curvas de DSC dos filmes de PVA controle (A), PV/TC-NL 30 (B), PV/TC-NL 50 (C), PV/TC-NL 70 (D) e  $\alpha$ -TC-NLS (dentro).



**Fonte** autor (2013).

O filme de PVA puro mostrou um pico endotérmico, relacionado com a temperatura de fusão em 188,95 °C. Baheti e Militki (2013), Palma-Rodriguez et al. (2012), Sreedhar et al. (2005) e Peppas e Mongia (1997) reportaram em estudos prévios  $T_f$  do PVA em 218,91 °C, 215,9 °C, 194,6 °C e 180,4 °C, respectivamente. Uma temperatura de transição foi encontrada para o filme de PVA em 52,11 °C, a qual pode estar relacionada com a região de transição vítrea.

Os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70 mostraram três picos endotérmicos em 46,94; 68,12 e 190,37 °C (Figura 5-B); 47,09; 68,24 e 190,44 °C (Figura 5-C) e 46,75; 68,41 e 189,47 °C (Figura 5-D), respectivamente. O primeiro e o segundo evento endotérmico de cada filme estão associados aos eventos endotérmicos das  $\alpha$ -TC-NLS (Figura 5, dentro), os quais foram em 48,55 and 67,00 °C, de acordo com estudo prévio. Os primeiros picos são similares ao pico do surfactante Poloxamer 188 presente na formulação das  $\alpha$ -TC-NLS. Entretanto, a temperatura de transição do PVA pode ter contribuído também para estes eventos. O segundo pico apresentado pelos filmes PV/TC-NL foram associados ao ponto de fusão do Compritol<sup>®</sup> 888 CG ATO (73,38 °C), componente também presente na formulação das  $\alpha$ -TC-NLS (DE

CARVALHO et al., 2013). O terceiro evento nos filmes PV/TC-NL está relacionado com a temperatura de fusão do PVA. As temperaturas iniciais (*onset*) e finais (*endset*) e a temperatura de fusão não apresentaram muitas modificações entre os filmes, mas a  $\Delta H_f$  do PVA modificou em todos os filmes PV/TC-NL (Tabela 3).

**Tabela 3** Eventos endotérmicos dos filmes de PVA e PV/TC-NL.

Filme	$T_f$ (°C)	<i>Onset</i> (°C)	<i>Endset</i> (°C)	$\Delta H_f$ (Jg <sup>-1</sup> )	GC (%)
PVA (controle)	188,95	168,76	200,98	29,13	21,01
PV/TC-NL 30	190,37	168,45	202,48	11,16	8,05
PV/TC-NL 50	190,44	171,39	202,58	8,56	6,18
PV/TC-NL 70	189,47	153,49	202,99	8,49	6,12

GC (%): grau de cristalinidade

A Tabela 3 apresenta a  $\Delta H_f$  do filme de PVA controle (29,13 Jg<sup>-1</sup>), PV/TC-NL 30 (11,16 Jg<sup>-1</sup>), PV/TC-NL 50 (8,56 Jg<sup>-1</sup>) e PV/TC-NL 70 (8,49 Jg<sup>-1</sup>) e pode ser observado que a incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes (PV/TC-LN) levou à diminuição da  $\Delta H_f$ . O filme somente de PVA mostrou maior valor de  $\Delta H_f$ , o que pode ser em decorrência da estrutura cristalina rígida do PVA puro devido às ligações –OH intramoleculares, sendo necessária maior energia para vibrar e rompê-las (LEE et al., 2010). O menor valor de  $\Delta H_f$  com a adição de  $\alpha$ -TC-NLS ao filme de PVA sugere uma descontinuidade nos filmes (PALMA-RODRÍGUEZ et al., 2012), o que pode ser observado na análise morfológica da seção transversal dos filmes (Figura 1, B-C). Os filmes de PVA puro (29,13 Jg<sup>-1</sup>), PV/TC-NL 30 (11,16 Jg<sup>-1</sup>), PV/TC-NL 50 (8,56 Jg<sup>-1</sup>) e PV/TC-NL 70 (8,49 Jg<sup>-1</sup>) apresentaram graus de cristalinidade de 21,01%, 8,05%; 6,18% e 6,12%, respectivamente. Peppas e Mongia (1997) reportaram grau de cristalinidade similar, em torno de 19,3%, para PVA puro.

### 3.8 Propriedades mecânicas

A influência da incorporação das  $\alpha$ -TC-NLS sobre a espessura dos filmes de PVA, o módulo de elasticidade (EM), a tensão na ruptura (TS) e a elongação na ruptura (%E) pode ser observada na Tabela 4. O filme de PVA puro mostrou maior tensão na ruptura (34,90 ± 2,2 MPa) em comparação com os filmes PV/NL-TC 30 (6,51 ± 0,3 MPa), 50 (2,93 ± 0,3 MPa) e 70 (2,26 ± 0,4 MPa), isto é, o filme de PVA puro apresentou uma maior capacidade de resistência à ruptura quando submetido à tensão do que os filmes incorporados com  $\alpha$ -TC-NLS. O filme de PVA puro, como observado na análise morfológica (Figura 1-A), apresenta interior e superfície mais compactos, enquanto os filmes

PV/TC-NL (Figura 1 B-D) mostram zonas descontínuas, com a incorporação de ar e presença de poros, o que indica uma menor aderência entre os componentes (TOH; LAI; RAHMAN, 2011), o que pode ter reduzido a resistência dos filmes à ruptura (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2009).

A elongação na ruptura (Tabela 4) está relacionada com a elasticidade de um material, uma vez que é medida através da extensão no ensaio de tração (SILVA et al., 2013). A percentagem de elongação (%E) foi maior para o filme de PVA puro (120,13%) e diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da adição de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes, sendo de 85,51; 24,69 e 8,44% para os filmes PV/TC-NL 30, 50 e 70, respectivamente, isto é, aumentou a rigidez dos filmes, ocasionando menor deformação plástica em comparação com o filme de PVA puro. Tendências semelhantes foram verificadas por Martins, Cerqueira e Vicente (2012) e Jongjareonrak et al. (2008), os quais encontraram que a %E diminuiu com a adição de vitamina E em filmes de quitosana e de gelatina, respectivamente. Mais uma vez, a estrutura descontínua apresentada pela adição  $\alpha$ -TC-NLS aos filmes pode ter influenciado, contribuindo para a redução da mobilidade das cadeias e da flexibilidade dos filmes PV/TC-LN; no entanto PV/TC-NL 30 preservou um certo grau de flexibilidade das cadeias.

O módulo de elasticidade ou módulo de Young (Tabela 4) observado para o filme de PVA controle foi em torno de 500 MPa e este resultado está de acordo com estudos prévios (KULJANIN et al., 2006; MBHELE et al., 2003). Este valor teve diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) com a incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes de PVA; entretanto, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os filmes PV/TC-NL.

**Tabela 4** Medidas de espessura, módulo de Young (EM), tensão na ruptura (TS) e elongação na ruptura (%E) dos filmes de PVA puro e incorporados com diferentes concentrações de  $\alpha$ -TC-NLS.

Filme	Espessura (mm)	EM (Mpa)	TS (Mpa)	%E
PVA (controle)	0,024±0,012 <sup>a</sup>	501,16±68,74 <sup>a</sup>	34,90±2,2 <sup>a</sup>	120,13±11,34 <sup>a</sup>
PV/TC-NL 30	0,091±0,010 <sup>b</sup>	176,73±21,37 <sup>b</sup>	6,51±0,30 <sup>b</sup>	85,51±9,47 <sup>b</sup>
PV/TC-NL 50	0,125±0,015 <sup>c</sup>	160,17±19,31 <sup>b</sup>	2,93±0,31 <sup>c</sup>	24,69±4,00 <sup>c</sup>
PV/TC-NL 70	0,149±0,035 <sup>d</sup>	147,43±19,52 <sup>b</sup>	2,26±0,38 <sup>c</sup>	8,44±2,00 <sup>d</sup>

Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando analisados pelo teste de Tukey.

A influência das nanopartículas de prata sobre as propriedades mecânicas do PVA foi estudada por Mbhele et al. (2003) e foi observado um aumento no módulo de elasticidade e na resistência do nanocompósito com um aumento no teor de Ag, indicando reforço da

matriz na presença de nanopartículas. Ibrahim, El-Zawawy e Nassar (2010) avaliaram o efeito de nano-celulose sobre as propriedades dos filmes de PVA e reportaram que a presença de 20% de nanopartículas de celulose na matriz de PVA aumentou a tensão na ruptura e a percentagem de alongação na ruptura, enquanto maior percentagem de partículas de nano-celulose diminuíram estes parâmetros, devido à alteração na estrutura morfológica dos filmes de PVA. No presente estudo, a incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS nos filmes de PVA não melhorou as propriedades mecânicas. Uma das diferenças entre os nossos resultados e dos reportados por Mbhele et al. (2003) e Ibrahim, El-Zawawy e Nassar (2010) foi o diâmetro médio das partículas de Ag (5 nm) e de nano-celulose (5,9-10,9 nm), respectivamente, ou seja, muito menores do que as nanopartículas obtidas no presente estudo, em torno 215 nm, o que pode ter contribuído para a formação das zonas descontínuas e presença de poros observados na análise de microscopia eletrônica (MEV) e, assim, para a redução da tensão na ruptura, alongação na ruptura e do módulo de Young.

#### 4 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que as nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol podem ser incorporadas em filmes de PVA (FTIR, difratometria de raios-X, e análise de DSC). A incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS foi homogênea e resultou em uma matriz com superfície rugosa e de seção transversal menos coesa. Devido à sua natureza anfifílica, o filme de PVA apresentou maior energia livre superficial total, seguido por PV/TC-LN 70, PV/TC-LN 30 e PV/TC-LN 50; entretanto, os filmes de PVA e PV/TC-LN 70 mostraram o maior e o menor componente dispersivo, respectivamente. A maior concentração de surfactantes nos filmes de PVA com maior concentração de  $\alpha$ -TC-NLS foi responsável por estes comportamentos. A análise termogravimétrica mostrou três estágios de decomposição térmica tanto para os filmes de PVA puro quanto para os filmes PV/TC-LN. Os filmes PV/TC-LN mostraram estabilidade térmica mais elevada do que os filmes de PVA puro. A inclusão  $\alpha$ -TC-NLS exerceu um efeito plastificante nos filmes de PVA, reduzindo o módulo de elasticidade e a tensão na ruptura. A percentagem de alongação também sofreu uma queda com o aumento da concentração de  $\alpha$ -TC-NLS.

## REFERÊNCIAS

- ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R.A.; GALICIA-GARCIA, T.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; GROSSO, C.R.F. Effect of surfactants on the functional properties of gelatina-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 129-136, 2011.
- ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli (Álcool Vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: Avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. **Polímeros: Ciênc. Tecnol.**, v. 11, n. 4, p. 174-181, 2001.
- ASTM D882-95a. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM International**, Philadelphia, United States, 1995.
- AZEREDO, H.M.C. de. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, p. 1240-1253, 2009.
- BAHETI, V.; MILITKY, J. Reinforcement of wet milled jute nano/micro particles in polyvinyl alcohol films. **Fibers and Polymers**, v. 14, n. 1, p. 133-137, 2013.
- BARRETO, P. L. M. **Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol**. 2003. 114 f. Tese. (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- BREWER, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221-247, 2011.
- BRUBACH, J.B.; JANNIN, V.; MAHLER, B.; BOURGAUX, C.; LESSIEUR, P.; ROY, P.; OLLIVON, M. Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by x-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy. **International Journal Pharmaceutics**, v. 336, p. 248-256, 2007.
- BYUN, Y.; HWANG, J.B.; BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARK, H.J.; WHITESIDE, S.V. Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 24-28, 2011.

CHAPMAN, D. The polymorphism of glycerides. **Chemical Reviews**, v. 62, p. 433-456, 1962.

CHEN, C-H.; WANG, F-Y.; MAO, C-F.; LIAO, W-T.; HSIEH, C-D. Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p.37-42, 2008a.

CHEN, Y.; CAO, X.; CHANG, P.R.; HUNEAULT, M.A. Comparative study on the films of poly(vinyl alcohol)/pea starch nanocrystals and poly(vinyl alcohol)/native pea starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 8-17, 2008b.

CHEONG, J.N.; TAN, C.P.; MAN, Y.B.C.; MISRAN, M.  $\alpha$ -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 204-209, 2008.

DE CARVALHO, S.M.; NORONHA, C.M.; FLORIANI, C.L.; LINO, R.C.; ROCHA, G., BELLETTINI, I.C.; OGLIARI, P.J.; BARRETO, P.L.M. Optimization of  $\alpha$ -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 278-285, 2013.

FANGUEIRO, J.F.; MACEDO, A.S.; JOSE, S.; GARCIA, M.L.; SOUTO, S.B.; SOUTO, E. B. Thermodynamic behavior of lipid nanoparticles upon delivery of Vitamin E derivatives into the skin: in vitro studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, p. 275-282, 2012.

FARIA, F.O.; VERCELHEZE, A.E.S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Quimica Nova**, v. 35, n. 3, p. 487-492, 2012.

FENG, L., SONG, Y., ZHAI, J., LIU, B., XU, J., JIANG, L., ZHU, D. Creation of a superhydrophobic surface from an amphiphilic polymer. **Angewandte Chemie**, v. 115, n. 7, p. 824-826, 2003.

GARGIULO, N.; ATTIANESE, I.; BUONOCORE, G.G.; CAPUTO, D.; LAVORGNA, M.; MENSITIERI, G.; LAVORGNA, M.  $\alpha$ -Tocopherol release from active polymer films loaded with



functionalized SBA-15 mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 167, p. 10-15, 2013.

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

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  $\alpha$ -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. **Food Research International**, v. 43, p. 1073-1078, 2010.

GUPTA, B.; AGARWAL, R.; ALAM, M.S. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-polyethylene oxide-carboxymethyl cellulose blend membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 2, p. 1301-1308, 2013.

HAN, J.H. New technologies in food packaging: overview. In: HAN, J.H. **Innovations in Food Packaging**. USA: Elsevier Science & Technology Books, 2005. Cap. 1, p. 03-11.

HATANAKA, J.; CHIKAMORIA, H.; SATO, H.; UCHIDA, S.; DEBARI, K.; ONOUE, S.; YAMADA, S. Physicochemical and pharmacological characterization of  $\alpha$ -tocopherol-loaded nano-emulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, p. 188-193, 2010.

HOLLAND, B.J.; HAY, J.N. The thermal degradation of poly(vinyl alcohol). **Polymer**, v. 42, n. 16, p. 6775-6783, 2001.

IBRAHIM, M.M.; EL-ZAWAWY, W.K.; NASSAR, M.A. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/nanospherical cellulose particle films. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 694-699, 2010.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E.A.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.J.; CLEYMAND, F.; DESOBRY, S. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 380-389, 2012.

- JAYASEKARA, R.; HARDING, I.; BOWATER, I.; CHRISTIE, G.B.Y.; LONERGAN, G.T. Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films. **Polymer Testing**, v. 23, p. 17-27, 2004.
- JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and  $\alpha$ -tocopherol. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 449-458, 2008.
- KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine**, v. 6, p. 753-759, 2010.
- KUCHAIYAPHUM, P.; PUNYODOM, W.; WATANESK, S.; WATANESK, R. Composition Optimization of Polyvinyl Alcohol/Rice Starch/Silk Fibroin-Blended Films for Improving Its Eco-Friendly Packaging Properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n.5, p. 2614-2620, 2013.
- KULIGOWSKI, J.; QUINTÁS, G.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares–Fourier transform infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 77, p. 229-234, 2008.
- KULJANIN, J.; ČOMOR, M.I.; DJOKOVIĆ, V.; NEDELJKOVIĆ, J.M. Synthesis and characterization of nanocomposite of polyvinyl alcohol and lead sulfide nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 95, p. 67-71, 2006.
- LEE, D.S. Packaging containing natural antimicrobial or antioxidative agents. In: HAN, J. H. **Innovations in Food Packaging USA**: Elsevier Science & Technology Books, 2005. Cap. 7, p. 108-122.
- LEE, T.S.; RAHMAN, W.A.W.A.; RAHMAT, A.R.; KHAN, M.I. Detection of synergistic interactions of polyvinyl alcohol–cassava starch blends through DSC. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p. 224-226, 2010.

- LUTTON, E.S. Review of the polymorphism of saturated even glycerides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 27, p. 276-281, 1950.
- MANSUR, H.S.; ORÉFICE, R.L.; MANSUR, A.A.P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 45, p. 7193-7202, 2004.
- MARTINS, J.T.; CERQUEIRA, M.A.; VICENTE, A.A. Influence of  $\alpha$ -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 220-227, 2012.
- MBHELE, Z.H.; SALEMANE, M.G.; VAN SITTERT, C.G.C.E., NEDELJKOVIĆ, J.M.; DJOKOVIĆ, V.; LUYT, A.S. Fabrication and characterization of silver-polyvinyl alcohol nanocomposites. **Chemistry of Materials**, v. 15, p. 5019-5024, 2003.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. 2012. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.
- MOZAFARI, M.R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; SUNTRES, Z.E.; SINGH, H.J. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 86, p. 2038-2045, 2006.
- MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-177, 2000.
- NDHLALA, A.R.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? **Molecules**, v. 15, p. 6905-6930, 2010.
- PALMA-RODRÍGUEZ, H.M.; AGUIRRE-ÁLVAREZ, G.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.; BELLO-PÉREZ, L.A.; VARGAS-TORRES, A. Oxidized banana-starch-polyvinyl alcohol film: Partial characterization. **Starch/Stärke**, v. 64, p. 882-889, 2012.

PEPPAS, N.A.; MONGIA, N.K. Ultrapure poly (vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.43, p. 51-58, 1997.

QIU, Y-R., RAHMAN, N.A., MATSUYAMA, H. Preparation of hydrophilic poly(vinyl butyral)/Pluronic F127 blend hollow fiber membrane via thermally induced phase separation. **Separation and Purification Technology**, v. 61, p. 1-8, 2008.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; VARGAS, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 23 p. 2102–2109., 2009.

SATO K. Crystallization of fats and fatty acids. In: GARTI, N.; SATO, K. **Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids** (Surfactant Science Series). New York: Marcel Dekker Inc, 1988. p. 267-303.

SAUPE, A.; RADES, T. Solid lipid nanoparticle. In: MOZAFARI, M. R. **Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy**. Dordrecht: Springer, 2006. Cap. 03, p. 41-50.

SEMSARZADEH, M.A.; GHALEI, B. Preparation, characterization and gas permeation properties of polyurethane–silica/polyvinyl alcohol mixed matrix membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 432, p. 115-125, 2013.

SHAHIDI, F., ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 112, p. 930-940, 2010.

SILVA, F.E.F.; DI-MEDEIROS, M.C.B.; BATISTA, K.A.; FERNANDES, K.F. PVA/Polysaccharides blended films: Mechanical properties. **Journal of Materials**, (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/413578> (*in press*).

SIN, L.T.; RAHMAN, W.A.W.A.; RAHMAT, A.R.; KHAN, M.I. Detection of synergistic interactions of polyvinyl alcohol–cassava starch blends through DSC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 224-226, 2010.

SINHA, V.R.; SRIVASTAVA, S.; GOEL, H.; JINDAL, V. Solid lipid nanoparticles (SLN'S): Trends and implications in drug targeting. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 212-238, 2010.

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

SIRIWATCHARAPIBOON, W.; TINNARAT, N.; SUPAPHOL, P. Preparation and characterization of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers containing platinum or platinum-ruthenium nanoparticles. **Journal of Polymer Research**, (2013).  
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10965-012-0040-1>. (*in press*).

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 82-89, 2009.

SREEDHAR, B.; SAIRAM, M.; CHATTOPADHYAY, D.K.; RATHNAM, P.A.S.; RAO, D.V.M. Thermal, mechanical, and surface characterization of starch-poly (vinyl alcohol) blends and borax-crosslinked films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, p. 1313-1322, 2005.

SUO, B.; SU, X.; WU, J.; CHEN, D.; WANG, A.; GUO, Z. Poly (vinyl alcohol) thin film filled with CdSe–ZnS quantum dots: Fabrication, characterization and optical properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 119, p. 237-242, 2010.

SWATHI, G.; PRASANTHI, N.L.; MANIKIRAN, S.S.; RAMARAO, N. Solid lipid nanoparticles: Colloidal carrier systems for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, p. 01-16, 2010.

TAN, C.P., NAKAJIMA, M.  $\beta$ -Carotene nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 661-671, 2005.

TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 7-16, 2011.

- THELLEN, C.; CHENEY, S.; RATTO, J.A. Melt processing and characterization of polyvinyl alcohol and polyhydroxyalkanoate multilayer films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 3, p. 2314-2324, 2013.
- TOH, W. Y.; LAI, J. C.; RAHMAN, W. A. W. A. Mechanical and water absorption properties of poly(vinyl alcohol)/sago pith waste biocomposites. **Journal of Composite Materials**, v. 0, p. 1-7, 2011.
- TUCKER, G.S. Food biodeterioration and methods of preservation. In: COLES, R.; MCDOWELL, D.; KIRWAN, M. **Food Packaging Technology**. USA: CRC Press, 2003. p. 32-64.
- VAN AARDT, M.; DUNCAN, S.E.; LONG, T.E.; O'KEEFE, S.F.; MARCY, J.E.; SIMS, S.R. Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: Thermogravimetric analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 587-591, 2004.
- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN BEEST, M.; DE KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 77-86, 1999.
- WEISS, J.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J.; KRISTBERGSSON, K.; HELGASON, T.; AWAD, T. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. **Food Biophysics**, v. 3, p. 146-154, 2008.
- WESSLING, C.; NIELSEN, T.; LEUFVÉN, A.; JÄGERSTAD, M. Retention of  $\alpha$ -tocopherol in low-density polyethylene (LDPE) and polypropylene (PP) in contact with foodstuffs and food-simulating liquids. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 79, p. 1635-1641, 1999.
- YAO, L.; HAAS, T.W.; GUISEPPI-ELIE, A.; BOWLIN, G.L.; SIMPSON, D.G.; WNEK, G.E. Electrospinning and stabilization of fully hydrolyzed poly(vinyl alcohol) fibers. **Chemistry of Materials**, v. 15, p. 1860-1864, 2003.
- YENÍLMEZ, E., YAZAN, Y. Release of vitamin E from different topical colloidal delivery systems and their in vitro-in vivo evaluation. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 167-188, 2010.

YOO, S-H.; SONG, Y-B.; CHANG, P-S.; LEE, H.G.  
Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, p. 25-30, 2006.

ZHU, G.; WANG, F.; XU, K.; GAO, Q.; LIU, Y. Study on properties of poly(vinyl alcohol)/polyacrylonitrile blend film. **Polímeros**, v. 23, n. 2, p. 146-151, 2013.





## CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes considerações podem ser feitas:

- As nanopartículas lipídicas sólidas contendo  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TC-NLS) foram preparadas com sucesso pelo método de homogeneização à alta pressão, a quente.
- Os modelos polinomiais quadráticos obtidos através da análise de superfície de resposta explicaram apropriadamente a variabilidade das respostas observadas, apresentando coeficientes de determinação acima de 0,65 e falta de ajuste não significativa.
- A concentração de lecitina de soja não afetou o diâmetro médio das partículas; a taxa de recuperação de  $\alpha$ -tocoferol não foi afetada pela concentração de Poloxamer 188 e; o potencial zeta não foi afetado pela concentração de  $\alpha$ -tocoferol.
- As condições ótimas de preparação das NLS foram determinadas como sendo 1,1% de  $\alpha$ -tocoferol, 0,75% de lecitina de soja e 1,3% de Poloxamer 188, obtendo-se o diâmetro médio, taxa de recuperação de  $\alpha$ -tocoferol e potencial zeta de 214,5 nm, 75,4 % e 41,9 mV, respectivamente.
- Através da análise de raios-X e DSC foi observado que a formulação ótima de  $\alpha$ -TC-NLS apresentou as formas polimórficas  $\alpha$  e  $\beta'$ , enquanto a NLS controle, sem adição de  $\alpha$ -TC, mostrou apenas a forma polimórfica  $\beta'$ .
- Através da análise de microscopia de transmissão foram observados diâmetros semelhantes aos encontrados por PCS, mostrando morfologia esférica e alguns cristais lipídicos.
- As  $\alpha$ -TC-NLS se mostraram estáveis fisicamente durante 21 dias nas temperaturas de armazenagem em 6 e 20 °C, de acordo com os valores de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta, mas somente em 6 °C a taxa de recuperação de  $\alpha$ -tocoferol não foi alterada.
- Os filmes de álcool polivinílico (PVA) incorporado com  $\alpha$ -TC-NLS foram obtidos com êxito através da técnica de *casting*.

- Os filmes de PVA adicionados com concentrações diferentes (30, 50 e 70%) de  $\alpha$ -TC-NLS (PV/TC-NL 30, 50 e 70) apresentaram boa estabilidade durante 12 semanas através da análise de fluorescência, indicando a não degradação do  $\alpha$ -TC na matriz polimérica.
- O filme de PVA puro se mostrou totalmente transparente enquanto os filmes PV/TC-NL apresentaram aparência amarelada. Estas características refletiram nos parâmetros de transmissão de luz (UV/visível), opacidade e atividade antioxidante, uma vez que os filmes com maior quantidade de  $\alpha$ -TC-NLS mostraram transmissão de luz significativamente menor ( $p < 0,05$ ) e opacidade e atividade antioxidante significativamente maior ( $p < 0,05$ ), demonstrando que os filmes constituem ótimas barreiras contra a luz UV e visível para evitar as degradações causadas pela foto-oxidação e atividade antioxidante dependente da concentração de  $\alpha$ -TC.
- Todos os filmes PV/TC-NL mostraram uma liberação rápida inicial seguida por um estado de equilíbrio entre o  $\alpha$ -TC transferido através do filme para o simulador e a migração natural do  $\alpha$ -TC a partir do simulador para o filme. Apenas o filme PV/TC-NL 30 liberou quase todo o conteúdo do  $\alpha$ -TC inicialmente adicionado; a mobilidade restrita do  $\alpha$ -TC na matriz de PVA ou um efeito pró-oxidante do  $\alpha$ -TC em concentrações elevadas pode ter limitado a liberação total de  $\alpha$ -TC nos filmes com uma maior quantidade  $\alpha$ -TC-NLS (50 e 70). No entanto, a taxa de liberação do  $\alpha$ -TC aumentou com o aumento da percentagem de  $\alpha$ -TC-NLS adicionado aos filmes PV/TC-NL, explicando a maior atividade antioxidante com o aumento da adição de  $\alpha$ -TC-NLS aos filmes.
- A análise morfológica mostrou que a incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS aos filmes foi homogênea e resultou em uma matriz com superfície rugosa e de seção transversal menos coesa e com maior volume que o PVA puro; o aumento de volume se refletiu na medida de espessura dos filmes e se atribuiu a incorporação de ar estabilizada pela presença de surfactantes.
- Devido à sua natureza anfifílica, o filme de PVA apresentou maior energia livre superficial total e os filmes de PVA e PV/TC-LN 70 mostraram o maior e o menor componente dispersivo, respectivamente. A maior concentração de surfactantes nos filmes de

PVA com maior concentração de  $\alpha$ -TC-NLS foi responsável por estes comportamentos.

- Os espectros de infravermelho mostraram que a incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS afetou a estrutura química de filmes de PVA com o estabelecimento de novas ligações químicas.
- A análise de raios-X mostrou picos com menor intensidade para o filme PV/TC-NL 50, indicando melhor miscibilidade entre o PVA e  $\alpha$ -TC-NLS e características amorfas nesta concentração de nanopartículas.
- A análise termogravimétrica mostrou três estágios de decomposição térmica tanto para os filmes de PVA puro quanto para os filmes PV/TC-LN. Os filmes PV/TC-LN mostraram estabilidade térmica mais elevada do que os filmes de PVA puro. Através da análise de DSC se observou que a incorporação de  $\alpha$ -TC-NLS diminuiu o grau de cristalinidade dos filmes de PVA.
- A inclusão  $\alpha$ -TC-NLS exerceu um efeito plastificante nos filmes de PVA, reduzindo o módulo de elasticidade e a tensão na ruptura. A percentagem de alongação também sofreu uma queda com o aumento da concentração de  $\alpha$ -TC-NLS.