

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS

**ANA PAULA ZAPELINI DE MELO**

**FORTIFICAÇÃO DE GELEIA DE GOIABA-SERRANA (*Acca  
Sellowiana* (Berg) Burret) COM NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA  
CARREGADAS COM VITAMINA D<sub>3</sub>**

FLORIANÓPOLIS  
2019



**ANA PAULA ZAPELINI DE MELO**

**FORTIFICAÇÃO DE GELEIA DE GOIABA-SERRANA (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret) COM NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM VITAMINA D<sub>3</sub>**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

FLORIANÓPOLIS  
2019

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

Melo, Ana Paula Zapelini de.  
PORTIFICAÇÃO DE GELEIA DE GOIABA-SERRANA (Acça  
Sellowiana (Berg) Burret) COM NANOPARTÍCULAS DE  
ZEÍNA CARREGADAS COM VITAMINA D3 / Ana Paula  
Zapelini de Melo ; orientador, Pedro Luiz Manique  
Barreto, 2018.  
122 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Nanopartículas. 3.  
Vitamina D3. 4. Geleia. 5. Goiaba-serrana (Acça  
Sellowiana (Berg) Burret). I. Manique Barreto,  
Pedro Luiz. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos. III. Título.

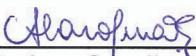
FORTIFICAÇÃO DE GELÉIA DE GOIABA-SERRANA (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret) COM NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM VITAMINA D<sub>3</sub>

Por

**Ana Paula Zapelini de Melo**

Esta Defesa de Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título “**Mestra** em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 21 de fevereiro 2019

  
Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa  
Coordenador

**Banca Examinadora:**

  
Prof.(a). Dr.(a). Pedro Luiz Manique Barreto  
Orientador (UFSC)

  
Prof.(a). Dr.(a). Michael Ramos Nunes  
Membro (IFSC)

  
Prof.(a). Dr.(a). Edna Regina Amante  
Membro (UFSC)

  
Prof.(a). Dr.(a). Alícia de Francisco de Casas  
Membro (UFSC)



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, pela orientação, confiança, oportunidade e atenção durante todos estes anos.

A Dr<sup>a</sup>. Cleonice Gonçalves da Rosa por abrir as portas da sua casa para me receber, estar sempre ao meu lado, me incentivando e dedicando seu tempo para me ensinar.

Ao professor Dr. Michael Ramos Nunes do Instituto Federal de Santa Catarina, pela disponibilização da goiaba-serrana para elaboração do trabalho, por colocar à disposição a estrutura do seu laboratório, por todos os ensinamentos, paciência e atenção.

Ao William Gustavo Sganzerla do Instituto Federal de Santa Catarina, pela colaboração com as análises de caracterização da geleia.

A Dr<sup>a</sup>. Carolina Montanheiro Noronha por estar sempre disponível para me acompanhar e ensinar.

Ao Laboratório de Leites e Derivados do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, a professora Dr<sup>a</sup>. Elane Schwinden Prudêncio e Msc. Silvani Verruck pela atenção e apoio com as análises de liberação gástrica.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, pela disponibilização de equipamentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Reologia e Polímeros Naturais, Matheus, Michelle, Aline, Bruna, Bianca, Daniele, Núbia e Brenda, pela amizade, companheirismo e aprendizado.

Ao meu esposo, família e amigos pelo amor, incentivo compreensão e paciência ao longo destes anos.

Aos membros da banca pela disposição.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

A UFSC, CNPQ e Capes.

A todos muito obrigada.



## RESUMO

A deficiência de vitamina D<sub>3</sub> é evidente em diversas partes do mundo, desta forma há um grande interesse em fortificar alimentos e bebidas com esta vitamina, porém devido a sua sensibilidade faz-se necessária a utilização de tecnologias apropriadas. Uma alternativa para melhorar a estabilidade e disponibilidade da vitamina D<sub>3</sub> nos alimentos é através da técnica de encapsulação. Este estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub>, para fortificação de geleia de goiaba-serrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret). As nanopartículas estudadas apresentaram estreita distribuição de tamanho e uniformidade, diâmetros em escala nanométrica, além de elevada eficiência de encapsulação. Através das análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar populações homogêneas de nanopartículas e formato esférico. A encapsulação da vitamina D<sub>3</sub> na matriz polimérica de zeína foi confirmada por calorimetria exploratória diferencial. Com o intuito de verificar o potencial de fortificação de matrizes alimentícias com nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub>, as nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> foram inseridas em uma geleia de goiaba-serrana. A incorporação das nanopartículas não alterou as características físico-químicas das geleias, incluindo sólidos totais, sólidos solúveis, pH, acidez titulável, umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, carboidratos e valor energético. Os resultados demonstraram que o tratamento térmico, bem como a adição de nanopartículas não interferiram na capacidade antioxidante das geleias. A forte correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos bem como de flavonoides com a atividade antioxidante, demonstra que os principais responsáveis pela ação antioxidante da goiaba-serrana são os compostos fenólicos. Os parâmetros L\*, a\*, b\* e  $\Delta E^*_{ab}$  de coloração das geleias demonstraram que a incorporação das nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> não afeta a coloração das mesmas. A análise microbiológica de bolores e leveduras revelou que as geleias se enquadraram nos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. As nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub> apresentaram comportamento gastrointestinal *in vitro* semelhante quando incorporadas na geleia. Os resultados demonstraram que o consumo de uma porção (20 g) de geleia de goiaba-serrana fortificada com nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub>, fornece aproximadamente 64 % da

ingestão diária recomenda de vitamina D<sub>3</sub>, considerando a categoria populacional acima de 9 anos de idade.

**Palavras-chave:** Nanopartículas. Zeína. Vitamina D<sub>3</sub>. Geleia. Goiabasserrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret).

## ABSTRACT

Vitamin D<sub>3</sub> deficiency is evident in many parts of the world, so there is a strong interest in fortifying foods and beverages with this vitamin, although due to its sensitivity, it is necessary to use appropriate technologies. An alternative to improving the stability and availability of vitamin D<sub>3</sub> in food is through the encapsulation technique. This study aimed to synthesize and characterize vitamin D<sub>3</sub> loaded zein nanoparticles, for fortification of goiaba-serrana jelly (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret). The studied nanoparticles presented a narrow size distribution and uniformity, nanometer scale diameters, and high encapsulation efficiency. Through the morphological analyses by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy, it was possible to observe the homogeneous populations of nanoparticles and its spherical shape. The encapsulation of vitamin D<sub>3</sub> in the zein polymer matrix was confirmed by differential scanning calorimetry. In order to verify the fortification potential of food matrices with vitamin D<sub>3</sub> nanoparticles, vitamin D<sub>3</sub> loaded zein nanoparticles were inserted in goiaba-serrana jelly. The incorporation of nanoparticles did not alter the physicochemical characteristics of the jellies, including total solids, soluble solids, pH, titratable acidity, moisture, minerals, lipids, proteins, carbohydrates and energetic value. The results demonstrated that the thermal treatment as well as the addition of nanoparticles did not interfere in jelly antioxidant capacity. The strong correlation between the content of phenolic compounds as well as of flavonoids and the antioxidant activity, demonstrates that the main responsible for the antioxidant action of goiaba-serrana are the phenolic compounds. Parameters L\*, a\*, b\* and  $\Delta E^*_{ab}$  of jellies coloration demonstrated that the incorporation of vitamin D<sub>3</sub> loaded zein nanoparticles does not affect their coloration. The microbiological analyses of molds and yeasts revealed that jellies conformed to the standards established by Brazilian legislation. Vitamin D<sub>3</sub> nanoparticles exhibited similar in vitro gastrointestinal behavior when incorporated into the jelly. The results showed that the consumption of one serving (20 g) of goiaba-serrana jelly fortified with vitamin D<sub>3</sub> nanoparticles, provides approximately 64 % of the recommended daily intake of vitamin D<sub>3</sub>, considering the population category above 9 years old.

**Keywords:** Nanoparticles. Zein. Vitamin D<sub>3</sub>. Jelly. Goiaba-serrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da vitamina D <sub>2</sub> e vitamina D <sub>3</sub> .....	29
Figura 2 - Metabolismo da vitamina D. ....	32
Figura 3 - Representação esquemática da preparação de nanopartículas poliméricas pela técnica de nanoprecipitação. ....	40
Figura 4 - Anatomia do grão de milho e suas partes. ....	41
Figura 5 - Estrutura química do polisorbato 80 (Tween® 80). ....	42
Figura 6 - Estrutura química da pectina de alta metoxilação (ATM). ...	44
Figura 7 - Estrutura química da pectina de baixa metoxilação (BTM). ...	44
Figura 8 - Estrutura gel pectina-açúcar. ....	45
Figura 9 - Formação da geleia em função da combinação de pectina, açúcar e acidez. ....	45
Figura 10 - Foto ilustrativa do fruto da goiabeira-serrana/feijoa ( <i>Acca sellowiana</i> (Berg) Burret), em corte transversal.....	46
Figura 11- Estrutura química básica de um flavonoide.....	47
Figura 12 - Fluxograma esquemático da forma de fortificação e análise das geleias de goiaba-serrana. ....	74
Figura 13 - Fluxograma esquemático do desenvolvimento das geleias de goiaba-serrana. ....	75
Figura 14 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas vazias e carregadas com vitamina D <sub>3</sub> , em magnificação de 2000 a 5000 vezes. ....	89
Figura 15 - Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas vazias e carregadas com vitamina D <sub>3</sub> , em magnificação de 800 a 200.000 vezes. ....	90
Figura 16 - Termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de vitamina D <sub>3</sub> , zeína, NP-vitD <sub>3</sub> , NP-vazia e Tween 80. ....	91



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes de vitamina D. ....	30
Tabela 2 - Definição de suficiência, insuficiência, deficiência e toxicidade de vitamina D (1 ng/mL = 2,5 nmol/L). ....	35
Tabela 3 - Dose diária recomendada conforme categoria populacional. ....	36
Tabela 4 - Limites mínimos e máximos de vitamina D oferecidos pelos suplementos alimentares conforme categoria populacional. ....	38
Tabela 5 - Condições utilizadas em cada etapa da simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> . ....	72
Tabela 6 - Diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação das NP-vazias e NP-vitD <sub>3</sub> . ....	85
Tabela 7 - Composição centesimal das GGS-C, GGS-vitD <sub>3</sub> , GGS-NP-vitD <sub>3</sub> , GGS-NP-vazia e Polpa-GS (g 100 <sup>-1</sup> g de peso fresco). ....	93
Tabela 8 - Atividade antioxidante e compostos bioativos (fenólicos totais e flavonoides) das GGS-C, GGS-vitD <sub>3</sub> , GGS-NP-vitD <sub>3</sub> , GGS-NP-vazia e Polpa-GS em peso fresco. ....	98
Tabela 9 - Parâmetros colorimétricos das GGS-C, GGS-vitD <sub>3</sub> , GGS-NP-vitD <sub>3</sub> , GGS-NP-vazia e Polpa-GS. ....	101
Tabela 10 - Análise microbiológica de bolores e leveduras das GGS-C, GGS-vitD <sub>3</sub> , GGS-NP-vitD <sub>3</sub> e GGS-NP-vazia. ....	103
Tabela 11 - Liberação de vitamina D <sub>3</sub> das NP-vitD <sub>3</sub> , vitamina D <sub>3</sub> livre (colecalfiferol) e GGS-vitD <sub>3</sub> , GGS-NP-vitD <sub>3</sub> , após cada etapa da simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> . ....	104



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1,25(OH) <sub>2</sub> D	1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D
25(OH)D	25-hidroxitamina D
7-DHC	7-dehidrocolesterol
a*	Vermelho-verde
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Métodos Oficiais de Análise da Associação de Química Analítica Oficial (do inglês " <i>Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry</i> ")
ATM	Alta metoxilação
b*	Amarelo-azul
BTM	Baixa metoxilação
CIE	Comissão Internacional de Iluminação (do inglês " <i>International Commission on Illumination</i> ")
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DG18	Dicloran glicerol ágar 18 %
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (do inglês " <i>Dynamic light scattering</i> ")
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês " <i>Differential scanning calorimetry</i> ")
EAG	Equivalente em ácido gálico
EE	Eficiência de encapsulação
Endo	Endotérmico
EQ	Equivalente em quercetina
Exo	Exotérmico
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês " <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ")
FRAP	Poder antioxidante de redução do íon ferro (do inglês " <i>Ferric reducing antioxidant power</i> ")
IS-C	Geleia de goiaba-serrana convencional
GGs-NP-vazia	Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas vazias
GGs-NP-vitD <sub>3</sub>	Geleia de goiaba-serrana fortificada com nanopartículas carregadas com vitamina D <sub>3</sub>

GGs-vitD <sub>3</sub>	Geleia de goiaba-serrana fortificada com vitamina D <sub>3</sub> livre
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro (do inglês “ <i>Generally Recognized as Safe</i> ”)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “ <i>High performance liquid chromatography</i> ”)
IAL	Instituto Adolf Lutz
IP	Índice de polidispersão
ISO	Organização Internacional de Normalização (do inglês “ <i>International Organization for Standardization</i> ”)
L*	Luminosidade
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NP-vazia	Nanopartículas vazias (de carga livre, amostra controle)
NP-vitD <sub>3</sub>	Nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D <sub>3</sub>
pH	Potencial hidrogeniônico
Polpa-GS	Polpa de goiaba-serrana
PTH	Paratormônio
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação linear
RDC	Resolução da diretoria colegiada
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (do inglês “ <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> ”)
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
Trolox	6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
UFC	Unidade formadora de colônia
UI	Unidades internacionais
UVB	Ultravioleta do tipo B
Z-ave	Diâmetro médio de partícula (do inglês “ <i>Mean particle size</i> ”)
ΔE* <sub>ab</sub>	Diferença total de cor

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
1.1 VITAMINA D.....	29
1.2 METABOLISMO DA VITAMINA D .....	31
1.3 HIPOVITAMINOSE D.....	33
1.4 SUPLEMENTAÇÃO E RECOMENDAÇÕES DIÁRIAS DE VITAMINA D <sub>3</sub> .....	34
1.5 ENCAPSULAÇÃO .....	38
1.6 FORTIFICAÇÃO DE GELEIA COM NANOPARTÍCULAS DE VITAMINA D <sub>3</sub> .....	43
1.7 GOIABA-SERRANA ( <i>Acca sellowiana</i> (Berg) Burret) .....	45
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO 2: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM VITAMINA D<sub>3</sub> PARA FORTIFICAÇÃO DE GELEIA DE GOIABA-SERRANA.....</b>	<b>61</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
2.1 MATERIAL .....	69
2.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D <sub>3</sub> .....	69
2.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	69
2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS .....	70

2.4.1	Determinação do diâmetro médio de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta ( $\zeta$ ) .....	70
2.4.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	70
2.4.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	71
2.4.4	Eficiência de encapsulação .....	71
2.4.5	Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	72
2.5	FORTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA GELEIA DE GOIABA-SERRANA .....	74
2.5.1	Elaboração das geleias.....	74
2.5.2	Sólidos totais .....	76
2.5.3	Sólidos solúveis .....	77
2.5.4	pH .....	77
2.5.5	Acidez total titulável .....	77
2.5.6	Cinzas .....	78
2.5.7	Proteínas .....	78
2.5.8	Lipídeos.....	78
2.5.9	Umidade .....	79
2.5.10	Carboidratos.....	79
2.5.11	Valor energético .....	79
2.5.12	Atividade antioxidante.....	80
2.5.13	Determinação dos compostos fenólicos totais .....	81
2.5.14	Determinação de flavonoides totais .....	81
2.5.15	Avaliação colorimétrica .....	81
2.5.16	Análises microbiológicas.....	82
2.5.17	Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	82
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	82
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	85
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS .....	85

3.1.1 Diâmetro médio de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP), potencial zeta ( $\zeta$ ) e eficiência de encapsulação (EE)	85
3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET)	88
3.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	90
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GELEIAS E POLPA DE GOIABA-SERRANA	92
3.2.1 Composição físico-química	92
3.2.2 Atividade antioxidante e compostos bioativos	96
3.2.3 Análise colorimétrica	101
3.2.4 Análises microbiológicas	103
3.2.5 Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>	104
CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS	111



## 1 INTRODUÇÃO

A deficiência de vitamina D é evidente em diversas partes do mundo, mesmo em regiões ensolaradas, causada por diferentes motivos, incluindo, falta de exposição à luz solar, dietas inadequadas, condições econômicas, sociais, dentre outras (STRATULAT et al., 2015; WALIA et al., 2017). Tal deficiência contribui para o risco de doenças ósseas e crônicas em todas as categorias populacionais (CASHMA, 2015; WALIA et al., 2017).

A vitamina D pode ser encontrada sob duas formas distintas, o ergocalciferol chamado de vitamina D<sub>2</sub>, presente em plantas, fungos e alguns invertebrados, e o colecalciferol de vitamina D<sub>3</sub>, em peixes gordurosos de água fria e profunda, óleo de fígado de bacalhau, gema de ovos, suplementos alimentares ou através da síntese endógena cutânea pelo precursor hormonal (7-deidrocolesterol), sob exposição fotolítica ultravioleta do tipo UVB (BOREL; CAILLAUD; CANO, 2013; KASALOVÁ et al., 2015).

Como a vitamina D<sub>3</sub> apresenta maior potencial biológico, quando comparada com a vitamina D<sub>2</sub> (Ozturk et al., 2015), além de desempenhar importantes funções no desenvolvimento ósseo, bem como na prevenção de câncer, doenças cardíacas e autoimunes, há um considerável interesse em fortificar alimentos e bebidas com a vitamina D<sub>3</sub> (GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015).

A fortificação de alimentos é considerada a principal abordagem para erradicar deficiências nutricionais, bem como assegurar a ingestão de vitaminas em níveis adequados (CASHMAN, 2015; MARQUES et al., 2012). O consumo de vitamina D proveniente de alimentos fortificados está principalmente relacionado a produtos lácteos, margarina, pães e cereais matinais (MARQUES et al., 2012).

Entretanto, alguns desafios estão associados à fortificação de alimentos, visto que a vitamina D<sub>3</sub> é altamente sensível a estresses ambientais e pode facilmente perder sua funcionalidade e benefícios fisiológicos (OZTURK et al., 2005; PARK et al., 2017).

Dentre as estratégias utilizadas para preservar as características dos compostos bioativos durante o processamento e armazenamento de alimentos, encontra-se a encapsulação. A técnica de encapsulação utilizando sistemas poliméricos de liberação controlada mostra-se adequada para proteção e entrega de vitaminas, no momento e na

quantidade desejados (KATOUZIAN; JAFARI, 2016; MOZAFARI et al., 2008).

Embora o Brasil seja o terceiro maior produtor de frutas do mundo (REETZ et al., 2014), poucas são apreciadas comercialmente. Considerando a valorização de frutas provenientes da região sul do Brasil, propõe-se a fortificação de uma geleia de goiaba-serrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret) com nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub>.

A goiaba-serrana proveniente do sul da América do Sul, principalmente da região sul do Brasil (AMARANTE et al., 2017), é uma fruta com polpa de coloração branca, sabor doce-acidulado e aromático (WESTON, 2010). Foi considerada uma planta para o futuro (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011), suas comprovadas atividades, antifúngica, antimicrobiana (MOSBAH et al., 2018), antioxidante (VUOTTO et al., 2000), antialérgica, anti-inflamatória, imunológica (AMARANTE; SANTOS, 2008; WESTON, 2010), bem como seu sabor e odor característicos, são consideradas promissoras para fabricação de diversos produtos alimentícios (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011; DEGENHARDT, 2003).

Como até o momento não existem estudos na literatura para fortificação de matrizes vegetais com vitamina D<sub>3</sub> encapsulada, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub>, para fortificação de geleia de goiaba-serrana.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> para fortificar a geleia de goiaba-serrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> (NP-vitD<sub>3</sub>) e nanopartículas vazias (de carga livre) (NP-vazia).

Avaliar o diâmetro médio de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP), potencial zeta ( $\zeta$ ) e eficiência de encapsulação (EE).

Avaliar as características morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica varredura (MEV).

Avaliar o comportamento térmico das nanopartículas por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Avaliar a liberação das nanopartículas submetidas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

Obter a geleia de goiaba-serrana e fortifica-la com nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub>.

Caracterizar a geleia de goiaba-serrana fortificada, quanto à composição centesimal, capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais e flavonoides totais, coloração, condições microbiológicas e simulação gastrointestinal *in vitro*.



# **CAPÍTULO 1**

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 VITAMINA D

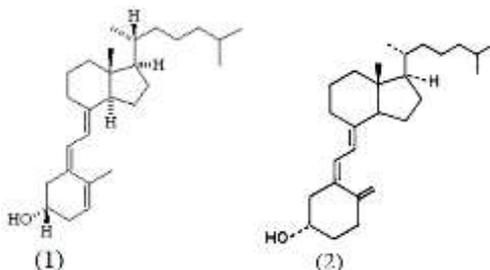
As vitaminas são um grupo de compostos orgânicos essenciais para o funcionamento e manutenção do organismo (SCHIEFERDECKER; THIEME; HAUSCHILD, 2015). São agrupadas de acordo com a solubilidade, as hidrossolúveis (do complexo B e C) e as lipossolúveis (A, D, E e K) (MCCREATH; DELGODA, 2017). Tal classificação reflete diretamente na sua biodisponibilidade, incluindo comportamento, absorção, transporte e armazenamento no organismo humano (SIZER; WHITNEY, 2003).

Em geral, as vitaminas são absorvidas por meio da ingestão de alimentos, com exceção da vitamina D que também pode ser sintetizada de forma endógena (GALANAKIS, 2017).

A vitamina D foi descoberta entre os anos de 1919 – 1924. Em 1930 foi constatado que a exposição da pele aos raios ultravioleta formaria o composto colecalciferol, e que através deste mecanismo os níveis adequados desta vitamina seriam mantidos (PREMAOR; FURLANETTO, 2006). Em meados de 1971, Norman e colaboradores (1971) descobriram a forma ativa desta vitamina e neste mesmo ano Holick e colaboradores (1971), isolaram e identificaram sua estrutura (DELUCA, 1988).

A vitamina D é um precursor hormonal de natureza esteróica e pode ser encontrado sob duas formas distintas, o ergocalciferol chamado de vitamina D<sub>2</sub> e o colecalciferol de vitamina D<sub>3</sub> (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química da vitamina D<sub>2</sub> (1) e vitamina D<sub>3</sub> (2).



Fonte: IUPAC (1981) e IUPAC (1989)

As vitaminas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> são encontradas em um número limitado de alimentos (Tabela 1) (HOLICK, 2012 ). As principais fontes de vitamina D<sub>2</sub> são as plantas, fungos e alguns invertebrados. Esta vitamina é sintetizada pela exposição à radiação ultravioleta do tipo UVB, em comprimento de onda de 290 a 315 nm, sob o esteroide vegetal ergosterol (KASALOVÁ et al., 2015; LEE et al., 2008). Quanto a vitamina D<sub>3</sub>, é encontrada em peixes gordurosos de água fria e profunda, como salmão, atum, sardinha (CASTRO, 2011), óleo de fígado de bacalhau (DAVID; LIVNEY, 2016; STRATULAT et al., 2015), gema de ovos (BOREL; CAILLAUD; CANO, 2012) ou obtida através de suplementos fortificados (DAVID; LIVNEY, 2016; LEE et al., 2008; MCCREATH; DELGODA, 2017). No entanto, a principal fonte de vitamina D<sub>3</sub> é através da síntese de forma endógena, ou seja, por intermédio da exposição à luz solar (CASTRO, 2011; STRATULAT et al., 2015; ZIANI; FANG; MCCLEMENTS, 2012).

As formas da vitamina D não diferem somente nas fontes de origem, mas também nas suas estruturas químicas. A vitamina D<sub>2</sub> apresenta 28 carbonos na estrutura (um a mais que a D<sub>3</sub>), uma ligação dupla extra entre os carbonos 22 e 23 e um grupamento metil adicional na cadeia lateral, além de apresentar um terço ou metade do potencial biológico quando comparada com a D<sub>3</sub> (CASTRO, 2011; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; OZTURK et al., 2015).

Tabela 1 - Fontes de vitamina D.

<b>Fonte</b>	<b>Teor de vitamina D aproximado (UI g<sup>-1</sup> *)</b>
Salmão fresco selvagem	600 a 1.000 UI/100 g de vitamina D <sub>3</sub>
Salmão fresco de criadouro	100 a 250 UI/100 g de vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub>
Salmão enlatado	300 a 600 UI/100 g de vitamina D <sub>3</sub>
Sardinhas enlatadas	300 UI/100 g de vitamina D <sub>3</sub>
Atum enlatado	236 UI/100 g de vitamina D <sub>3</sub>
Óleo de fígado de bacalhau	400 a 1.000 UI/100 g de vitamina D <sub>3</sub>
Cogumelos shiitake frescos	100 UI/100 g de vitamina D <sub>2</sub>
Cogumelos shiitake desidratados	1.600 UI/100 g de vitamina D <sub>2</sub>
Gema de ovo	20 UI/gema de vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub>

\*UI g<sup>-1</sup>: Unidades Internacionais por grama. 1 UI = 0,025 mg. Fonte: Adaptado de Holick (2012).

## 1.2 METABOLISMO DA VITAMINA D

O metabolismo de absorção da vitamina D ocorre por intermédio de exposição fotolítica. O raio UVB converte o composto 7-dehidrocolesterol (7-DHC) em pré-vitamina D<sub>3</sub> na superfície da epiderme humana, resultando em uma isomerização térmica e assim formando o colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>), que possui uma configuração espacial mais estável (CASTRO, 2011; STRATULAT et al., 2015; ZIANI; FANG; MCCLEMENTS, 2012).

O ergocalciferol e o colecalciferol são biologicamente inativos, e necessitam que haja duas hidroxilações sequenciais para que sejam convertidos em formas metabólicas ativas. A via metabólica da vitamina D (Figura 2) (RAFF; LEVITZKY, 2013) inicia-se no fígado, onde ocorre a primeira hidroxilação, pela enzima 25-hidroxilase, formando 25-hidroxivitamina D ou 25(OH)D, chamado de calcidiol ou calcifediol, metabólito inativo da vitamina. Posteriormente, no rim haverá a segunda hidroxilação pela 1- $\alpha$ -hidroxilase para formar 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D, o calcitriol, a forma biologicamente ativa da vitamina D (CASTRO, 2011; HOLICK, 2007; LEE et al., 2008; KASALOVÁ et al., 2015)

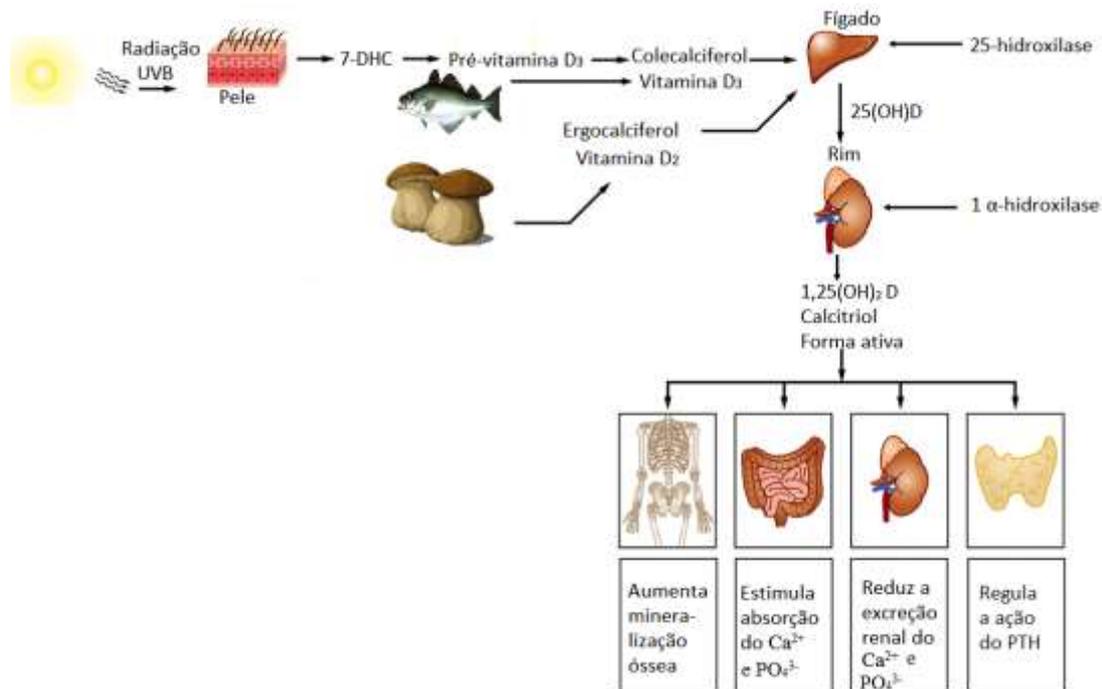
Através de receptores de hormônio esteroide, localizados nos intestinos, ossos, rins e na glândula paratireoide, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D atua na regulação e modificação óssea, na absorção de cálcio e fosfato no intestino (sua principal função), no aumento e reabsorção de cálcio e fosfato nos rins, além de regular a ação do paratormônio (PTH) pelas glândulas paratireoides (RAFF; LEVITZKY, 2013).

Através de proteínas presentes nos enterócitos (células epiteliais intestinais), a forma ativa da vitamina irá atuar no intestino possibilitando a absorção ativa e passiva de Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> no jejuno e duodeno, respectivamente (BLANCO; BLANCO, 2017; CASTRO, 2011; LICHTENSTEIN et al., 2013).

Nos rins a forma ativa da vitamina reduz a excreção dos íons cálcio e fosfato, devido ao aumento da reabsorção destes nos túbulos distais (CASTRO, 2011).

A síntese da 1,25(OH)<sub>2</sub>D é estimulada pelo paratormônio e pelos níveis de cálcio e fosfato do sangue, ou seja, um decréscimo de vitamina D irá induzir a ação do PTH, desta forma, regulando a absorção sérica de Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (BLANCO; BLANCO, 2017; LICHTENSTEIN et al., 2013).

Figura 2 - Metabolismo da vitamina D.



Fonte: Adaptado de Raff e Levitzky (2013).

### 1.3 HIPOVITAMINOSE D

A hipovitaminose consiste na carência de uma ou mais vitaminas essenciais no organismo. A hipovitaminose D teve sua predominância após a Revolução Industrial no norte da Europa, onde a queima de carvão e madeira encobria a atmosfera e criava uma barreira à exposição solar direta na epiderme; conseqüentemente, gerando desordens esqueléticas como o raquitismo em crianças e a osteomalácia em adultos (WALIA et al., 2017; HOLICK, 2007; PREMAOR; FURLANETTO, 2006).

O raquitismo é caracterizado pela redução da mineralização da placa epifisária (placa de crescimento) e leva à anormalidades esqueléticas que variam de acordo com a idade do indivíduo e o estágio da doença (CHIBUZOR et al., 2017). Nos adultos, como a placa de crescimento já está fechada, a osteomalácia se manifesta provocando a desmineralização óssea, ou seja, os ossos tornam-se mais delgados. Neste caso, as deformidades esqueléticas são mais brandas e só serão reveladas em estágios muito avançados da doença (PREMAOR; FURLANETTO, 2006).

Embora a vitamina D esteja diretamente envolvida com demandas ósseas, sua deficiência também foi relacionada com doenças como, câncer, diabetes, hipertensão, doenças autoimunes e cardiovasculares (PARK et al., 2017; DAVID; LIVNEY, 2016; KATOUZIAN; JAFARI, 2016; GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015; ABBASI et al., 2014; HOLICK, 2004b).

A deficiência de vitamina D no organismo é consequência de diversos fatores, como por exemplo, a localização geográfica, onde quanto mais afastado é o local da linha do Equador, maior é a espessura da camada atmosférica, assim, dificultando a entrada dos raios ultravioleta (WALIA et al., 2017; CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2016; STRATULAT et al., 2015). A variação da quantidade dos raios solares também é modificada de acordo com a sazonalidade, ou seja, sendo inferior principalmente em meses de inverno (CASTRO, 2011; LEE et al., 2008).

Outra variável que pode estar relacionada com esta deficiência é a quantidade de melanina presente na epiderme, indivíduos com pele mais escura necessitam de uma maior exposição aos raios ultravioleta para sintetizar uma quantidade suficiente da vitamina (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2016; CASTRO, 2011; GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015; LEE et al., 2008; STRATULAT et al., 2015).

A faixa etária também é considerada um fator determinante para síntese da vitamina, a epiderme e derme tendem a apresentar um afinamento devido aos processos de envelhecimento e consequentemente as reservas de 7-DHC também são reduzidas (HOLICK, 2004a).

Além disso as rigorosas orientações no sentido de os indivíduos evitarem a exposição solar e utilizarem extensivamente protetores solares, bloqueia o espectro da radiação UVB, requerido para iniciar o processo de ativação na epiderme (CASTRO, 2011).

A eficácia da síntese cutânea também pode ser determinada por outros fatores como por exemplo, estilo de vida, dieta inadequada, restrições alimentares, dentre outros (GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015; HOLICK, 2004b; STRATULAT et al., 2015; WALIA et al., 2017).

#### 1.4 SUPLEMENTAÇÃO E RECOMENDAÇÕES DIÁRIAS DE VITAMINA D<sub>3</sub>

O melhor biomarcador para avaliar o estado de vitamina D nos indivíduos é através dos níveis séricos de 25(OH)D, pois reflete a quantidade do precursor disponível para ser sintetizada (TANG; EPSTEIN, 2011), além de mensurar a vitamina total obtida pela dieta e exposição à luz solar (REBELO-MARQUES et al., 2017).

Por meio desta avaliação é possível diagnosticar insuficiência, deficiência ou uma possível toxicidade (hipercalcemia) da vitamina (HEUREUX, 2017). Casos de intoxicação são extremamente raros e normalmente causados por ingestão inadequada ou quantidades excessivamente elevadas de vitamina D (HOLICK et al., 2011; PETERS; MARTINI, 2014).

Os níveis séricos ideais de vitamina D ainda não estão em concordância na literatura, a princípio são considerados excelentes aqueles que mantêm os níveis de PTH de forma adequada no organismo (LICHTENSTEIN et al., 2013). Os critérios mais utilizados são os da *Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets*, *Endocrine Society Clinical Practice Guideline* e *American Academy of Pediatrics* (Tabela 2).

Tabela 2 - Definição de suficiência, insuficiência, deficiência e toxicidade de vitamina D (1 ng/mL = 2,5 nmol/L).

<b>Diagnósticos</b>	<i>Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets</i> (MUNNS et al., 2016)	<i>Endocrine Society Clinical Practice Guideline</i> (MIRSA et al., 2008)	<i>American Academy of Pediatrics</i> (HOLICK et al., 2011)
	Níveis séricos de 25(OH)D (ng/mL)		
<b>Suficiência</b>	> 20	30-100	21-100
<b>Insuficiência</b>	12-20	21-29	16-20
<b>Deficiência</b>	< 12	< 20	< 15
<b>Toxicidade</b>	> 100	> 100	> 150

Fonte: Autor.

Este tipo de diagnóstico é utilizado para identificar os indivíduos que necessitam de suplementação para alcançar níveis ideais da vitamina, e assim auxiliar no tratamento de doenças relacionadas com a hipovitaminose (HEUREUX, 2017).

As recomendações diárias de ingestão de vitamina D também não são consensuais na literatura, e podem ser superiores às recomendadas pela ANVISA e FAO.

De maneira geral, os indivíduos que não conseguem sintetizar a vitamina em quantidades suficientes devem adequar o seu nível de acordo com a categoria populacional (faixa etária, gestação e/ou lactação) (Tabela 3) (BRASIL, 2005; FAO, 2001).

Tabela 3 - Dose diária de vitamina D recomendada conforme categoria populacional.

<b>Órgão</b>	<b>Categoria populacional</b>	<b>Dose diária recomendada de vitamina D (µg)</b>
<b>Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)</b>	0 - 6 meses	5
	7 - 12 meses	5
	1 - 3 anos	5
	4 - 6 anos	5
	7 - 9 anos	5
	10 - 18 anos	5
	19 - 50 anos	5
	51 - 65 anos	10
	65 + anos	15
	Gestante	5
Lactante	5	
<b>Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)</b>	0 - 6 meses	5
	7 - 11 meses	5
	1 - 3 anos	5
	4 - 6 anos	5
	7 - 10 anos	5
	Adulto	5
	Gestante	5
	Lactante	5

1 IU = 25 ng, 40 UI = 1 µg, 200 UI = 5 µg, 400 UI = 10 µg, 600 UI = 15 µg.  
 Fonte: Adaptado de FAO (2001) e BRASIL (2005).

Apesar da concentração diária de consumo de vitamina D ainda não ter sido estabelecida consensualmente, a ingestão recomendada pela ANVISA e FAO apresenta valores improváveis de serem obtidos exclusivamente pela alimentação, bem como exposição solar (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2016), visto que mesmo em lugares ensolarados a população também pode apresentar deficiência desta vitamina (TANG; EPSTEIN, 2011). Além disso, para sustentar estes níveis pode ser necessário ingerir aproximadamente 1500-2000 UI dia<sup>-1</sup> (37,5-50 µg dia<sup>-1</sup>) de vitamina D (MARQUES, 2017).

Os bebês constituem um grupo de risco de hipovitaminose D, devido às altas taxas de crescimento esquelético apresentadas nesta faixa etária, bem como na adolescência, em que o rápido crescimento do

esqueleto, aumenta a necessidade de concentrações da vitamina na sua forma ativa (FAO, 2001). Em relação aos idosos, o declínio da vitamina D irá ocorrer de acordo com o envelhecimento e a taxa de síntese na epiderme. Na gravidez e no aleitamento materno, as diversas alterações hormonais fazem necessário a presença desta vitamina em níveis adequados no organismo (FAO, 2001).

Prado e colaboradores (2015) realizaram um estudo no Brasil com 226 mulheres e seus bebês recém nascidos, 85 % das mulheres e 80,5 % dos recém nascidos apresentaram deficiência ou insuficiência da vitamina. Moreira e colaboradores (2017) avaliaram os níveis de 25(OH)D em homens entre 20-93 anos na cidade do Rio de Janeiro, os resultados demonstraram que 46,7 % dos indivíduos apresentaram deficiência e 27,6 % insuficiência da vitamina no organismo. Milagres e colaboradores (2017) demonstraram que mais da metade das crianças brasileiras estudadas (56,3 %), apresentaram insuficiência ou deficiência de vitamina D.

Devido a valores tão expressivos relacionados à deficiência de vitamina D encontrados em diversos estudos, a suplementação é frequentemente prescrita, e para minimizar a deficiência desta vitamina em uma grande parcela da população, foram adotadas medidas públicas para fortificação de alimentos. Os principais alimentos fortificados atualmente são produtos lácteos, margarina e produtos de cereais (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2016).

Recentemente, a Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018, estabeleceu as listas de constituintes, limites de uso, alegações e rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Nela consta os novos limites mínimos e máximos que devem ser oferecidos pelos suplementos alimentares de acordo com a recomendação diária de consumo, divididos por categoria populacional (Tabela 4) (BRASIL, 2018). As recomendações de consumo diário de vitamina D citadas anteriormente, não estão revogadas.

Tabela 4 - Limites mínimos e máximos de vitamina D oferecidos pelos suplementos alimentares conforme categoria populacional.

<b>Categoria populacional</b>	<b>Dose diária recomendada de vitamina D (µg)</b>	
	<b>Limite mínimo</b>	<b>Limite máximo</b>
0 - 6 meses	1,5	12,5
7 - 11 meses	1,5	19,0
1 - 3 anos	2,25	31,5
4 - 8 anos	2,25	37,5
9 - 18 anos	2,25	50,0
≥ 19 anos	3	50,0
Gestante	2,25	50,0
Lactante	2,25	50,0

1 µg colecalciferol = 40 UI de vitamina D. Fonte: BRASIL (2018).

Embora exista um crescente interesse na fortificação de alimentos e bebidas com a vitamina D, existe uma série de desafios relacionados a este enriquecimento (PARK et al., 2017), incluindo baixa solubilidade em água, degradação química quando exposto à luz, calor e oxigênio, biodisponibilidade oral variável (GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015; OZTURK et al., 2015; WALIA et al., 2017), além de fácil degradação sob condições digestivas quando desprotegida (DAVID; LIVNEY, 2016).

Diante destes desafios faz-se necessária a utilização de tecnologias apropriadas para uma possível aplicação em produtos fortificados. Uma alternativa para melhorar a estabilidade e disponibilidade de vitamina D nos alimentos é através da técnica de encapsulação, que fornece proteção aos compostos sensíveis, além de controlar a liberação dos mesmos.

## 1.5 ENCAPSULAÇÃO

A encapsulação pode ser definida como um processo de aprisionamento de uma substância. O composto encapsulado pode ser chamado de recheio, núcleo, agente ativo, fase interna ou carga útil. Já a substância que está encapsulando pode ser chamada de revestimento, membrana, concha, material de suporte, material de parede, fase externa ou matriz (ZUIDAM; NEDOVIĆ, 2010). A técnica tem como objetivo preservar os compostos bioativos frente às condições de processamento,

bem como administrar de maneira adequada a liberação dos mesmos (ESFANJANI; JAFARI, 2016).

Esta tecnologia pode ser identificada conforme o diâmetro médio das partículas, valores inferiores a 1000 nm são denominadas nanopartículas (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006), enquanto grandezas entre 0,1 a 1,0  $\mu\text{m}$ , micropartículas (ENJETI; LINCZ; SELDON, 2007).

Partículas nanométricas apresentam vantagens quando comparadas às de escalas micrométricas. Á medida que o tamanho das partículas é reduzido há uma maior área superficial e maior potencial de solubilidade, devido à grande absorção interfacial do composto com o núcleo, assim aumentando a biodisponibilidade e melhorando a liberação de compostos bioativos na concentração e taxa desejados (KATOZIAN; JAFARI, 2016; MOZAFARI et al., 2008).

As principais vantagens da nanoencapsulação de vitaminas incluem, a rápida dissociação, elevada área superficial em relação à proporção em massa, alta absorção intracelular, redução das reações entre vitaminas e outras moléculas no meio circundante, redução da quantidade de material (núcleo-material de parede) utilizado, longa estabilidade das vitaminas revestidas, além de estabilidade física reforçada contra coalescência e separações gravitacionais (KATOZIAN; JAFARI, 2016).

Abbasi e colaboradores (2014) verificaram a estabilidade da vitamina D<sub>3</sub> encapsulada em nanopartículas de proteína de soro de leite. Os resultados demonstraram que as nanopartículas podem aprisionar a vitamina D<sub>3</sub> e atrasar sua liberação na presença de oxigênio, além de serem utilizadas para enriquecer bebidas ou alimentos com baixo teor de gordura.

David e Livney (2016) utilizaram proteína de batata como base para fabricação de nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. Os nanocomplexos apresentaram proteção significativa, redução das perdas da vitamina durante o processo de pasteurização e também durante testes simulados de vida útil.

A escolha do sistema de entrega e da metodologia utilizada para nanoencapsulação influencia rigorosamente as características físico-químicas das vitaminas. Desta forma, para a escolha de uma técnica apropriada de nanoencapsulação deve-se considerar a natureza da vitamina a ser encapsulada, as propriedades físico-químicas, o tamanho

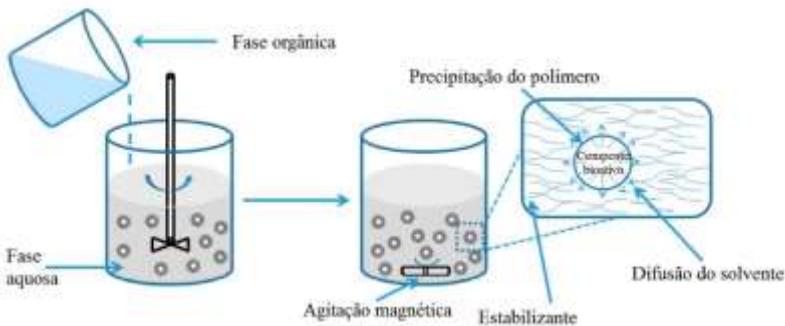
requerido e o material de parede utilizado (KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

São descritos na literatura diferentes metodologias para encapsulação de compostos bioativos em escala nanométrica, dentre elas destacam-se a nanoprecipitação, emulsão-difusão, dupla emulsificação, emulsão de coacervação, polímero de revestimento e camada por camada (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A técnica de nanoprecipitação (Figura 3) (WANG et al., 2016) proposta por Fessi e colaboradores (1989) apresenta diversas vantagens quando comparada com outras metodologias de nanoencapsulação, tais como, rapidez, simplicidade, fácil utilização, além de permitir a formação de partículas com diâmetro médio entre 100 a 300 nm (FANG; BHANDARI, 2010).

A metodologia consiste basicamente em três etapas: primeiramente os compostos ativos e um polímero são misturados em uma solução orgânica, posteriormente é vertida em uma solução aquosa contendo tensoativo e em seguida, a dispersão resultante de nanopartículas é evaporada para eliminar o solvente orgânico e, por fim, caso necessário, a solução é centrifugada ou filtrada para se obter as partículas (FANG; BHANDARI, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática da preparação de nanopartículas poliméricas pela técnica de nanoprecipitação.



Fonte: Adaptado de Wang e colaboradores (2016).

Um dos polímeros mais utilizados para controlar a liberação de compostos bioativos em formulações farmacêuticas e alimentícias é a zeína. Zeína é a principal proteína de armazenamento do grão de milho, pertencente à classe das prolaminas (LUO; WANG, 2014) (Figura 4)

(BRITANNICA, 1996). Sua estrutura é formada predominantemente por aminoácidos não-polares, incluindo ácido glutâmico (21-26 %), leucina (20 %), prolina (10 %) e alanina (10 %), e pobre em aminoácidos essenciais, como lisina e triptofano. A proporção de aminoácidos é responsável pela sua principal característica, a solubilidade em soluções alcoólicas e insolubilidade em água, exceto em condições extremas de pH (pH 11 ou maiores), altas concentrações de ureia ou detergentes aniônicos (PAPALIA; LONDERO, 2015).

Figura 4 - Anatomia do grão de milho e suas partes.



Fonte: Adaptado de Britannica (1996).

A zeína é reconhecida como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), ou seja, é considerada segura para consumo humano, possuindo características de baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, além de possuir baixa digestibilidade, quando comparada à outras proteínas (JIAO et al., 2018; LUO; WANG, 2014).

Diante de todas estas propriedades, seu uso em sistemas alimentares pode ser uma estratégia adequada para controlar a liberação de compostos bioativos no momento e quantidade apropriados (LUO; WANG, 2014).

Os surfactantes ou tensoativos são utilizados nas formulações para evitar agregação das partículas e melhorar a estabilidade das

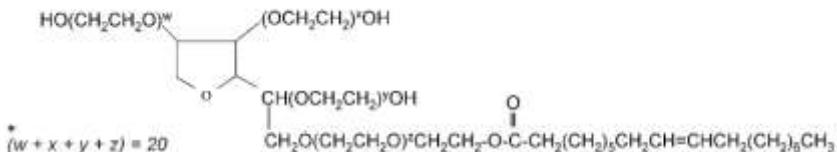
soluções. São substâncias anfífilas, com uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. A porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não iônica ou anfotérica, enquanto a porção apolar geralmente é uma cadeia hidrocarbonada. Apresentam amplas propriedades para aplicações industriais, incluindo emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, além de proporcionar solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os polisorbatos são tensoativos anfífilos, não iônicos, compostos de ésteres do polioxietileno sorbitano esterificados com ácidos graxos. O polisorbato 80 (mono-oleato de polioxietileno sorbitano ou comercialmente chamado de Tween® 80) é um dos mais utilizados em formulações alimentícias e farmacêuticas, pois aumenta a biodisponibilidade dos compostos ativos (KERWIN, 2008).

Sua estrutura química (Figura 5) é constituída de cadeias de hidrocarbonetos que fornecem a natureza hidrofóbica, enquanto as subunidades de óxido de etileno a natureza hidrofílica (KERWIN, 2008). O Tween® 80 quando digerido no intestino pode colaborar com o transporte e biodisponibilidade oral de compostos lipofílicos (KAUR; MEHTA, 2017), como por exemplo a vitamina D<sub>3</sub>.

Todos estes parâmetros tornam o Tween® 80 uma escolha conveniente e segura para uso em formulações alimentícias com nanopartículas.

Figura 5 - Estrutura química do polisorbato 80 (Tween® 80).



\* $(w + x + y + z = 20)$  refere-se ao número total de subunidades de óxido de etileno em cada molécula de surfactante, não excedendo a 20. Fonte: Kerwin (2008).

Estudos publicados demonstram bons resultados ao enriquecer diversos produtos com vitamina D<sub>3</sub>. Peres (2010) desenvolveu e caracterizou um biscoito tipo *cookie* enriquecido com cálcio e vitamina D<sub>3</sub> obtendo resultados sensoriais, microbiológicos e físico-químicos satisfatórios. Stratulat e colaboradores (2015) fortificaram queijo com vitamina D<sub>3</sub> e ômega-3 vegetal na forma de partículas emulsionadas, os resultados demonstraram que a fortificação de queijos com estes compostos bioativos geram um impacto positivo na composição,

rendimento e estabilidade química do produto resultante. Tipchuwong e colaboradores (2017) enriqueceram sorvete com emulsionante de proteína do leite carregado com vitamina D<sub>3</sub>, os resultados indicaram que a forma emulsionada de vitamina D<sub>3</sub> melhorou a estabilidade da mesma nas diversas formulações de sorvete testada.

## 1.6 FORTIFICAÇÃO DE GELEIA COM NANOPARTÍCULAS DE VITAMINA D<sub>3</sub>

De acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008) geleias são definidas como produtos preparados a partir de frutas e/ou sucos, misturados com açúcar, pectina, ácidos e outros ingredientes permitidos, podendo apresentar frutas inteiras, partes e/ou pedaços sob variadas formas. Esta mistura é processada até atingir concentração e consistência semissólida adequadas.

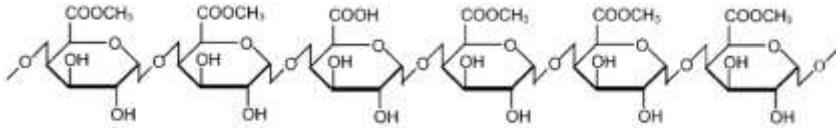
Os componentes indispensáveis para elaboração de uma geleia são: fruta, pectina, acidulantes e açúcar, este último pode ser substituído por adoçantes ou edulcorantes para redução calórica. A ordem da adição e a quantidade destes componentes podem definir a qualidade do produto final (KROLOW, 2005).

As frutas devem estar em estágio ótimo de maturação pois é neste estágio que apresentam maior concentração de pectina, aroma, cor e sabor (KROLOW, 2005).

Quando a fruta não é suficientemente rica em pectina é permitido adicioná-la à formulação. Sua concentração no meio influenciará diretamente na conservação da malha formada e na densidade das fibras (NACHTIGALL; ZAMBIAZI; CARVALHO, 2004).

Normalmente em geleias ditas convencionais utiliza-se pectina de alta metoxilação (ATM) (Figura 6) (THARANATHAN, 2003). Apresenta mais de 50 % dos grupamentos carboxila esterificados, formam géis principalmente por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, em pH aproximadamente igual a 3,5 e na presença de mais de 50 % de açúcar (BEMILLER, 2018; LÖFGREN; HERMANSSON, 2007).

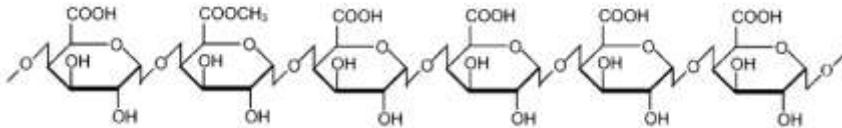
Figura 6 - Estrutura química da pectina de alta metoxilação (ATM).



Fonte: Tharanathan (2003).

Em geleias com baixo teor de sólidos solúveis é utilizado pectina de baixa metoxilação (BTM) (Figura 7) (THARANATHAN, 2003). Apresenta menos de 50 % dos grupamentos carboxila esterificados, a formação do gel é assegurada por interações entre os grupamentos carboxila e íons divalentes, como por exemplo o cálcio, não sendo necessária a presença de açúcares (BEMILLER, 2018; LÖFGREN; HERMANSSON, 2007).

Figura 7 - Estrutura química da pectina de baixa metoxilação (BTM).



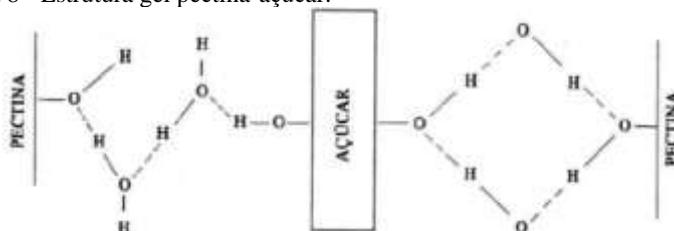
Fonte: Tharanathan (2003).

Os acidulantes provocam a protonação dos grupamentos carboxila, diminuindo a repulsão eletrostática e aumentando a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias. Com a adição de sólidos solúveis, haverá a redução da disponibilidade de água livre (CAMPBELL-PLATT, 2015), assim formando um emaranhado, semelhante à uma rede, capaz de aprisionar líquidos (Figura 8) (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

A flexibilidade das fibras no gel é controlada pela acidez do substrato, substratos com elevada acidez geram um gel flexível, ou podem destruir a estrutura pela hidrólise da pectina. A baixa acidez produz fibras fracas, incapazes de suportar o líquido e então o gel se rompe (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

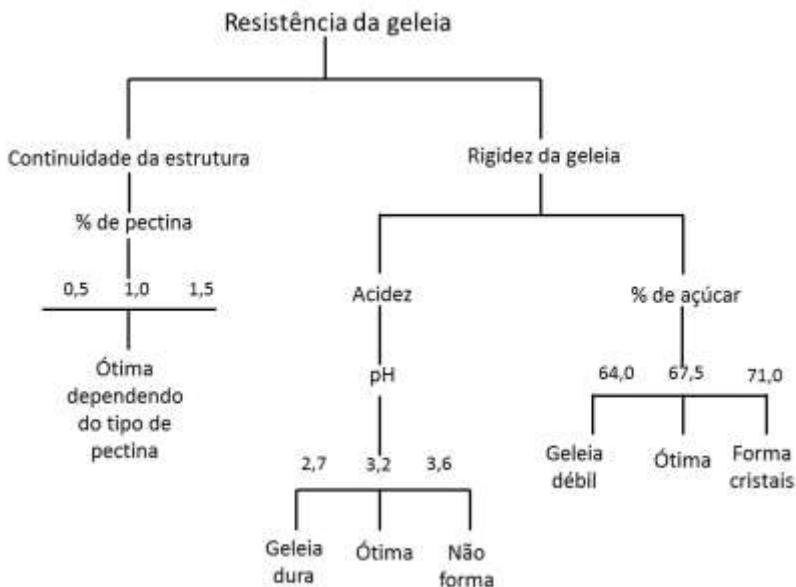
Os intervalos ideais de concentração de pectina, açúcar e pH são demonstrados na Figura 9 (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

Figura 8 - Estrutura gel pectina-açúcar.



Fonte: Gava, Silva e Frias (2009).

Figura 9 - Formação da geleia em função da combinação de pectina, açúcar e acidez.



Fonte: Gava, Silva e Frias (2009).

### 1.7 GOIABA-SERRANA (*Acca sellowiana* (Berg) Burret)

Na elaboração da geleia foram utilizados os frutos de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) também chamada de feijoa, pertencente à família *Myrtaceae*, é uma espécie frutífera nativa do sul do

Brasil, Paraguai Uruguai e Argentina (AMARANTE; SANTOS, 2008). No sul do Brasil, especialmente em Santa Catarina manifesta-se em áreas com altitudes de aproximadamente 1000 m (OLTRAMARI et al., 2000).

O fruto da goiabeira-serrana (Figura 10) é semelhante ao da goiabeira comum (*Psidium guajava* L.), porém apresenta polpa de coloração branca com sabor doce-acidulado e muito aromático (WESTON, 2010). A maturação dos frutos se estende por 3 a 4 semanas, sendo que na Serra Catarinense concentra-se entre os meses de fevereiro a maio (SANTOS, 2009).

Figura 10 - Foto ilustrativa do fruto da goiabeira-serrana/feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret), em corte transversal.



Fonte: Weston (2010).

O cultivo e exploração comercial são realizados predominantemente na Nova Zelândia e Colômbia, com material genético uruguaio. No Brasil ainda é pouco conhecida, entretanto, devido às suas características sensoriais possui grande potencial de mercado para fabricação de sucos, geleias, sorvetes, licores entre outros (DEGENHARDT, 2003).

Em 2011, o Ministério do Meio Ambiente classificou a goiabeira-serrana como uma planta para o futuro e foi considerada uma das espécies alimentícias nativas da região sul do Brasil com potencial valor econômico (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

O fruto apresenta elevada atividade antifúngica, antimicrobiana (MOSBAH et al., 2018), antialérgica, anti-inflamatória, atividade imunológica (AMARANTE; SANTOS, 2008; WESTON, 2010) e principalmente antioxidante (VUOTTO et al., 2000). Estas inúmeras

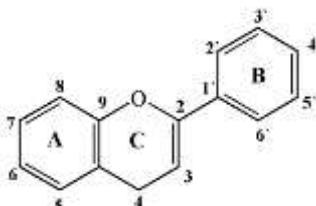
ações biológicas são atribuídas ao conteúdo de fitoquímicos presentes nos frutos, com destaque para os compostos fenólicos (MELO et al., 2008).

Os compostos fenólicos são considerados potentes antioxidantes que impedem danos oxidativos nas biomoléculas (CAMPOS, 2019). A presença de anel aromático em sua estrutura e grupamentos hidroxila, atribui a este grupo a capacidade de inibir e estabilizar radicais livres (OETTERER; REGITANO- D'ARCE; SPOTO, 2006).

O grupo dos compostos fenólicos pode ser subdividido em três principais classes: os ácidos fenólicos, taninos e os flavonoides, este considerado o maior da categoria (CAMPOS, 2019).

A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anéis A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002) (Figura 11) (COOK; SAMMAN, 1996).

Figura 11- Estrutura química básica de um flavonoide.



Fonte: Cook e Samman (1996).

Os compostos antioxidantes podem atuar em diversas etapas do processo oxidativo, agindo por diferentes mecanismos. Portanto, podem ser classificados em duas categorias principais, os antioxidantes primários e secundários (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes primários, seu mecanismo de ação consiste na doação de átomos de hidrogênio a radicais livres, promovem a remoção ou inativação destes radicais formados durante as primeiras etapas da oxidação (iniciação e propagação), assim interrompendo a reação em cadeia (Equações 1 e 2) (RAMALHO; JORGE, 2006).



Onde  $\text{ROO}\cdot$  e  $\text{R}\cdot$  são radicais livres, AH antioxidante com átomo de hidrogênio e  $\text{A}\cdot$  radical inerte.

Os átomos de hidrogênio doados pelos antioxidantes são abstraídos pelos radicais livres ( $\text{R}\cdot$  e  $\text{ROO}\cdot$ ) com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Formando espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte ( $\text{A}\cdot$ ). Como este radical é estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar reações oxidativas (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes secundários (ou sinérgicos) contribuem para retardar as reações de auto-oxidação por diversos mecanismos de ação, como por exemplo, quelar metais, doar átomos de hidrogênio a antioxidantes primários, decompor hidroperóxidos em espécies não radicalares, desativar oxigênio singlete, absorver radiação ultravioleta ou agir como supressores de oxigênio (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Apesar das conhecidas propriedades biológicas apresentadas pela goiaba-serrana, ainda não existem publicações na literatura envolvendo a fortificação de matrizes vegetais com nanopartículas de vitamina  $\text{D}_3$ , desta forma, torna-se interessante um estudo com este intuito.

## REFERÊNCIAS

ABBASI, A.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, M. A. E.; DAVOODI, D. Stability of vitamin D<sub>3</sub> encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. **Food Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 379–383, 2014.

AMARANTE, C. V. T.; SANTOS, K. L. Editorial: Goiababeira-serrana (*Acca sellowiana*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 01, 2008.

BEMILLER, J. N. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. AACC International, ed. 3, p. 303–312, 2019.

BLANCO, A.; BLANCO G. **Medical Biochemistry**, p. 624-632, Elsevier Inc., 2017.

BOREL, P; CAILLAUD D; CANO, N. J. Vitamin D bioavailability : State of the art. **Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1193–1205, 2013.

BRASIL. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o **“Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos”** Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b). Acesso: 20 set. 2017.

BRASIL. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o **“Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais”** constante do anexo desta Resolução. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_269\\_2005\\_COMP.pdf/25aaf9f3-32bc-4e80-aa6c-0520332533a6](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_269_2005_COMP.pdf/25aaf9f3-32bc-4e80-aa6c-0520332533a6). Acesso: 04 ago. 2017.

BRASIL. Instrução normativa nº 28, de 26 de julho de 2018. **“Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Disponível em:

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN\\_28\\_2018\\_CO\\_MP.pdf/db9c7460-ae66-4f78-8576-dfd019bc9fa1](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN_28_2018_CO_MP.pdf/db9c7460-ae66-4f78-8576-dfd019bc9fa1). Acesso: 21 nov. 2018.

BRITANNICA, Encyclopaedia Britannica, Inc 1996. **The outer layers and internal structures of a kernel of corn**. Disponível em: <https://www.britannica.com/technology/cereal-processing#ref50113> Acesso: 06 mar. 2019.

CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 42–46, Elsevier Inc., 2016.

CAMPBELL-PLATT, G. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Manole Editora, 2015.

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico da vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 8, p. 566–575 2011.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66–76, 1996.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Ministério do Meio Ambiente. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Sul**. MMA, p. 111-129, 2011.

CHIBUZOR, M. T.; GRAHAM-KALIO, D.; MEREMIKWU, M. M.; ADUKWU, J. O. Vitamin D, calcium or a combination of vitamin D and calcium for the treatment of nutritional rickets in children. (Protocol). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, n. 3, p. 1–15, 2017.

DAVID, S.; LIVNEY, Y. D. Potato protein based nanovehicles for health promoting hydrophobic bioactives in clear beverages. **Food Hydrocolloids**, v. 57, n. 2, p. 229–235, 2016.

DEGENHARDT J.; DUCROQUET, J.; GUERRA, M. P.; NODARI, O. R. Avaliação fenotípica de características de frutos em duas

famílias de meio-irmãos de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg.) de um pomar comercial em São Joaquim, SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 475–479, 2003.

DELUCA, H F. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. **Faseb Journal**, v. 2, n. 3, p. 224–236, 1988.

ENJETI, A. K.; LINCZ, L. F.; SELDON, M. Detection and measurement of microparticles an evolving research tool for vascular biology. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 33, n. 8, p. 771–779, 2007.

ESFANJANI, A. F.; JAFARI, S. M. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, n. 6, p. 532–543, 2016.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FAO. **Human vitamin and mineral requirements**, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMOOURY, H.; BEJITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

GALANAKIS, C. M. **Nutraceutical and Functional Food Components Effects of Innovative Processing Techniques**, p. 160–201, Elsevier Inc., 2017.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. **Tecnologia de Alimentos Princípios e Aplicações**, p. 364 – 373, Nobel Editora, 2009.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 3, p. 276–290, 2010.

GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability. **Food Chemistry**, v. 171, n. 3, p. 117–122, 2015.

HEUREUX, N. Vitamin D testing - where are we and what is on the horizon? **Advances in Clinical Chemistry**, p. 59–101, Elsevier Inc., 2017.

HEIM, E., K.; TAGLIAFERRO, R., A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HOLICK, M. F.; SCHNOES, H. K.; DELUCA, H. F.; SUDA, T.; COUSINS, R. J. Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol a metabolite of vitamin D active in intestine. **Biochemistry**, v. 10, n. 14, p. 2799–2804, 1971.

HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1678–1688, 2004a.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 3, p. 362–371, 2004b.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266–281, 2007.

HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GORDON, C. M.; HANLEY, D. A.; HEANEY, R. P.; MURAD, M. H.; WEAVER, C. M. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, 2011.

HOLICK, M. F. **Vitamina D Como Um Tratamento Tão Simples Pode Reverter Doenças Tão Importantes**, p. 324, Editora Fundamento Educacional Ltda., 2012.

IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos.** Instituto Adolfo Lutz ed. 4, São Paulo, 2008.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations. 1989. **European Journal of Biochemistry**, v. 186, n. 3, p. 429-58, 1989.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of vitamin D. Recommendations 1981. **Pure and Applied Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 1511–1516.

JIAO, Y; ZHENG, X.; YING CHANG, Y.; LI, D.; SUN, X.; LIU, X. Zein-derived peptides as nanocarriers to increase the water solubility and stability of lutein. **The Royal Society of Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 117–123, 2018.

KASALOVÁ, E.; AUFARTOVÁ, J.; KRČMOVÁ, L. K.; SOLICHOVÁ, D.; SOLICH, P. Recent trends in the analysis of vitamin D and its metabolites in milk - a review. **Food Chemistry**, v. 171, n. 3, p. 177–190, 2015.

KATOZIAN, I.; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 34–48, 2016.

KAUR, G.; MEHTA, S. K. Developments of polysorbate (Tween) based microemulsions: preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 134–160, 2017.

KERWIN, B. A. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2924–2935, 2008.

KROLOW, A. C. R **Preparo artesanal de geléias e geleíadas.** Embrapa Clima Temperado, p. 9–27, 2005.

LÖFGREN, C.; HERMANSSON, A-M. Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 480–486, 2007.

LEE, J. H.; O'KEEFE, J. H.; BELL, D. H.; HENSRUD D. D.; HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. An important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 24, p. 1949–1956, 2008.

LICHTENSTEIN, A.; FERREIRA-JÚNIOR M.; SALES M.; AGUIAR F.; FONSECA L.; SUMITA N.; DUARTE A. Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 495–506, 2013.

LUO, Y.; WANG, Q. Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 16, p. 1–12, 2014.

MARQUES, M. F.; MARQUES, M. M.; XAVIER, E. R.; GREGÓRIO, E. L. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. **HU Revista**, v. 38, n. 1–2, p. 29–36, 2012.

MCCREATH, S. B.; DELGODA, R. **Pharmacognosy, Fundamentals, Applications and Strategies**, p. 281- 288, Elsevier Inc., 2017.

MILAGRES, L.C.; ROCHA, N. P.; ALBUQUERQUE, F. M.; CASTRO, A. P.P.; FILGUEIRAS, M.S.; PESSOA, M.C.; PELUZIO, M. C. G.; NOVAES, J. F. Sedentary behavior is associated with lower serum concentrations of vitamin D in Brazilian children. **Public Health**, v. 152, n. 11, p. 75–78, 2017.

MISRA, M.; PACAUD, D.; PETRYK, A. COLLETT-SOLBERG, P. F.; KAPPY, M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. **Pediatrics**, v. 122, n. 2, p. 398–417, 2008.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010.

MOREIRA, M. L.; MACEIRA, M.; LOPES, F. R.; FARIAS, F. M. L. Vitamin D deficiency and its influence on bone metabolism and density in a brazilian population of healthy men. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 21 , n. 1 , p. 91–97, 2017.

MOSBAH, H.; LOUATI, H.; BOUJBIHA, M. A.; CHAHDOURA, H.; SNOUSSI, M.; FLAMINI, G.; ASCRIZZI, R.; BOUSLEMA, A.; ACHOUR, L.; SELMI, B. Phytochemical characterization, antioxidant, antimicrobial and pharmacological activities of Feijoa sellowiana leaves growing in Tunisia. **Industrial Crops & Products**, v. 112, n. 1, p. 521–531, 2018.

MOZAFARI, M. R.; KHOSRAVI-DARANI, K.; BORAZAN, G. G.; CUI, J.; PARDAKHTY, A.; YURDUGUL, S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. **International Journal of Food Properties**, v. 11, n. 4, p. 833–844, 2008.

MUNNS C. F.; SHAW, N.; KIELY M.; SPECKER, B. L.; THACHER, T. D.; OZONO, K.; MICHIGAMI, T.; TIOSANO, D.; MUGHAL, M. Z.; MÄKITIE, O.; RAMOS-ABAD, L.; WARD, L.; DIMEGLIO, L. A.; ATAPATTU, N.; CASSINELLI, H.; BRAEGGER, C.; PETTIFOR, J. M.; SETH, A.; IDRIS, H. W.; BHATIA, V.; FU, J.; GOLDBERG, G.; SÄVENDAHL, L.; KHADGAWAT, R.; PLUDOWSKI, P.; MADDOCK, J.; HYPPÖNEN, E.; ODUWOLE, A.; FREW, E.; AGUIAR, M.; TULCHINSKY, T.; BUTLER, G.; HÖGLER, W. Consensus recommendations on prevention and management of nutritional rickets. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 2, p. 394–415, 2016.

NACHTIGALL, A. M.; ZAMBIAZI, R. C.; CARVALHO, D. S. Geléia light de hibisco: características físicas e químicas. **Alimento Nutricional**, v. 15, n. 2, p. 155–161, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactants: properties and applications. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NORMAN A. W.; MYRTLE, J. F.; MIDGETT, R. J.; NOWICKI, H. G.; WILLIAMS, V.; POPJAK, G. 1,25-Dihydroxycholecalciferol:

identification of the proposed active form of vitamin D<sub>3</sub> in the intestine. **American Association for the Advancement of Science**, v. 306, n. 800, p. 702–704, 1971.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Manole, p. 270 - 274, 2006.

OLTRAMARI, A. C. O.; VESCO, L. L. D.; PEDROTTI, E. L.; DUCROQUET, J. H. J.; NODARIS, R. O.; GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 61–68, 2000.

OZTURK, B.; ARGIN, S.; OZILGEN, M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D<sub>3</sub> bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 187, n. 11, p. 499–506, 2015.

PAPALIA, Í. D. A. S.; LONDERO, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 552–559, 2015.

PARK, S. J.; GARCIA, C. V.; SHIN, G. H.; KIM, J. T. Development of nanostructured lipid carriers for the encapsulation and controlled release of vitamin D<sub>3</sub>. **Food Chemistry**, v. 225, n. 6, p. 213–219, 2017.

PERES, A. P. **Desenvolvimento de um biscoito tipo cookie enriquecido com cálcio e vitamina D**. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 73–74, 2010.

PETERS, B. S. E.; MARTINI, L. A. Vitamina D. **International Life Sciences Institute do Brasil**, v. 2, n. 2, p. 1–64, 2014.

PRADO, M. R. M. C.; CÁSSIA, E.; OLIVEIRA, C.; ASSIS, K. F.; RIBEIRO, S. A. V.; PRADO JUNIOR, P. P.; SANT'ANA, L. F. R.; PRIORE, S. E.; FRANCESCHINI, C. C. Prevalence of vitamin D deficiency and associated factors in women and newborns in the immediate postpartum period. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, n. 3, p. 286–293, 2015.

PREMAOR, M. O.; FURLANETTO, T. W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença.

**Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 1, p. 25–37, 2006.

RAFF, H.; LEVITZKY, M. G. **Fisiología Médica: Un enfoque por aparatos y sistemas**. McGraw-Hill Interamericana, p. 649–654, 2013.

RAMALHO, V. C. R.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REETZ, R. E.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; DRUM, M. **Anuário Brasileiro da Fruticultura de 2014**. Editora Gazeta Santa Cruz, 2015.

REBELO-MARQUES, A.; MOREIRA, R.T.; NUNES, C.; GOMES, J.; AIRES, C.; RITA, P.; PEREIRA, R.; PINTO, F. P. A vitamina D nos cuidados de saúde primários, a importância do seu doseamento e a sua suplementação. **Patient Care**, n. 2, p. 30–41, 2017.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 10, p. 547–556, 2006.

SANTOS, K. L. **Diversidade cultural, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para a domesticação da espécie**. Tese de doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SCHIEFERDECKER, M. E. M.; THIEME, R. D.; HAUSCHILD, D. B. **Vitaminas, Minerais e Eletrólitos: Aspectos Fisiológicos, Nutricionais e Dietéticos**, Editora Rubio, p. 133–148, 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 9, p. 930-940, 2010.

SIZER, F. S.; WHITNEY, E. **Nutrição**. Editora Manole Ltda., p. 190–193, 2003.

STRATULAT, I.; BRITTEN, M.; SALMIERI, S.; FUSTIER, P.; ST-GELAIS, D.; CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, M. Enrichment of cheese with vitamin D<sub>3</sub> and vegetable omega-3. **Journal of Functional Foods**, v. 13, n. 3, p. 300–307, 2015.

TANG, J. Y.; EPSTEIN, E. H. **Vitamin D and skin cancer**, Elsevier, p. 1751-1762, 2011.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

TIPCHUWONG, N.; CHATRAPORN, C.; NGAMCHUACHIT, P.; TANSAWAT, R. Increasing retention of vitamin D<sub>3</sub> in vitamin D<sub>3</sub> fortified ice cream with milk protein emulsifier. **International Dairy Journal**, v. 74, n. 11, p. 74–79, 2017.

VUOTTO, M. L.; BASILE, A.; MOSCATIELLO, V.; SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M. T. L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 6, p. 197–201, 2000.

WALIA, N.; DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; CHEN, L. R. C. Fish oil based vitamin D nanoencapsulation by ultrasonication and bioaccessibility analysis in simulated gastro-intestinal tract. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, n. 5, p. 623–635, 2017.

WANG, Y.; LI, P.; TRUONG-DINH, T.; ZHANG, J.; KONG, L. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. **Nanomaterials**, v. 6, n. 26, p. 1–18, 2016.

WANG, M.; FU, Y.; CHEN, G.; SHI, Y.; LI, X.; ZHANG, H.; SHEN, Y. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan and tea polyphenols coating on zein nanoparticles to encapsulate  $\beta$ -carotene by anti-solvent precipitation method. **Food Hydrocolloids**, v. 77, n. 4, p. 577–587, 2018.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 923-926, 2010.

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, n. 2, p. 1106–1112, 2012.

ZUIDAM, N. J.; NEDOVIĆ, V. A. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**, Springer, p. 3–100, 2010.



## **CAPÍTULO 2**

### **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM VITAMINA D<sub>3</sub> PARA FORTIFICAÇÃO DE GELEIA DE GOIABA-SERRANA**



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> para fortificação de geleia de goiaba-serrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret). As nanopartículas foram caracterizadas quanto aos parâmetros de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação. A morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, e as propriedades térmicas por calorimetria exploratória diferencial. As nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub> apresentaram adequada distribuição de tamanho (abaixo de 200 nm), índice de polidispersão (abaixo de 0,2), potencial zeta (24,5 mV) e elevada eficiência de encapsulação (97,21 %). As análises morfológicas possibilitaram a observação de uma grande quantidade de partículas sintetizadas, com populações homogêneas, formato esférico e um tamanho médio de  $144 \pm 3,25$  nm para as nanopartículas carregadas. Os resultados de espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de transmissão, apresentaram-se em concordância, considerando as diferenças das metodologias. As nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub> foram incorporadas na geleia de goiaba-serrana e o seu impacto foi avaliado na composição centesimal, capacidade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides totais, coloração, condições microbiológicas e simulação gastrointestinal *in vitro*. A incorporação das nanopartículas não alterou a composição centesimal e atividade antioxidante, demonstrando que as geleias podem ser utilizadas como fonte de antioxidantes naturais, devido ao conteúdo de compostos fenólicos presentes. As análises colorimétricas demonstraram geleias tendência à coloração escura, avermelhada e amarelada. As formulações de geleia estudadas se enquadraram nos padrões estabelecidos pela legislação, durante os 90 dias de avaliação. As nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub> apresentaram comportamento gastrointestinal *in vitro* semelhante quando incorporadas na geleia, com ápice de liberação na fase intestinal do duodeno e íleo. A geleia de goiaba-serrana fortificada com nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub> pode ser utilizada para suplementação de vitamina D<sub>3</sub>.

**Palavras-chave:** Fortificação. Geleia. Goiaba-serrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret). Nanopartículas. Vitamina D<sub>3</sub>.



## ABSTRACT

The aim of this study was to develop and characterize zein nanoparticles loaded with vitamin D<sub>3</sub> for fortification of goiaba-serrana jelly (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret). Nanoparticles were characterized by parameters of mean particle diameter, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency. The morphology was evaluated by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy, and the thermal properties by differential scanning calorimetry. Nanoparticles loaded with vitamin D<sub>3</sub> presented adequate distribution of size (200 nm), polydispersity index (below 0.2), zeta potential (24.5 mV) and high encapsulation efficiency (97.21 %). Morphological analyses allowed the observation of a large number of synthesized particles with homogeneous populations, spherical shape and average size of  $144 \pm 3.25$  nm for the charged nanoparticles. Results of dynamic light scattering and transmission electron microscopy are in agreement considering the methodological differences. Vitamin D<sub>3</sub> nanoparticles were incorporated into goiaba-serrana jelly and their impact evaluated on the centesimal composition, antioxidant capacity, phenolic compounds and total flavonoids, staining, microbiological conditions and gastrointestinal simulation in vitro. Incorporation of the nanoparticles did not alter the centesimal composition and antioxidant activity, demonstrating that jellies can be used as source of natural antioxidants, due to the content that phenolic compounds present. The colorimetric analyzes showed jellies tendency to dark, reddish, and yellowish coloration. The jelly formulations studied were in accordance with the standards established by legislation during the 90 days of evaluation. Vitamin D<sub>3</sub> nanoparticles exhibited similar in vitro gastrointestinal behavior when incorporated into the jelly, with apex releasing into the intestinal phase of the duodenum and ileum. Goiaba-serrana jelly fortified with vitamin D<sub>3</sub> nanoparticles can be used for vitamin D<sub>3</sub> supplementation.

**Keywords:** Fortification. Jelly. Goiaba-serrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret). Vitamin D<sub>3</sub>. Nanoparticles.



## 1 INTRODUÇÃO

A vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol), precursor hormonal de natureza esteróica, é considerada essencial para o bom funcionamento do corpo humano (CASTRO, 2011; KASALOVÁ et al., 2015; LEE et al., 2008). Como desempenha importantes funções no desenvolvimento ósseo, bem como na prevenção de câncer, doenças cardíacas e autoimunes, há um considerável interesse em fortificar alimentos e bebidas com esta vitamina (GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015).

O principal desafio da fortificação de alimentos e bebidas com a vitamina D<sub>3</sub> está associado à sua alta sensibilidade a degradação. Portanto, para que a mesma desempenhe suas atividades biológicas de maneira adequada, deve ser preservada da exposição à luz, calor, oxigênio, elevadas temperaturas, dentre outros (WALIA et al., 2017).

A nanoencapsulação pode ser uma abordagem promissora para o fornecimento direcionado, bem como a proteção da vitamina dos ambientes desfavoráveis de processamento, armazenamento e entrega de nutrientes (HASANVAND 2015; KATOUZIAN; JAFARI, 2016). Este processo inclui o aprisionamento ou revestimento de uma substância (composto ativo) dentro de uma matriz (encapsulante) (ZUIDAM; NEDOVIĆ, 2010).

Para melhorar a eficiência e estabilidade destas nanoestruturas é importante a escolha de materiais e metodologias adequadas (AZEVEDO et al., 2014). Dentre as diversas classes de materiais empregados como encapsulantes, os sistemas baseados em polímeros têm atraído muita atenção, principalmente devido à flexibilidade, diversidade, propriedades, composição e a facilidade de funcionalização oferecida por estas matérias primas (NICOLAS et al., 2012).

A zeína, principal proteína de armazenamento do grão de milho, é um polímero natural particularmente interessante pois apresenta características promissoras, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e lenta digestibilidade (LUO; WANG, 2014). Tais características tornam a zeína um veículo ideal para encapsulação de compostos bioativos, com aplicações em diferentes segmentos, especialmente de alimentos, farmacêutico e biomédico (JIAO et al., 2018).

A nanoprecipitação é uma técnica fácil, simples, rápida e que permite a formação de partículas de tamanhos reduzidos (100 a 300 nm). A metodologia consiste primeiramente na mistura do composto ativo com

o polímero em uma solução orgânica e, posteriormente, esta solução é vertida em uma solução aquosa contendo tensoativo, desta forma, ocorrendo a formação das nanopartículas de maneira instantânea (FANG; BHANDARI, 2010).

Tendo em vista a grande biodiversidade da flora catarinense, o modelo de alimento escolhido para ser fortificado com nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub>, trata-se de uma geleia de goiaba-serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret).

O potencial da fortificação de matrizes vegetais com nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub> ainda não foi estudado. Por este motivo, os objetivos desta pesquisa foram sintetizar nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> e caracterizá-las quanto às suas características físico-químicas, morfológicas, comportamento térmico e liberação gastrointestinal simulada *in vitro*, além de elaborar e fortificar uma geleia de goiaba-serrana (*Acca Sellowiana* (Berg) Burret) com nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub>, bem como investigar o impacto da incorporação das nanopartículas nas características físico-químicas da geleia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>), surfactante polisorbato 80 (Tween® 80), zefina (CAS: 9010-66-6), metanol, acetonitrila grau HPLC, pectina de baixa metoxilação (BTM), cloreto de cálcio, ácido cítrico e ácido benzoico utilizados foram adquiridos da empresa *Sigma Aldrich*, e os frutos da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) foram colhidos no dia 7 de março de 2018 em Lages, Santa Catarina, Brasil (27° 48' 27.101" S, 50° 19' 57.424" W)

### 2.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D<sub>3</sub>

A vitamina D<sub>3</sub> foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando equipamento Shimadzu (Modelo LC-20AT, Tóquio, Japão), equipado com um sistema controlador CBM - 20A, um sistema de bomba LC - 20AT, um detector de arranjo de fotodiodo SPD - M20A, CTO - 20A, e amostrador automático SIL - 20A. A análise foi realizada utilizando uma coluna Shim-pack Shimadzu C18 (250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm de tamanho de partícula; Tóquio, Japão), protegido por uma coluna de guarda (Shimadzu C18; 12,5 mm x 4,6 mm; 5 µm tamanho de partícula, Tóquio, Japão).

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Staffas e Nyman (2003), em comprimento de onda de 265 nm, com uma fase móvel de metanol:acetonitrila (90:10) (v/v) com um fluxo constante de 1,6 mL min<sup>-1</sup>. A coluna analítica foi mantida a 35 °C, volume de injeção de 20 µL e tempo total da corrida de 10 minutos. Os dados foram armazenados e processados por um sistema de estação de trabalho LC (Tóquio, Japão).

As curvas analíticas da área do pico em função da concentração de vitamina D<sub>3</sub> foram lineares na gama de concentrações de 0,0001 a 0,1 mg mL<sup>-1</sup>. A equação de regressão da curva de calibração foi  $y = 3 \cdot 10^7 x + 43720$  ( $R^2 = 0,9969$ ).

### 2.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> (NP-vitD<sub>3</sub>) e as nanopartículas vazias (de carga livre, amostra controle) (NP-vazia) foram preparadas por nanoprecipitação, de acordo com a metodologia descrita por da Rosa e colaboradores (2015) com adaptações. A solução de zeína foi preparada na concentração de 20 mg de zeína em 10 mL de etanol (85 % v/v), e mantida sob agitação magnética por 24 horas, posteriormente 200 µL da solução alcoólica de colecalciferol 20 mg mL<sup>-1</sup> foram adicionados às soluções de zeína. As soluções de zeína contendo colecalciferol foram vertidas em 30 mL de solução aquosa de Tween® 80 (1,5 % m/v) e mantidas sob homogeneização em Ultra Turrax (Modelo T25, IKA-Works, Inc., Cincinnati, Estados Unidos) a 10000 rpm por 3 minutos. O etanol foi evaporado em capela com exaustão por 24 h (TENG et al., 2013).

## 2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

A caracterização físico-química das NP-vitD<sub>3</sub> e NP-vazia foi estudada na temperatura de  $6 \pm 2$  °C simulando processo de refrigeração. As amostras foram armazenadas em vidro âmbar e avaliadas quanto à eficiência de encapsulação, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, a morfologia das nanopartículas foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, análise térmica realizada por calorimetria exploratória diferencial e simulação gastrointestinal *in vitro*.

### 2.4.1 Determinação do diâmetro médio de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ)

Medidas de potencial zeta (ζ, mV), índice de polidispersão (IP) e diâmetro médio de partícula (Z-ave, nm), foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) em ângulo de 173°, as amostras foram medidas em célula de eletroforese.

### 2.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas foi analisada por MET e MEV. Para o MET foi utilizado um microscópio JEOL (Modelo JEM-1011, Tóquio, Japão) operando a 70 kV. As soluções contendo as nanopartículas foram previamente diluídas (1:1) em água ultrapura Milli-Q® e cerca de 5 µL de cada amostra foi depositada sobre as grades de cobre revestidas com carbono (200 mesh). Após secagem a temperatura ambiente, as grades foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão.

Para o MEV foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura JEOL (Modelo JSM-6390LV, Tóquio, Japão). As soluções contendo as nanopartículas foram gotejadas sobre uma fita dupla-face de carbono já previamente fixada em um suporte de alumínio (*stubs*) e mantidas em estufa a vácuo (Modelo TE-395, Tecnal, São Paulo, Brasil), posteriormente foram recobertas com uma fina camada de ouro em recobridora a vácuo Leica (Modelo EM SCD500, Illinois, EUA). A visualização foi realizada nos aumentos de 2000 a 5000 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 kV.

### **2.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

As análises de DSC foram realizadas para as nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>, amostra controle (não carregada), zeína, Tween 80 e vitamina D<sub>3</sub> livre (colecalfiferol), em equipamento MC-DSC (TA Instruments, New Castle, EUA), 10 mg foram aquecidas em panela de alumínio a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup>, com um fluxo de nitrogênio de 20 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram analisadas no intervalo de aquecimento entre -20 °C a 140 °C.

### **2.4.4 Eficiência de encapsulação**

As análises de eficiência de encapsulação foram conduzidas conforme metodologia descrita por de Carvalho e colaboradores (2013). As nanopartículas foram submetidas à técnica de ultrafiltração ou centrifugação por suspensão, utilizando Ultra Amicon Filtros Centrifugos com membrana 30k Ultracel (Milipore, Irlanda). O procedimento consistiu em centrifugar as amostras por 30 minutos com uma velocidade de 6000 rpm, separando os compostos encapsulados dos não encapsulados. O filtrado que permeou a membrana filtrante constituiu-se nos compostos não encapsulados, os quais foram analisados e

quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com o item 4.2. Os compostos encapsulados ficaram retidos na membrana filtrante.

A eficiência de encapsulação foi expressa em porcentagem de eficiência de encapsulação a qual consiste na diferença entre o conteúdo do composto ativo livre (não encapsulado), e o conteúdo que foi aprisionado dentro da matriz polimérica (encapsulado), de acordo com a Equação 3.

$$EE \% = \left( \frac{\text{Vitamina D}_3 \text{ inicial teórica} - \text{Vitamina D}_3 \text{ não encapsulada}}{\text{Vitamina D}_3 \text{ inicial teórica}} \right) * 100 \quad (3)$$

#### 2.4.5 Simulação gastrointestinal *in vitro*

A simulação das condições gastrointestinais *in vitro* foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Verruck e colaboradores (2017) com adaptações, para as nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub> (NP-vitD<sub>3</sub>) e vitamina D<sub>3</sub> livre (colecalfiferol).

A análise foi realizada de maneira sequencial simulando as condições típicas da boca, esôfago-estômago, duodeno e íleo do corpo humano. As condições utilizadas em cada etapa, incluindo soluções enzimáticas, pH, tempo e intensidade de agitação são descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições utilizadas em cada etapa da simulação gastrointestinal *in vitro*.

Etapas	Condições simuladas	Agitação (rpm)	pH	Tempo (min)
Boca	$\alpha$ -amilase	200	6,9	2
	+ CaCl <sub>2</sub>			
Esôfago- Estômago	Pepsina	130	5,5	10
			4,6	10
	3,8		10	
	2,8		20	
	2,3		20	
	HCl	2	20	

<b>Etapas</b>	<b>Condições simuladas</b>	<b>Agitação (rpm)</b>	<b>pH</b>	<b>Tempo (min)</b>
Duodeno	Pancreatina	45	5	20
	+			
	Sais biliares			
Íleo	+	45	6,5	90
	NaHCO <sub>3</sub>			

Fonte: Adaptado de Verruck e colaboradores (2017).

Para a simulação de temperatura e intensidade dos movimentos peristálticos em cada etapa do sistema digestivo humano foi utilizado um banho-maria (Modelo DI950 M, Dist, Florianópolis, Brasil) com agitação mecânica a  $37 \pm 1$  °C.

Para o ensaio foram utilizados 10 mL das amostras NP-vitD<sub>3</sub> e vitamina D<sub>3</sub> livre ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Primeiramente as amostras foram submetidas à simulação da etapa da boca, onde o pH foi ajustado para 6,9 com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução de saliva preparada com  $100 \text{ U mL}^{-1}$  de  $\alpha$ -amilase em  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) foi adicionada às amostras a uma taxa de  $240 \mu\text{L min}^{-1}$  por 2 minutos, sob agitação a 200 rpm.

Na etapa seguinte simulando o esôfago-estômago, o pH das amostras foi diminuído até 2, utilizando ácido clorídrico (HCl)  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Posteriormente foi adicionado  $500 \mu\text{L}$  de solução de pepsina ( $25 \text{ mg mL}^{-1}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl) em alíquotas de igual volume durante toda a fase gástrica, totalizando 90 minutos sob agitação a 130 rpm.

Na etapa de simulação do duodeno, o pH foi aumentado para 5, utilizando NaHCO<sub>3</sub>  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida foi adicionado  $2,5 \text{ mL}$  da solução de sais biliares de pancreatina bovina ( $2 \text{ g L}^{-1}$  de pancreatina e  $12 \text{ g L}^{-1}$  de sais biliares bovinos em NaHCO<sub>3</sub>  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). As amostras foram mantidas sob agitação a 45 rpm por 20 minutos.

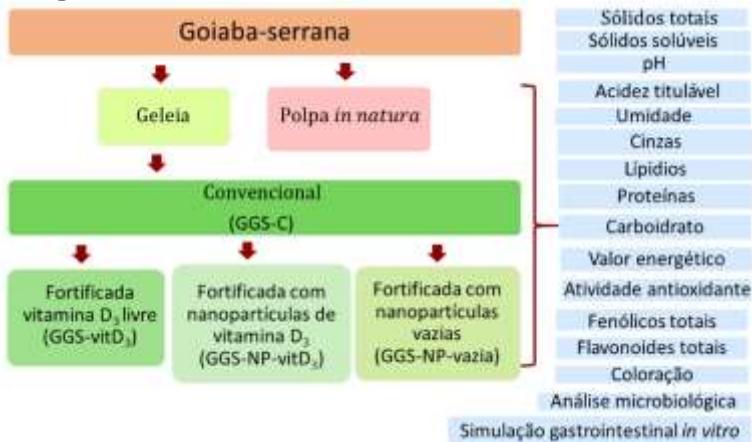
Para simulação da última etapa, o íleo, o pH foi aumentado para 6,5, utilizando NaHCO<sub>3</sub>  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , e as amostras mantidas sob agitação durante 90 minutos a 45 rpm.

Ao final de cada etapa da simulação gastrointestinal, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 6000 rpm, analisadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com o item 4.2.

## 2.5 FORTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA GELEIA DE GOIABA-SERRANA

O estudo foi conduzido conforme a Figura 12. A geleia de goiaba-serrana convencional (GGS-C) foi fortificada de 3 maneiras diferentes: com vitamina D<sub>3</sub> livre (GGS-vitD<sub>3</sub>), nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub> (GGS-NP-vitD<sub>3</sub>) e nanopartículas vazias (GGS-NP-vazia). As formulações de geleia e a polpa de goiaba-serrana *in natura* (Polpa-GS) foram caracterizadas quanto aos sólidos totais, sólidos solúveis, pH, acidez titulável, umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, carboidratos, valor energético, atividade antioxidante, fenólicos totais, flavonoides totais, coloração, avaliação microbiológica e simulação gastrointestinal *in vitro*.

Figura 12 - Fluxograma esquemático da forma de fortificação e análise das geleias de goiaba-serrana.

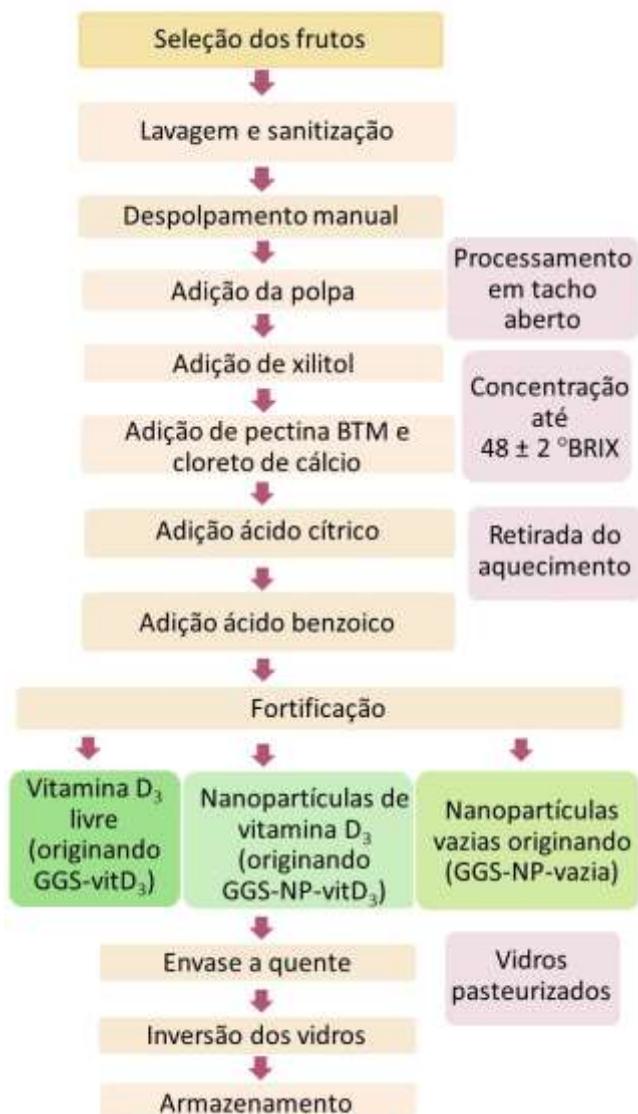


Fonte: Autor.

### 2.5.1 Elaboração das geleias

O desenvolvimento das geleias foi conduzido conforme Reissig (2015), com modificações, de acordo com a Figura 13.

Figura 13 - Fluxograma esquemático do desenvolvimento das geleias de goiabasserrana.



Fonte: Autor.

Foi utilizado polpa de goiaba-serrana, edulcorante xilitol, calculado com base em seu equivalente de doçura (300 vezes mais doce quando comparado com a sacarose), 2,5 % de pectina BTM (em relação a massa da polpa), 50 mg de cloreto de cálcio (por g de pectina utilizada), 0,05 % de ácido benzoico (em relação a massa da polpa) e 0,2 % de ácido cítrico (em relação a massa da polpa).

Os frutos da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) foram colhidos em Lages, Santa Catarina, Brasil. Após a colheita, os frutos foram sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 10 minutos e posteriormente foram submetidos ao despulpamento manual.

A polpa de goiaba-serrana foi homogeneizada em multiprocessador e transferida para um recipiente de aço inoxidável, sob pressão atmosférica e agitação manual constante (simulando tacho aberto) e ao atingir aproximadamente  $85 \pm 2$  °C o xilitol foi adicionado.

Posteriormente, a pectina BTM (previamente dissolvida em água fervente  $80 \pm 2$  °C) e o cloreto de cálcio foram adicionados, para formação do gel.

Para o monitoramento dos sólidos solúveis durante o processamento foi utilizado um refratômetro digital portátil (Modelo PAL-3, Atago, São Paulo, Brasil). Ao atingir aproximadamente  $48 \pm 2$  °Brix ( $85 \pm 2$  °C), a geleia foi retirada do aquecimento e adicionado ácido cítrico e ácido benzoico.

A geleia de goiaba serrana (GGS-C) foi fortificada com: vitamina D<sub>3</sub> encapsulada ( $50 \mu\text{g } 20 \text{ g}^{-1}$ ) (GGS-NP-vitD<sub>3</sub>), vitamina D<sub>3</sub> livre ( $50 \mu\text{g } 20 \text{ g}^{-1}$ ) (GGS-vitD<sub>3</sub>) e com nanopartículas vazias (GGS-NP-vazia)

O envase foi realizado a quente  $87 \pm 3$  °C em recipientes de vidro previamente submetidos a pasteurização ( $80 \pm 2$  °C por 15 min), com capacidade de 248 mL, tampas de folha de flandres revestidas com estanho e com revestimento interno de resina epóxi-fenólica. Após o envase, foi realizada a inversão das embalagens por 5 minutos.

### 2.5.2 Sólidos totais

Para determinação dos sólidos totais, foi pesado e homogeneizado 5 g de cada amostra em cápsulas metálicas (previamente secas e pesadas). As amostras foram secas em estufa (Modelo TE-395, Tecnal, São Paulo, Brasil) por 6 horas a  $70 \pm 2$  °C sob pressão reduzida  $\leq 100$  mm Hg (13,3 kPa). Após o resfriamento em dessecador

as amostras foram pesadas. Os sólidos totais foram calculados conforme Equação 4 (IAL, 2008).

$$\text{Sólidos totais (g 100 g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{massa da amostra seca}}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (4)$$

### 2.5.3 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi determinado por refratometria, utilizando um refratômetro digital portátil (Modelo PAL-3, Atago, São Paulo, Brasil). Uma gota de cada amostra foi gotejada sobre o prisma do refratômetro e os resultados apresentados foram expressos em graus Brix (IAL, 2008).

### 2.5.4 pH

Para determinação do pH, 10 g de cada uma das amostras foi pesada em béquer, diluída em 100 mL de água destilada, homogeneizada e medido o pH com o auxílio de um potenciômetro (Bel Engineering, W3B, Monza, Itália), devidamente aferido com soluções tampões de pH 4,0 e 6,86 (IAL, 2008).

### 2.5.5 Acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada pesando-se 10 g de cada amostra em erlenmeyer, diluída em 100 mL de água, adicionada 0,3 mL de solução de fenolftaleína e titulada com hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> sob agitação constante, até o aparecimento de coloração rósea. A acidez titulável foi calculada conforme Equação 5 e 6 (IAL, 2008).

$$\text{Acidez Total (g ácido cítrico 100 g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Vol}_{\text{NaOH}} \times 0,1 \times 192}{\text{massa amostra} \times 10 \times 3} \quad (5)$$

$$\text{Acidez Total (\%)} = \frac{V \times f \times M}{P} \times 100 \quad (6)$$

Em que V é o volume da solução de NaOH, f é o fator de correção da solução de NaOH, P é a massa da amostra e M a molaridade da solução de NaOH.

### 2.5.6 Cinzas

Para determinação das cinzas, 10 g de cada amostra foi pesada em cápsulas de porcelana (previamente secas e pesadas), posteriormente foram incineradas em mufla a  $550 \pm 5$  °C por 4 a 6 horas, resfriadas em dessecador e pesadas. O teor de cinzas foi determinado de acordo com Equação 7 (IAL, 2008).

$$\text{Cinzas (g 100 g}^{-1}\text{)} = \frac{[\text{MA} - (\text{MCA}_{\text{após mufla}} - \text{MCV})]}{\text{MA}} \times 100 \quad (7)$$

Em que MA é a massa da amostra, MCA é a massa do cadinho com a amostra e MCV massa do cadinho vazio.

### 2.5.7 Proteínas

O teor de proteína das amostras foi determinado pelo método de Kjeldahl. Em um tudo de digestão foi pesado 0,2 g de cada amostra, adicionado 2 g de mistura catalítica (sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio) e colocados no bloco digestor Kjeldahl, até atingir  $350 \pm 2$  °C por aproximadamente 6 horas. Após o resfriamento dos tubos, foram adicionados 10 mL de água destilada e transferidos para erlenmeyer. Os tubos foram colocados em destilador e neutralizados com hidróxido de sódio (50 % m/v), ao destilado foi adicionado 10 mL de solução de ácido bórico (2 % m/v) e por fim titulado com ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Um branco sem a amostra foi preparado. As proteínas foram calculadas conforme Equação 6, utilizando fator de correção de nitrogênio para proteína igual a 6,25 (AOAC, 2002).

$$\text{Proteínas (g 100 g}^{-1}\text{)} = \frac{[0,014 \times 6,25 \times (\text{Vol}_{\text{HCl}} - \text{Vol branco}) \times 0,02]}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (6)$$

### 2.5.8 Lipídeos

Os lipídeos foram determinados por extração em Soxhlet. Foram pesados 5 g de cada amostra em papel de filtro (previamente desengordurado), transferidas para um extrator tipo Soxhlet, acoplado a um balão de fundo chato e adicionado éter. As amostras foram mantidas sob aquecimento em chapa elétrica por 8 horas. O papel filtro foi retirado, o éter destilado e o balão contendo o resíduo extraído foi transferido para

uma estufa a  $105 \pm 2$  °C por aproximadamente 1 hora. O resíduo foi resfriado em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesado. Os lipídeos foram calculados conforme Equação 9 (AOAC, 2002).

$$\text{Lipídeos (g 100 g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{massa de lípidios}}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (9)$$

## 2.5.9 Umidade

Foram pesados 5 g de cada amostra em cápsula de porcelana (previamente secas e pesadas) e colocadas em estufa a  $105 \pm 2$  °C por aproximadamente 3 horas ou até peso constante. As cápsulas foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente para posterior pesagem. A umidade foi determinada de acordo com a Equação 10 (IAL, 2008).

$$\text{Umidade (g 100 g}^{-1}\text{)} = \frac{[\text{MA} - (\text{MCA}_{\text{após estufa}} - \text{MCV})]}{\text{MA}} \times 100 \quad (10)$$

Em que MA é a massa da amostra, MCA massa do cadinho com a amostra, MCV massa do cadinho vazio.

## 2.5.10 Carboidratos

Os carboidratos (carbo) foram determinados por diferença conforme Equação 11 (BRASIL, 2003).

$$\text{Carbo (g 100 g}^{-1}\text{)} = 100 - (\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{lipídeos} + \text{proteínas}) \quad (11)$$

## 2.5.11 Valor energético

Para o cálculo do valor energético, foram utilizados os fatores de conversão para os carboidratos, considerando o xilitol (poliol), gorduras e proteínas. Cada grama de poliol corresponde a 2,4 kcal, proteína 4 kcal e lipídeo 9 kcal, conforme Equação 12 (BRASIL, 2003).

$$\text{Valor energético (Kcal 100 g}^{-1}\text{)} = \text{Poli} \times 2,4 + \text{P} \times 4 + \text{L} \times 9 \quad (12)$$

Em que Poli é poliol, P é proteína e L é lipídeos.

### 2.5.12 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelas metodologias DPPH (remoção do radical DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (remoção do radical ABTS - ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) e FRAP (poder antioxidante de redução do íon ferro, do inglês *ferric reducing antioxidant power*), utilizando o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) como padrão da curva de calibração. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) ( $\mu\text{mol TEAC } 100^{-1}$  g de amostra).

Para extração dos compostos bioativos, 5 g da polpa de goiabasserrana fresca foram homogeneizadas e diluídas em etanol 50 % (m/v). Os extratos foram submetidos à homogeneização em Ultra Turrax (Modelo T25, IKA-Works, Inc., Cincinnati, Estados Unidos) a 10000 rpm por 3 minutos. Posteriormente os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativos e armazenados a  $25 \pm 2$  °C.

A atividade antioxidante por DPPH foi determinada conforme Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  dos extratos das amostras a 2850  $\mu\text{L}$  de DPPH 0,1  $\text{mmol L}^{-1}$  e incubado por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV-Vis 752D, Labman, China) em comprimento de onda de 515 nm. A equação de regressão da curva de calibração foi  $y = 29,1 x + 0,0142$  ( $R^2 = 0,998$ ).

A determinação do ABTS foi conduzida conforme Re e colaboradores (1999), com adaptações. Em 30  $\mu\text{L}$  dos extratos das amostras foram adicionados 3 mL da solução ABTS $\cdot^+$  e homogeneizados em agitador de tubos. Após 6 minutos ao abrigo da luz, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV-Vis 752D, Labman, China) em comprimento de onda de 734 nm. A equação de regressão da curva de calibração foi  $y = 40,3 x - 0,00139$  ( $R^2 = 0,999$ ).

O FRAP foi determinado conforme Arnous, Makris e Kefalas (2002). Em 100  $\mu\text{L}$  dos extratos das amostras foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de cloreto férrico 3  $\text{mmol L}^{-1}$ , 1,8 mL de solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 1  $\text{mmol L}^{-1}$  e mantidos em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV-Vis 752D, Labman, China) em comprimento de onda de 620 nm. A equação de regressão da curva de calibração foi  $y = 5,37 x + 0,0271$  ( $R^2 = 0,998$ ).

### 2.5.13 Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi conduzida conforme metodologia modificada de Folin Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959). Os compostos bioativos foram extraídos conforme item 2.5.12.

Em um tubo de ensaio foram adicionados 104  $\mu\text{L}$  dos extratos das amostras e 1667  $\mu\text{L}$  de água destilada. Em seguida, foram adicionados aos tubos 104  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin- Ciocalteu (tungstato de sódio 300  $\text{mmol L}^{-1}$ , molibdato de sódio 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , sulfato de lítio 1,36  $\text{mol L}^{-1}$ , ácido clorídrico 1,25  $\text{mol L}^{-1}$  e ácido fosfórico 730  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e incubados por 3 minutos. Posteriormente foram adicionados 208  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 1,9  $\text{mol L}^{-1}$ . Após 2 horas, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV-Vis 752D, Labman, China) em comprimento de onda de 725 nm, utilizando ácido gálico como padrão da curva de calibração. A equação de regressão da curva de calibração foi  $y = 52,4 x - 0,0204$  ( $R^2 = 0,999$ ). Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) ( $\text{mg EAG } 100^{-1}$  g de amostra)

### 2.5.14 Determinação de flavonoides totais

Os flavonoides totais foram determinados conforme Zhishen e colaboradores (1999). Os compostos bioativos foram extraídos conforme item 2.5.12.

Em 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra, foi adicionado 2 mL de água deionizada e 150  $\mu\text{L}$  de solução de nitrito de sódio (5 % v/v). Após 5 minutos, foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto de alumínio (10 % v/v) e mantido incubado por 5 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 mL de solução de 1  $\text{mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio e realizada a leitura em espectrofotômetro (UV-Vis 752D, Labman, China) em comprimento de onda de 510 nm e utilizando quercetina como padrão da curva de calibração. A equação de regressão da curva de calibração foi  $y = 2,98 x + 0,0064$  ( $R^2 = 0,995$ ). Os resultados foram expressos em equivalente de quercetina (EQ) ( $\text{mg EQ } 100^{-1}$  g de amostra).

### 2.5.15 Avaliação colorimétrica

A análise da coloração das geleias foi determinada conforme os padrões do CIE (*International Commission on Illumination*), em aparelho

colorímetro Minolta (CR 400; Minolta, Japão), na faixa de comprimento de onda de 380 a 780 nm, em que  $L^*$  (luminosidade) varia de 0 (preto) a 100 (branco),  $a^*$  varia do verde (-) ao vermelho (+) e  $b^*$  varia de azul (-) ao amarelo (+). Uma placa de cor branca foi utilizada como padrão. A diferença total de cor ( $\Delta E^*_{ab}$ ) foi calculada utilizando a Equação 13.

$$\Delta E^*_{ab} = \frac{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}{2} \quad (13)$$

Onde:  $\Delta L^* = L^*_{\text{controle}} - L^*_{\text{amostra}}$ ;

$\Delta a^* = a^*_{\text{controle}} - a^*_{\text{amostra}}$ ;

$\Delta b^* = b^*_{\text{controle}} - b^*_{\text{amostra}}$ ;

### 2.5.16 Análises microbiológicas

A contagem de bolores e leveduras foi determinada pelo método ISO 21527- 1: 2008 (Microbiologia de alimentos e de produtos animais – Métodos horizontais para enumeração de bolores e leveduras – Parte 2: Técnica de contagem de colônias em produtos com atividade de água menor ou igual a 0,95).

As amostras foram pesadas assepticamente (25 g) e diluídas em água peptonada 0,1 % (Acumedia, Neogen, Brasil) na proporção 1:10, as diluições seriadas foram inoculadas em superfície de ágar dicloran glicerol ágar 18 % (DG18, Merck, Alemanha). As placas inoculadas foram incubadas em aerobiose a  $25 \pm 1$  °C por 5 dias.

A contagem de bolores e leveduras foi realizada no tempo zero, 30, 60 e 90 dias. As análises microbiológicas foram avaliadas de acordo com os parâmetros preconizados pela RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, que estabelece valores de tolerância para bolores e leveduras da ordem de  $10^4$  UFC  $g^{-1}$  (BRASIL, 2001).

### 2.5.17 Simulação gastrointestinal *in vitro*

A simulação das condições gastrointestinais *in vitro* foram realizadas conforme o item 2.4.5. Foram utilizados 10 g das amostras de GGS-vitD<sub>3</sub> e GGS-NP-vitD<sub>3</sub>.

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* STATISTICA (versão 13.3, TIBCO, Tulsa, EUA) e submetidos a análise de variância e teste de Tukey ao nível de significância de 5 %. Para as análises de atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides totais foi determinado o coeficiente linear de correlação de Person. As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos como médias e desvio padrão.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

Os parâmetros utilizados para caracterização físico-química das nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub> (NP-vitD<sub>3</sub>) e nanopartículas controle (NP-vazia) foram diâmetro médio de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP), potencial zeta ( $\zeta$ ), eficiência de encapsulação (EE), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

##### 3.1.1 Diâmetro médio de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP), potencial zeta ( $\zeta$ ) e eficiência de encapsulação (EE)

O estudo do diâmetro médio de partícula (Z-ave, nm), índice de polidispersão (IP), potencial zeta ( $\zeta$ , mV) e eficiência de encapsulação (EE, %), são fundamentais para caracterização de nanopartículas estáveis para aplicações alimentícias.

Os resultados de diâmetro médio de partícula (Tabela 6) evidenciaram eficiência do método utilizado, devido ao pequeno diâmetro apresentado pelas nanopartículas, abaixo de 200 nm. Valores superiores ( $p < 0,05$ ) foram encontrados para NP-vitD<sub>3</sub>, quando comparado com a amostra controle (NP-vazia). Isto é justificável devido à elevada massa molecular resultante da incorporação de vitamina D<sub>3</sub> nas nanopartículas. Luo, Teng e Wang (2012), ao estudar a encapsulação de vitamina D<sub>3</sub> em nanopartículas de zeína revestidas com carboximetilquitosana, obtiveram valores semelhantes de diâmetro médio de partícula, entre 85 a 200 nm.

Tabela 6 - Diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação das NP-vazias e NP-vitD<sub>3</sub>

Amostra	Z-ave (nm)	IP	$\zeta$ (mV)	EE (%)
<b>NP-vazias</b>	171,8 ± 0,85 <sup>a</sup>	0,200 ± 0,01 <sup>a</sup>	21,2 ± 1,08 <sup>a</sup>	-
<b>NP-vitD<sub>3</sub></b>	185,7 ± 2,10 <sup>b</sup>	0,193 ± 0,02 <sup>a</sup>	24,5 ± 1,60 <sup>a</sup>	97,27 ± 1,87

NP-vazias: Nanopartículas vazias. NP-vitD<sub>3</sub>: Nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. Z-ave: Diâmetro médio de partícula. IP: índice de polidispersão.  $\zeta$ : Potencial zeta. EE %: Eficiência de encapsulação. -: Análise não realizada. Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas idênticas

sobrescritas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Fonte: Autor.

A composição química e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes para definir o diâmetro médio das partículas (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003). Os principais aspectos que influenciam no tamanho da partícula incluem, natureza e concentração do polímero, polaridade do solvente e concentração dos surfactantes utilizados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

De acordo com Banerjee e colaboradores (2016), nanopartículas com diâmetro na ordem de 50 a 200 nm são absorvidas e transportadas através das células intestinais de maneira mais eficiente, quando comparadas às partículas de maior tamanho, ou seja, a utilização de partículas com diâmetros reduzidos proporcionam uma maior solubilidade, reatividade e eficiência para entrega de compostos bioativos no trato gastrointestinal, bem como facilitação da penetração de barreiras biológicas.

O índice de polidispersão é um parâmetro utilizado para indicar a homogeneidade da solução e seu valor varia entre 0 e 1. Quanto mais próximo a 0, mais homogênea é a solução e quanto mais próximo a 1, menos homogênea é a distribuição de tamanho das partículas (GRUMEZESCU, 2017). Os resultados encontrados de IP abaixo de 0,2 para as nanopartículas estudadas sugerem estreita distribuição de tamanho e uniformidade das partículas em suspensão. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de IP entre as amostras analisadas. Valores semelhantes de IP foram encontrados por Park e colaboradores (2017), ao elaborar transportadores lipídicos nanoestruturados carregados com vitamina D<sub>3</sub>, com IP de 0,19.

O potencial zeta dimensionado através da mobilidade eletroforética das partículas em um campo elétrico é utilizado para determinar a carga superficial e a estabilidade de uma suspensão coloidal, pois indica mudanças tanto na superfície quanto na força de repulsão que existe entre as partículas. De maneira geral, quanto maior a repulsão eletrostática entre as partículas, maior será sua estabilidade físico-química (PARK et al., 2017).

Em relação à carga superficial das nanopartículas, o pH do meio é um dos parâmetros que mais influenciam este indicador, desta forma, o potencial zeta torna-se positivo em meio ácido e negativo em meio básico (BERG et al., 2009; CRUCHO; BARROS, 2017; KHOLI; MITTAL, 2009). Resultados positivos de potencial zeta obtidos para as

nanopartículas (NP-vitD<sub>3</sub> e NP-vazia) são atribuídos ao caráter catiônico da zeína e pH do meio entre 2 e 3.

Valores de potencial zeta em módulo entre 0 e 10 mV demonstram partículas altamente instáveis, de 10 a 20 mV partículas relativamente estáveis, 20 a 30 mV moderadamente estáveis e valores em torno de 30 mV partículas altamente estáveis (BHATTACHARJEE, 2016). Os resultados obtidos demonstraram população de partículas moderadamente estáveis, porém fora da faixa de estabilidade ideal (30 mV), o que ocorre devido à utilização de polímeros catiônicos e agentes estabilizantes não-iônicos, como o Tween, que promovem estabilidade à solução pelo impedimento estérico (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), sendo esta estabilização a preponderante no sistema estudado. De acordo com Mitri e colaboradores (2011), quando há uma estabilização estérica adicional (como neste caso o Tween 80) valores em torno de 20 mV já são suficientes para manter a estabilidade do sistema coloidal.

Os resultados obtidos no presente estudo para eficiência de encapsulação, comprovam adequada incorporação de vitamina D<sub>3</sub> nas nanopartículas, corroborando com os resultados alcançados por estudos que utilizaram a mesma metodologia, apresentando EE entre 88,5 e 99,8 % (DA ROSA et al., 2015).

A composição das nanopartículas afeta as suas características de liberação. Portanto, a eficiência de encapsulação está diretamente relacionada com o método utilizado, a natureza química, concentração e polaridade do composto ativo e do polímero utilizado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). A formação das nanopartículas é favorecida pela hidrofobicidade das moléculas de zeína e vitamina D<sub>3</sub>, devido a formação de interações hidrofóbicas, além de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (LUO; TENG; WANG, 2012).

O estudo realizado por Peñalva e colaboradores (2015) obteve resultados inferiores de EE, em torno de 57 %, ao elaborar nanopartículas de zeína carregadas com ácido fólico (vitamina B9). Liang e colaboradores (2018) avaliaram o efeito do ultrassom na preparação de partículas de zeína carregadas com resveratrol, obtiveram resultados de EE de 85 %. Walia e colaboradores (2017) ao estudar nanoencapsulação de vitamina D em óleo de peixe por ultrassonografia apresentaram resultados semelhantes aos do presente estudo, 95 a 98 % de eficiência de encapsulação.

### **3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

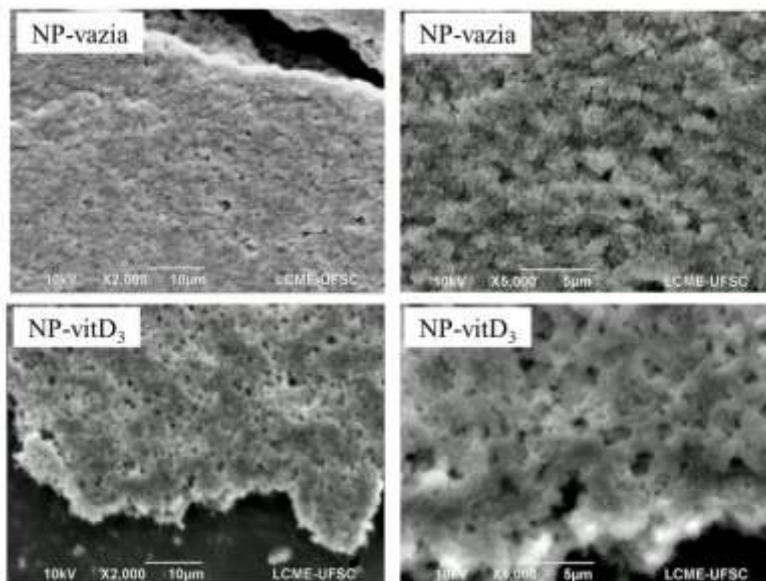
Análises de MEV e MET foram realizadas para as NP-vazia e NP-vitD<sub>3</sub>.

As diferentes morfologias das partículas interferem diretamente no transporte e absorção de compostos bioativos, além de afetar a solubilidade de compostos pouco solúveis em água, influenciando na área superficial, bem como nas interações com alvos biológicos, podendo trazer melhor eficácia para as formulações (BANERJEE et al., 2016).

A microscopia eletrônica de varredura, é uma técnica de imagens em que um feixe de elétrons interage com uma amostra e gera sinais diferentes, refletindo a morfologia, as propriedades estruturais, porosidade e a superfície das partículas de maneira tridimensional (CRUCHO; BARROS, 2017).

As nanopartículas obtidas não foram submetidas a métodos de secagem, optou-se por mantê-las em dispersão coloidal, uma vez que esta foi a condição escolhida para prosseguir com os estudos. No entanto, as análises por MEV não possibilitaram a observação das nanopartículas de maneira individual, devido a forma de preparo das amostras e ao pequeno diâmetro apresentado pelas mesmas (menor que 200 nm) . No entanto, é possível observar nas micrografias da Figura 14 que há uma grande quantidade de partículas sintetizadas.

Figura 14 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas vazias e carregadas com vitamina D<sub>3</sub>, em magnificação de 2000 a 5000 vezes.



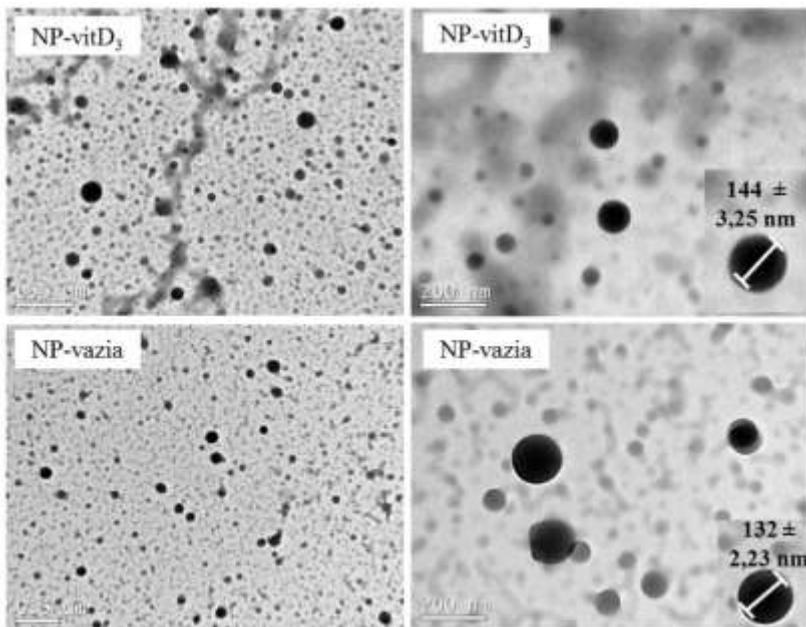
NP-vazia: Nanopartículas vazias. NP-vitD<sub>3</sub>: Nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. Fonte: Autor.

Outra técnica apropriada para caracterização morfológica de nanopartículas é a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Essencialmente o MET gera uma imagem bidimensional formada a partir dos elétrons transmitidos através da amostra (CRUCHO; BARROS, 2017).

Através das micrografias obtidas por MET é possível observar que não houve diferença morfológica entre as NP-vazia e NP-vitD<sub>3</sub> (Figura 15). As nanopartículas apresentaram populações homogêneas, formato esférico e um tamanho de  $132 \pm 2,23$  nm para a NP-vazia e  $144 \pm 3,25$  nm para a NP-vitD<sub>3</sub>, inferiores ( $p < 0,05$ ) aos resultados obtidos pelo espalhamento de luz dinâmico medido no equipamento Zetasizer Nano Series. Isso pode ser explicado pelo fato de que o espalhamento de luz dinâmico avalia o raio hidrodinâmico das partículas em uma suspensão, enquanto o MET fornece a área da superfície com base na quantidade de elétrons incidentes transmitidos através de uma amostra,

de maneira resumida, os valores obtidos por espalhamento de luz dinâmico normalmente são superiores quando comparados aos de MET (BHATTACHARJEE et al., 2016).

Figura 15 - Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas vazias e carregadas com vitamina D<sub>3</sub>, em magnificação de 800 a 200.000 vezes.



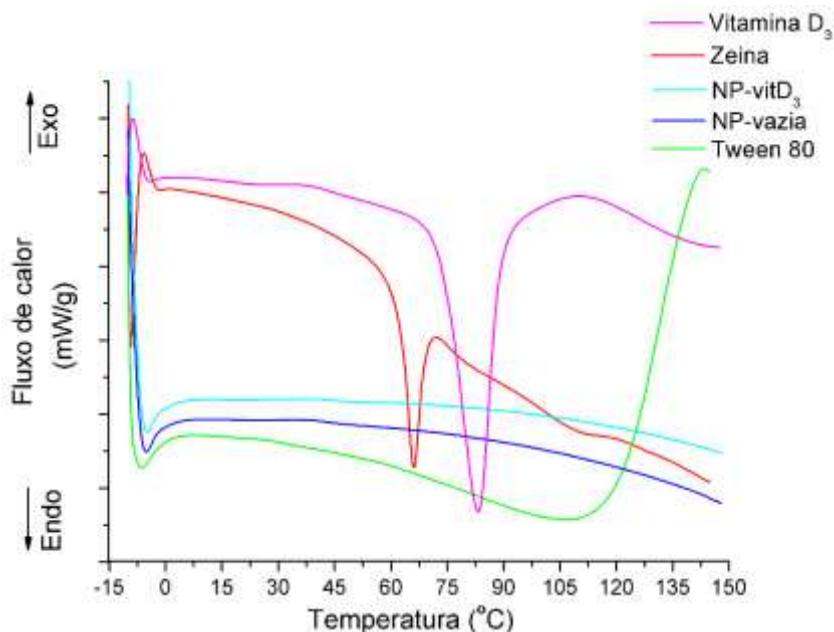
NP-vazia: Nanopartículas vazias. NP-vitD<sub>3</sub>: Nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. Fonte: Autor.

### 3.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Por meio da análise de calorimetria exploratória diferencial é possível monitorar mudanças nas propriedades físicas ou químicas de materiais em função da temperatura (ATKINS; de PAULA; KEELER, 2007), além de acompanhar possíveis interações entre compostos bioativos presentes nas nanopartículas (CRUCHO; BARROS, 2017).

As análises de DSC (Figura 16) foram realizadas para os componentes puros presentes nas nanopartículas, incluindo zeína, Tween 80 e vitamina D<sub>3</sub>, e também para NP-vazia e NP-vitD<sub>3</sub>.

Figura 16 - Termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de vitamina D<sub>3</sub>, zeína, NP-vitD<sub>3</sub>, NP-vazia e Tween 80.



NP-vitD<sub>3</sub>: Nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. NP-vazias: Nanopartículas vazias. Endo: Endotérmico. Exo: Exotérmico. Fonte: Autor.

O termograma referente a vitamina D<sub>3</sub> pura (colecalférol) demonstra amplo pico endotérmico em 83,72 °C correspondente ao seu ponto de fusão. Luo, Teng e Wang (2012) e Fathi, e colaboradores (2015), obtiveram picos de fusão da vitamina D<sub>3</sub> em temperaturas de 87,8 e 88,1 °C, ao avaliarem a encapsulação desta, em matrizes de carboximetilquitosana e amido de milho com alto teor de amilose, respectivamente.

O pico endotérmico característico apresentado pela zeína a 66,51 °C pode estar associado a evaporação da água ligada (LUO; TENG; WANG, 2012). Valor semelhante foi encontrado por Luo e colaboradores (2011), apresentando pico endotérmico de 73,2 °C ao estudar nanopartículas de  $\alpha$ -tocoferol revestidas com zeína e quitosana.

O pico endotérmico exibido no termograma das NP-vitD<sub>3</sub> e NP-vazia a - 5,32 °C é provavelmente referente à presença do surfactante Tween 80 utilizado na síntese das nanopartículas.

A ausência do pico endotérmico referente à vitamina D<sub>3</sub> no termograma das NP-vitD<sub>3</sub> demonstra que a vitamina está molecularmente dispersada na matriz polimérica e, portanto, encapsulada nas nanopartículas de zeína (HASANVAND et al., 2015; LUO; TENG; WANG, 2012). De maneira geral, é possível confirmar que a interação entre os compostos hidrofóbicos presentes na zeína e vitamina D<sub>3</sub> favoreceram a formação das nanopartículas (LIANG et al., 2018). O mesmo foi observado por Wang e colaboradores (2018) ao encapsular β-caroteno revestido com zeína, carboximetilquitosana e polifenóis.

## 3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GELEIAS E POLPA DE GOIABA-SERRANA

### 3.2.1 Composição físico-química

A composição físico-química dos alimentos é fundamental para determinar as características dos produtos. As formulações de geleia de goiaba-serrana e polpa *in natura* foram analisadas quanto aos sólidos totais, sólidos solúveis, acidez titulável, pH, umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, carboidratos e valor energético conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Composição centesimal das GGS-C, GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vazia e Polpa-GS (g 100<sup>-1</sup> g de peso fresco).

Análises	Composição centesimal				
	GGs-C	GGs-vitD <sub>3</sub>	GGs-NP-vitD <sub>3</sub>	GGs-NP-vazia	Polpa-GS
<b>Sólidos totais (g)</b>	68,91 ± 1,03 <sup>a</sup>	69,81 ± 2,30 <sup>a</sup>	68,57 ± 3,40 <sup>a</sup>	72,35 ± 2,01 <sup>a</sup>	13,94 ± 0,25 <sup>b</sup>
<b>Sólidos solúveis (°Brix)</b>	48,73 ± 1,02 <sup>a</sup>	50,90 ± 0,78 <sup>a</sup>	48,42 ± 0,36 <sup>a</sup>	49,46 ± 0,92 <sup>a</sup>	12,57 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>pH</b>	3,04 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>Acidez titulável (%)</b>	0,84 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>Umidade (%)</b>	39,10 ± 0,66 <sup>a</sup>	39,91 ± 0,34 <sup>a</sup>	39,20 ± 0,65 <sup>a</sup>	39,97 ± 0,57 <sup>a</sup>	76,69 ± 0,21 <sup>b</sup>
<b>Cinzas (g)</b>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,90 ± 0,62 <sup>b</sup>
<b>Lipídeos (g)</b>	0,81 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,64 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,99 <sup>a</sup>
<b>Proteínas (g)</b>	0,90 ± 0,68 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,57 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,42 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,23 <sup>a</sup>
<b>Carboidratos (g)</b>	56,24 ± 2,50 <sup>a</sup>	51,34 ± 5,40 <sup>a</sup>	55,96 ± 4,26 <sup>a</sup>	54,36 ± 2,77 <sup>a</sup>	12,95 ± 2,38 <sup>b</sup>
<b>Valor energético (kcal)</b>	149,44 ± 3,43 <sup>a</sup>	138,68 ± 4,41 <sup>a</sup>	136,77 ± 6,55 <sup>a</sup>	143,41 ± 2,80 <sup>a</sup>	20,08 ± 3,82 <sup>b</sup>

GGs-C: Geleia de goiaba-serrana convencional. GGs-vitD<sub>3</sub>: Geleia de goiaba-serrana com vitamina D<sub>3</sub> livre. GGs-NP-vitD<sub>3</sub>: Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. GGs-NP-vazia: Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas vazias. Polpa-GS: Polpa de goiaba-serrana. Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas idênticas sobscritas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância (p < 0,05). Fonte: Autor.

De maneira geral, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras GGS-C, GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub> e GGS-NP-vazia para os parâmetros analisados, demonstrando que a incorporação de nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub>, não altera as características físico-químicas das geleias.

Os sólidos totais, além de estimarem a quantidade de açúcares dissolvidos (sacarose, glicose ou frutose), resultantes da hidrólise do amido durante o amadurecimento dos frutos, também determinam outros compostos solúveis, como por exemplo, sais, ácidos e vitaminas (CHAVES et al., 2004). As amostras de geleia apresentaram valores superiores ( $p < 0,05$ ) de sólidos totais, quando comparada a Polpa-GS, devido aos sólidos adicionados no processamento das geleias, incluindo o edulcorante xilitol, ácido cítrico, benzoico, pectina e cloreto de cálcio.

Como a maioria dos sólidos solúveis presentes nas frutas são compostos por açúcares, este é utilizado como um indicativo do ponto de maturação e grau de doçura, sendo também utilizado para frutas processadas (CHITARRA; CHITARRA, 2005; GAVA; SILVA; FRIAS, 2009). Para as geleias, os valores de sólidos solúveis foram superiores ( $p < 0,05$ ) quando comparados à polpa, isso pode ser explicado pela concentração dos açúcares da fruta durante o aquecimento e pela utilização do edulcorante xilitol na formulação das geleias. Apesar de o xilitol apresentar reduzido valor calórico, é um carboidrato que se comporta de maneira similar ao açúcar (CHATTOPADHYAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2014).

O potencial hidrogeniônico (pH) e acidez titulável são importantes para avaliar o estado de conservação dos produtos alimentícios. Podem influenciar no sabor, odor, textura, cor e estabilidade físico-química das geleias (CECCHI, 2003). Ambos afetam drasticamente a formação do gel (FEATHERSTONE, 2016).

Os resultados de pH revelaram geleias firmes e estáveis, com valores inferiores aos apresentados pela polpa ( $p < 0,05$ ) e dentro dos padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação brasileira vigente (pH máximo de 4,5), sendo considerado um produto ácido (BRASIL, 2005). Valores superiores de pH foram encontrados por Santos e colaboradores (2017), variando entre 3,68 e 4,44 ao estudar quatro diferentes formulações de geleia de goiaba-serrana. Em relação à polpa, Amarante e colaboradores (2013) obtiveram valores semelhantes ao presente estudo, com pH variando entre 2,0 e 3,7 para os genótipos Alcântara, Helena, Mattos e Nonante de goiaba-serrana, provenientes do município de São Joaquim, em Santa Catarina.

Os resultados obtidos para acidez titulável entre 0,3 e 0,8 %, relevaram que não houve sinérese e indicaram manutenção adequada da textura das geleias (DIAS et al., 2011). As amostras GGS-C, GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub> e GGS-NP-vazia, apresentaram valores menores ( $p < 0,05$ ) de pH e acidez titulável quando comparada a Polpa-GS, devido à adição de ácido cítrico e benzoico na formulação das geleias. Benincá (2014) ao estudar as reações pós-colheita de quadro diferentes genótipos de goiaba-serrana, colhidos no município de São Joaquim, encontrou resultados semelhantes aos do presente estudo para polpa, com acidez titulável variando entre 0,81 a 2,01 % em peso fresco.

A determinação da umidade dos alimentos é importante, uma vez que elevados conteúdos de umidade podem favorecer o crescimento de microrganismos deteriorantes (FORSYTHE, 2013). O alto teor de umidade exibido pela Polpa-GS é uma característica comum dos frutos da família Myrtaceae (VALLILO et al., 2005). Através dos resultados apresentados pelas amostras de geleia (abaixo de 40 %) é possível classificá-las como “alimentos com umidade intermediária” (FORSYTHE, 2013). De acordo com Gava, Silva e Frias (2009), alimentos com umidade entre 15 e 40 %, com alta concentração de sólidos solúveis e pH baixo, são considerados microbiologicamente estáveis.

Em relação as cinzas, quantidade de substâncias minerais presentes nos alimentos (CHAVES et al., 2004), as amostras de geleia apresentaram valores inferiores ( $p < 0,05$ ) quando comparadas à polpa, possivelmente devido a diluição dos minerais presentes na formulação das geleias, enquanto para a polpa são considerados os minerais contidos apenas na fruta, incluindo as sementes.

O baixo teor lipídico apresentado pelas amostras neste estudo é característico, uma vez que na maioria das frutas e hortaliças, os lipídeos estão disponíveis em quantidades mínimas (GOLDONI et al., 2017). Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras estudadas em relação ao teor de lipídeos. Amarante e colaboradores (2018) obtiveram resultados semelhantes, 0,79 % de lipídeos em peso fresco, ao estudar a composição físico-química e mineral de casca e polpa, de diferentes genótipos de goiaba-serrana, provenientes no município de São Joaquim.

O conteúdo proteico da polpa de goiaba-serrana revelou valores superiores aos referenciados pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2011), quando comparada a goiaba-vermelha (*Psidium guajava* L.), que apresentou 0,6 g por 100<sup>-1</sup> g de parte comestível. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao teor proteico das

geleias e polpa de goiaba-serrana. Os resultados demonstraram que o processamento das geleias, não alterou o conteúdo proteico das mesmas.

Os carboidratos são considerados os constituintes mais abundantes nos frutos maduros da goiabeira-serrana (ZHU, 2018). Os resultados exibidos corroboraram com os estudos de Zhu (2018), apresentando 15,21 g 100<sup>-1</sup> g de carboidrato em peso fresco, ao estudar as propriedades químicas e biológicas da goiaba-serrana. Como esperado o teor de carboidratos das geleias foi superior ( $p < 0,05$ ) quando comparado à polpa, em virtude do processamento e presença de xilitol nas geleias.

A variação das características físico-químicas da fruta, quando comparada a outros estudos, pode ser explicada devido a influência dos estágios de maturação, época de colheita, localização, clima, condições do solo, exposição a luz solar, além da diversidade dos genótipos existentes (FANIADIS, DROGOUDI, VASILAKAKIS, 2010), consequentemente diversificando as características finas da geleia.

O valor energético apresentado pelas geleias aproximadamente 30 kcal por porção (20 g), apresentou resultados inferiores às geleias de goiaba-vermelha comerciais, adoçadas com sacarose (aproximadamente 58 kcal 20<sup>-1</sup> g), demonstrando que o edulcorante xilitol é capaz de substituir perfeitamente a sacarose, pois além de possuir reduzido valor calórico (2,4 kcal), é permitido na quantidade necessária para se obter o sabor doce desejado (BRASIL, 2001), não apresenta sabor residual e pode ser consumido por diabéticos, uma vez que seu metabolismo é independente de insulina (MUSSATTO; ROBERTO, 2002).

### **3.2.2 Atividade antioxidante e compostos bioativos**

As frutas são fontes naturais de substâncias com propriedades antioxidantes, essa característica é atribuída ao conteúdo de fitoquímicos presentes nos frutos, dentre os quais se destaca o grupo dos compostos fenólicos (MELO et al., 2008). O poder antioxidante dos compostos fenólicos está principalmente relacionado com as suas propriedades de reduzir agentes doadores de hidrogênio ou elétrons e com a capacidade de redução de metais, como por exemplo, o ferro (CAMPOS, 2019).

Para estimar a capacidade antioxidante de vegetais, existem inúmeros ensaios descritos na literatura, tendo em vista a diversidade de compostos antioxidantes presentes nas matérias primas e a complexidade de atuação frente a diferentes radicais livres (ALVES et al., 2010; SOARES et al., 2008).

Dentre os mecanismos utilizados para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de frutos, destaca-se: o sequestro dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS), e o poder de redução do íon ferro (FRAP) (do inglês *ferric reducing antioxidant power*) (THAIPONG et al., 2006).

A atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e flavonóides totais foram avaliados para as formulações de geleia de goiaba-serrana e para a polpa *in natura*, pelas metodologias DPPH, ABTS e FRAP (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade antioxidante e compostos bioativos (fenólicos totais e flavonoides) das GGS-C, GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vazia e Polpa-GS em peso fresco.

Amostra	Atividade antioxidante ( $\mu\text{mol TEAC } 100^{-1} \text{ g}$ )			Compostos bioativos	
	DPPH	ABTS	FRAP	Compostos fenólicos totais ( $\text{mg EAG } 100^{-1} \text{ g}$ )	Flavonoides totais ( $\text{mg EQ } 100^{-1} \text{ g}$ )
<b>GGS-C</b>	162,66 $\pm$ 7,24 <sup>a</sup>	142,73 $\pm$ 11,14 <sup>a</sup>	983,94 $\pm$ 68,29 <sup>a</sup>	136,59 $\pm$ 9,30 <sup>a</sup>	98,89 $\pm$ 3,55 <sup>a</sup>
<b>GGS-vitD<sub>3</sub></b>	175,19 $\pm$ 5,01 <sup>a</sup>	154,49 $\pm$ 14,87 <sup>a</sup>	968,51 $\pm$ 44,64 <sup>a</sup>	144,81 $\pm$ 4,70 <sup>a</sup>	100,55 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>
<b>GGS-NP-vitD<sub>3</sub></b>	178,66 $\pm$ 2,52 <sup>a</sup>	157,49 $\pm$ 1,61 <sup>a</sup>	1047,87 $\pm$ 7,97 <sup>a</sup>	149,30 $\pm$ 5,58 <sup>a</sup>	101,40 $\pm$ 1,68 <sup>a</sup>
<b>GGS- NP-vazia</b>	172,37 $\pm$ 2,48 <sup>a</sup>	154,48 $\pm$ 10,43 <sup>a</sup>	1008,49 $\pm$ 7,97 <sup>a</sup>	139,14 $\pm$ 8,89 <sup>a</sup>	97,57 $\pm$ 3,76 <sup>a</sup>
<b>Polpa-GS</b>	182,48 $\pm$ 12,47 <sup>a</sup>	150,60 $\pm$ 9,17 <sup>a</sup>	1086,39 $\pm$ 42,75 <sup>a</sup>	156,02 $\pm$ 0,78 <sup>b</sup>	117,07 $\pm$ 2,62 <sup>b</sup>

GGS-C: Geleia de goiaba-serrana convencional. GGS-vitD<sub>3</sub>: Geleia de goiaba-serrana com vitamina D<sub>3</sub> livre. GGS-NP-vitD<sub>3</sub>: Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. GGS-NP-vazia: Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas de vazias. Polpa-GS: Polpa de goiaba-serrana. DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona)-6-ácido sulfônico. FRAP: Poder antioxidante redutor férrico. TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. EAG: Equivalente de ácido gálico. EQ: Equivalente de quercetina. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas idênticas sobrescritas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância (p < 0,05).

Fonte: Autor.

Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à atividade antioxidante de acordo com as três metodologias testadas para as amostras GGS-C, GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vazia, Polpa-GS, revelando que o tratamento térmico, bem como a adição de nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> não interferiram na capacidade antioxidante das mesmas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bof e colaboradores (2012) ao estudar geleias de uva, maçã, morango, pera, goiaba e figo, e demonstraram que o processamento térmico não afetou significativamente as geleias de maçã e pera, porém houve redução da atividade antioxidante nas demais geleias. Amakura e colaboradores (2000) estudaram a atividade antioxidante de nove tipos de *berries* frescas e suas geleias, e os resultados demonstraram geleias com atividade antioxidante superior quando comparadas às frutas não processadas.

Os resultados dos compostos bioativos para as amostras de GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub> e GGS-NP-vazia, apresentaram perda de  $8,69 \pm 3,65$  e  $14,92 \pm 1,46$  % para fenólicos e flavonoides respectivamente, quando comparadas a Polpa-GS. Isto é atribuído ao efeito da temperatura utilizada para produção das geleias, temperaturas acima de 40 °C podem provocar perdas significativas destes compostos (BABY et al., 2007).

Em relação à incorporação das nanopartículas, ao comparar as diferentes formulações de geleia, os resultados demonstraram que as NP-vitD<sub>3</sub> e NP-vazia, não interferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais presentes nas amostras de geleia.

Amarante e colaboradores (2017) obtiveram resultados inferiores ao presente estudo com atividade antioxidante de  $88,3 \pm 8,9$  mg EAG 100<sup>-1</sup> g de peso fresco, ao estudar o conteúdo fenólico total de cinco genótipos brasileiros de goiaba-serrana. Pasquariello e colaboradores (2015) ao estudar por três anos, doze cultivares de goiaba-serrana obtidas de diferentes países, obtiveram valores médios de compostos fenólicos totais de  $153,72 \pm 49,39$  mg EAG 100<sup>-1</sup> g de peso fresco, corroborando com os resultados do presente estudo.

Em relação ao conteúdo de flavonoides totais, os resultados de Pasquariello e colaboradores (2015) foram inferiores, quando comparados a esta pesquisa variando entre  $33,17 \pm 2,45$  e  $14,22 \pm 0,47$  mg EQ 100<sup>-1</sup> g de peso fresco.

A grande variação nos valores de compostos fenólicos e flavonóides, quando comparado a outros estudos são relacionados a

diversos fatores, principalmente às condições ambientais como temperatura, umidade, duração da luz do dia, tempo de maturação e período da colheita (MONFORTE et al., 2014). Estes fatores influenciam significativamente no desenvolvimento das frutas, bem como na biodisponibilidade destes metabólitos após o processamento.

A quantidade de compostos fenólicos presente no fruto está diretamente correlacionada ( $r = 0,883$ ) com o conteúdo de flavonoides, confirmando que ambos são responsáveis pela atividade antioxidante das amostras estudadas.

Os flavonoides totais apresentaram forte correlação positiva ( $r = 0,898$ ) com a metodologia FRAP, enquanto os compostos fenólicos apresentaram forte correlação positiva com DPPH ( $r = 0,936$ ) e FRAP ( $r = 0,987$ ), revelando mecanismos antioxidantes tanto de captura de radicais livres como redução de íons metálicos, atuando nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002).

De acordo com Monforte e colaboradores (2014), os principais compostos fenólicos presentes na goiaba-serrana são pertencentes a classe dos flavonóides (dos quais a quercetina, catequina, rutina, eriodictiol e eriocitrina são preponderantes) e dos ácidos fenólicos, (majoritariamente gálico, siringico e elágico). Portanto, estes compostos naturalmente são capazes de fornecer os principais mecanismos antioxidantes presentes na goiaba-serrana.

O desempenho dos compostos fenólicos como antioxidantes está relacionado com sua estrutura molecular, e dependerá da posição e do número de grupamentos hidroxila presentes (CAMPOS, 2019; SIMÕES et al., 2013). Em geral, para os flavonóides, quanto maior o número de substituintes hidroxila, maior sua atividade (ALVES et al., 2010). A quercetina (flavonoide) é considerada um quelante altamente eficaz de metais de transição (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002), pois possui uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, substituintes hidroxilas nos carbonos 3, 5 e 7 e o grupo catecol no anel B (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

A forte correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos bem como de flavonoides com a atividade antioxidante, demonstra que os principais responsáveis pela ação antioxidante da goiaba-serrana são o grupo dos compostos fenólicos (SOUZA, 2015).

Portanto, pelos métodos estudados, as amostras de GGS-C, GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vazia e Polpa-GS, apresentaram expressiva atividade antioxidante; portanto, podem ser utilizadas como fonte de antioxidantes naturais.

### 3.2.3 Análise colorimétrica

A coloração de frutas frescas e processadas é um dos atributos sensoriais mais importantes para a aceitabilidade do consumidor (MELGAREJO et al., 2011), uma vez que o efeito visual gerado pela cor, normalmente é superior quando comparado a outros atributos, como por exemplo, o odor (TOCCHINI; MERCADANTE, 2011).

A análise colorimétrica foi realizada para as formulações de geleia de goiaba-serrana e para a polpa de goiaba-serrana conforme a Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros colorimétricos das GGS-C, GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vazia e Polpa-GS.

Amostra	L*	a*	b*	ΔE* <sub>ab</sub>
<b>GGS-C</b>	37,05 ± 1,45 <sup>a</sup>	3,89 ± 0,21 <sup>a</sup>	10,59 ± 0,63 <sup>a</sup>	**
<b>GGS-vitD<sub>3</sub></b>	37,30 ± 1,34 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,22 <sup>a</sup>	10,57 ± 0,96 <sup>a</sup>	1,28 ± 1,02 <sup>a</sup>
<b>GGS-NP-vitD<sub>3</sub></b>	37,63 ± 1,02 <sup>a</sup>	3,74 ± 0,35 <sup>a</sup>	11,50 ± 1,48 <sup>a</sup>	3,00 ± 1,19 <sup>a</sup>
<b>GGS-NP-vazia</b>	35,94 ± 2,38 <sup>a</sup>	3,93 ± 0,71 <sup>a</sup>	11,48 ± 1,41 <sup>a</sup>	2,99 ± 1,76 <sup>a</sup>
<b>Polpa-GS</b>	45,58 ± 1,81 <sup>b</sup>	8,02 ± 0,18 <sup>b</sup>	17,88 ± 1,66 <sup>b</sup>	10,52 ± 2,14 <sup>b</sup>

GGS-C: Geleia de goiaba-serrana convencional. GGS-vitD<sub>3</sub>: Geleia de goiaba-serrana com vitamina D<sub>3</sub> livre. GGS-NP-vitD<sub>3</sub>: Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. GGS-NP-vazia: Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas de vazias. Polpa-GS: Polpa de goiaba-serrana. L\*: Luminosidade, varia de 0 (preto) a 100 (branco). a\*: Vermelho-verde, varia de verde (-) a vermelho (+). b\*: Amarelo-azul, varia de azul (-) a amarelo (+). ΔE\*<sub>ab</sub>: diferença total de cor (entre parâmetros de cor). Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas idênticas sobrescritas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância (p < 0,05). Fonte: Autor.

O parâmetro luminosidade (L\*) indicou geleias de coloração mais escura (p < 0,05) quando comparadas com a polpa *in natura*, a coordenada de cromaticidade a\* (+) indicou a tendência à coloração mais avermelhada (p < 0,05) nas amostras de geleia.

O edulcorante escolhido para formulação das geleias (xilitol) apresenta ausência de grupamentos aldeídos ou cetônicos, desta forma, não participa de reações de escurecimento não enzimático, como por exemplo a reação de *Maillard* (MUSSATO; ROBERTO, 2002). Em

contrapartida, temperaturas elevadas e valores de pH próximos a 3,2, hidrolisam a sacarose, adicionando moléculas de glicose e frutose ao grupo de açúcares redutores disponíveis para a reação de *Maillard*. Estas reações alteram o perfil de cor e sabor das geleias, além de contribuírem para a degradação da cor durante o armazenamento (CABALLERO, 2003).

Os resultados de coloração escura e avermelhada apresentados pelas geleias, revelam reações de escurecimento enzimático, possivelmente ocasionadas por enzimas do grupo oxirredutases, como peroxidase e polifenoloxidase, que catalisam a degradação de compostos fenólicos presentes na fruta com a presença de oxigênio, bem como reações de escurecimento não-enzimático devido à reação de *Maillard*, assim provocando o aparecimento de pigmentos acastanhados ou avermelhados na polpa da fruta (BENINCÁ, 2014; MISHARA, 2012; SILVA; SULAIMAN, 2018).

Com relação ao parâmetro colorimétrico  $b^*$  (+) indicativo de tendência a coloração amarelada, as amostras de polpa apresentaram valores superiores ( $p < 0,05$ ) aos encontrados nas geleias, demonstrando geleias com tendência de coloração menos amarelada ( $p < 0,05$ ) quando comparadas com a polpa *in natura*, isso é justificável uma vez que os frutos utilizados estavam em estágio final de maturação, revelando os carotenoides, mascarados pela coloração esverdeada da casca devido à presença das clorofilas. Durante a maturação, o etileno promove a ativação das enzimas responsáveis pela degradação da clorofila (clorofilases) (VELHO, 2009). Com a degradação da clorofila, os carotenoides existentes nos tecidos tornam-se visíveis (CHITARRA; CHITARRA, 2005), promovendo a perda da coloração verde e originando compostos de coloração escura, avermelhada e amarelada.

Para avaliar alterações globais de cor de uma amostra em relação a um controle, foi utilizado o parâmetro ( $\Delta E^*_{ab}$ ), onde valores menores que 1 significam diferenças de coloração não perceptíveis ao olho humano, valores maiores que 1 e menores que 3 demonstram pequenas diferenças de cor perceptíveis ao olho humano, e por fim, valores maiores que 3 diferenças totalmente perceptíveis (BODART et al., 2008).

Os resultados de  $\Delta E^*_{ab}$  revelaram que as amostras GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub> e GGS-NP-vazia apresentaram pequenas diferenças de coloração perceptíveis ao olho humano quando comparadas com a amostra controle (GGS-C).

Para a polpa de goiaba-serrana os resultados de  $\Delta E^*_{ab}$  diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das demais amostras e indicaram diferenças

de cor completamente perceptíveis ao olho humano, devido ao processamento utilizado para produção das geleias.

Valores semelhantes de coloração para a polpa *in natura* foram encontrados por de Souza (2015), ao estudar a coloração de cinco genótipos brasileiros de goiabeira-serrana (cultivares Alcântara, Mattos, Helena, Nonante e acesso 2316), sob diferentes condições de armazenamento.

De maneira geral, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de coloração entre as geleias estudadas para os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $\Delta E^*_{ab}$ , revelando que a incorporação das nanopartículas de zeína carregadas com vitamina  $D_3$  não afeta a coloração das mesmas.

### 3.2.4 Análises microbiológicas

A análise microbiológica de bolores e leveduras foi realizada para as formulações de geleias de goiaba-serrana conforme a Tabela 10.

Tabela 10 - Análise microbiológica de bolores e leveduras das GGS-C, GGS-vit $D_3$ , GGS-NP-vit $D_3$  e GGS-NP-vazia.

<b>Bolores e leveduras (UFC g<sup>-1</sup>)</b>				
Tempo	GGS-C	GGS-vit $D_3$	GGS-NP-vit $D_3$	GGS-NP-vazia
<b>0 dias</b>	-	-	-	-
<b>30 dias</b>	-	-	-	-
<b>60 dias</b>	-	-	-	-
<b>90 dias</b>	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$

GGS-C: Geleia de goiaba-serrana convencional. GGS-vit $D_3$ : Geleia de goiaba-serrana com vitamina  $D_3$  livre. GGS-NP-vit $D_3$ : Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas carregadas com vitamina  $D_3$ . GGS-NP-vazia: Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas de vazias. -: Não houve crescimento. Fonte: Autor.

As características físico-químicas apresentadas pelas geleias estudadas, tais como pH baixo, elevada concentração de sólidos solúveis (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009), além da presença do edulcorante xilitol nas formulações (MUSSATTO; ROBERTO, 2002), ofereceram resistência ao crescimento de bolores e leveduras. As hidroxilas presentes no xilitol se ligam às moléculas de água, assim reduzindo a atividade de água do meio, desta forma, criando um ambiente desfavorável para o

crescimento de micro-organismos deteriorantes, conferindo maior conservação aos produtos (MAIA et al., 2008).

Os resultados das análises microbiológicas comprovaram que todas as formulações de geleia se enquadraram nos padrões estabelecidos pela legislação, a qual estabelece tolerância de  $10^4$  UFC  $g^{-1}$  para bolores e leveduras (BRASIL, 2001), durante os 90 dias de análise.

A incorporação de nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> não afetou as características microbiológicas das geleias.

### 3.2.5 Simulação gastrointestinal *in vitro*

As NP-vitD<sub>3</sub>, vitamina D<sub>3</sub> livre (colecalférol) e GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub>, foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, com o objetivo de investigar a influência da encapsulação na liberação de vitamina D<sub>3</sub> ao longo da passagem pelas etapas da boca, esôfago-estômago, duodeno e íleo, demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Liberação de vitamina D<sub>3</sub> das NP-vitD<sub>3</sub>, vitamina D<sub>3</sub> livre (colecalférol) e GGS-vitD<sub>3</sub>, GGS-NP-vitD<sub>3</sub>, após cada etapa da simulação gastrointestinal *in vitro*.

Etapas	Liberação de vitamina D <sub>3</sub>			
	NP-vitD <sub>3</sub> ( $\mu g mL^{-1}$ )	Vitamina D <sub>3</sub> livre ( $\mu g mL^{-1}$ )	GGS-NP- vitD <sub>3</sub> ( $\mu g 20 g^{-1}$ )	GGS-vitD <sub>3</sub> ( $\mu g 20 g^{-1}$ )
Inicial	42,26 $\pm$ 0,36 <sup>aA</sup>	34,56 $\pm$ 0,55 <sup>aB</sup>	-	-
Boca	3,65 $\pm$ 2,70 <sup>bA</sup>	5,13 $\pm$ 0,24 <sup>bA</sup>	5,25 $\pm$ 3,62 <sup>aA</sup>	45,74 $\pm$ 6,39 <sup>aB</sup>
Esôfago- Estômago	5,24 $\pm$ 0,13 <sup>bA</sup>	16,15 $\pm$ 0,61 <sup>cB</sup>	1,69 $\pm$ 3,76 <sup>aA</sup>	20,66 $\pm$ 9,30 <sup>bB</sup>
Duodeno	23,03 $\pm$ 2,27 <sup>cA</sup>	2,16 $\pm$ 1,24 <sup>dB</sup>	12,33 $\pm$ 2,97 <sup>bC</sup>	1,38 $\pm$ 1,13 <sup>c</sup>
Íleo	6,34 $\pm$ 1,70 <sup>bC</sup>	**	12,62 $\pm$ 5,22 <sup>bC</sup>	**

NP-vitD<sub>3</sub>: Nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. Vitamina D<sub>3</sub> livre: vitamina não aprisionada nas nanopartículas. GGS-NP-vitD<sub>3</sub>: Geleia de goiaba-serrana com nanopartículas carregadas com vitamina D<sub>3</sub>. GGS-vitD<sub>3</sub>: Geleia de goiaba-serrana com vitamina D<sub>3</sub> livre. \*\*: Não houve liberação. -: Não detectada. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas idênticas sobrescritas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância ( $p < 0,05$ ) para a mesma amostra entre todas as etapas avaliadas. Letras maiúsculas idênticas sobrescritas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de

significância ( $p < 0,05$ ) entre as amostras e na mesma etapa avaliada. Fonte: Autor.

Na boca, o processo digestivo inicia-se com a mastigação e a presença de amilase salivar (FEHER, 2017). Após exposição às condições simuladas da boca (enzima  $\alpha$ -amilase e cloreto de cálcio, em pH neutro), não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as NP-vitD<sub>3</sub>, vitamina D<sub>3</sub> livre e GGS-NP-vitD<sub>3</sub>. Isto pode ser explicado, uma vez que a zeína é considerada um polímero resistente à digestão gástrica, além de exibir propriedades bioadesivas, que formam ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com a mucina (principal proteína encontrada na saliva e no revestimento da mucosa do trato gastrointestinal) (LI et al., 2018). As interações entre polímeros bioadesivos com a mucina são interessantes, visto que retardam o processo de liberação, além de aumentarem o tempo de absorção na membrana celular (ELZOGHBY et al., 2017; PATEL; VELIKOV, 2014; PEÑALVA et al., 2015).

O bolo alimentar resultante das degradações mecânicas e enzimáticas da etapa da boca é transportado através do esôfago para o estômago pelos movimentos peristálticos (digestão gástrica) (GUERRA et al., 2012). Após exposição às condições simuladas do esôfago-estômago (enzima pepsina e ácido clorídrico, com acidificação gradativa, pH de 5,5 até 2,0), as NP-vitD<sub>3</sub> e GGS-NP-vitD<sub>3</sub> apresentaram taxa de liberação menor ( $p < 0,05$ ) quando comparadas a vitamina D<sub>3</sub> livre e GGS-vitD<sub>3</sub>. Isso pode ser atribuído às severas condições ácidas apresentadas nesta etapa, indicando tendência contínua de degradação das moléculas livres de vitamina D<sub>3</sub> e apresentando pouco ou nenhum dano às moléculas encapsuladas (WALIA et al., 2017).

O surfactante não-iônico utilizado (Tween 80), também pode proporcionar estabilização estérica e resistência à aglomeração mediante pH reduzido (MCCLEMENTS, 2013; ZOU et al., 2016). Além disso, o material de parede empregado (zeína) apresenta estabilidade sob condições ácidas e resistência à ação da enzima pepsina (CHENG; FERRUZZI; JONES, 2019), desta forma, controlando os compostos bioativos no estômago para possível liberação no intestino (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005).

O mesmo foi observado por Cheng, Ferruzzi e Jones (2019), ao estudar a estabilidade de nanopartículas de zeína carregadas com luteína, demonstraram que as mesmas melhoram a estabilidade digestiva da

luteína, protegendo o carotenoide durante a digestão gástrica, bem como liberando-o em condições intestinais.

Nas etapas seguintes, digestão intestinal (duodeno e íleo) é onde geralmente as vitaminas são absorvidas no organismo humano (YUN; CHO; PARK, 2013). Após condições intestinais simuladas do duodeno (enzima pancreatina, sais biliares e bicarbonato de sódio, em pH aproximadamente igual a 5), as amostras apresentaram diferentes comportamentos, sugerindo possível degradação da vitamina quando desprotegida, enquanto valores superiores ( $p < 0,05$ ) foram encontrados para as NP-vitD<sub>3</sub> e GGS-NP-vitD<sub>3</sub>. Este comportamento é particularmente interessante, indicando adequada liberação de vitamina D<sub>3</sub> quando encapsulada, possivelmente atribuído à hidrólise da zeína devido às sucessivas mudanças de pH e interações com enzimas e sais biliares presentes nesta etapa (YAO et al., 2018).

Após simulação das condições do íleo (bicarbonato de sódio, em pH aproximadamente igual a 6,5), foi possível evidenciar a total degradação da vitamina D<sub>3</sub> não encapsulada. Em contrapartida as NP-vitD<sub>3</sub> e GGS-NP-vitD<sub>3</sub> ainda apresentaram liberação nesta etapa, comprovando baixa liberação de vitamina D<sub>3</sub> em condições gástricas e elevada sob condições intestinais quando encapsuladas em zeína.

Resultados semelhantes foram encontrados por Yao e colaboradores (2018), ao estudar nanopartículas de zeína carregadas com curcumina revestidas com alginato e gelatina, os resultados demonstraram que as moléculas de curcumina foram liberadas das nanopartículas de zeína quando a proteína foi totalmente hidrolisada pelas enzimas digestivas, e então incorporadas no interior hidrofóbico das micelas dos sais biliares, assim, demonstrando controle e resistência adequados para proteção frente às condições estomacais e liberação da curcumina sob condições intestinais simuladas.

De maneira geral, não houve liberação completa de vitamina D<sub>3</sub>, nas condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, as NP-vitD<sub>3</sub> apresentaram  $81,13 \pm 2,98$  % de liberação, com ápice de liberação na fase intestinal do duodeno, enquanto a vitamina D<sub>3</sub> livre apresentou  $68,77 \pm 3,63$  % com liberação máxima na fase gástrica do esôfago-estômago. Este fenômeno pode ser explicado pela presença de condições ácidas durante o ensaio, que degradam e/ou isomerizam a vitamina D<sub>3</sub>. Em meio ácido a vitamina D<sub>3</sub> pode isomerizar para isotachisterol (WINUPRASITH et al., 2018).

As nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub> apresentaram comportamento gastrointestinal semelhante quando incorporadas na geleia, apresentando ápice de liberação na fase do duodeno e íleo.

Os resultados demonstraram que o consumo de uma porção (20 g) de geleia de goiaba-serrana fortificada com nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub> fornece  $31,89 \pm 3,66$  µg de vitamina D<sub>3</sub>, aproximadamente  $63,78 \pm 4,89$  % da ingestão diária recomenda (50 µg) de vitamina D<sub>3</sub>, considerando a categoria populacional acima de 9 anos de idade.

Como mencionado anteriormente as NP-vitD<sub>3</sub> apresentaram diâmetro médio relativamente pequeno (abaixo de 200 nm), confirmando que tamanhos reduzidos de partícula podem prolongar o tempo de permanência de materiais encapsulados quando submetidos à condições gastrointestinais (KASAAI, 2018), bem como melhorar sua solubilidade, retardar degradações químicas e favorecer adequada absorção no organismo humano (MCCLEMENTS; XIAO, 2014). Podem, porém, permitir o acesso enzimático e conseqüentemente a degradação de compostos bioativos presentes nas nanopartículas (HASANVAND et al., 2015).



## CONCLUSÃO

No presente estudo, obteve-se uma geleia de goiaba-serrana fortificada com nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub>.

As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de nanoprecipitação. Os resultados revelaram nanopartículas estáveis, com estreita distribuição de tamanho, uniformidade e elevada eficiência de encapsulação, comprovando a efetividade do método de nanoprecipitação. Através das análises morfológicas (MET e MEV), foi possível observar nanopartículas com populações homogêneas, formato esférico e um tamanho reduzido. A encapsulação da vitamina D<sub>3</sub> na matriz polimérica de zeína, pôde ser confirmada por calorimetria exploratória diferencial.

Em relação às geleias de goiaba-serrana fortificadas com nanopartículas de vitamina D<sub>3</sub>, os resultados demonstraram que a incorporação das nanopartículas não alterou as características físico-químicas das mesmas.

O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais presentes nas amostras comprovou que as geleias podem ser utilizadas como fonte de antioxidantes naturais.

A coloração das amostras de geleia foi avaliada através dos parâmetros L\*, a\*, b\* e  $\Delta E^*_{ab}$ , os quais revelaram geleias com tendência a coloração escura, avermelhada, amarelada e pequenas diferenças de coloração perceptíveis ao olho humano quando comparadas com a amostra controle.

As análises microbiológicas asseguraram que as formulações de geleia se enquadraram nos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

Os resultados das análises de simulação gastrointestinal *in vitro* demonstraram que o aprisionamento da vitamina D<sub>3</sub> em escalas nanométricas, bem como a utilização de zeína como revestimento das nanopartículas, protegeram a vitamina D<sub>3</sub> quando submetida às condições gástricas, além de fornecer um mecanismo adequado para liberação controlada no intestino, oferecendo aproximadamente 64 % da ingestão diária recomenda de vitamina D<sub>3</sub>, considerando a categoria populacional acima de 9 anos de idade.

Através dos resultados obtidos por este estudo, a geleia de goiaba-serrana fortificada com nanopartículas de zeína carregadas com vitamina D<sub>3</sub> pode ser utilizada para suplementação de vitamina D<sub>3</sub>.



## REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q. A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos Orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

AMAKURA, Y.; UMINO, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6292–6297, 2000.

AMARANTE, C. V. T.; SOUZA, A. G.; BENINCÁ, T. D. T.; STEFFENS, C. A. Characterization of dietary attributes and mineral composition of the fruit in Brazilian genotypes of feijoa. **Acta horticulturae**, v. 2, n. 124, p. 947–954, 2018.

AMARANTE, C. V. T.; SOUZA, A. G.; BENINCÁ, T. D. T.; STEFFENS, C. A. Phenolic content and antioxidant activity of fruit of Brazilian genotypes of feijoa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1223–1230, 2017.

AMARANTE, C. V. T.; STEFFENS, C. A.; BENINCÁ, T. D. T.; HACKBARTH, C.; SANTOS, K. L. Qualidade e potencial de conservação pós-colheita dos frutos em cultivares brasileiras de goiabeira-serrana. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 990–999, 2013.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. Association of Official Analytical Chemistry, ed. 17, Washington, 2002.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 655–665, 2002.

ATKINS, P.; de PAULA, J.; KEELER, J. **Atkins' Physical Chemistry**, Oxford, ed. 11, p. 56–69, 2018.

BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and *Ptychopetalum olacoides* Bentham). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 405–412, 2007.

BANERJEE, A.; QI, J.; GOGOI, R.; WONG, J.; MITRAGOTRI, S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 238, n. 9, p. 176–185, 2016.

BENINCÁ, T. D. T. **Pós-Colheita de Goiabeira-Serrana: Enzimas Ligadas ao Escurecimento de Polpa, Revestimentos Comestíveis e Compostos Bioativos**. Dissertação Apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, 2014.

BERG, J. M.; ROMOSER, A.; BANERJEE, N.; ZEBDA, R.; SAYES, C. M. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 4, p. 276–283, 2009.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, n. 1, p. 337–351, 2016.

BODART, M.; PEÑARANDA, E.; DENEYER, A.; FLAMANT, G. Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. **Building and Environment**, v. 43, n. 12, p. 2046–2058, 2008.

BOF, C. M. J.; FONTANA, R. C.; PIEMOLINI-BARRETO, L. T. ; SANDRI, I. G. Effect of freezing and processing technologies on the antioxidant capacity of fruit pulp and jelly. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 107–114, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o **“Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b). Acesso: 20 dez. 2017.

BRASIL. Resolução - RDC nº 2, de 22 de janeiro de 2001. Aprova o **“Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Edulcorantes, Estabelecendo seus Limites Máximos para os Alimentos”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Disponível em:

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_03\\_2001.pdf/de0ef06a-25a9-422f-b1f7-a9cf8eb22faa?version=1.0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_03_2001.pdf/de0ef06a-25a9-422f-b1f7-a9cf8eb22faa?version=1.0). Acesso: 22 dez. 2018.

BRASIL. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o **“Regulamento Técnico Sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360\\_23\\_12\\_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc). Acesso: 20 dez. 2017.

BRASIL. Resolução - RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o **“Regulamento Técnico para Produtos de Vegetais, Produtos de Frutas e Cogumelos Comestíveis”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_272\\_2005\\_.pdf/40ddbf30-4939-403e-a9d1-fbab47ffc5bb](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_272_2005_.pdf/40ddbf30-4939-403e-a9d1-fbab47ffc5bb). Acesso: 20 dez. 2018.

CAMPOS, M. R. S. **Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications**. Woodhead Publishing, p. 33-50, 2019.

CHATTOPADHYAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Artificial sweeteners – a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 4, p. 611–621, 2014.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIRA, J. P.G.; ALMEIDA, F. A. C.; LEITE, J. C. A.; SILVA, F. L. H. Caracterização físico-química do suco

da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, p. 1–11, 2004.

CHENG, C. J.; FERRUZI, M.; JONES, O. G. Fate of lutein-containing zein nanoparticles following simulated gastric and intestinal digestion. **Food Hydrocolloids**, v. 87, n. 2, p. 229–236, 2019.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. 2. ed. Lavras, 2005.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: a study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, n. 6, p. 771–784, 2017.

DA ROSA, C. G.; MACIEL, M. V. O. B.; DE MELO, A. P. Z.; JUMMES, B.; DA SILVA, T.; MARTELLI, S. M.; VILLETTI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, n. 5, p. 337–344, 2015.

DE CARVALHO, S. M.; MONTANHEIRO, N. C.; 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, n. 8, p. 278–285, 2013.

DIAS, C. S.; BORGES, S. V.; QUEIROZ, F.; PEREIRA, P. A. P. Influência da temperatura sobre as alterações físicas, físico-químicas e químicas de geleia da casca de banana (*Musa spp.*) Cv. Prata durante o armazenamento. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 28–34, 2011.

ELZOGHBY, A. O.; EL-LAKANY, A. S.; HELMY, M. W.; ABU-SERIE, M. M.; ELGINDY, N. A. Shell-crosslinked zein nanocapsules for oral codelivery of exemestane and resveratrol in breast cancer therapy. **Nanomedicine**, v. 12, n. 24, p. 2785–2805, 2017.

FANIADIS, D.; DROGOUDI, P. D.; VASILAKAKIS, M. Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of

sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 301–304, 2010.

FEATHERSTONE, S. **A Complete Course in Canning and Related Processes**. Elsevier, v. 3, n. 14, p. 313–349, 2016.

FEHER, J. **Quantitative Human Physiology: An Introduction**. Academic Press, p. 821–833, 2017.

FORSYTHE, S. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. Artmed, ed. 22, p. 160–162, 2013.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. **Tecnologia de Alimentos Princípios e Aplicações**, p. 364–373, Nobel Editora, 2009.

GOLDONI, J. **Caracterização Físico-química, Atividade Antimicrobiana de Frutos e Germinação de Sete Capoteira [*Campomanesia Guazumifolia* (Cambess.) O. Berg]**. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul, 2017.

GRUMEZESCU, A. M. **Nutrient Delivery**. Elsevier Inc., p. 733–735, 2017.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

HASANVAND, E.; FATH, M.; BASSIRI, A.; JAVANMARD, M.; ABBASZADEH, R. Novel starch based nanocarrier for vitamin D fortification of milk: Production and characterization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, n. 9, p. 264–277, 2015.

HEIM, E., K.; TAGLIAFERROO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, ed. 4, São Paulo, 2008.

ISO. **ISO 21527-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95**. International Organization for Standardization, 2008.

KASAAI, M. R. Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, n. 7, p. 184–197, 2018.

KHOLI, R.; MITTAL, K. L. **Developments in Surface Contamination and Cleaning: Fundamentals and Applied Aspects**, Elsevier Inc., p. 584–586, 2008.

LI, H.; XU, Y.; SUN, X.; WANG, S.; WANG, J.; ZHU, J.; WANG, D.; ZHAO, L. Stability, bioactivity, and bioaccessibility of fucoxanthin in zein-caseinate composite nanoparticles fabricated at neutral pH by antisolvent precipitation. **Food Hydrocolloids**, v. 84, n. 11, p. 379–388, 2018.

LIANG, Q.; REN, X.; ZHANG, X.; HOU, T.; CHALAMAIAH, M.; MA, H.; XU, B. Effect of ultrasound on the preparation of resveratrol-loaded zein particles. **Journal of Food Engineering**, v. 221, n. 10, p. 88–94, 2018.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D<sub>3</sub>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 836–843, 2012.

LUO, Y.; ZHANG, B.; WHEENT, M.; YU, L.; WANG, Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145–152, 2011.

MAIA, M. C. A.; GALVÃO, A. P. G. L. K.; DELLA MODESTA, R. C.; PEREIRA JÚNIOR, N. Avaliação sensorial de sorvetes à base de

xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 146–151, 2008.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. **Therapeutic Delivery**, v. 4, n. 7, p. 841–857, 2013.

MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Excipient foods: designing food matrices that improve the oral bioavailability of pharmaceuticals and nutraceuticals. **Food & Function**, v. 5, n. 7, p. 1307–1333, 2014.

MELGAREJO, P.; MARTÍNEZ, R.; HERNÁNDEZ F. C. A.; MARTÍNEZ, J. J.; LEGUA, P. Anthocyanin content and colour development of pomegranate jam. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 477–481, 2011.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 193–201, 2008.

MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R. H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1–2, p. 267–275, 2011.

MISHARA, B. B.; KUMAR, S.; WADHAWAN, S.; HAJARE, S. N.; SAXENA, S.; MORE, V.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Browning of litchi fruit pericarp: role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase and effect of gamma radiation. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 604–612, 2012.

MONFORTE, M. T.; LANUZZA, F.; MONDELLO, D.; NACCARI, C.; PERGOLIZZI, S.; GALATIM E. M. Phytochemical composition and gastroprotective effect of Feijoa *sellowiana* Berg fruits from Sicily. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 2, n. 1, p. 14–21, 2014.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010.

- MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.
- CABALLERO, B. **The Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Academic Press, ed. 2, p. 3416 – 3419, 2003
- PARK, S. J.; GARCIA, C.V.; SHIN, H. G.; KIM, T. J. Development of nanostructured lipid carriers for the encapsulation and controlled release of vitamin D<sub>3</sub>. **Food Chemistry**, v. 225, n. 1, p. 213–219, 2017.
- PARRIS, N.; COOKE, P. H.; HICKS, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4788–4792, 2005.
- PASQUARIELLO, M. S.; MASTROBUONI, F.; PATRE D.; ZAMPELLA, L.; CAPUANO, L. R.; SCORTICHINI, M.; PETRICCIONE, M. Agronomic, nutraceutical and molecular variability of feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) germplasm. **Scientia Horticulturae**, v. 191, n. 8, p. 1–9, 2015.
- PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Zein as a source of functional colloidal nano and microstructures. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 450–458, 2014.
- PEÑALVA, R.; ESPARZA, I.; GONZALEZ-NAVARRO, C. J.; QUINCOES, G.; PEÑUELAS, I.; IRACHE, J. M. Zein nanoparticles for oral folic acid delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 450–457, 2015.
- 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 n. 9–10, p.1231–1237, 1999.
- REISSIG, G. N. **Geleias convencionais e diet de araçá e de pitanga: estabilidade no processamento e armazenamento**. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, 2015.

SANTOS, K. L.; BUDZIAK, D.; PEREIRA, G. E.; BORBA, B. M.; ALMEIDA, E. B. C. Avaliação físico-química e sensorial de geleias de goiaba-serrana (*Acca sellowiana*). **Agropecuária Catarinense, Florianópolis**, v. 30, n. 3, p. 41–44, 2017.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo**, Ulbra, p. 55–63, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SHINWARI, K. J.; RAO, P. S. Stability of bioactive compounds in fruit jam and jelly during processing and storage: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, n. 5, p. 181–193, 2018.

SILVA, F. V. M.; SULAIMAN, A. polyphenoloxidase in fruit and vegetables: inactivation by thermal and non-thermal processes, **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1–15, 2018.

SIMÕES, V. N.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; OLIVEIRA, T. D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, J. M.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A. A.; ANJOS, A. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga (III). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 495–501, 2013.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 727–732, 2008.

SOUZA, A. G. **Caracterização Física, Química, Nutricional e Antioxidante em Frutos e Flores de Genótipos de Goiabeira-Serrana [*Acca Sellowiana* (Berg.) Burret]** Tese de doutorado em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, 2015.

STAFFAS, A.; NYMAN, A. Determination of cholecalciferol (vitamin d<sub>3</sub>) in selected foods by liquid chromatography: NMKL1 collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 400–406, 2003.

SWAIN, T.; HILLIS, W. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63–68, 1959.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, ed. 4, p. 38, 2011.

TENG, Z.; LUO, Y.; WANG, Q. Carboxymethyl chitosan – soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D<sub>3</sub>. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 524–532, 2013.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6, p. 669–675, 2006.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por clae, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310–313, 2001.

VALLILO, M. I.; GARBELOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L. C. A. Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 241–244, 2005.

VERRUCK, S.; CARVALHO, M. W.; LIZ, G. R.; AMANTE, E. R.; WERNECK, C. R.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S. Survival of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments. **Small Ruminant Research**, v. 153, n. 7, p. 48–56, 2017.

VELHO, A. C. **Fisiologia e preservação da qualidade pós-colheita de Goiaba-serrana [*Acca Sellowiana* (Berg.) Burret]**. Dissertação de mestrado em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, 2009.

- WALIA, N.; DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; CHEN, L.; RAMALINGAM, C. Fish oil based vitamin D nanoencapsulation by ultrasonication and bioaccessibility analysis in simulated gastrointestinal tract. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 39, n. 5, p. 623–635, 2017.
- WANG, M.; FU, Y.; CHEN, G.; SHI, Y.; LI, X.; ZHANG, H.; SHEN, Y. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan and tea polyphenols coating on zein nanoparticles to encapsulate  $\beta$ -carotene by anti-solvent precipitation method. **Food Hydrocolloids**, v. 77, n. 4, p. 577–587, 2018.
- WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 923–926, 2010.
- WINUPRASITH, T.; KHOMEIN, P.; MITBUMRUNG, W.; SUPHANTHARIKA, M.; NITITHAMYONG, A.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of vitamin D<sub>3</sub> in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: impact on *in vitro* digestion and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 83, n. 10, p. 153–164, 2018.
- YAO, K.; CHEN, W.; SONG, F.; MCCLEMENTS, D. J.; HU, K. Tailoring zein nanoparticle functionality using biopolymer coatings: Impact on curcumin bioaccessibility and antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 79, n. 6, p. 262–272, 2018.
- YUN, Y.; CHO, Y. W.; PARK, K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 11, p. 822–832, 2013.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.
- ZHU, F. Chemical and biological properties of feijoa (*Acca sellowiana*). **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, n. 9, p. 121–131, 2018.

ZOU, L.; ZHENG, B.; ZHANG, R.; ZHANG, Z.; LIU, W.; LIU C.; XIAO, P.; MCCLEMENTS, D. J. Enhancing the bioaccessibility of hydrophobic bioactive agents using mixed colloidal dispersions: curcumin-loaded zein nanoparticles plus digestible lipid nanoparticles. **Food Research International**, v. 81, n. 3, p. 74–82, 2016.