



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

NANOEMULSÕES DE β -CAROTENO: ESTABILIDADE E APLICAÇÕES EM
ALIMENTOS

CARINA MOLINS BORBA

PROF.^a DR.^a JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT

Orientadora

PROF.^a DR.^a CRISTIANA LIMA DORA

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

NANOEMULSÕES DE β -CAROTENO: ESTABILIDADE E APLICAÇÕES EM
ALIMENTOS

CARINA MOLINS BORBA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de doutor em Engenharia e Ciência
de Alimentos.

PROF.^a DR.^a JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT

Orientadora

PROF.^a DR.^a CRISTIANA LIMA DORA

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2019

Ficha catalográfica

B726n Borba, Carina Molins.
 Nanoemulsões de β -caroteno: estabilidade e aplicações em
 Alimentos / Carina Molins Borba. – 2019.
 193 f.

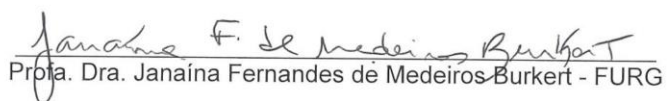
 Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande –
 FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
 Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.
 Orientadora: Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert.
 Coorientadora: Dra. Cristiana Lima Dora.

 1. Carotenoide 2. Corantes 3. Lácteos 4. Nanotecnologia
 5. Termoestabilidade I. Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros
 II. Dora, Cristiana Lima III. Título.

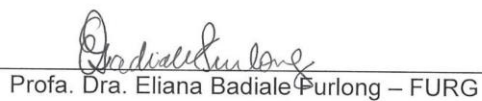
CDU 547.912

APROVAÇÃO

Tese defendida por Carina Molins Borba aprovada em 29 de agosto de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:


Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert - FURG


Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavareze - UFPEL


Profa. Dra. Eliana Badiale Purlong – FURG


Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG


Prof. Dr. Mariano Michelin – FURG

DEDICATÓRIA

Para as mulheres mais incríveis que conheço: Tania e Catiane.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as oportunidades de crescimento, profissional e pessoal, que colocou em meu caminho durante esses anos.

Aos meus pais, Paulo e Tania pelo amor e suporte em todos os momentos, mas principalmente naqueles em que minha fé (em Deus e em mim mesma) esteve abalada. Obrigada pelas oportunidades que me deram, pelos exemplos de valores, garra e caráter, que com toda a certeza me trouxeram até aqui.

Aos meus irmãos Fábio e Catiane, e irmãos emprestados Milene e Leonardo pelo carinho, amor e apoio em cada etapa dessa caminhada. Obrigada por me presentear com os amores da minha vida, meus sobrinhos Thiago, Sofia e Luísa, que fazem a caminhada ser mais florida e cheia de amor.

Ao meu marido Cleber, por todo o amor, carinho, suporte e motivação. Obrigada por confiar e acreditar na minha capacidade, mesmo quando eu duvido. Obrigada por ter escolhido dividir a vida comigo. Te amo!

À Universidade Federal do Rio Grande – FURG e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pelas oportunidades recebidas ao longo desses 6 anos que estive aqui.

À minha orientadora, Prof. Janaína Burkert, por ter me recebido de braços abertos em 2013, sem me conhecer, apenas confiando em uma indicação. Obrigada por cada oportunidade de crescimento e aprendizado que me proporcionou, mas principalmente, por ter sido mais que apenas uma orientadora, pela preocupação e carinho de mãe. Obrigada por ir além da função de professora e ser exemplo de ser humano. Meu carinho e gratidão eterna.

À minha coorientadora, Prof. Cristiana Dora, exemplo raro dentro da academia de disponibilidade e boa vontade. Obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório e do seu grupo de pesquisa para nós. Obrigada por ter confiado em mim e acreditado no trabalho que eu estava propondo. Esse trabalho saiu do papel graças ao seu apoio. Muito muito obrigada!

À Prof. Eliana Furlong, que mesmo não sendo uma das orientadoras oficiais, foi de extrema importância durante todo o trabalho. Obrigada por nos receber tantas vezes na sua sala ou até mesmo no meio do corredor, sempre disposta a elucidar minhas dúvidas ou sugerir formas de fazer as coisas com a estrutura que tínhamos. Obrigada por abrir as portas do LAMCA e nos permitir utilizar os equipamentos. Mas principalmente, por ser exemplo de pessoa. Por mostrar que podemos sim ser grandes pesquisadores e professores sem deixar de sermos humanos. A senhora é e sempre será para mim um exemplo a ser seguido.

Aproveito e deixo meu agradecimento à querida técnica Maristela Cerqueira, por toda a disponibilidade e boa vontade que demonstrou todas as vezes que precisei de ajuda, assim como pelos ensinamentos sobre CG e HPLC.

Agradeço também a Prof. Juliana Bidone pelo auxílio nos primeiros experimentos

A todos os colegas, IC'S e amigos que tive o prazer de conhecer ao longo desses seis anos no LASCQ e no ENGEPIO: Bruno, Vanessa, Chico, Renata Nunes, Guilherme, Adriel, Juliane entre tantos outros. Foi um prazer conhecer e aprender um pouco com cada um de vocês.

Um agradecimento especial para as “xuxus”, que mais do que compartilhar o vício em café e chimarrão, dividiram comigo minhas aflições e inseguranças, que riram e vibraram nos momentos de alegria e vitória e me deram suporte nos momentos difíceis: Belkis, Renata, Tabita, Joana, Daniela, Joice e Elisane. Vocês encheram minha vida de luz e amor. Serei eternamente grata a vocês e à Deus por ter colocado pessoas tão incríveis na minha vida! Obrigada pela amizade, amo vocês!

À minha IC da vida Millene. Obrigada pelas conversas, risadas, por toda a ajuda, comprometimento, respeito e amizade nesses seis anos! À Luana, que chegou depois, mas conquistou seu espaço. Além de compartilhar comigo o melhor dia do ano (nosso aniversário) demonstrou dedicação e carinho com o trabalho! Agradeço a oportunidade de ter participado da formação de vocês. Foi uma imensa honra!

À Gabriela Araújo, por muito mais do que só ter operado o HAP, mas por ter se tornado uma amiga. Tu foste um anjo que Deus mandou para alegrar as longas horas de trabalho (e me ensinar a contar com palitinhos)! Obrigada por tudo, estás sempre nas minhas orações! Aproveito e agradeço a Jamile Rodrigues, minha IC emprestada, por toda a ajuda e disponibilidade (desculpa por ter sujado muitas vidrarias).

Ao meu grupo de Emaús. Obrigada Semeadoras pelas orações e apoio!

Ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica – MiBi, na pessoa da Prof. Michele Greque por ter disponibilizado o Zeta Sizer. Ao técnico Adriano Henrard e a colega Bruna Vaz pela disponibilidade para realização das análises. Agradeço também ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos - LTA, em especial à técnica Aline Mássia e aos colegas pós-graduandos pela disponibilização e auxílio nas análises de colorimetria e textura.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de doutorado.

E a todos os que não foram citados aqui, mas que de uma forma ou de outra participaram dessa jornada, meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

**“...There's always going to be another mountain
I'm always going to want to make it move
Always going to be an uphill battle,
Sometimes I'm going to have to lose,
Ain't about how fast I get there,
Ain't about what's waiting on the other side
It's the climb
Keep on moving
Keep climbing
Keep the faith, baby
It's all about
The climb
Keep the faith... Keep your faith...”
(The Climb – Miley Cyrus)**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lipídios utilizados para formulação de nanoemulsões.....	41
---	----

ARTIGO 1

Tabela 1 - Tamanho de Partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial ζ de nanoemulsões de óleos vegetais com e sem adição de β -caroteno durante 90 d de estocagem a 4 °C.....	69
Tabela 2 - Índice de Ostwald <i>ripening</i> (w) e R^2 para nanoemulsões armazenadas durante 90 d.....	70
Tabela 3 - Concentração de β -caroteno (mg mL ⁻¹) durante 90 d de armazenamento a 4°C.....	73
Tabela 4 - Parâmetros de degradação do carotenoide das nanoemulsões formuladas com óleo de milho, soja e arroz.....	74

ARTIGO 2

Tabela 1 - Tamanho de partícula, IPD e potencial ζ durante estocagem a 4 °C, 25 °C e 37 °C.....	92
Tabela 2 - Taxa de Ostwald <i>ripening</i> (w) de nanoemulsões estocadas a 4 °C e 25 °C.....	93
Tabela 3 - Taxa de degradação, meia vida, energia de ativação e coeficiente de determinação das nanoemulsões de β -caroteno em diferentes temperaturas até 30 d de armazenamento.....	97

ARTIGO 3

Tabela 1 - Parâmetros de textura do iogurte com e sem nanoemulsões.....	121
Tabela 2 - Caracterização (base seca) das amostras de iogurte com e sem adição de nanoemulsão.....	121
Tabela 3 - Viscosidades aparentes em diferentes taxas de cisalhamento de iogurtes sem e com adição nanoemulsão.....	122
Tabela 4 - Parâmetros reológicos de nanoemulsões com e sem adição de nanoemulsões.....	122

ARTIGO 4

Tabela 1 - Composição do gelato.....	137
Tabela 2 - Caracterização (base seca) dos gelatos com e sem nanoemulsão.....	143

Tabela 3 - Parâmetros de textura do gelato sem (GC) e com (GN β) adição de nanoemulsões.....	145
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas dos carotenoides β -caroteno (a), licopeno (b), luteína (c) e astaxantina (d).....	27
Figura 2 - Isômeros <i>trans</i> e <i>cis</i> de β -caroteno.....	28
Figura 3 - Clivagem simétrica de β -caroteno em retinol.....	29
Figura 4 - Processos de desestabilização de nanoemulsões (a) e diferença entre cremeação e sedimentação (b).....	39
Figura 5 - Esquema estrutural de uma gota de emulsão óleo em água.....	44
Figura 6 - Estabilização eletrostática e estérica.....	45
Figura 7 - Estabilidade física de emulsões de mesma formulação (a) submetidas ao processo de HAP após 30 d e (b) emulsões preparadas sem HAP após 24 h.....	54

ARTIGO 2

Figura 1- Tamanho de partícula (a), potencial ζ (b), IPD (c) e retenção de β -caroteno (d) de nanoemulsões após tratamentos térmicos.....	90
Figura 2- Nanoemulsão ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) controle (a), após PTB (b) e PTA (c).....	91
Figura 3 - Degradação de β -caroteno nas nanoemulsões (concentração inicial = $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (a) e concentração inicial = $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (b)) durante o armazenamento a 4, 25 e 37 ° C com e sem exposição à luz.....	96

ARTIGO 3

Figura 1 - Microscopia de Transmitância Eletrônica - MET (x100) de nanoemulsões de β -caroteno e óleo de milho.....	117
Figura 2 - Acompanhamento da acidez titulável, pH e sinérese dos iogurtes IB (a), I β (b), IN β (c) e IAT (d) durante 30 d de armazenamento	119-120
Figura 3 - Variação de cor, Ângulo Hue e croma após 30 d de estocagem.....	124
Figura 4 - Relação C/C_0 ao longo dos 30 d de armazenamento do iogurte adicionado nanoemulsões de β -caroteno.	125

ARTIGO 4

Figura 1 - Acompanhamento de pH, sólidos solúveis e carotenoides das formulações GB (a), GN β (b) e G β (c).....	139-140
--	---------

Figura 2- Variação de cor, ângulo Hue e croma após 28 d de estocagem.....	142
Figura 3 - <i>Overrun</i> das amostras GC, GN β e G β	144
Figura 4 - Monitoramento do derretimento dos gelatos com e sem a adição de nanoemulsões de β -caroteno durante 120 min e taxa de derretimento (g min ⁻¹)	146

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: RESUMO, ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	19
RESUMO	21
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
 CAPÍTULO II: REVISÃO DA LITERATURA	29
3 REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1 CAROTENOIDES	31
3.2 NANOTECNOLOGIA	34
3.3 NANOEMULSÕES	37
3.4 ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES	41
3.4.1 Lipídios	45
3.4.2 Surfactantes	47
3.4.3 Condições de armazenamento	51
3.5 PRODUÇÃO DE NANOEMULSÕES	54
3.5.1 Homogeneização à alta pressão (HAP)	56
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
 CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	61
ARTIGO 1: ANÁLISE DE ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS VEGETAIS E β-CAROTENO PRODUZIDAS POR HOMOGENIZAÇÃO À ALTA PRESSÃO	63
RESUMO	65
1 INTRODUÇÃO	67
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 MATERIAIS	68
2.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES	69
2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES	69
2.3.1 Tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (PDI) e índice de Ostwald <i>ripening</i> (W)	69
2.3.2 Potencial ζ	70
2.4 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS VEGETAIS	70
2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE β -CAROTENO	71
2.6 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO β -CAROTENO	71
2.6 ÍNDICE DE PERÓXIDOS (IP)	71
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS VEGETAIS DE ARROZ, CANOLA, GERGELIM, GIRASSOL, LINHAÇA, MILHO E SOJA	72
3.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE ARROZ, MILHO E SOJA COM E SEM A ADIÇÃO DE β -CAROTENO SINTÉTICO E AVALIAÇÃO DA SUA ESTABILIDADE FÍSICA	72
3.3 DEGRADAÇÃO DO β -CAROTENO NANOEMULSIONADO	76

3.4 ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM AZEITE DE OLIVA ADICIONADO DE NANOEMULSÕES DE β -CAROTENO	78
4 CONCLUSÕES	79
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ARTIGO 2: ESTABILIDADE FÍSICA E QUÍMICA DE NANOEMULSÕES DE β -CAROTENO DURANTE ESTOCAGEM E PROCESSAMENTO TÉRMICO

RESUMO	85
1 INTRODUÇÃO	87
2 MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1 MATERIAL	88
2.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES	88
2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOEMULSÕES	89
2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE β -CAROTENO POR COMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	89
2.5 ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES SUBMETIDAS A TRATAMENTOS TÉRMICOS	90
2.6 ESTABILIDADE FÍSICA DAS NANOEMULSÕES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	91
2.7 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO β -CAROTENO	92
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	93
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1 ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES SUBMETIDAS A TRATAMENTOS TÉRMICOS	93
3.2 ESTABILIDADE FÍSICA DAS NANOEMULSÕES EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO	95
3.3 DEGRADAÇÃO DO β -CAROTENO DURANTE TRATAMENTOS TÉRMICOS E EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM	99
4 CONCLUSÕES	104
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

ARTIGO 3: ESTABILIDADE, REOLOGIA E TEXTURA DE IOGURTES ADICIONADOS DE NANOEMULSÃO DE β -CAROTENO

RESUMO	113
1 INTRODUÇÃO	115
2 MATERIAL E MÉTODOS	116
2.1 MATERIAL	116
2.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES	116
2.3 PREPARO DO IOGURTE	117
2.4 DETERMINAÇÃO DE pH E ACIDEZ TITULÁVEL	117
2.5 SINÉRESE	118
2.6 ACOMPANHAMENTO DE β -CAROTENO	118
2.7 VARIAÇÃO DE COR	119
2.8 VISCOSIDADE	119
2.9 ANÁLISE DE TEXTURA	120
2.10 COMPOSIÇÃO PROXIMAL	120
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	120
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
4 CONCLUSÃO	130

5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
----------	---	------------

ARTIGO 4: AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DE SORVETES TIPO <i>GELATO</i> ADICIONADO DE NANOEMULSÃO DE β-CAROTENO	135
--	------------

RESUMO.....	137
--------------------	------------

1 INTRODUÇÃO	139
---------------------------	------------

2 MATERIAL E MÉTODOS	140
-----------------------------------	------------

2.1 MATERIAL	140
--------------------	-----

2.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES	140
------------------------------------	-----

2.3 GELATO	140
------------------	-----

2.4 pH, SÓLIDOS SOÚVEIS TOTAIS, <i>OVERRUN</i> E DERRETIMENTO	141
---	-----

2.5 TEOR DE CAROTENOIDE	141
-------------------------------	-----

2.6 VARIAÇÃO DE COR	142
---------------------------	-----

2.7 ANÁLISE DE TEXTURA	143
------------------------------	-----

2.8 COMPOSIÇÃO PROXIMAL	143
-------------------------------	-----

2.10ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	143
------------------------------	-----

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
---------------------------------------	------------

4 CONCLUSÃO	151
--------------------------	------------

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
---	------------

CAPÍTULO IV: CONCLUSÃO GERAL	155
---	------------

4 CONCLUSÃO GERAL	157
--------------------------------	------------

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	159
---	------------

CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
---	------------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
---	------------

APÊNDICES	185
------------------------	------------

APÊNDICE 1	187
-------------------------	------------

APÊNDICE 2	187
-------------------------	------------

APÊNDICE 3	1894
-------------------------	-------------

APÊNDICE 4	1905
-------------------------	-------------

APÊNDICE 5	190
-------------------------	------------

APÊNDICE 6	1916
-------------------------	-------------

APÊNDICE 7	191
-------------------------	------------

APÊNDICE 8	1927
-------------------------	-------------

APÊNDICE 9	192
-------------------------	------------

APÊNDICE 10	1938
--------------------------	-------------

APÊNDICE 11.....	189
-------------------------	------------

CAPÍTULO I
RESUMO, ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO

A aplicação de nanotecnologia é uma realidade nos mais diversos setores industriais e econômicos. As indústrias alimentícia e farmacêutica têm grande interesse no uso de nanoemulsões para liberação de compostos lipofílicos, como os carotenoides. Pode ser encontrada na literatura uma quantidade significativa de trabalhos que desenvolvem nanoestruturas com potencial para serem adicionadas a alimentos, porém, ainda são escassos estudos de suas aplicações em matrizes alimentícias, assim como sua avaliação durante o processamento tecnológico. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo produzir nanoemulsões de óleos vegetais comestíveis com β -caroteno e estudar suas características físico-químicas, estabilidade e aplicação como aditivo para matrizes alimentares. As nanoemulsões foram produzidas utilizando dois surfactantes não iônicos (Tween 20 e Span 80), em homogeneizador à alta pressão (6 ciclos somando 2 min a $6,9 \times 10^7$ Pa). Foram formuladas nanoemulsões com óleo de arroz, milho e soja (com $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de β -caroteno), e acompanhadas sua estabilidade física durante 90 d a 4°C e teor de β -caroteno. Posteriormente, foram testadas duas concentrações de β -caroteno ($0,5$ e $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) com óleo de milho e submetidas a pasteurização e esterilização, e estocagem a 4 , 25 e 37°C com e sem luz por até 90 d. Afim de avaliar o efeito da adição das nanoemulsões em alimentos utilizou-se dois produtos modelo amplamente consumidos pela população: iogurte e sorvete (tipo gelato). As formulações com óleo de arroz, milho e soja com e sem adição do carotenoide apresentaram tamanho de partícula em torno de 355 nm , com índice de polidispersão em torno de $0,2$ e potencial ζ entre -20 e -40 mV . As nanoemulsões com óleo de milho apresentaram maior capacidade de proteção do carotenoide, não ocorrendo degradação significativa ($p < 0,05$) de β -caroteno durante os 90 d de estocagem, sendo esse óleo escolhido para a continuação do trabalho. Após os tratamentos térmicos e armazenamento, as nanoemulsões não mostraram evidências de desestabilização física, restando $70-80\%$ do carotenoide após os processos de pasteurização e esterilização e 70% quando armazenadas a 4°C sem luz. Os iogurtes com nanoemulsões apresentaram comportamento semelhante nos parâmetros pH e acidez titulável às amostras sem nanoemulsão. No entanto, a adição de nanoemulsões afetou significativamente ($p < 0,05$) a sinérese, reologia e textura do iogurte. As amostras com nanoemulsões apresentaram apenas uma pequena variação de cor, com conteúdo de β -caroteno sem variações significativas ($p > 0,05$) durante o armazenamento. No gelato, a adição de nanoemulsão permitiu aumentar o rendimento do produto pelo aumento do *overrun*, sem afetar os parâmetros de estabilidade como pH, sólidos solúveis, firmeza e derretimento ($p > 0,05$). Embora não tenha sido observada diferença significativa ($p > 0,05$) na proteção dos carotenoides, o uso de nanoemulsões aumentou a dispersão do carotenoide, que por consequência produziu um gelato com maior homogeneidade e coloração mais intensa. Interessantes informações sobre a utilização de óleos de grau alimentício no desenvolvimento de nanoemulsões foram observados durante o trabalho, como a estabilidade física e química das nanoemulsões de β -caroteno durante processos térmicos tradicionais e condições ambientais. A aplicação das nanoemulsões em alimentos demonstrou que essas nanoestruturas carreadoras de compostos lipofílicos, como os carotenoides, podem melhorar a dispersão desses compostos em produtos alimentícios e ainda em alguns casos agirem como melhoradores tecnológicos.

Palavras-chave: Carotenoide. Corantes. Lácteos. Nanotecnologia. Termoestabilidade.

ABSTRACT

Nanotechnology application occurs in different industrial and economic sectors. The food and pharmaceutical industries have a great interest in the use of nanoemulsions for the release of lipophilic compounds, such as carotenoids. A significant amount of papers in the literature develop nanostructures with potential food grade. However, there are still few studies of their applications in food matrices, as well as their evaluation during technological processing. Thus, the present work aimed to produce nanoemulsions of edible vegetable oils with β -carotene and to study their physical-chemical characteristics, stability, and application as an additive for food matrices. Nanoemulsions were produced using two nonionic surfactants (Tween 20 and Span 80) in a high-pressure homogenizer (6 cycles adding 2 min at 6.9×10^7 Pa). Nanoemulsions were formulated with rice, corn and soybean oil, and their physical stability was monitored for 90 d at 4 °C as the β -carotene content. Subsequently, two concentrations of β -carotene (0.5 and 0.2 mg mL⁻¹) were tested with corn oil and subjected to pasteurization and sterilization, and storage at 4, 25 and 37 °C for up to 90 d. In order to evaluate the effect of the addition of nanoemulsions in foods, two model products widely consumed by the population were used: yogurt and ice cream (gelato type). The formulations with rice oil, corn oil, and soybean oil with and without carotenoid addition had a particle size in the 300 nm range, with a polydispersity index of around 0.2 and potential ζ between -20 and -40 mV. The nanoemulsions with corn oil presented higher carotenoid protection capacity, with no significant degradation ($p < 0.05$) of β -carotene during the 90 d of storage, so this oil was chosen to continue the work. Samples with two carotenoid concentrations were submitted to pasteurization and sterilization and stored at 4 °C, 25 °C, and 37 °C in the presence and absence of light for up to 90 days. After heat treatments and storage, the nanoemulsions showed no evidence of physical destabilization, retaining 70-80 % of the carotenoid after the pasteurization and sterilization processes and 70 % when stored at 4 °C without light. Yogurts with nanoemulsions showed similar behavior in the parameter pH and acidity titrable to samples without nanoemulsion. However, the addition of nanoemulsions significantly affected ($p < 0.05$) the syneresis, rheology, and texture of the yogurt. Samples with nanoemulsions showed only a small color variation, with β -carotene content without significant variations ($p > 0.05$) during storage. In the gelato, the addition of nanoemulsion allowed to increase the yield of the product by increasing the overrun, without affecting the stability parameters such as pH, soluble solids, firmness and melting ($p > 0.05$). Although no significant difference ($p > 0.05$) was observed in the protection of carotenoids, the use of nanoemulsions increased the solubility of the carotenoid, which consequently produced a gelato with greater homogeneity and more intense staining. Interesting information on the use of food grade oils in the development of nanoemulsions was observed during work, such as the physical and chemical stability of β -carotene nanoemulsions during thermal processes and environmental conditions. The application of nanoemulsions in food has shown that these nanostructures carrying lipophilic compounds, such as carotenoids, can improve the dispersion and stability of these compounds in food products.

Key words: Carotenoid. Dyes. Dairy products. Nanotechnology. Thermostability.

1 INTRODUÇÃO

Carotenoides compreendem um amplo grupo de pigmentos lipofílicos, que proporcionam as cores amarelo, laranja e vermelho a vegetais e animais, podendo ser encontrados tanto em organismos procarióticos como em eucarióticos (GÓMEZ-GARCÍA; OCHOA-ALEJO, 2013). Esses compostos apresentam estrutura básica formada por unidades de isopreno ligadas covalentemente (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007), sendo que, a longa cadeia de ligações duplas conjugadas dos carotenoides, os torna suscetíveis à degradação química por diferentes fatores como pH, luz, calor, oxigênio e metais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001), tornando mais difícil sua incorporação em alimentos e bebidas (BOON et al., 2009). Além disso, o caráter lipofílico da maioria dos carotenoides dificulta sua incorporação em formulações com base aquosa (VELIKOV; PELAN, 2008). Alimentos funcionais enriquecidos com componentes bioativos, como os carotenoides, podem além da nutrição básica proporcionar também benefícios à saúde, auxiliando na prevenção de doenças (JANA; GANDY; JANA, 2017) sendo de grande interesse para indústria de alimentos.

Os carotenoides, assim como os demais componentes bioativos dos alimentos tendem a sofrer degradações e inativações, sendo que processos de encapsulamento podem retardar ou prevenir essas degradações permitindo sua liberação controlada no sistema digestório. Diversos sistemas carreadores vêm sendo estudados e testados em diferentes condições aos quais os alimentos podem ser submetidos como aquecimento, alterações de pH e força iônica (DOS SANTOS et al., 2016), aplicação de tensões mecânicas, entre outras. Esses estudos são de grande importância uma vez que a estabilidade, capacidade de retenção e forma de liberação das moléculas encapsuladas estão diretamente ligadas à natureza da interação entre as moléculas e a matriz de encapsulamento (JANA; GANDY; JANA, 2017).

A aplicação de nanotecnologia é uma realidade nos mais diversos setores industriais e econômicos (MANGEMATIN; WALSH, 2012). Sistemas de liberação baseados em nanoemulsões podem aumentar a biodisponibilidade de compostos lipofílicos, devido ao pequeno tamanho de partícula e alta relação superfície/volume (ACOSTA, 2009). Assim, indústrias alimentícia e farmacêutica têm demonstrado grande interesse no uso de nanoemulsões especialmente para liberação de compostos lipofílicos, como os carotenoides (LEE; MCCLEMENTS, 2010).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para produzir partículas nanométricas, dentre elas a homogeneização à alta pressão (HAP). Um método de alta energia

(DOMÍNGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016), que apresenta como principais vantagens: não requer a utilização de solventes (SUN et al., 2015), os homogeneizadores à alta pressão são equipamentos já utilizados em escala industrial (McCLEMENTS 2004 citado por DOMÍNGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016) e permitir a adição de maiores quantidades de compostos comparado com outras técnicas de nanoencapsulamento (TAN et al., 2016).

Pode ser encontrada na literatura uma quantidade significativa de trabalhos que desenvolvem nanoestruturas com potencial grau alimentício, porém, ainda são escassos estudos de suas aplicações em matrizes alimentares, assim como sua avaliação durante o processamento tecnológico. No presente trabalho se propõe a produzir nanoemulsões de óleos vegetais comestíveis com β -caroteno e estudar suas características físico-químicas, estabilidade e aplicação como aditivo para matrizes alimentares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir nanoemulsões de óleos vegetais comestíveis com β -caroteno e estudar suas características físico-químicas, estabilidade e aplicação como aditivo para matrizes alimentares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tipo de óleo vegetal (arroz, milho ou soja) sobre a estabilidade das nanoemulsões;

- Verificar a capacidade das nanoemulsões de reduzir a degradação do β -caroteno sob diferentes condições ambientais (com e sem luz nas temperaturas de 4, 25 e 37 °C) e durante processamentos térmicos;

- Avaliar as alterações dos parâmetros de estabilidade das nanoemulsões quando armazenadas a diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C) e após processamento térmico;

- Aplicar nanoemulsões de β -caroteno em iogurte verificando seu efeito sobre parâmetros tecnológicos do produto;

- Desenvolver sorvete do tipo gelato com adição de nanoemulsões de β -caroteno avaliando seu efeito sobre parâmetros tecnológicos do produto.

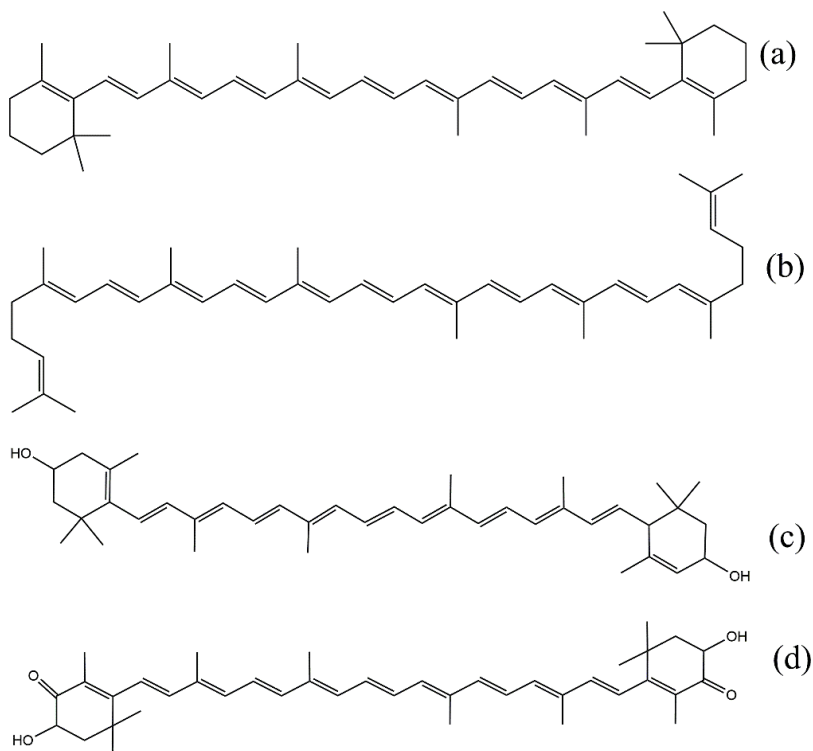
CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CAROTENOIDES

Carotenoides compreendem um amplo grupo de pigmentos terpenoides lipofílicos, que proporcionam as cores amarelo, laranja e vermelho a vegetais e animais, podendo ser encontrados tanto em organismos procarióticos como em eucarióticos (GÓMEZ-GARCÍA; OCHOA-ALEJO, 2013). Do ponto de vista químico, os carotenoides possuem estrutura básica formada por unidades de isopreno ligadas covalentemente, criando uma molécula com 40 carbonos, sendo algumas dessas estruturas apresentadas na Figura 1.

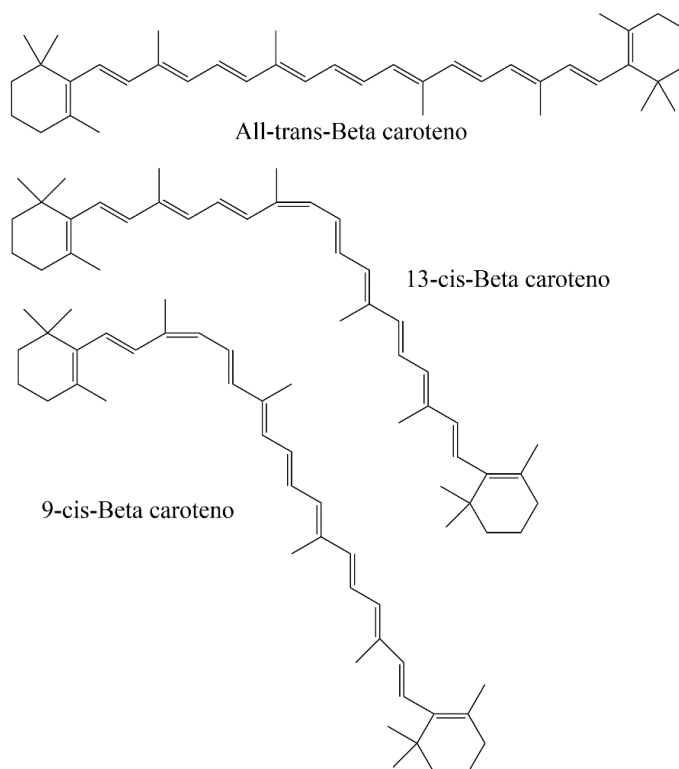
Figura 1 - Estruturas químicas dos carotenoides β -caroteno (a), licopeno (b), luteína (c) e astaxantina (d).



Por apresentar uma cadeia altamente insaturada, os carotenoides tornam-se bastante suscetíveis a isomeração e oxidação. Fatores como calor, acidez e luz podem promover a isomeração de carotenoides trans (forma usual) para conformações cis (Figura 2). Esses fatores podem ainda, dependendo da concentração de oxigênio presente no meio, estimular a degradação oxidativa, sendo que tanto o processo de isomeração quanto a

oxidação levam a perda de cor, atividade provitamina A e antioxidante (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Figura 2 - Isômeros *trans* e *cis* de β -caroteno.

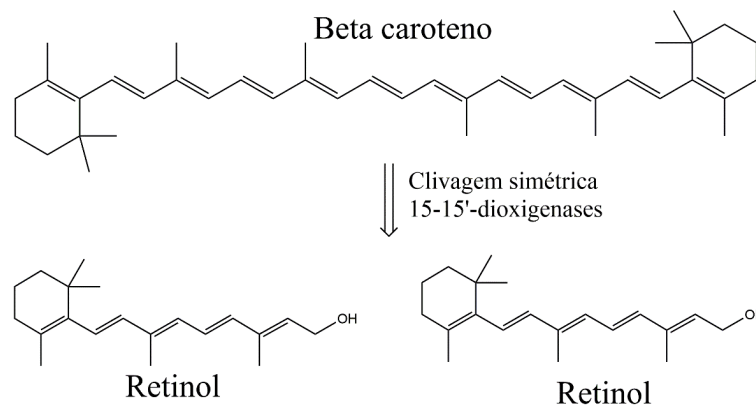


As principais funções bioquímicas dos carotenoides são determinadas por sua longa cadeia de duplas ligações conjugadas (3 a 15 ligações) que também é responsável por seu espectro de cor, visto que, o comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção e a cor da molécula (WEEDON, 1995 citado por FRASER; BRAMLEY, 2004). Carotenoides que possuam um anel β , sem grupos funcionais oxigenados, juntamente com uma cadeia de polieno contendo pelo menos 11 átomos de carbono, no trato intestinal humano podem ser bioconvertidos a retinol e ésteres retinil, pela ação de 15-15'-dioxigenases (Figura 3), funcionando como a maior fonte alimentar de vitamina A (TANG, 2010).

A vitamina A é um nutriente essencial para o funcionamento normal da visão, e manutenção da função celular, integridade epitelial, produção de células vermelhas do sangue, imunidade e reprodução (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). A deficiência de vitamina A é uma grande preocupação especialmente em países de baixa renda, sendo considerada um problema de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). A estimativa em 2013 era de que 17,4 % das crianças brasileiras abaixo de 5 anos de idade e

12,3 % de mulheres em idade reprodutiva apresentavam deficiência dessa vitamina (BRASIL, 2013b).

Figura 3 - Clivagem simétrica de β -caroteno em retinol.



Dos mais de 700 carotenoides descritos, apenas 50 são precursores de vitamina A (CARDOSO et al., 2017), dentre eles o β -caroteno ($C_{40}H_{56}$) que é um dos principais carotenoides presentes na dieta, sendo o maior precursor de vitamina A. Esse carotenoide pode ser encontrado em produtos como couve, nabo, espinafre, alface, manga, melão, pimentão, abóbora, cenoura e batata-doce (BOON et al., 2010).

O número de duplas ligações conjugadas dos carotenoides, assim como a natureza e posição dos grupos substituintes afetam sua capacidade antioxidante. Por exemplo, cataxantina e astaxantina apresentam melhores atividades antioxidantes que β -caroteno ou zeaxantina. A atividade antioxidante aumenta com o aumento do número de duplas ligações conjugadas, grupos cetona e presença de anéis ciclopentano em sua estrutura (YOUNG; LOWE, 2001). Têm sido comprovado que essa capacidade antioxidante dos carotenoides pode reduzir o risco de certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e degenerativas, como Alzheimer e Parkinson (KIRSH et al., 2006; WANG et al., 2008). É importante destacar que para que os efeitos benéficos dos carotenoides sejam obtidos é necessário primeiro que eles estejam biodisponíveis ao organismo exposto, o que envolve diferentes etapas: liberação da matriz, solubilização na fase lipídica do quimo seguida de transferência para micelas mistas no intestino delgado e então absorção (MUTSOKOTI et al., 2015).

A importância comercial dos carotenoides pode ser observada pelo crescimento de seu mercado, que em 2017 movimentou aproximadamente US\$1,5 bilhões, com estimativa de crescimento anual de 5,7 %, alcançando US\$2,0 bilhões até 2022 (BCC RESEARCH MARKET FORECASTING, 2018). Devido a suas importantes atividades biológicas,

interesse crescente por compostos bioativos, limitada solubilidade e alta sensibilidade, diversas linhas de trabalho vem desenvolvendo formas de proteger e facilitar o manuseio destes compostos, empregando diferentes tecnologias como a microencapsulação (BRAGA, 2016; NOGUEIRA; PRESTES; BURKERT, 2017) e a nanotecnologia (CHAARI et al., 2018).

3.2 NANOTECNOLOGIA

Um nanômetro (nm) é definido como um bilionésimo de metro (10^{-9} m), e a nanotecnologia envolve a produção, manipulação, uso e caracterização de materiais nessa escala (BUSQUETS; MBUNDI, 2017). Essa tecnologia vem auxiliando no processo de desenvolvimento de produtos em diversos setores como indústrias de microeletrônica, aeroespacial e farmacêutica (PATHAK, 2017).

Materiais projetados em nanoescala podem apresentar propriedades bem diferentes de quando estão em escalas maiores, sendo que a capacidade de produzir materiais com novas características, pode ser benéfico para muitos setores industriais e comerciais e vem sendo explorado nos últimos anos (SMISMANS; STOKES, 2017). O mercado global de nanotecnologia em 2016 era estimado em US\$ 39,2 bilhões devendo alcançar US\$ 90,5 bilhões até 2021 com uma taxa de crescimento anual composta de 18,2 %, de 2016 a 2021 (BCC RESEARCH, 2016).

Do ponto de vista regulatório, os nanomateriais são explícita e implicitamente abrangidos pela legislação da União Europeia, com o termo nanomaterial tendo sido definido em diferentes documentos com relevância regulamentar (RAUSCHER; RASMUSSEN; SOKULL-KLÜTTGEN, 2017). Países como Austrália, Canadá, China, Japão e Estados Unidos apresentam regulamentação para pontos como definição, rotulagem, caracterização, risco e toxicidade de nanomateriais (LAI et al., 2018). No Brasil, não existem regulamentações específicas para nanotecnologia, apesar de o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) trabalhar em um marco regulatório, que está sendo desenvolvido com ajuda de pesquisadores e empresários (FANTIN, 2018). Adicionalmente, desde 2013 vinha tramitando na assembleia legislativa um projeto de lei (PL 5133/2013) que visava regulamentar a rotulagem de produtos da nanotecnologia e de produtos que fazem uso de nanotecnologia (BRASIL, 2013a) porém o mesmo foi arquivado em 31 de Janeiro de 2019.

Inicialmente, o nanoencapsulamento de compostos foi desenvolvido com o objetivo de melhorar a liberação de fármacos. Por sua escala, as nanopartículas não são regidas pelas mesmas leis que regem estruturas maiores, conferindo a elas propriedades físicas e químicas muito particulares, que vêm despertando interesse na indústria de alimentos (JANA; GANDY; JANA, 2017). Diversas nanoestruturas como lipossomas (TAN et al., 2014), nanopartículas poliméricas (MIYAZAWA et al., 2015), nanopartículas lipídicas sólidas (MARCIAL; CARNEIRO; LEITE, 2017), carreadores nano estruturados (MARCIAL; CARNEIRO; LEITE, 2017) e nanoemulsões (SALVIA-TRUJILLO et al., 2018) são descritas na literatura.

Essas nanoestruturas podem ser utilizadas na área de alimentos com diferentes objetivos, oferecendo soluções promissoras para a melhora de características como estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade de compostos ativos (CHUANG et al., 2018). Além disso, auxiliam também na utilização de compostos que apesar de características nutricionais excelentes, possuem características sensoriais desagradáveis, como por exemplo, a melhora da aceitação sensorial de produtos como a capsaicina, substância oriunda da pimenta, com interessante atividade antimicrobiana porém com elevada pungência e de sabor e aroma intenso (AKBAS; SOYLER; OZTOP, 2017). Outra substância que apresenta características sensoriais intensas e alta susceptibilidade, que limitam sua utilização em alimentos, é o óleo de peixe.

Lipossomas (tamanho médio de 409 nm) de óleo de peixe foram utilizados para enriquecimento de iogurte por Ghorbanzade et al. (2017), levando a redução da acidez, sinérese e índice de peróxidos do produto desenvolvido em comparação com os controles (sem adição de óleo e com adição direta de óleo). Além disso, as amostras fortificadas com nanolipossomas, após 21 d de armazenamento, apresentaram maiores conteúdos de DHA (ácido docosahexaenoico) e EPA (ácido eicosapentaenoico) do que os iogurtes adicionados diretamente do óleo. Sensorialmente as amostras de iogurte fortificadas com os nanolipossomas não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) das amostras controle (sem adição de óleo de peixe) para os parâmetros sabor, aroma, cor, textura e aceitação global, enquanto que os iogurtes adicionados diretamente de óleo de peixe, apresentaram médias estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) em comparação a amostra controle.

Visando reduzir a oxidação de óleo de girassol, Assis et al. (2018) desenvolveram filmes de amido de mandioca adicionados de β -caroteno não encapsulado e de nanocápsulas lipídicas de β -caroteno (NCB) com tamanho médio de 286 nm. A adição de β -caroteno não encapsulado afetou negativamente as propriedades mecânicas (resistência à tração e

alongamento) dos filmes formados, visto que por sua característica hidrofóbica sua interação com a matriz aquosa é reduzida. Porém, quando foram aplicadas nos filmes as NCB, foram observados maiores valores de resistência à tração, uma vez que o nanoencapsulamento pode elevar a solubilidade de compostos hidrofóbicos em água, reduzindo a incompatibilidade com a matriz polimérica. Filmes adicionados de 5 % de NCB, apresentaram maior capacidade protetora, sendo que as amostras de óleo de girassol embaladas com eles sofreram menores degradações oxidativas, com valores de peróxidos de $6,72 \pm 0,52$ mEq kg⁻¹, inferior ao estabelecido pelo *Codex alimentarius* que é de 10 mEq kg⁻¹. Além da atividade antioxidante conhecida do β -caroteno, os autores relacionam a elevada capacidade protetiva dos filmes ao fato de que a adição de nanocápsulas diminui a transmissão de luz UV (210 nm) e visível (500 nm) o que auxilia na redução da indução da oxidação lipídica.

Embalagens de polietileno adicionadas de nanopartículas de prata, dióxido de titânio e silício foram desenvolvidas para a manutenção de cogumelos *Flammulina velupes*. Após 15 d de estocagem a 4 °C e umidade relativa de 90 %, os cogumelos estocados nas embalagens com nanocompósitos apresentaram melhor aparência, redução da oxidação e menor perda de massa, em comparação aos cogumelos estocados em embalagens desenvolvidas somente com polietileno e sem embalagem (SHI et al., 2018).

Nanoestruturas além de auxiliarem na funcionalização de embalagens são também estudadas para enriquecimento de produtos alimentícios. Bsgherpour et al. (2017) descrevem a utilização de carreadores nanoestruturados (tamanho médio de 165 nm) do fitoesterol β -sistosterol para enriquecimento de manteiga, visando adicionar funcionalidade a este produto. Não foram observadas alterações no índice de peróxidos e acidez do produto adicionado dos carreadores durante estocagem.

Suco de laranja fortificado com nanocarreadores de licopeno (aproximadamente 135 nm) foi comparado sensorialmente com outras duas amostras, um controle de suco sem adição de carreadores e outra de suco com adição de licopeno sem encapsulamento. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre as amostras com nanocarreadores e as amostras controle, nos termos descritores sabor residual, homogeneidade e aceitação global. Enquanto a amostra contendo licopeno não encapsulado apresentou elevação na turbidez, sabor residual e presença de partículas na boca, levando a significativa ($p < 0,05$) redução na avaliação de homogeneidade, sabor residual e aceitação total. A menor aceitação do produto adicionado de licopeno não encapsulado se deve a baixa solubilidade desse carotenoide em sistemas aquosos, o que acarreta maiores quantidades de partículas não solubilizadas, demonstrando que a incorporação de compostos lipofílicos em alimentos de base

aquosa se torna mais eficaz e viável quando aplicados sistemas em escala nanométrica (ZARDINI et al., 2018). Dentre as diversas estruturas desenvolvidas em nanoescala uma das que vem se destacando por sua aplicação em diversas áreas são as nanoemulsões.

3.3 NANOEMULSÕES

Nanoemulsões são definidas como dispersões de dois líquidos imiscíveis estabilizadas por um filme interfacial de surfactante, com gotas de diâmetro médio de 100-500 nm (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017). Os principais líquidos comercialmente utilizados são água e óleo e as emulsões podem ser classificadas como óleo em água (o/a), formada por pequenas gotas de óleo dispersas em água ou água em óleo (a/o), formadas por pequenas gotas de água dispersas em óleo. Essas dispersões podem ser produzidas em grande escala, utilizando operações comuns na indústria, o que as torna particularmente adequadas para aplicações comerciais (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

Essas nanoestruturas são utilizadas com frequência como sistemas de liberação de substâncias bioativas, como carotenoides (SHU et al., 2018), antimicrobianos (BALTA et al., 2017), óleos essenciais (KRISHNAMOORTHY et al., 2018), ácidos graxos poli-insaturados (CHEN et al., 2017a), antioxidantes (GHAYOUR et al., 2019) e vitaminas (OZTURK et al., 2014). Dentre os diferentes nanocarreadores lipídicos as nanoemulsões são uma das formas mais simples e economicamente eficazes de controlar a estabilidade e biodisponibilidade destes compostos (McCLEMENTS; XIAO, 2012). Sendo o objetivo principal facilitar a incorporação desses bioativos em alimentos, protege-los durante estocagem e auxiliar na liberação controlada no trato gastrointestinal (GUTIÉRREZ et al., 2013; TEO et al., 2017; YI et al., 2016).

Óleos essenciais como o de sálvia são conhecidamente antimicrobianos, principalmente contra patógenos Gram positivos, e o desenvolvimento de nanoemulsões formuladas com esses óleos pode auxiliar na amplificação de seu efeito sobre os micro-organismos. As concentrações mínimas inibitórias (MIC) contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Salvia multicaulis* foram 50 %, 70 %, 87,5 % e 25 % menores, respectivamente, do que as requeridas para o emprego direto do óleo de sálvia. A melhora na ação antimicrobiana de óleos essenciais nanoemulsionados ocorre devido ao pequeno tamanho das partículas, que facilita a transferência dos compostos através dos poros da membrana celular do micro-organismo (GHARENAGHADEH et al., 2017).

Os efeitos conservantes de nanoemulsão de óleo essencial de orégano em hambúrgueres de pescada foram avaliados durante 15 d a 4 °C por Asensio et al. (2018). Após 14 d, foram detectadas diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Os hambúrgueres com adição direta de óleo de orégano e com nanoemulsões de óleo de orégano apresentaram os maiores teores de EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosahexaenoico). Além disso, as amostras adicionadas de nanoemulsão apresentaram menor contagem microbiana, demonstrando que a incorporação do óleo essencial de orégano em nanoemulsões melhora a atividade de conservação dos hambúrgueres de pescada.

Os efeitos de nanoemulsão à base de óleo de girassol contendo diferentes concentrações (0,0 %, 0,5 % e 1,0 %) de óleo essencial de *Zataria* (*Zataria multiflora* Boiss.) no frescor de filés de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram avaliados por Shadman et al. (2017), através da determinação das propriedades físico-químicas e sensoriais durante o armazenamento a 4 °C. As amostras tratadas com as nanoemulsões apresentaram valores de peróxidos aproximadamente 44 % menores, após os 15 d de estocagem, do que a amostra controle. Para os teores de ácido tiobarbitúrico e nitrogênio básico volátil total (TVB-N) as amostras tratadas com nanoemulsão apresentaram valores pelo menos 35 % e 15 % menores do que a amostra controle. Do ponto de vista sensorial, a qualidade dos filés tratados com a nanoemulsão e 1 % de óleo essencial foi significativamente diferente ($p < 0,05$) em comparação com os demais tratamentos. A incorporação das nanoemulsões com o óleo de *Zataria* aumentou a aceitabilidade do sabor, odor e textura dos filés de truta, sendo considerado pelos autores uma opção para conservação de alimentos.

Nanoemulsões de ácido cinâmico aplicadas em alfaces apresentaram capacidade de reduzir 65 % da contagem de bactérias mesófilas e 61 % de bactérias psicrófilas, enquanto a amostra controle tratada somente com o ácido, apresentaram redução de 30 % e 22 % para bactérias mesófilas e bactérias psicrófilas, respectivamente (LETSIDIDI et al., 2018).

Diversos estudos descrevem a adição de nanomateriais em embalagens de alimentos, visando além da proteção física dos produtos, adicionar funcionalidade a esses invólucros. Noori; Zeynali; Almasi (2018) desenvolveram filmes de caseinato de sódio adicionados com nanoemulsões de óleo de gengibre para recobrimento de filés de peito de frango. Os filmes apresentaram interessante potencial antimicrobiano, reduzindo o desenvolvimento de bactérias psicrófilas durante 12 d de armazenamento (4 °C), assim como reduziu perdas durante o cozimento do produto e alterações de coloração.

Coberturas comestíveis baseadas em nanoemulsões de óleo essencial de orégano e fibras de tangerina (NOEFT) foram testadas quanto sua capacidade antimicrobiana durante o

armazenamento refrigerado de queijo fatiado (ARTIGAS; FANI; BELLOSO, 2017). Coberturas contendo pelo menos 2 % de NOEFT reduziram em 23 % a população de *Staphylococcus aureus* após 15 d de armazenamento. As coberturas com 2,5 % de NOEFT inibiram o desenvolvimento de bactérias psicrófilas por até 6 d e de mofos e leveduras por até 24 d de armazenamento, ampliando assim a vida útil do produto.

Esse mesmo agente antimicrobiano foi utilizado por Robledo et al. (2018) em coberturas comestíveis formadas por uma blenda de proteína de quinoa e quitosana aplicadas em tomates cereja. As amostras de tomate foram higienizadas com hipoclorito e inoculadas com *Botrytis cinérea*, um fungo responsável pela podridão cinzenta e um dos agentes de deterioração mais comum para as bagas. As amostras contaminadas foram então divididas em três grupos: sem cobertura (TI), cobertas com o filme de proteína de quinoa e quitosana (TI-C) e coberto com o mesmo filme adicionado de nanoemulsões de timol (TI-CNE). As amostras TI-CNE mostraram uma redução significativa ($p < 0,05$) no desenvolvimento do fungo após 7 d a 5 °C, em comparação as amostras controles TI e TI-C. Sendo que, a observação deste efeito inibitório no 7º dia pode estar relacionado a liberação controlada do timol.

Visando a redução do uso de corantes sintéticos, Bovi; Petrus; Pinho (2017) desenvolveram bebidas isotônicas adicionadas de nanoemulsões de óleo de buriti. Para o estudo foram desenvolvidas duas formulações, uma com adição de 100 % de corante amarelo crepúsculo e outra com substituição de 25 % do corante por nanoemulsão de óleo de buriti. Durante a análise sensorial do produto foram observadas médias significativamente ($p < 0,05$) inferiores nos parâmetros cor, aroma e sabor das amostras adicionadas de nanoemulsões em comparação as amostras padrão. A maior diferença observada foi no parâmetro sabor, o qual é descrito pelos autores como consequência do surfactante utilizado (polissorbato 80). Este defeito sensorial no produto poderia ser solucionado, segundo os autores, através de modificações nas formulações, o que demonstra a importância da continuidade do estudo para o desenvolvimento de novos produtos adicionados de diferentes formulações de nanoemulsões, em busca de uma formulação que apresente além das vantagens nutricionais, características sensoriais aceitáveis para o consumidor.

Na indústria farmacêutica as nanoemulsões são estudadas para diferentes aplicações. Um exemplo, é o desenvolvimento de filmes para liberação via transdérmica de carvedilol, composto lipofílico utilizado como antidepressivo (ALKILANI et al., 2018). As nanoemulsões de carvedilol formuladas utilizando polisorbato 20 e éter monoetílico de dietilenoglicol (em diferentes concentrações) como surfactantes e uma mistura de ácido oleico

e miristato de isopropila (3:1 v v⁻¹) como fase oleosa foram adicionadas a filmes compostos por quitosana e hidroxipropilmetilcelulose. Nos testes de liberação *in vitro*, utilizando membranas sintéticas Strat-M™ como substitutas da pele humana, foi observado que os filmes nos quais foram utilizadas as nanoemulsões como veículo para o carvedilol apresentaram elevação (1,6x) significativa ($p < 0,01$) na permeação do composto e um coeficiente de permeabilidade 1,9x maior em comparação com o filme controle (apenas com o carvedilol dissolvido no filme). Essa melhora da liberação do composto pode estar relacionada a ação intensificadora dos demais componentes, como ácido oleico e polissorbato, assim como o reduzido tamanho de partícula que facilita a aderência do fármaco a membrana, tornando do transporte mais eficiente.

Ainda na área farmacêutica, durante o tratamento de algumas doenças se faz necessário o uso de drogas com efeitos colaterais efetivos, como no caso do tratamento da toxoplasmose, no qual é utilizado sulfadiazina e pirimetamina que podem gerar efeitos colaterais como toxicidade hematológica, alergia, deficiência de ácido fólico e supressão da medula óssea (DEĞERLI et al., 2003; MCLEOD et al., 2006). Uma alternativa é o uso do composto atovaquona que possui menores efeitos colaterais, porém é altamente hidrofóbico o que reduz sua biodisponibilidade (SHUBAR et al., 2011). Visando melhorar esse aspecto, Azami et al. (2018) desenvolveram nanoemulsão com óleo de semente de uva e atovaquona (NE-AT) e compararam sua eficiência com uma suspensão de atovaquona (S-AT) contra toxoplasmose aguda e crônica em camundongos. Os autores observaram uma melhora significativa na biodisponibilidade do composto nos camundongos tratados com NE-AT, em comparação ao tratamento com S-AT. Além disso, foi observada a eliminação total de cistos cerebrais em alguns dos camundongos tratados com NE-AT e a eficiência das NE-AT comprovada pelo aumento do tempo de sobrevivência e diminuição da carga parasitária em camundongos infectados em comparação com a administração de atovaquona livre.

As nanoemulsões podem ser utilizadas no tratamento de outras parasitoses, como por exemplo a leishmaniose. Moraes et al. (2018) testaram o efeito de nanoemulsões de óleo de copaíba e andiroba (nanocopa e nanoandi) sobre *Leishmania infantum* e *L. amazonenses* em camundongos. Os autores observaram ação tóxica sobre as duas espécies, com mudanças estruturais nas células dos micro-organismos, com redução nos níveis de infecção, verificando-se efeitos benéficos em parâmetros de lesões induzidas (tamanho da lesão, carga parasitária e histopatologia), redução de carga parasitária no baço e no fígado e melhora nas características histopatológicas. Muitas outras aplicações das nanoemulsões para área farmacêutica e médica são descritas na literatura como agentes citotóxicos contra células de

câncer de boca (TUBTIMSRI et al., 2018), para desenvolvimento de mucoadesivos intranasais para liberação de medicamentos cerebrais (ABDOU; KANDIL; MINIAWY, 2017), como promotores de permeação cutânea de medicamentos (ARANTES et al., 2017; ARGENTA et al., 2018; KACI et al., 2018) entre outros.

Além do uso na indústria de alimentos e farmacêutica, as nanoemulsões podem ser utilizadas em outras áreas, como na petroquímica, onde existem trabalhos estudando o uso de nanoemulsões na liberação controlada de inibidores de asfaleno. Esses compostos orgânicos presentes no petróleo são altamente instáveis e tendem a precipitar dentro de reservatórios, poços e instalações, o que afeta de forma severa a qualidade e custo da produção de petróleo (ALCÁZAR-VARA; ZAMUDIO-RIVERA; BUENROSTRO-GONZÁLEZ, 2016). A forma mais comum de lidar com esse problema é o uso de inibidores de asfaleno, porém dessa forma uma grande quantidade de compostos químicos são adicionados aos reservatórios, elevando o custo do restante do processo (BOUTS et al., 1995). Visando reduzir esse problema Alhreez; Wen, (2018) testaram a eficácia e desempenho da liberação controlada do inibidor ácido dodecil benzeno sulfônico – DBSA em três casos: aplicação direta de DBSA, nanoemulsões (formuladas com xileno como fase oleosa, Tween 80 e ácidos sulfônicos como surfactantes, através do método de ultrassom) sem DBSA (brancas) e com DBSA. O uso de nanoemulsões permitiu uma redução de 95 % na quantidade de inibidor necessário para estabilizar o asfaleno em comparação a aplicação direta do DBSA, triplicou o tempo de sedimentação do asfaleno e reduziu até 75 % da espessura da camada de precipitação do asfaleno.

Na área ambiental nanoemulsões podem ser utilizadas para controle de insetos, como por exemplo mosquitos. Nanoemulsões de óleo de neem exibiram efeito ovicida e larvicida contra os mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex tritaeniorhynchus*, sendo considerada potencialmente biosegura por não apresentar efeito sobre espécies não-alvo (bactéria *Enterobacter ludwigii*) e nem fitotoxicidade (teste realizado com arroz) (MISHRA et al., 2018). Muitas outras aplicações para as nanoemulsões podem ser encontradas na literatura, nas mais diferentes áreas, demonstrando toda a potencialidade dessas nanoestruturas.

3.4 ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES

As nanoemulsões podem ser caracterizadas por três parâmetros básicos: tamanho hidrodinâmico da partícula, índice de polidispersão (IPD) e carga superficial. O tamanho de partícula é uma de suas características mais importantes, uma vez que influencia suas

características ópticas, reológicas, de estabilidade e liberação, bem como sua ação biológica (McCLEMENTS; RAO, 2011). O IPD é uma medida adimensional entre 0 e 1 (YUAN et al., 2008) e reflete a distribuição do tamanho das partículas na formulação. A carga superficial é comumente medida pelo potencial ζ , que representa o potencial eletro-cinético em sistemas coloidais (KIM et al., 2012). Valores de potencial ζ superiores a ± 30 mV indicam que as cargas elétricas no sistema são suficientes para se assumir que as forças repulsivas entre as gotas são predominantes. Essa carga elétrica permite uma melhor estabilidade física (ARANCIBIA et al., 2017a).

Além da técnica escolhida para o preparo, as características físico-química e funcionais das nanoemulsões são afetadas também por fatores como composição, tamanho, carga elétrica, estado de agregação, entre outros, o que pode ser útil permitindo que suas propriedades sejam manipuladas para obtenção de características físico químicas ou fisiológicas específicas, mas também podem influenciar na estabilidade das nanoemulsões (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

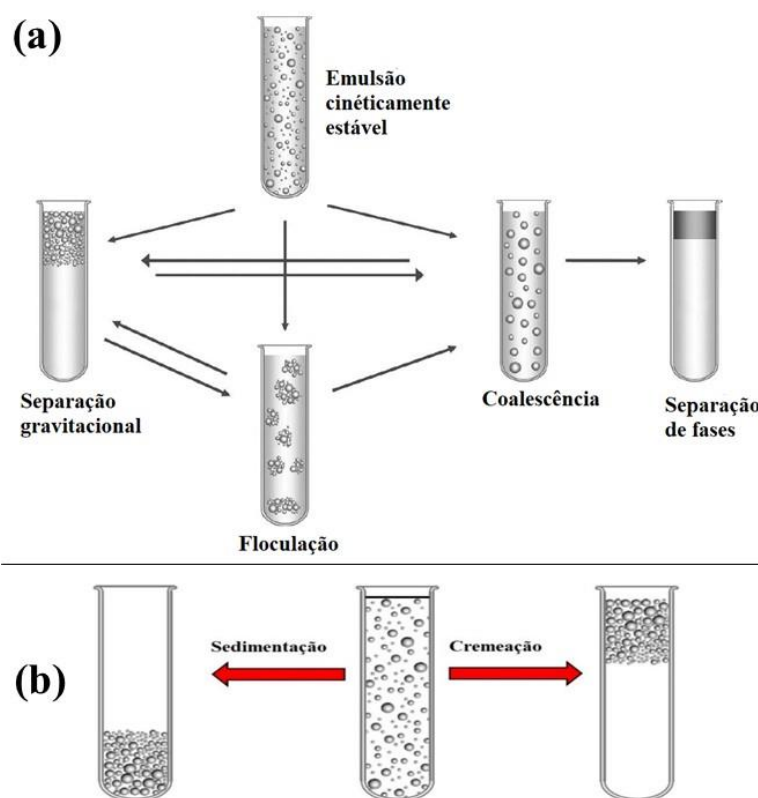
Segundo Zhang; McClements (2018) o termo estabilidade representa a capacidade das emulsões de manter suas propriedades ao longo do tempo. Devido às interações moleculares desfavoráveis que ocorrem na interface óleo-água, consequência do efeito hidrofóbico que reduz a área de contato entre as duas fases, as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis (BADAWY et al., 2017).

Porém dentro de sistemas termodinâmicos existem fases conhecidas como metaestáveis, que são fases cineticamente retidas com energia livre positiva acima do estado de equilíbrio, que podem exibir propriedades superiores às suas correspondentes fases estáveis (SUN et al., 2016). As emulsões são sistemas que apresentam diferentes estados metaestáveis, assim através da redução do tamanho de partícula, por exemplo, é gerada uma energia de ativação (ΔG^*) que deve ser superada antes que a emulsão atinja seu estado mais termodinamicamente favorável (MCCLEMENTS, 2015), permitindo que as nanoemulsões possuam mais estabilidade cinética (metaestabilidade) do que as emulsões convencionais (PATHAK, 2017).

Do ponto de vista de aplicações comerciais, é de grande importância que as nanoemulsões se mantenham cineticamente estáveis, principalmente quando expostas a condições ambientais durante as etapas de produção, armazenamento, transporte e utilização dos produtos aos quais são adicionadas. Sendo que, mudanças em suas propriedades podem levar a alterações de aparência, textura e na liberação dos compostos bioativos, além de afetar suas aplicações específicas (ZHANG; MCCLEMENTS, 2018).

Diversos processos de desestabilização podem ocorrer simultaneamente nesses sistemas, dentre eles separação gravitacional, floculação, coalescência e Ostwald *ripening* (TADROS et al., 2004; TAYLOR, 2003) que estão esquematizados na Figura 4 (a). A separação gravitacional pode ser de dois tipos, a cremação na qual as gotas, por possuírem menor densidade do que a fase dispersante, se movem para o topo da suspensão e a sedimentação na qual as gotas, por possuírem maior densidade do que a fase dispersante, se movem para fundo da suspensão (Figura 4 (b)), qualquer uma delas é causada pela diferença de densidade entre a fase dispersa e líquido ao seu redor (McCLEMENTS, 2015; McCLEMENTS; RAO, 2011;).

Figura 4 - Processos de desestabilização (a) e diferença entre cremação e sedimentação (b).



Fonte: Adaptadas de McClements (2015) e Zhang; McClements (2018)

Os processos de floculação e coalescência são duas formas de agregação e dependem da natureza das interações coloidais entre as gotas. Durante o processo de floculação duas ou mais gotas se associam umas às outras devido às forças atrativas e formam aglomerados (McCLEMENTS; RAO, 2011). As características desses aglomerados estão diretamente relacionadas a natureza das interações coloidais e hidrodinâmicas entre as gotas e

dos mecanismos de colisão (movimento browniano, gravidade ou agitação mecânica) (MCCLEMENTS, 2015).

Na coalescência ocorre a colisão das gotículas umas com as outras que por sua vez ocasiona uma fusão, originando gotas maiores. Esse processo apresenta maior dependência de forças de curto alcance e interações moleculares do que a os processos de separação gravitacional ou a floculação. A tendência à coalescência é de forma geral determinada pelo mecanismo físico responsável pelo encontro das gotículas (movimento browniano, cisalhamento simples, turbulência e gravidade), a natureza das interações entre as gotículas (forças coloidais e hidrodinâmicas) e a resistência do filme de estabilizante (MCCLEMENTS, 2015).

Outro processo é a desestabilização por Ostwald *ripening*, processo no qual ocorre um gradiente de concentração entre as gotas, devido à diferença de curvatura, principalmente em amostras polidispersas e na presença de compostos, como os álcoois que elevam a solubilidade dos lipídeos, fazendo com que a fase dispersa se difunda das gotas pequenas (maior curvatura) para as gotas maiores (menor curvatura) (MCCLEMENTS, 2015).

Em comparação com emulsões convencionais, devido ao tamanho reduzido das partículas, as nanoemulsões apresentam boa estabilidade contra os processos de separação gravitacional, floculação e coalescência, sendo que alguns autores descrevem o mecanismo de Ostwald *ripening* como principal gerador de instabilidade de emulsões na escala nanométrica (BADAWY et al., 2017). A força motriz para o mecanismo de Ostwald *ripening* é o fato de que a solubilidade em água de moléculas de óleo dispersas em uma gota esférica aumenta com a diminuição do raio pela Equação 1 (ZHANG; McCLEMENTS, 2018):

$$S(r)=S(\infty)e^{\frac{2\gamma V_m}{RT r}}=S(\infty)e^{\frac{\alpha}{r}} \quad (1)$$

Onde: $S(\infty)$ é a solubilidade em água das moléculas de óleo para um sistema água-óleo planar; $S(r)$ é a solubilidade em água das moléculas de óleo quando estão presentes dentro de uma gotícula esférica de raio r ; $\alpha = \frac{2\gamma V_m}{RT}$ é uma escala de comprimento característica; V_m é o volume molar das moléculas de óleo e γ é a tensão interfacial óleo - água.

De forma simplificada a Equação 1 descreve que a concentração de moléculas de óleo em contato com a água será maior para quanto menor for o raio da gota. Assim é gerado o gradiente de concentração que faz com que o óleo disperso na água se mova da superfície

das gotas menores para a das maiores, levando a um aumento geral no tamanho médio hidrodinâmico das gotas durante o armazenamento (ZHANG; MCCLEMENTS, 2018).

O conhecimento dos mecanismos mais importantes de instabilidade das nanoemulsão assim como os fatores que podem auxiliar o seu controle são fundamentais para permitir projetar sistemas com características de estabilidade apropriadas. Dentre alguns desses fatores, podem ser destacados o tipo de lipídio utilizado, o surfactante escolhido assim como as condições de armazenamento das nanoemulsões após o preparo.

3.4.1 Lipídios

Para o desenvolvimento de nanoemulsões podem ser utilizados lipídios de cadeia longa (XU; MUKHERJEE; CHANG, 2018), média (TAARJI et al., 2018) e curta (SHAO et al., 2018) puros ou em blendas (YANG et al., 2018). Uma lista de alguns lipídios utilizados no desenvolvimento de nanoemulsões está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Lipídios utilizados para formulação de nanoemulsões de acordo com o tamanho de cadeia dos seus principais componentes.

Lipídio	Referência	Lipídio	Referência
Óleo de amendoim	Xu; Mukherjee; Chang (2018)	Óleo de milho	Ryu et al. (2018)
Óleo de soja	Shu et al. (2018)	Óleo de canola	Kaci et al. (2018)
Óleo de girassol	Li et al. (2018)	Azeite de oliva	Polychniatou; Tzia (2018)
Óleo de peixe	Taarji et al. (2018)	Óleo de palma	Ryu et al. (2018)
Óleo de buriti	Bovi; Petrus; Pinho (2017)	Óleo de abacate	Arancibia et al. (2017a)
Óleo de coco	Pengon et al. (2018)	D-limoneno	Sonu et al. (2018)
Óleo de cravo	Shao et al. (2018)	Óleo de tomilho	Ryu et al. (2018)
Óleo de alecrim	Llinares et al. (2018)	Óleo de canela	Ghani et al. (2018)
Óleo de menta	Bakry et al. (2017)	Óleo de sálvia	Gharenaghadeh et al. (2017)

A escolha dos componentes é de grande importância pois as características físico-químicas (solubilidade em água, tensão interfacial, viscosidade, entre outras) da fase oleosa podem afetar a formação, estabilidade e propriedades das nanoemulsões (MCCLEMENTS; RAO, 2011; TADROS et al., 2004). Além disso, segundo Zhang; McClements (2018) o uso de triacilgliceróis de cadeia longa originam nanoemulsões mais estáveis ao processo de Ostwald *ripening* devido à baixa solubilidade desses ácidos graxos em água.

Com objetivo de aproveitar essa característica, Ryu et al. (2018) avaliaram o impacto de lipídios de cadeia longa na formação, estabilidade e atividade antimicrobiana de nanoemulsões de óleo de tomilho. Utilizando o óleo de milho, o diâmetro médio das gotículas das nanoemulsões aumentou à medida que a concentração de óleo de milho aumentou. A atividade antimicrobiana das nanoemulsões também sofreu influência da presença do óleo de milho, sendo que conforme sua concentração aumentou, a atividade antimicrobiana reduziu. Um dos motivos dessa redução da atividade está ligado as diferenças no tamanho de partícula, que podem ter influenciado na capacidade das gotas de óleo de tomilho de interagir com a superfície das células microbianas.

Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) também podem ser empregados como inibidores de maturação, reduzindo os processos de Ostwald *ripening*. Em nanoemulsões de óleo de canela, a adição de 70 e 60 % (m m^{-1}) de Miglyol 812 (um tipo de TCM) permitiu o desenvolvimento de gotas de tamanho menores (107,30 e 100,70 nm, respectivamente) com distribuições de tamanho monomodais e valores de IPD inferiores a 0,2 em comparação a formulações desenvolvidas com 0, 20, 60 e 100 % de óleo de canela, as quais algumas apresentaram separação de fases visível durante o armazenamento e distribuição multimodal de tamanho de partícula (CHUESIANG et al., 2018).

Fan et al. (2017a) utilizaram três óleos Neobee 1053 (C8 e C10 como principais ácidos graxos), óleo de coco (C12 como principais ácido graxo) e óleo de milho (C18 como principais ácidos graxos) para avaliar o efeito do tamanho das cadeias dos ácidos graxos e o grau de saturação dos óleos na lipólise e bioacessibilidade de β -caroteno durante digestão *in vitro*. Foi observada uma correlação inversa entre a extensão da lipólise e o tamanho da cadeia dos ácidos graxos, com lipólises de 87,3 % para Neobee, 64,6 % para o óleo de coco e 51,4 % para o óleo de milho. Porém a bioacessibilidade apresentou comportamento inverso, quanto maior a cadeia dos ácidos graxos maior a bioacessibilidade (óleo de milho > óleo de coco > Neobee), sendo que a liberação do carotenoide foi positivamente proporcional a insaturação e comprimento das cadeias de ácidos graxos. Isso ocorre porque nesse caso são

geradas micelas maiores, facilitam a transferência do composto melhorando a solubilização do carotenoide.

Nanoemulsões com lipídios de cadeia longa (TCL - óleo de milho), média (TCM - Miglyol 812) e curta (TCC - Tributirina) preparadas pelo método de microfluidização por Ahmed et al. (2012), apresentaram variação de tamanho e estabilidade ocasionadas pelo tamanho da cadeia lipídica. Tamanho de partículas inferiores a 200 nm e IPD menores que 0,2 foram obtidos em nanoemulsões formuladas como TCL E TCM, porém nas nanoemulsões com TCC como fase oleosa os tamanho de partícula foram superiores a 1900 nm com IPD indicando perfil polidisperso das partículas (maior que 0,6), e separação de fases sendo observada após apenas 24 h de estocagem. Quando as nanoemulsões foram formuladas com uma blenda de TCM e TCC (50:50) os tamanhos de partículas novamente foram inferiores a 200 nm, com estabilidade ao crescimento de partícula e separação gravitacional. Os tamanhos de cadeia dos lipídios também afetaram significativamente a liberação de ácidos graxos livres durante a simulação de processos digestivos, com taxa inicial de liberação mais rápida para as emulsões contendo TCC ou TCM:TCC do que para as emulsões contendo TCM ou TCL. Esse comportamento pode ocorrer por três motivos, a solubilidade do TCC em água permite que o processo de digestão comece na fase aquosa; a menor cadeia de hidrocarbonetos facilita a ação das lipases ou porque os produtos da digestão dos TCC tendem a deixar a superfície das gotas de forma mais fácil do que os produtos da degradação dos TCM e TCL. A biodisponibilidade de curcumina encapsulada nas nanoemulsões também foi superior com o aumento do tamanho da cadeia dos lipídios.

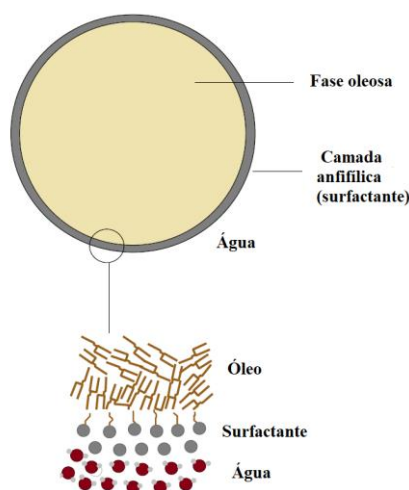
3.4.2 Surfactantes

Segundo Rosen; Kunjappu (2012) surfactantes (também chamados de emulsificantes ou tensoativos) são substâncias que quando presentes em pequenas concentrações, possuem a propriedade de adsorver nas superfícies ou interfaces do sistema, alterando sua energia livre.

São moléculas compostas por duas partes, uma hidrofílica, que interage com a fase aquosa e outra lipofílica que fará a interação como a fase oleosa do sistema (SANTOS; MING; GONÇALVES, 2014), também conhecidas como estruturas anfipáticas ou anfífilas (ROSEN; KUNJÁPPU, 2012). Assim, esses compostos são utilizados para estabilizar emulsões, sendo adsorvido na interface da gota, formando uma camada ao seu redor, como pode ser observado na Figura 5 (PATHAK, 2017). Esses compostos desempenham papel de

destaque na estabilização das nanoemulsões visto que os processos de floculação e coalescência são evitados quando as interações repulsivas superam as interações atrativas como as forças de Van der Waals, por exemplo (CHAARI et al., 2018; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

Figura 5 - Esquema estrutural de uma gota de emulsão óleo em água.



Fonte: Adaptado de Pathak (2017).

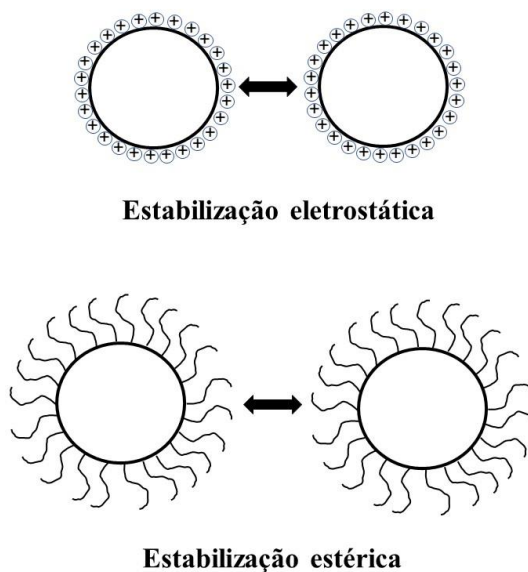
Essas interações repulsivas podem ser de dois tipos: eletrostáticas ou estéricas (Figura 6). A estabilização eletrostática ocorre quando as forças eletrostáticas repulsivas, geradas pelas cargas na superfície, superam as forças atrativas de Van der Waals e interações hidrofóbicas entre as partículas. A estabilização estérica é um termo genérico usado para descrever a estabilização de sistemas coloidais que ocorre pela mobilidade das cadeias dos componentes (NAPPER, 1977).

Essas substâncias tensoativas podem ser classificadas de diferentes formas, por exemplo, quanto sua origem (naturais ou sintéticos) e quanto a carga elétrica de sua porção hidrofílica, que pode ser: aniônica (a superfície ativa da molécula tem carga negativa); catiônica (a superfície ativa da molécula possui carga positiva); *zwitteriônica* (a superfície ativa pode ter cargas negativas e positivas) e não iônica (a superfície ativa da molécula não possui carga iônica aparente) (ROSEN; KUNJÁPPU, 2012).

Além disso, o equilíbrio entre a parte hidrofílica e hidrofóbica da molécula, chamado de valor HLB, proposto por Griffin (1949) também pode ser uma forma de classificação. Nesse sistema cada surfactante recebe um valor numérico (chamado de HLB) que é a expressão do balanço entre o tamanho e força das partes hidrofílicas e lipofílicas do

tensoativo. Quanto menor o valor do HLB (abaixo de 9), mais lipofílico é o surfactante, valores de HLB superiores a 11 caracterizam compostos hidrofílicos, o que determinará se ele será utilizado em emulsões do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (SANTOS; MING; GONÇALVES, 2014).

Figura 6 - Estabilização eletrostática e estérica.



Industrialmente é comum o uso de blends de surfactante, sendo que essa mistura é mais eficiente quando feita uma combinação de proporções adequadas entre emulsificantes lipofílicos e hidrofílicos. Quando dois surfactantes de valores HLB conhecidos são usados juntos com um determinado lipídio, existe uma relação ideal para que seja obtida a melhor eficiência do processo de emulsificação, que é expressa pela Equação 2 (GRIFFIN, 1949):

$$\frac{(W_A \times HLB_A) + (W_B \times HLB_B)}{W_A + W_B} = HLB_{\text{óleo}} \quad (2)$$

Onde: W_A é a massa do surfactante A; W_B é a massa do surfactante B; HLB_A e HLB_B são os valores HLB dos surfactantes A e B; $HLB_{\text{óleo}}$ é o valor requerido de HLB do óleo para o tipo de emulsão que está sendo estudada.

A escolha do surfactante é um ponto bastante importante também pelo fato de que o tipo e a concentração desses componentes podem afetar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões dependendo das condições ambientais. As propriedades interfaciais do

surfactante que afetam sua habilidade de formar e estabilizar nanoemulsões, devem ser levadas em consideração. A taxa com a qual o emulsificante adsorve na interface é um importante fator para a formação das emulsões (OZTURK; MCCLEMENTS, 2016).

Nanoemulsões formuladas com proteína do soro de leite ou lactoferrina apresentaram tamanho de partículas inferiores ($p < 0,05$) e maior estabilidade física durante aquecimento (90 °C por 15 min) em comparação com nanoemulsões formuladas usando Tween 20. Porém no mesmo estudo foi observado que as nanoemulsões com proteína do soro de leite apresentaram desestabilização em pH próximo ao seu ponto isoelétrico (4,5-5) devido a redução da repulsão eletrostática, assim como na presença de CaCl_2 em concentrações próximas a 10 mM, isso porque ocorre triagem da carga negativa e formação de pontes de cálcio levando à agregação de gotículas. Porém as amostras produzidas com lactoferrina e Tween 20 não tiveram sua estabilidade afetada pelo pH ou presença de até 90 mM de CaCl_2 . Isso ocorre devido ao processo de estabilização dessa formulação ser dominado por repulsão estérica e não eletrostática (TEO et al., 2016).

Artiga-Artigas; Lanjari-Pérez; Martín-Belloso (2018) avaliaram a influência da concentração de três surfactantes de constituição molecular distinta (Tween 20, palmitato de sacarose e lecitina) sob a estabilidade de nanoemulsões de curcumina. Foi observada influência do tipo de surfactante nos parâmetros tamanho, índice de polidispersão, potencial ζ e viscosidade. As nanoemulsões apresentaram menores tamanhos de partícula ($p < 0,05$) quando formuladas como Tween 20 (249-276 nm) em comparação às amostras formuladas com lecitina (322-400 nm) e palmitato de sacarose (350-373 nm). No parâmetro índice de polidispersão, as amostras com palmitato foram as mais polidispersas ($p < 0,05$) com valores acima de 0,5, provavelmente pela presença de ésteres de tamanho molecular diversos que interferem no processo de emulsificação, seguida pelas amostras com lecitina, com valores médios de 0,37 e Tween 20 com média de 0,26. O potencial ζ para os três surfactantes apresentou valores negativos apesar de o Tween 20 e o palmitato serem considerados não iônicos. Como era esperado os maiores valores foram encontrados nas amostras estabilizadas com lecitina (em torno de -85 mV), seguida pelas amostras com palmitato (em torno de -67 mV) e pelas amostras com Tween (em torno de -37 mV). As cargas negativas observadas nas amostras com surfactantes não iônicos são consequência de impurezas como ácidos graxos livres tanto no óleo como nos surfactantes.

A concentração e o tipo de surfactante afetaram também a viscosidade das amostras, sendo que as nanoemulsões formuladas como palmitato na concentração de 2,0 % apresentaram as maiores viscosidades (em torno de 137 mPas s^{-1}), consequência do fato de o

palmitato de sacarose ter a capacidade de formar sistemas viscosos ou semelhantes a gel, sendo estes sistemas ainda mais viscosos a baixas temperaturas e altas concentrações de surfactante (ARTIGA-ARTIGAS; LANJARI-PÉREZ; MARTÍN-BELLOSO, 2018).

3.4.3 Condições de armazenamento

Durante o desenvolvimento e ao longo da vida útil dos produtos adicionados de nanoemulsões, essas estruturas serão submetidas as mais variadas condições de armazenamento e processamento, que poderão acelerar os processos de desestabilização desses sistemas (KHALID et al., 2017; SHU et al., 2018).

Nanoemulsões de astaxantina em óleo de soja estabilizadas com dois surfactantes, saponinas ou Tween 20, foram produzidas por Chen et al. (2018). As propriedades iniciais das nanoemulsões foram similares, com tamanhos de partícula em torno de 125 nm (saponina) e 145 nm (Tween 20). Quando submetidas a pH variando de 3-8 e concentrações de CaCl_2 variando de 0-100 mM as nanoemulsões com Tween 20 apresentaram excelente estabilidade, sem sinais de separação de fases. Já as formulações com saponinas, apresentaram instabilidade em pH abaixo de 6, desestabilizando por completo em pH 3, assim como na presença de CaCl_2 , com separação de fases ocorrendo mesmo em baixas concentrações salinas, devido a redução da repulsão eletrostática. Por outro lado, o aquecimento (60, 90 e 120 °C por 30 min) não afetou a estabilidade das nanoemulsões com saponina, mas acarretou crescimento de partícula e formação de halos quando as nanoemulsões como Tween 20 foram aquecidas a 90 °C. Os teores astaxantina sofreram significativas quedas quando as nanoemulsões foram aquecidas a 90 e 120 °C independente do surfactante utilizado.

Quando armazenadas a 5 e 25 °C por 30 d, todas as nanoemulsões foram estáveis fisicamente, porém a capacidade de proteger a astaxantina foi extremamente afetada pela temperatura de armazenamento e pelo tipo de surfactante. Maiores retenções do carotenoide ocorreram durante armazenamento a 5 °C para ambos os surfactantes, porém comparando-se os dois surfactantes o uso de saponina levou perdas de apenas 5,6 % em 30 d, enquanto as nanoemulsões com Tween 20 apresentavam redução de 47,3 %, variação ligada provavelmente a capacidade antioxidante da saponina utilizada.

Nanoemulsões de D-limoneno produzidas por ultrasonificação e estabilizadas por complexos proteína de soro de leite/maltodextrinas foram submetidas a diferentes condições de processamento com objetivo de avaliar sua estabilidade. As amostras foram submetidas a variações de pH (3,0–7,0) e força iônica (0,1–1,0 M NaCl) e aos tratamentos térmicos de

pasteurização (63 °C - 30 min), *forewarming* (80 °C – 10 min), fervura (95 °C – 10 min) e autoclavagem (121 °C). Os valores de tamanho de partícula diminuíram de 127,60±4,34 nm em pH 3 para 118,10±3,42 nm em pH 7, com exceção do pH 4, onde o maior tamanho de partícula, 231,30±5,87 nm foi observado, devido a aproximação com o ponto isoelétrico do complexo proteína/maltodextrina.

Porém do ponto de vista geral as nanoemulsões foram estáveis na faixa de pH de 3-7. O potencial ζ apresentou valores positivos nos pH 3,0 e 4,0 (5,98±0,49 e 0,86±0,39, respectivamente), na faixa entre pH 5,0 e 7,0 os valores tornaram negativos. Isso ocorre porque a conjugação de proteínas do soro altera a distribuição da carga superficial da proteína, diminuindo o ponto isoelétrico. A nanoemulsão quando submetida a concentração iônica testada apresentou um pequeno aumento de partícula de 116,60±5,30 nm (controle) para 139,10±3,42 nm (NaCl 1,0 M), porém não foram observadas desestabilizações, o que indica a dominância da repulsão estérica, cuja força é independente do ambiente iônico. Já para o potencial ζ o aumento da concentração iônica alterou as cargas elétricas das gotas (-19,64±0,23 mV nas emulsões controle para -13,02±0,78 mV nas emulsões com NaCl 1,0 M), devido à diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas. As nanoemulsões apresentaram também excelente estabilidade durante os tratamentos térmicos, sem observações de alterações de tamanho e potencial ζ (SONU et al., 2018).

Cheong; Tan; Nyam (2017) avaliaram os efeitos de três temperaturas de armazenamento (4 °C±2 °C, 25 °C±2 °C e 40 °C±2 °C) sobre a estabilidade físico-química de nanoemulsões de óleo de semente de Kenaf (*Hibiscus cannabinus*). A condição de armazenamento a 4 °C foi a que apresentou a melhor estabilidade. Nessa condição observou-se uma estabilização no tamanho de partícula após a segunda semana, sem variações significativas do IPD (manteve-se abaixo de 0,2) e do potencial ζ (em torno de -36 mV) por até 12 semanas. As amostras estocadas a 25 °C apresentaram redução significativa ($p<0,05$) no tamanho de partícula (129,87±1,27 para 121,08±2,34) enquanto as amostras armazenadas a 40 °C apresentaram um aumento ($p<0,05$) de 129,87±1,27 para 133,70±3,18 em 8 semanas de estocagem. Aumentos significativos no mesmo período ($p<0,05$) no IPD também foram observados para as duas temperaturas, de 0,12±0,01 para 0,17±0,01 (25 °C) e 0,26±0,02 (40 °C). As cargas negativas das partículas nas duas condições passaram de -36,7±1,0 para -29,4±1,0 (25 °C) e -27,3±1,3 (40 °C), indicando redução da estabilização eletrostática proporcionada pelos emulsificantes, o que levou a formação de sedimentos a partir da 4ª e 8ª semana de estocagem para as temperaturas de 40 e 25 °C, respectivamente.

Além das condições de armazenamento afetarem a estabilidade física das nanoemulsões, podem interferir e acelerar os processos de degradação dos compostos bioativos presentes nessas nanoestruturas.

Nanoemulsões de astaxantina e óleo de milho estabilizadas por saponinas foram submetidas a diferentes condições de pH, força iônica, tratamentos térmicos e armazenamento, sendo avaliado o efeito sobre a estabilidade das gotas e sobre o teor de carotenoide. As nanoemulsões não apresentaram variação significativa de tamanho ($p > 0,05$) quando aquecidas de 30-90 °C, sem observação de processos de cremação, ligada a forte estabilização eletrostática gerada pelos grupamentos carboxílicos presentes nas estruturas das saponinas, confirmada pelos valores de potencial ζ em torno de -35 mV. As nanoemulsões foram altamente estáveis em valores de pH de 7 a 9, no entanto, tornaram-se instáveis com um aumento significativo ($p < 0,05$) de tamanho a pH 4-6, com formação de uma fase oleosa em pH 3. A carga elétrica das gotículas foi afetada diretamente pelo pH, sendo o potencial ζ fortemente negativo (-40 mV) em pH 9 e ligeiramente negativo (-13 mV) em pH 4. Boa estabilidade de nanoemulsões foi observada apenas em baixos níveis de NaCl (≤ 25 mM), uma vez que não houve mudança no tamanho das partículas. Porém, as nanoemulsões tornaram-se propensas a coalescência em maiores concentrações salinas, com separação de fases em concentrações de 125 mM. Foi avaliado também a estabilidade das nanoemulsões durante 15 d de armazenamento a 5, 25 e 40 °C. As nanoemulsões apresentaram uma boa estabilidade contra o crescimento das gotas e processos de cremação durante o armazenamento nas três temperaturas testadas, porém a taxa de degradação da astaxantina aumentou proporcionalmente ao aumento da temperatura (SHU et al., 2018).

Nanoemulsões de catequina com óleo de girassol produzidas por homogeneização à alta pressão, foram armazenadas em diferentes temperaturas (4, 27 e 37 °C), pH (2,0; 4,0; 5,0; 7,0; e 9,0) e concentrações de NaCl (até 100 mM), para verificação de sua estabilidade física, sendo avaliados durante oito semanas os parâmetros tamanho de partícula, microestrutura, índice de cremação, viscosidade aparente, oxidação lipídica, polifenóis e eficiência de encapsulamento (GADKARI; SHASHIDHAR; BALARAMAN, 2017). Segundo os autores existe uma relação direta entre a variação no tamanho das gotas, o índice de cremação e a viscosidade aparente das emulsões. O tamanho da partícula foi afetado pela temperatura, sendo que as amostras estocadas a 37 °C apresentaram a maior variação, de $260 \pm 0,01$ nm para $2,27 \pm 0,02$ μ m após 8 semanas. Esse parâmetro foi também afetado pela alcalinidade do meio, sendo que após 4 semanas nos pH 7 e 9 o tamanho de partícula passou para 390 nm. A concentração salina apresentou efeito em toda a faixa estudada, sendo mais

acentuada em 50 e 100 mM onde os tamanhos, após oito semanas, eram de $1,38 \pm 0,03 \mu\text{m}$ e $4,48 \pm 0,32 \mu\text{m}$, respectivamente, consequência do aumento da viscosidade aparente ocasionada pela ação neutralizante do sal sobre as forças ativas de superfície. O aumento da temperatura e pH na faixa alcalina elevaram também as taxas de degradação das catequinas assim como a expulsão do bioativo de dentro das gotas, reduzindo o teor de composto encapsulado.

Gadkari; Shashidhar; Balaraman (2017), avaliaram também o efeito de duas formas de tratamento térmico: baixa temperatura/longo tempo (LTHT – 63°C por 30 min) e alta temperatura/curto tempo (HTST - 95°C por 10 min). A variação de tamanho de gota observada foi maior para o tratamento LTHT ($260 \pm 0,01 \text{ nm}$ para $1,82 \pm 0,05 \mu\text{m}$) do que para o tratamento HTST ($260 \pm 0,01 \text{ nm}$ para $303 \pm 0,02 \text{ nm}$). A nanoemulsão apresentou a capacidade de proteger o extrato rico em catequinas durante o processamento térmico, com menor alteração química em comparação ao extrato livre, que apresentou uma redução significativa do bioativo após os processamentos térmicos.

Nanoemulsões de óleo de cravo e canela foram submetidas a centrifugação a $10.000 \times g$ por 20 min, estocagem a 25 , 37 e 60°C por um mês e aquecidas a 80 , 90 e 100°C por 30 min. Após a centrifugação o sistema manteve a aparência sem alterações significativas ($0 > 0,05$) no tamanho da partícula, assim como após um mês de estocagem, mantendo valores de IPD de $0,22$ a $0,29$ mesmo a 60°C . Quando aquecidas a 80°C as nanoemulsões mantiveram-se estáveis, sem mudanças visuais. Quando a temperatura superou os 90°C o sistema tornou-se turvo, porém com a temperatura retornando a valores inferiores a 90°C a nanoemulsões retornou a seu aspecto visual inicial, como tamanhos de partículas em torno de 9 nm e IPD variando entre $0,19$ e $0,33$, sugerindo que as gotas de nanoemulsão poderiam recuperar seu estado original (ZHANG et al., 2017).

Como pode ser observado a estabilidade das nanoemulsões não está ligada apenas a um fator, mas a vários, passando pela técnica de preparo, surfactante utilizado, composição da fase oleosa e condições de armazenamento, sendo então a cada nova formulação necessário avaliar a estabilidade das nanoemulsões, e assim poder determinar suas potenciais aplicações.

3.5 PRODUÇÃO DE NANOEMULSÕES

Devido ao papel dominante do efeito hidrofóbico a interação das moléculas de óleo e água na interface é fortemente desfavorável do ponto de vista termodinâmico (McCLEMENTS, 2015). Assim as emulsões não são formadas espontaneamente, por isso

além do óleo, água e surfactante, a formação das gotas exige que uma energia seja aplicada ao sistema. Quanto menor o tamanho da gotícula (abaixo da escala micrométrica nesse caso) maior a quantidade de energia requerida (CARPENTER; SAHARAN, 2017; TADROS et al., 2004).

A maior demanda por energia para a formação das nanoemulsões em comparação com emulsões pode ser entendida considerando-se a pressão de Laplace (Equação 2), que é a diferença de pressão entre a parte interna e externa da gota (TADROS et al., 2004):

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (2)$$

Onde: R_1 e R_2 são os raios principais de curvatura da gota, sendo que para gotas esféricas assume-se que $R_1 = R_2 = R$, assim:

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R} \quad (3)$$

Para reduzir uma gota a gotas menores é necessária uma forte deformação o que eleva o valor de p , sendo assim, se $R_a > R_b$, o estresse para deformar uma gota com R_a é menor do que para uma gota com R_b , como esse estresse é transferido pelo líquido circundante via agitação, quanto maior o estresse necessário maior a agitação requerida o que eleva a energia exigida para a produção de gotas menores (TADROS et al., 2004).

Para que uma gota seja quebrada durante a homogeneização, as forças disruptivas devem exceder as forças interfaciais e essa magnitude pode ser caracterizada pelo número de Weber que relaciona as forças disruptivas pelas forças interfaciais. As gotas tendem a ser rompidas quando o número de Weber excede algum valor crítico (em torno da unidade), que depende das características físicas das fases aquosa e de óleo (MCCLEMENTS, 2015).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a fabricação de nanoemulsões, sendo geralmente classificadas como de baixa ou alta energia. Técnicas de baixa energia são baseadas na formação das gotículas pela alteração da composição do sistema ou das condições ambientais (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018; PATHAK, 2017), como por exemplo os processos de inversão de fases por composição (ABDOU; GALHOUM; MOHAMED, 2018) e inversão de fases por temperatura (CHUESIANG et al., 2018).

Técnicas que empregam alta energia, que são as mais utilizadas na produção industrial de nanoemulsões, baseiam-se em dispositivos mecânicos que geram intenso fluxo

de cisalhamento, turbulento e cavitacional (McCLEMENTS; JAFARI, 2018; PATHAK, 2017), reduzindo o tamanho das gotículas, como por exemplo os microfluidizadores (ARTIGA-ARTIGAS et al., 2018), sonicadores (AKBAS; SOYLER; OZTOP, 2018; NOORI; ZEYNALI; ALMASI, 2018) e homogeneizadores à alta pressão (SALVIA-TRUJILLO et al., 2018).

Segundo McClements; Jafari (2018) a escolha do método de fabricação de nanoemulsões depende da natureza dos materiais a serem homogeneizados, particularmente o tipo de óleo e surfactante assim como dos atributos físico-químicos e funcionais desejados (características ópticas, reológicas, de estabilidade e de liberação).

3.5.1 Homogeneização à alta pressão (HAP)

A homogeneização à alta pressão (HAP) foi originalmente empregada na indústria láctea na etapa de homogeneização dos glóbulos de gordura (HAYES; KELLY, 2003), porém passou a ser empregada para outras finalidades como destruição de micro-organismos (DONSÌ et al., 2009), ruptura celular para recuperação de biocompostos (YAP et al., 2015), inativação de enzimas (WELTI-CHANES; OCHOA-VELASCO; GUERRERO-BELTRÁN, 2009), método para formulação de produtos com reduzido teor de gordura (AGANOVIC; BINDRICH; HEINZ, 2018), pré-processamento para melhora da biodisponibilidade de compostos (MUTSOKOTI et al., 2015) e desenvolvimento de nanocarreadores (QIAN; McCLEMENTS, 2011).

O homogeneizador à alta pressão é formado basicamente por uma bomba de deslocamento positivo de alta pressão, geralmente com pistões triplos para minimizar as flutuações de pressão e uma válvula de homogeneização do tipo *drop and lift* (PHIPPS, 1975). Durante a HAP uma emulsão primária é pressionada por um orifício estreito alcançando alta velocidade e gerando alta energia devido aos processos de cisalhamento, impacto e cavitação, seguida de uma expansão praticamente instantânea, que ocasiona uma partição nas gotas. Isso faz com que os diâmetros das gotas geradas diminuam sistematicamente com o aumento da taxa de cisalhamento (KOURNIATIS et al., 2010). Essa técnica é considerada muito eficaz devido a algumas vantagens: formação de partículas com baixa polidispersão, possibilidade de utilizar alta concentração lipídica, não necessitar de solventes orgânicos, além da possibilidade de aumento de escala para produção industrial (MISTRY; MOHAPATRA; DASH, 2012).

Um dos pontos importantes é a geração de calor durante a HAP, o que poderia causar a degradação de compostos bioativos. Nanoemulsões de astaxantina formuladas com três concentrações do carotenoide (0,5; 2 e 4 %) produzidas por HAP não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre a quantidade de astaxantina antes e depois do processo de homogeneização (AFFANDI; JULIANTO; MAJEED, 2011). Segundo Håkansson (2019), o tempo de residência dos compostos no homogeneizador é curto em comparação as taxas de degradação tipicamente reportadas para nutrientes sensíveis à temperatura e nutracêuticos, sendo assim nenhuma degradação substancial é esperada.

El Kinawy et al. (2012) comparou dois sistemas de homogeneização um a disco e um homogeneizador à alta pressão, para a produção de emulsões de óleo de milho com 3 % de Tween 20. Após uma hora de homogeneização com o sistema a disco, foram geradas macroemulsões de tamanho de partícula de 6 μm , não sendo possível conseguir gotículas em nanoescala nem mesmo com parâmetros técnicos otimizados como alta viscosidade, alta velocidade de rotação e aumento da quantidade de emulsificante. Porém quando utilizado 3 ciclos de HAP com pressão de $3,99 \times 10^7$ Pa, a mesma formulação gerou nanoemulsões com tamanho de partícula de 200 nm. Essa diferença ocorre devido ao fato de o HAP usar não só forças de fluxo laminar e turbulento para a ruptura da gota, mas também a cavitação que ocorre dentro do equipamento.

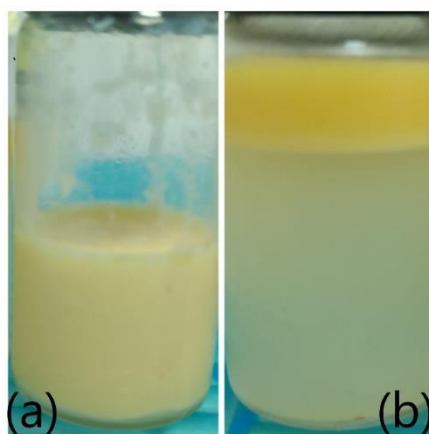
A formulação de nanoemulsões de óleo de milho e TCM estabilizadas por três tipos de lecitinas (ovo, girassol e canola) pelas técnicas de emulsificação espontânea e HAP foram avaliadas por Schuh; Bruxel; Teixeira (2014). Comparando-se as duas técnicas para cada uma das lecitinas foi observado que os tamanhos de partículas utilizando a lecitina de canola e de girassol eram superiores para o processo de HAP (296 ± 8 e 417 ± 25 nm para canola e girassol, respectivamente) do que para a emulsificação espontânea (221 ± 23 e 243 ± 24 nm para canola e girassol, respectivamente). Apesar da HAP ter sido menos eficiente na redução do tamanho das gotas, formulações mais estáveis foram geradas, uma vez que as emulsões obtidas por emulsificação espontânea apresentaram desestabilização após uma semana de preparo, enquanto as amostras produzidas com HAP permaneceram visualmente estáveis por pelo menos 30 d, o que demonstra a importância da escolha do método de preparação no desenvolvimento de emulsão estáveis

Na Figura 7 é apresentada a comparação entre emulsões, de formulação idêntica sendo a única diferença a passagem ou não pelo HAP, o que tem como consequência mudanças significativas na estabilidade físicas das emulsões. Comportamento semelhante foi observado por Ahmed et al. (2012) com emulsões de curcumina. As formulações que não

foram submetidas a HAP, chamadas de emulsões convencionais apresentaram cremeação após 4 horas de armazenamento, enquanto as formulações submetidas a HAP, chamadas de nanoemulsões, permaneceram homogêneas. Isso está relacionado a maior densidade de energia colocada no sistema pela HAP que além da redução do tamanho de partícula exerce também influência nos desempenhos dos surfactantes (CALLIGARIS et al., 2016).

Além dos parâmetros já citados anteriormente, a estabilidade e as características das nanoemulsões também são afetadas pelos parâmetros utilizados durante a HAP. O tamanho de partícula e IPD, por exemplo, está ligado à pressão e ao número de ciclos utilizado. Sotomayor-Gerding et al. (2016) avaliaram o efeito da pressão e número de ciclos nas características de nanoemulsões controle e enriquecidas com carotenoides. Os tamanhos de partícula das emulsões controles foram de 210, 168 e 164 nm quando utilizados 1, 4 e 10 ciclos de 70 MPa e 242, 134 e 126 nm para os mesmos ciclos, porém a 100 MPa. A variação do tamanho após 4 ciclos para as duas pressões não foi significativa, demonstrando que existe um limite para o efeito do número de ciclos sobre o tamanho das partículas. Fixando-se o número de ciclos em 4 foi possível observar que o aumento da pressão (5, 10, 15, 30, 70 e 100 MPa) levou a reduções no tamanho de partícula (777, 446, 323, 285, 168 e 134 nm, respectivamente), o mesmo comportamento foi observado nos valores de IPD, devido a formação de gotas mais homogêneas. A influência dos maiores tamanhos e IPD encontrados para 5 MPa foram confirmados pelos testes de estabilidade onde o índice de estabilidade dessas nanoemulsões foram 3,4x menores do que para as mesmas emulsões formuladas com 100 MPa, apresentando as maiores taxas de separação gravitacional.

Figura 7 - Estabilidade física de emulsões de mesma formulação (a) submetidas ao processo de HAP após 30 d e (b) emulsões preparadas sem HAP após 24 h.



Além do tamanho e estabilidade, outros pontos podem ser melhorados com a escolha da HAP como método de preparo. O uso de HAP para a produção de nanoemulsões de capsaicina acarretou maior eficiência de encapsulamento e taxas de retenção do que o uso de ultrassom. Também foram observados aumentos na atividade antimicrobiana das nanoemulsões contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* quando produzidas com a técnica de HAP, relacionados provavelmente a boa capacidade de retenção e eficiência de encapsulamento que facilitam a difusão do agente ativo através da parede celular bacteriana resultando em maior atividade antibacteriana em comparação com a ultrassonificação (AKBAS; SOYLER; OZTOP, 2018).

Sendo assim a escolha da técnica de homogeneização à alta pressão para o desenvolvimento de nanoemulsões é bastante vantajosa, apresentando potencial para desenvolver estruturas estáveis, com características ativas elevadas e de fácil escalonamento dentro da indústria de alimentos.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A nanotecnologia apresenta potencial para aplicação na indústria alimentícia, porém pontos como estabilidade física devem ser ainda avaliados cuidadosamente a fim de determinar as melhores estruturas e produtos a serem aplicados. Muitos fatores podem afetar a estabilidade de nanoestruturas como fatores extrínsecos e intrínsecos dos produtos, sendo nesse ponto que este trabalho busca atuar. Para isso o presente trabalho foi dividido em quatro artigos, apresentados no Capítulo III.

Este estudo, além de apresentar o potencial uso de óleos de grau alimentício em nanoemulsões e a estabilidade delas frente a diferentes processos térmicos e condições de armazenamento, contribui também para determinação da influência dessas nas características físico-químicas de dois produtos amplamente consumidos pela população, iogurte e sorvete (tipo gelato).

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

ANÁLISE DE ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES DE ÓLEOS VEGETAIS E β - CAROTENO PRODUZIDAS POR HOMOGENIZAÇÃO À ALTA PRESSÃO

RESUMO

β -caroteno é um carotenoide com importantes propriedades biológicas, mas que apresenta grande sensibilidade à degradação. Todavia, essa instabilidade pode ser superada através do encapsulamento desse composto. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi investigar a estabilidade física de nanoemulsões contendo óleos vegetais (milho soja e arroz) e β -caroteno, avaliar a cinética de degradação do carotenoide nanoencapsulado e testar a capacidade antioxidante dessas emulsões. O tamanho de partícula das nanoemulsões com e sem adição de β -caroteno foi aproximadamente 355 nm, com índice de polidispersão em torno de 0,2 e potencial ζ entre -20 e -40 mV. Não foi observada degradação significativa ($p>0,05$) de β -caroteno nas nanoemulsões com óleo de milho durante 90 d de estocagem. Interessantes informações adicionais sobre a utilização de óleo de grau alimentício no desenvolvimento de nanoemulsões foram obtidas durante os experimentos.

Palavras-chave: Arroz. Carotenoide. Milho. Nanotecnologia. Soja.

1 INTRODUÇÃO

O β -caroteno é um carotenoide laranja encontrado em plantas, animais e micro-organismos (GUL et al., 2015). Este carotenoide é utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica por apresentar propriedades biológicas como atividade pró-vitamina A e antioxidante (GRUNE et al., 2010). Os carotenoides possuem estrutura básica formada por 8 unidades de isopreno (C_5H_8) ligadas covalentemente, cuja cadeia altamente insaturada, torna estes pigmentos suscetíveis a isomerização e oxidação causadas por fatores como calor, pH, oxigênio e luz. Ambos os processos podem acarretar perda de cor, atividade antioxidante e pró-vitamínica (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A instabilidade dos carotenoides vem sendo objeto de muita pesquisa (ACHIR et al., 2016; KOTÍKOVÁ et al., 2016). Uma possibilidade para superar esse problema é o uso da nanotecnologia, que vem demonstrando habilidade em melhorar processos, embalagens e estabilidade de vários compostos, incluindo carotenoides. Entre os nanocarreadores estudados para encapsulamento de carotenoides (ANARJAN et al., 2010; GUAN; WU; ZHONG, 2016; YI et al., 2014), as nanoemulsões podem ser destacadas. Nanoemulsões podem ser descritas como dispersões óleo em água com gotas nanométricas de 100-500 nm (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017). Esse tipo de nanocarreador vem sendo utilizado para encapsular um grande número de compostos de interesse para indústria alimentícia e farmacêutica, incluindo polifenóis (SUN et al., 2015), óleos essenciais (SUGUMAR et al., 2016) e carotenoides (YI et al., 2015).

Esses nanocarreadores apresentam-se como uma boa opção para melhoria da biodisponibilidade de carotenoides. Yi et al. (2014) produziram nanoemulsões de β -caroteno, óleo de milho e caseinato de sódio (com diâmetros entre 124-368 nm) em microfluidizador. Os autores observaram que a biodisponibilidade do produto (definido como o teor de β -caroteno recuperado na fase aquosa após a digestão *in vitro*) estava relacionada com o diâmetro das gotas das nanoemulsões. Em adição, nenhuma oxidação significativa do carotenoide foi observada durante o processo a simulação *in vitro* do processo de digestão.

As nanoemulsões também apresentam a capacidade de proteger os carotenoides. Guan; Wu; Zhong (2016) avaliaram, entre outras coisas, a estabilidade química de β -caroteno presente em nanoemulsões de óleo de soja com e sem adição de lecitina e eugenol, produzidas em homogeneizador à alta velocidade. Para a avaliação da estabilidade química, nanoemulsões com lecitina, lecitina+eugenol e amostras controle de β -caroteno dissolvido em

acetato de etila foram submetidas a 30 d de estocagem a 21 °C, seguida por tratamento térmico a 60 °C e 80 °C por 8 h. Os autores observaram que as constantes de degradação do carotenoide nas nanoemulsões foram significativamente ($p < 0,05$) menores do que na amostra controle, sob todas as condições testadas.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas na preparação de nanoemulsões, como difusão do solvente (DORA et al., 2012), inversão de fases (IZQUIERDO et al., 2005), ultrassom (SUGUMAR et al., 2016) e homogeneização à alta pressão (HAP) (ANARJAN et al., 2010), tanto individualmente quanto em combinação. HAP é um método de alta energia que possui como principais vantagens não requerer solventes e já ser tradicionalmente utilizado em processos de homogeneização na indústria de alimentos (DOMÍNGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016).

Nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis com tendência a separação de fases com o tempo. Muitos fatores interferem na formação e estabilidade cinética de nanoemulsões, incluindo a concentração de surfactante (AFFANDI; JULIANTO; MAJEED, 2011), condições operacionais (ANARJAN et al., 2010) e o tipo de óleo utilizado em seu preparo (SUN et al., 2015; YI et al., 2016).

Os mecanismos mais comuns de desestabilização de emulsões são separação gravitacional, floculação, coalescência e Ostwald *ripening*. Este último é o principal mecanismo de desestabilização e envolve o aumento no número de gotas maiores devido ao movimento de moléculas de óleo das gotas menores (CAPEK, 2004) e o modelo de Lifshitz-Slezov-Wagner (LSW) é tipicamente aplicado para prever as taxas de Ostwald *ripening* (TAYLOR, 1998). Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade e cinética de degradação de nanoemulsões de β -caroteno produzidas com HAP utilizando óleos vegetais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

β -caroteno sintético (>93 %) e Span® 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Tween 20 da LabSynth, os óleos de arroz (marca Carreteiro), canola (marca Bom Preço), gergelim (marca Pазze), girassol (marca Pазze), linhaça (marca Pазze), milho (marca Liza), soja (marca Liza), e azeite de oliva (marca Nova Oliva) foram adquiridos no mercado local. Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES

Para o preparo das nanoemulsões, a fase oleosa foi composta por (relação de massa do componente por massa total de fase oleosa - $m\ m^{-1}$): 70 % de óleo e 30 % de Span® 80 e a fase aquosa foi composta por 10 mL de água e 1 % ($m\ v^{-1}$ – relação massa de surfactante por volume de fase aquosa) de Tween 20. A fase oleosa foi aquecida a 60 °C e a fase aquosa foi aquecida a 80 °C, ambas sob agitação magnética. Depois da completa dissolução das fases, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa (relação de 10:1) sob agitação magnética constante (700 rpm). A emulsão formada foi homogeneizada por 2 min a 14.500 rpm em Ultra-turrax® (T10 basic, IKA) e na sequência foi submetida a seis ciclos de 20 s a 68,9 MPa em homogeneizador à alta pressão (EmulsiFlex-C3, Avestin) (MARTÍNEZ, 2016). As amostras foram então coletadas em frascos âmbar e estocadas a 4 °C por 90 d. Para o preparo das nanoemulsões contendo β -caroteno, o carotenoide foi disperso na fase oleosa (para uma concentração final de 0,5 mg por mL de formulação final) e aquecido juntamente com a fase para auxiliar em sua dispersão.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

2.3.1 Tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (PDI) e índice de Ostwald *ripening* (W)

O tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico médio) e o índice de polidispersão (IPD) foram determinados por lespalhamento de luz dinâmico utilizando-se o equipamento Zetasizer S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, RU) em 0, 30, 60 e 90 d. As medições de tamanho de partícula foram realizadas a 25 °C após diluição adequada das amostras em NaCl 1 mM (1:100). Cada determinação de tamanho teve a duração de 300 s e foi realizada com ângulo de detecção de 90° (DORA et al., 2012). O diâmetro hidrodinâmico foi determinado usando a equação de Stokes-Einstein.

Os valores de tamanho de partícula observados durante a estocagem foram utilizados aplicando o modelo de Lifshitz–Slyozov–Wagner (LSW) para predizer o índice de Ostwald *ripening* (W), definido como a taxa de mudança do raio cúbico (volume) das partículas (CAPEK, 2004; TAYLOR, 2003) expressa pela Equação 2 como:

$$W = \frac{dr_n^3}{dt} \quad (2)$$

2.3.2 Potencial ζ

O potencial ζ foi determinado por anemometria laser doppler, utilizando-se o equipamento Zetasizer S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, RU) em 0, 30, 60 e 90 d. Para as medições do potencial ζ , as amostras foram colocadas na célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potencial ζ foram calculados como valores médios da mobilidade eletroforética, utilizando-se a equação de Smoluchowski (DORA et al., 2012).

2.4 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS VEGETAIS

Inicialmente foram selecionados, através de levantamento bibliográfico, sete óleos que poderiam ser utilizados como fase oleosa no desenvolvimento das nanoemulsões: arroz, canola, gergelim, girassol, linhaça, milho e soja. Os perfis de ácidos graxos foram determinados através de cromatografia a gás. As amostras foram esterificadas segundo método descrito por Metcalfe; Schmitz; Pelka (1966), que consiste na saponificação dos lipídios com solução metanólica de KOH (0,5 N) e catalisada por solução metanólica de trifluoreto de boro. A quantificação foi realizada segundo Massarolo et al. (2016), em cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010 Plus) equipado com injetor split/splitless, coluna capilar RTX® -1 (30 m×0.25 mmID×0.25 μ m) e detector de ionização de chama (FID). Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste na vazão de 1,25 mL min⁻¹. A temperatura do injetor e do detector foi ajustada em 260 °C. As condições cromatográficas para separação foram: temperatura inicial da coluna de 50 °C, com aumento para 200 °C a uma razão de 5 °C, sendo mantida a essa temperatura por 4 min. A segunda etapa consistiu em elevação da temperatura em uma razão de 2 °C min⁻¹ até 240 °C, mantendo nessa temperatura por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com os padrões de éster metílico foi utilizada para a identificação do perfil de ácidos graxos das amostras e quantificada pela padronização das áreas.

2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE β -CAROTENO

Determinações do teor total de β -caroteno das nanoemulsões formuladas com o carotenoide foram realizadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 d. Alíquotas foram diluídas em metanol e a absorbância medida em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 450 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) e a concentração foi estimada usando uma curva padrão previamente construída (APÊNDICE 1). O teor de β -caroteno (concentração total) das suspensões coloidais foi calculado após a determinação da concentração do composto nas soluções de metanol e foi expresso em mg de β -caroteno mL⁻¹ de suspensão coloidal.

2.6 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO β -CAROTENO

O cálculo da constante de degradação do β -caroteno nas nanoemulsões foi realizado usando o modelo de cinética de primeira ordem (Equação 3) descrito por Teo et al. (2017):

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (3)$$

Onde: C=concentração (mg mL⁻¹) de β -caroteno no tempo “t”; C₀= concentração inicial (mg mL⁻¹) de β -caroteno; k=constante de degradação (d⁻¹); t=tempo (d).

A meia-vida (E_{1/2}), que representa o tempo (d) necessário para que a concentração de β -caroteno reduza a 50 %, sendo calculada pela Equação 4 (TEO et al., 2017):

$$E_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (4)$$

2.6 ÍNDICE DE PERÓXIDOS (IP)

Para avaliar a capacidade das nanoemulsões com β -caroteno de auxiliarem na redução da formação de peróxidos amostras de nanoemulsão foram misturadas a azeite de oliva (1:5 m m⁻¹) e submetidas juntamente com amostras controle (somente azeite de oliva) à exposição a luz UVC (30 W) por 15 h para acelerar o processo oxidativo. Após o IP foi determinado utilizando método padronizado segundo AOAC (2000).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos e análises foram realizados em triplicata (com exceção da composição de ácidos graxos, $n=2$) e os dados analisados por análise de variância (ANOVA) e se necessário submetidos a teste de Tukey ($p<0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS VEGETAIS DE ARROZ, CANOLA, GERGELIM, GIRASSOL, LINHAÇA, MILHO E SOJA

A determinação da composição de ácidos graxos dos sete óleos (APÊNDICE 2) propostos demonstrou que apesar das fontes vegetais distintas, os principais componentes das amostras eram os ácidos graxos C16:1, C18:1, C18:2 e C18:3, ou seja, ácidos graxos insaturados, que possuem papel importante em vários processos fisiológicos e que, por não serem sintetizados pelo organismo humano, devem ser supridos pela alimentação (WALTER; MARCHEZAN; DE AVILA, 2008).

Apesar do teor desses quatro ácidos graxos variarem entre as amostras, todos são considerados ácidos graxos de cadeia longa. Em vista desta similaridade de tamanho de cadeia dos ácidos graxos dos óleos estudados e não sendo viável desenvolver nanoemulsões com todos os óleos, definiu-se que para a continuidade do trabalho seriam utilizados apenas os óleos de arroz, milho e soja, devido ao fato de serem abundantemente produzidos, o que auxilia na redução de custos além de apresentarem compostos como tocoferóis, tocotrienóis, orizanóis e outros carotenoides (NAVARRO et al., 2016).

3.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE ARROZ, MILHO E SOJA COM E SEM A ADIÇÃO DE β -CAROTENO SINTÉTICO E AVALIAÇÃO DA SUA ESTABILIDADE FÍSICA

Após o preparo, as emulsões apresentaram boa estabilidade visual, sem separação de fases aparente. Na Tabela 1 pode-se observar que o tamanho médio das gotas das nanoemulsões formuladas com os três óleos vegetais (arroz, milho e soja) que foi de aproximadamente 355 nm (média dos seis valores iniciais), sem diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$) durante 90 d de estocagem.

Tabela 1- Tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial ζ de nanoemulsões de óleos vegetais com e sem adição de β -caroteno durante 90 d de estocagem a 4 °C.

Nanoemulsões sem β -caroteno				
Tamanho de partícula (nm)				
Tempo (d)	0	30	60	90
Óleo de arroz	360,96 $\pm$ 20,40 ^{a,A}	346,00 $\pm$ 26,17 ^{a,A}	340,80 $\pm$ 32,00 ^{a,A}	337,50 $\pm$ 33,87 ^{a,A}
Óleo de milho	372,83 $\pm$ 17,88 ^{a,A}	348,27 $\pm$ 28,45 ^{a,A}	337,56 $\pm$ 26,77 ^{a,A}	334,42 $\pm$ 33,42 ^{a,A}
Óleo de soja	373,31 $\pm$ 37,34 ^{a,A}	332,71 $\pm$ 29,73 ^{a,A}	314,49 $\pm$ 70,86 ^{a,A}	350,16 $\pm$ 19,45 ^{a,A}
IPD				
Tempo (d)	0	30	60	90
Óleo de arroz	0,21 $\pm$ 0,13 ^{a,A}	0,21 $\pm$ 0,16 ^{a,A}	0,13 $\pm$ 0,07 ^{a,A}	0,08 $\pm$ 0,04 ^{a,A}
Óleo de milho	0,34 $\pm$ 0,04 ^{a,A}	0,13 $\pm$ 0,12 ^{a,b,A}	0,17 $\pm$ 0,07 ^{a,b,A}	0,11 $\pm$ 0,06 ^{b,A}
Óleo de soja	0,26 $\pm$ 0,15 ^{a,A}	0,13 $\pm$ 0,02 ^{a,A}	0,10 $\pm$ 0,07 ^{a,A}	0,10 $\pm$ 0,01 ^{a,A}
Potencial ζ (mV)				
Tempo (d)	0	30	60	90
Óleo de arroz	-28,22 $\pm$ 6,45 ^{a,A}	-26,11 $\pm$ 4,75 ^{a,A}	-27,59 $\pm$ 4,44 ^{a,A}	-33,54 $\pm$ 3,04 ^{a,A}
Óleo de milho	-28,66 $\pm$ 6,67 ^{a,b,A}	-21,51 $\pm$ 2,11 ^{a,A}	-29,29 $\pm$ 11,90 ^{a,b,A}	-40,38 $\pm$ 3,44 ^{b,A}
Óleo de soja	-30,62 $\pm$ 3,98 ^{a,A}	-23,38 $\pm$ 2,91 ^{a,A}	-23,91 $\pm$ 3,75 ^{a,A}	-33,48 $\pm$ 8,57 ^{a,A}
Nanoemulsões com β -caroteno				
Tamanho de partícula (nm)				
Tempo (d)	0	30	60	90
Óleo de arroz	312,82 $\pm$ 52,16 ^{a,A}	300,09 $\pm$ 12,47 ^{a,A}	302,67 $\pm$ 47,14 ^{a,A}	296,18 $\pm$ 37,13 ^{a,A}
Óleo de milho	281,80 $\pm$ 36,21 ^{a,A}	304,50 $\pm$ 10,70 ^{a,A}	305,54 $\pm$ 45,07 ^{a,A}	293,04 $\pm$ 32,61 ^{a,A}
Óleo de soja	343,47 $\pm$ 64,67 ^{a,A}	337,36 $\pm$ 14,26 ^{a,A}	327,00 $\pm$ 47,46 ^{a,A}	326,42 $\pm$ 44,73 ^{a,A}
IPD				
Tempo (d)	0	30	60	90
Óleo de arroz	0,16 $\pm$ 0,03 ^{a,A}	0,17 $\pm$ 0,04 ^{a,A}	0,15 $\pm$ 0,04 ^{a,A}	0,20 $\pm$ 0,05 ^{a,A}
Óleo de milho	0,14 $\pm$ 0,06 ^{a,A}	0,17 $\pm$ 0,04 ^{a,A}	0,18 $\pm$ 0,03 ^{a,A}	0,13 $\pm$ 0,07 ^{a,A}
Óleo de soja	0,13 $\pm$ 0,06 ^{a,A}	0,16 $\pm$ 0,05 ^{a,A}	0,15 $\pm$ 0,04 ^{a,A}	0,12 $\pm$ 0,05 ^{a,A}
Potencial ζ (mV)				
Tempo (d)	0	30	60	90
Óleo de arroz	-28,73 $\pm$ 1,81 ^{a,A}	-28,49 $\pm$ 4,92 ^{a,A}	-42,06 $\pm$ 4,04 ^{b,A}	-30,52 $\pm$ 1,45 ^{a,A}
Óleo de milho	-27,79 $\pm$ 3,03 ^{a,A}	-31,71 $\pm$ 4,78 ^{a,A}	-32,63 $\pm$ 4,46 ^{a,A}	-37,04 $\pm$ 1,06 ^{a,A}
Óleo de soja	-32,32 $\pm$ 1,04 ^{a,A}	-33,13 $\pm$ 2,15 ^{a,A}	-28,52 $\pm$ 7,08 ^{a,A}	-33,93 $\pm$ 4,16 ^{a,A}

Média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05) na linha. Médias com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05) na coluna (comparação do mesmo parâmetro e dia entre os óleos)

Resultados similares foram alcançados com nanoemulsões de azeite de oliva e óleo de linhaça com Tween 20 como surfactante empregando-se HAP sem aquecimento, obtendo partículas com diâmetros médios de 365 e 360 nm, respectivamente (SUN et al.,

2015). Yuan et al. (2008) desenvolveram nanoemulsões de β -caroteno com tamanhos de 132 a 184 nm, no entanto, elas foram preparadas com triglicerídeos de cadeia média e Tween 20, a 100 MPa e o HAP foi aquecido a 50 °C durante o processo. De acordo com os autores, temperaturas de homogeneização em torno de 50 °C resultaram em um decréscimo significativo ($p < 0,05$) no tamanho de partícula em comparação com o observado a 30 °C. Porém no presente trabalho optou-se por não utilizar aquecimento durante o processo de HAP, devido à instabilidade do β -caroteno. Apesar das partículas obtidas no presente trabalho serem um pouco maiores, seu tamanho pode ser considerado adequado para as aplicações propostas apresentando estabilidade cinética por até 90 d de estocagem.

De fato, tais medidas de tamanho de partícula são indicadores da estabilidade das formulações. Um rápido crescimento do tamanho das gotas, indica alta instabilidade do sistema (BERNARDI et al., 2011), o que pode afetar a aparência e a textura de produtos onde serão aplicadas (YI et al., 2014). A estabilidade física de nanoemulsões pode também ser avaliada utilizando o índice de Ostwald *ripening* (w), baseado no modelo LSW (Tabela 2 e APÊNDICE 3). No presente trabalho foi determinado que valores de $R^2 \geq 0,8$ seriam satisfatórios para considerar que o modelo era capaz de descrever os dados apresentados, valores de R^2 entre 0,79-0,60 os modelos propostos seriam considerados de capacidade reduzida em descrever os dados e $R \leq 0,59$ seria considerado que o modelo não apresentava capacidade de descrever o comportamento dos dados.

O modelo linear proposto não foi capaz de descrever os dados das nanoemulsões formuladas com óleo de soja e óleo de milho+ β -caroteno e capacidade reduzida para as nanoemulsões com óleo de milho e óleo de arroz+ β -caroteno. Para as amostras formuladas com óleo de arroz e óleo de soja+ β -caroteno o modelo linear proposto apresentou boa capacidade de descrever a modificação dos tamanhos de partícula ao longo dos 90 d.

Tabela 2- Índice de Ostwald *ripening* (w) e R^2 para nanoemulsões armazenadas durante 90 d.

Óleo	w (nm ³ d ⁻¹)	R^2
Milho	-0,0178	0,78
Soja	-	0,22
Arroz	-0,0115	0,87
Milho+ β -caroteno	-	0,15
Soja+ β -caroteno	-0,0085	0,93
Arroz+ β -caroteno	-0,0055	0,73

Segundo Urbina-Villalba; Rahn-Chique (2013) o crescimento das gotas é consequência da difusão para a fase aquosa do óleo de uma gota para outra. Quando o raio da gota (r_g) é maior do que o raio crítico (r_c) as gotas aumentam seus tamanhos com o tempo, porém, quando r_g é menor do que r_c o tamanho das gotas tende a reduzir. No presente estudo, o modelo proposto não foi capaz de descrever satisfatoriamente a maior parte dos dados assim como os valores de w das nanoemulsões que apresentaram bom ajuste ao modelo eram negativos, indicando que o raio das gotas dessas emulsões estava abaixo do raio crítico. Assim, as nanoemulsões testadas não apresentaram tendência de aumento de tamanho, o que leva a estabilidade observada ao longo do armazenamento.

Em termos de índice de polidispersão (IPD) (Tabela 1), enquanto as nanoemulsões produzidas com óleo de soja e arroz não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) durante o armazenamento, as nanoemulsões produzidas com óleo de milho exibiram um decaimento significativo ($p<0,05$) nesse parâmetro depois de 90 d. Para as nanoemulsões formuladas com β -caroteno, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) neste parâmetro depois de 90 d de estocagem, para cada um dos três óleos.

Valores de IPD podem variar entre 0 e 1 (YUAN et al., 2008) sendo que quanto maior o valor, mais polidispersas serão as amostras. Após 90 d de estocagem (4 °C) todas as nanoemulsões testadas apresentaram valores inferiores ou iguais a 0,2 (Tabela 1), podendo ser consideradas monodispersas (IZQUIERDO et al., 2005), sendo esse comportamento exemplificado no APÊNDICE 3. Essa característica está provavelmente relacionada ao processo de HAP onde é gerada uma grande quantidade de forças sobre a emulsão, reduzindo o IPD (ANARJAN et al., 2010).

De acordo com Kim et al. (2012), o potencial ζ representa o potencial eletrocinético em sistemas coloidais. O potencial ζ das nanoemulsões brancas e aquelas adicionadas de β -caroteno foram altamente negativos (-20 a -40 mV, Tabela 1). Esses valores favorecem a estabilidade pelas forças repulsivas, causadas pela carga negativa na superfície das gotículas (YI et al., 2014). Como os surfactantes (Tween 20 e Span® 80) utilizados na formulação das nanoemulsões são não-iônicos, essa elevada carga negativa é, provavelmente, oriunda de impurezas presentes nos surfactantes e nos óleos, como ácidos graxos livres (McCLEMENTS, 2005 citado por TRONCOSO; AGUILERA; MCCLEMENTS, (2012)). Potenciais ζ negativos similares (-20 mV), foram descritos por Troncoso; Aguilera; McClements (2012) para nanoemulsões preparadas com o mesmo surfactante não-iônico (Tween 20) utilizado neste trabalho.

O potencial ζ das nanoemulsões sem β -caroteno testadas, com exceção da preparada com óleo de milho, não apresentaram variação significativa ($p>0,05$) durante 90 d de estocagem, assim como as nanoemulsões com β -caroteno e ambos os óleos, milho e soja. Porém, a nanoemulsão contendo β -caroteno e óleo de arroz apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) nesse parâmetro após 60 d, e um pequeno decréscimo em 90 d. Comparando-se as nanoemulsões produzidas utilizando os três diferentes óleos vegetais, nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi observada durante o armazenamento tanto para as emulsões com apenas óleo quanto para aquelas adicionadas de carotenoide.

A estabilidade cinética de uma emulsão durante o armazenamento pode ser afetada pelos componentes utilizados em sua formulação (AFFANDI; JULIANTO; MAJEED, 2011). No presente trabalho foram testados 3 tipos de óleos, produzindo nanoemulsões com estabilidades similares. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a mesma mistura de emulsificantes foi utilizada para a formulação de cada uma das três nanoemulsões, assim como a mesma proporção de cada um dos demais componentes, a única diferença entre as nanoemulsões era o óleo vegetal.

Os principais ácidos graxos dos três óleos vegetais são de cadeia longa, como também foi descrito anteriormente por Zambiasi et al. (2007). Nanoemulsões formuladas com óleos com tamanho de cadeia similar (palma, canola, milho e azeite de oliva) não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), no tamanho de partícula, IPD e potencial ζ (YI et al., 2015). Ahmed et al. (2012), comparando nanoemulsões formuladas com triacilgliceróis de cadeia longa (óleo de milho), média (Miglyol[®] 812) e curta (Tributirina), após 24 h de estocagem, observaram que as nanoemulsões preparadas com óleo de milho e Miglyol[®] 812 mantiveram a aparência homogênea, enquanto as emulsões com tributirina foram altamente instáveis, apresentando separação de fases. Os autores relatam que esta separação é consequência da alta solubilidade de triacilgliceróis de cadeia curta em água. Assim, o uso de lipídios de cadeia longa pode facilitar a formação de nanoemulsões estáveis. Portanto, o tamanho das gotas, a solubilidade do óleo e o potencial de interação entre as gotas afeta o comportamento, determinado se a emulsão permanecerá homogênea ao longo do tempo (URBINA-VILLALBA; RAHN-CHIQUÉ, 2013).

3.3 DEGRADAÇÃO DO β -CAROTENO NANOEMULSIONADO

Para verificar a capacidade de proteger o carotenoide, as nanoemulsões foram estocadas durante 90 d a 4 °C. Porém não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$)

na concentração de β -caroteno até 30 d (Tabela 3). Após 60 d de estocagem, nanoemulsões com óleo de arroz e soja apresentaram decréscimos de 25 e 38 %, respectivamente, na concentração do carotenoide em comparação com o valor inicial. Porém não foram observados decréscimos significativos ($p>0,05$) de 60 até 90 d. Essa estabilidade no teor do carotenoide das nanoemulsões até 30 d pode ser considerada satisfatória. Yuan et al. (2008) descreveram perdas de 14 a 25 % de β -caroteno em nanoemulsões estocadas a 4 e 25 °C durante o mesmo período de armazenamento.

Tabela 3 – Concentração de β -caroteno (mg mL^{-1}) durante 90 d de armazenamento a 4 °C.

Tempo (d)	Concentração de β -caroteno (mg mL^{-1})			
	0	30	60	90
Óleo de Arroz	$0,56 \pm 0,05^{a,A}$	$0,45^{*a,b,B}$	$0,42 \pm 0,02^{b,A}$	$0,39 \pm 0,09^{b,A}$
Óleo de Milho	$0,50 \pm 0,04^{a,A}$	$0,50 \pm 0,04^{a,A}$	$0,39 \pm 0,05^{a,A}$	$0,40 \pm 0,10^{a,A}$
Óleo de Soja	$0,50 \pm 0,04^{a,A}$	$0,42 \pm 0,05^{a,b,B}$	$0,31 \pm 0,12^{b,A}$	$0,27 \pm 0,04^{b,A}$

Média $\pm$ desvio padrão (n=3). *Desvio padrão $<0,01$. Médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$) na linha. Médias com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$) na coluna.

Essa maior estabilidade pode estar relacionada ao fato de que durante a HAP o equipamento não foi aquecido, uma vez que o emprego deste parâmetro pode favorecer a formação de radicais livres, e acelerar a degradação dos carotenoides. O decréscimo no teor de β -caroteno nas nanoemulsões contendo óleo de soja e arroz apresentaram um comportamento linear ($R^2 = 0,95$ e $0,91$, respectivamente), com uma constante de degradação (k) e meia vida ($E_{1/2}$) de $0,008 \text{ d}^{-1}$ e 86 d para o primeiro e $0,009 \text{ d}^{-1}$ e 77 d para o segundo (Tabela 4). Esses valores são similares aos encontrados por Teo et al. (2017) para nanoemulsões de luteína e óleo de milho, que demonstrou que a degradação do carotenoide é dependente da temperatura. Durante armazenamento a 5 °C, os valores de k para essas nanoemulsões foi $0,010 \text{ d}^{-1}$ ($R^2=0,80$), com $E_{1/2}$ de 79 d. Em temperaturas de 20 e 40 °C, os valores de k subiram para $0,039$ e $0,086 \text{ d}^{-1}$, e $E_{1/2}$ apresentou um decréscimo para aproximadamente 17 e 8 d.

As nanoemulsões com óleo de milho não apresentaram decaimento significativo ($p>0,05$) no teor de β -caroteno durante os 90 d de estocagem. O efeito protetivo do uso do óleo de milho sobre o β -caroteno em nanoemulsões já havia sido descrito por Yi et al. (2016), sendo superior a triglicerídeos de cadeia média (TCM). Os autores observaram que enquanto nanoemulsões contendo óleo de milho apresentaram 80 % de retenção do β -caroteno, aquelas

contendo TCM apresentaram apenas 25 % de retenção após 30 d de estocagem a 25 °C na ausência de luz. Este comportamento pode estar relacionado com a presença de tocoferóis, carotenoides e outros antioxidantes presentes nos óleos vegetais refinados, como o utilizado no presente trabalho.

Tabela 4 - Parâmetros de degradação do carotenoide das nanoemulsões formuladas com óleo de milho, soja e arroz.

Parâmetro de degradação	Milho	Soja	Arroz
k (d ⁻¹)	-0,006	-0,008	-0,009
R ²	0,48	0,95	0,91
E _{1/2} (d)	-	86	77

Outro fato que colabora para a menor degradação dos carotenoides é o tamanho da partícula obtida. Apesar de muitos trabalhos focarem seu interesse em partículas menores que 100 nm, essas podem não ser a melhor escolha para a proteção de compostos bioativos, como os carotenoides. De fato, emulsões com tamanhos de partícula inferiores a 100 nm demonstraram maior degradação do carotenoide luteína do que emulsões com tamanhos superiores a 100 nm, durante 30 d de estocagem a 5, 20 e 40 °C. Essa diferença é provavelmente consequência da grande relação entre a área superficial e o volume da partícula, o que eleva a exposição do carotenoide ao ambiente externo (TEO et al., 2017).

Devido à estabilidade física similar das nanoemulsões formuladas com os três óleos vegetais e frente à necessidade de escolha de apenas um deles, foi selecionado o óleo de milho para a formulação de nanoemulsões para sequenciamento do trabalho, por não ter sido observado degradação significativa do β -caroteno dentro das condições estudadas.

3.4 ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM AZEITE DE OLIVA ADICIONADO DE NANOEMULSÕES DE β -CAROTENO

Durante o processo de oxidação de óleos e gorduras, os produtos iniciais são hidroxiperóxidos, os quais subsequentemente são quebrados em compostos de peso molecular menor que levam a rancidez oxidativa. A determinação do índice de peróxidos é um método padrão usado para quantificação de hidroxiperóxidos na indústria, para determinação da estabilidade oxidativa de óleos (VAN DE VOORT et al., 1994). No presente estudo, o efeito

das nanoemulsões sobre o IP determinado pela adição a amostras de azeite de oliva e submetendo a mistura a um processo de oxidação acelerada (luz UV-C).

Os índices de peróxidos para as amostras de azeite de oliva sem adição da nanoemulsão e adicionados das emulsões formuladas com β -caroteno e óleo de arroz, milho e soja foram $169,2 \pm 12,3$, $166,5 \pm 18,6$, $167,3 \pm 13,4$ e $112,9 \pm 4,7$ mEq kg⁻¹, respectivamente. As amostras com adição de nanoemulsão de β -caroteno com óleo de soja apresentaram valores de IP estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) das demais.

Özogul et al. (2016) avaliaram o efeito de nanoemulsões de óleos vegetais, entre eles soja e milho, sobre qualidade microbiológica, sensorial e física de peixe refrigerado. As análises de IP demonstraram que após 12 d, as amostras tratadas com nanoemulsões de óleo de soja apresentaram valores estatisticamente inferiores para esse parâmetro em comparação ($p < 0,05$) com o óleo de milho. Esta observação em conjunto com as similaridades das nanoemulsões em estudo, possibilita a sugestão de que essa diferença é, provavelmente, consequência de um efeito sinérgico entre o β -caroteno e outros antioxidantes presentes de forma natural no óleo de soja.

Apesar da nanoemulsão de β -caroteno e óleo de soja apresentar menor IP, todos os valores estão acima do permitido, que é até 20 mEq kg⁻¹ (MAPA, 2012). Esses resultados bem superiores, são decorrentes provavelmente do elevado tempo de exposição das amostras (15 h) ao agente oxidante, sendo interessante a realização de uma cinética de oxidação, para determinar por quanto tempo as emulsões auxiliam na manutenção da estabilidade do azeite.

4 CONCLUSÕES

As nanoemulsões formuladas com os três óleos (arroz, milho e soja) apresentaram excelente estabilidade física durante 90 d de estocagem a 4 °C. Durante 90 d de estocagem, nenhuma perda significativa ($p > 0,05$) de β -caroteno foi observada nas nanoemulsões de óleo de milho, sendo que as nanoemulsões com óleo de arroz e soja ainda apresentavam mais de 50 % do teor do carotenoide após o mesmo período. A nanoemulsão formulada com óleo de soja demonstrou melhor capacidade antioxidante, com redução da peroxidação de azeite de oliva. O presente trabalho apresenta importantes informações sobre o uso de óleos de grau alimentício para a formulação de nanoemulsões, utilizando uma técnica que pode ser facilmente escalonada para propósitos industriais, assim como, a capacidade dessas nanoemulsões de proteger da degradação um carotenoide de grande importância biológica e industrial.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHIR, N.; DHUIQUE-MAYER, C.; HADJAL, T.; MADANI, K.; PAIN, J.; DORNIER, M. Pasteurization of citrus juices with ohmic heating to preserve the carotenoid profile. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 397–404, 2016.
- AFFANDI, M. M. R.; JULIANTO, T.; MAJEED, A. B. A. Development and stability evaluation of Astaxanthin nanoemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, n. SUPPL. 1, p. 143–148, 2011.
- AHMED, K.; LI, Y.; McCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 799–807, 2012.
- ANARJAN, N.; MIRHOSSEINI, H.; BAHARIN, B. S.; TAN, C. P. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 477–483, 2010.
- AOAC - ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Ed. 17, Washington, D.C., CD-ROM, 2000.
- BRASIL, **INSTRUÇÃO NORMATIVA No 1**, de 30 de janeiro de 2012 Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva, 2012.
- BERNARDI, D. S.; PEREIRA, T. A.; MACIEL, N. R.; BORTOLOTO, J.; VIERA, G. S.; OLIVEIRA, G. C.; ROCHA-FILHO, P. A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *In vitro* and *in vivo* assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p. 1–9, 2011.
- CAPEK, I. Degradation of kinetically stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2–3, p. 125–155, 2004.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. **Fennema's Food Chemistry**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- DOMÍNGUEZ-HERNÁNDEZ, C. R.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; SALGADO-CERVANTES, M. A.; BERISTÁIN, C. I. Stability, antioxidant activity and bioavailability of nano-emulsified astaxanthin. **Revista Mexicana de Ingeniera Química**, v. 15, n. 2, 2016.
- DORA, C. L.; PUTAUX, J.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; DUBREUIL, F.; SOLDI, V.; BOSALI, R.; LEMOS-SENNA, E. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 1972–1981, 2012.
- GRUNE, T.; LIETZ, G.; PALOU, A.; ROSS, C.; STAHL, W.; TANG, G.; THURNHAM, D.; YIN, S.; BIESALSKI, H. K. β -Carotene is an important vitamin a source. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2268S–2285S, 2010.

GUAN, Y.; WU, J.; ZHONG, Q. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene. **Food Chemistry**, v. 194, p. 787–796, 2016.

GUL, K.; TAK, A.; SINGH, A. K.; SINGH, A. K.; YOUSUF, B.; WANI, A. A. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene - A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2015.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 1, p. 388–394, 2005.

KIM, D. M.; HYUN, S. S.; LEE, C. H.; BYUN, S. Y. Identification of an emulsifier and conditions for preparing stable nanoemulsions containing the antioxidant astaxanthin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 1, p. 64–73, 2012.

KOTÍKOVÁ, Z.; ŠULC, M.; LACHMAN, J.; PIVEC, V.; ORSÁK, M.; HAMOUZ, K. Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. **Food Chemistry**, v. 197, p. 992–1001, 2016.

MARTÍNEZ, J. M. H. **Nanocarreadores lipídicos contendo ácidos graxos insaturados provenientes de Tainha (*Mugil liza*) como transportadores de carotenoides**. 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

MASSAROLO, K. C.; SOUZA, T. D.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S. Influence of cultivation *Rhizopus oryzae* on rice bran on lipid fraction: Fatty acids and phospholipids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, n. July, p. 204–208, 2016.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514–515, mar. 1966.

NAVARRO, S. L. B.; CAPELLINI, M. C.; ARACAVA, K. K.; RODRIGUES, C. E. C. Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: Extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 185–194, 2016.

ÖZOGUL, Y.; DUMUS, M.; UCAR, Y.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Comparative study of nanoemulsions based on commercial oils (sunflower, canola, corn, olive, soybean, and hazelnut oils): Effect on microbial, sensory, and chemical qualities of refrigerated farmed sea bass. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 422–430, 2016.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington D.C.: ILSI Press, 2001.

SUGUMAR, S.; SINGH, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Nanoemulsion of orange oil with nonionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 1, p. 113–120, 2016.

- SUN, Y.; XIA, Z.; ZHENG, J.; QIU, P.; ZHANG, L.; McCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Nanoemulsion-based delivery systems for nutraceuticals: Influence of carrier oil type on bioavailability of pterostilbene. **Journal of Functional Foods**, v. 13, p. 61–70, 2015.
- TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 2, p. 107–163, 1998.
- TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions: Estimation of solution thermodynamics of the disperse phase. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 106, n. 1–3, p. 261–285, 2003.
- TEO, A.; LEE, S. J.; GOH, K. K. T.; WOLBER, F. M. Kinetic stability and cellular uptake of lutein in WPI-stabilised nanoemulsions and emulsions prepared by emulsification and solvent evaporation method. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1269–1276, 2017.
- TRONCOSO, E.; AGUILERA, J. M.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 355–363, 2012.
- URBINA-VILLALBA, G.; RAHN-CHIQUÉ, K. Short-time evolution of alkane-in-water nanoemulsions. **Condensed Matter**, v. 1, p. 1–14, 2013.
- VAN DE VOORT, F. R.; ISMAIL, A. A.; DUBOIS, J.; NICODEMO, T. Determination of peroxide value by Fourier transform near-infrared spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 9, p. 921–926, fev. 1994.
- WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; DE AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 44, p. 1184–1192, 2008.
- YI, J.; LAM, T. I.; YOKOYAMA, W.; CHENG, L. W.; ZHONG, F. Cellular Uptake of beta-carotene from protein stabilized solid lipid nanoparticles prepared by homogenization-evaporation method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1096–1104, 2014.
- YI, J.; ZHONG, F.; ZHANG, Y.; YOKOYAMA, W.; ZHAO, L. Effects of Lipids on in Vitro Release and Cellular Uptake of β -Carotene in Nanoemulsion-Based Delivery Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 50, p. 10831–10837, 2015.
- YI, J.; FAN, Y.; YOKOYAMA, W.; ZHANG, Y.; ZHAO, L. Thermal degradation and isomerization of β -carotene in oil-in-water nanoemulsions supplemented with natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 9, p. 1970–1976, 2016.
- YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 61–68, 2008.
- ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 111–120, 2007.

ARTIGO 2

**ESTABILIDADE FÍSICA E QUÍMICA DE NANOEMULSÕES DE β -CAROTENO
DURANTE ESTOCAGEM E PROCESSAMENTO TÉRMICO**

RESUMO

A nanotecnologia tornou-se uma opção para o encapsulamento de compostos, como os carotenoides. Entretanto, para sua incorporação em produtos alimentícios, é necessário desenvolver sistemas nanométricos que sejam estáveis em diferentes condições às quais são submetidos os alimentos durante sua produção, transporte e armazenamento. Assim, com o intuito de desenvolver uma formulação de nanoemulsão estável para aplicação em alimentos, a estabilidade físico-química de nanoemulsões de β -caroteno após tratamentos térmicos e armazenamento sob diferentes condições foi investigada neste trabalho. As nanoemulsões de β -caroteno foram formuladas com óleo de milho pela técnica de homogeneização à alta pressão, com diâmetro hidrodinâmico na faixa de 300 nm, que está dentro da escala adequada para preparações industriais como alimentos e cosméticos. As gotículas das nanoemulsões apresentaram carga negativa (aproximadamente -25 mV) e distribuição monodispersa. As amostras foram submetidas processos térmicos (121 °C, 1,1 atm por 9 min e 100°C por 14 min) , e armazenadas a 4 °C, 25 °C e 37 °C na presença e ausência de luz por até 90 d. Após os tratamentos térmicos e armazenamento, as nanoemulsões não mostraram evidências de desestabilização física, restando 70-80 % do carotenoide após os processos de pasteurização e esterilização e 70 % quando armazenados a 4 °C sem luz. Os conhecimentos gerados nesta investigação forneceram informações sobre a estabilidade física e química das nanoemulsões de β -caroteno durante processos térmicos tradicionais e condições ambientais.

Palavras-chave: Termoestabilidade. Pasteurização. Ostwald *ripening*. Nanotecnologia. Carotenoides. Óleo de Milho.

1 INTRODUÇÃO

Carotenoides são tetraterpenoides com uma série de duplas ligações conjugadas, descritos como antioxidantes naturais, capazes de reduzir o risco de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata (CARDOSO et al., 2017). Além de sua capacidade antioxidante, alguns carotenoides como o β -caroteno, são precursores de outras moléculas essenciais como a vitamina A (GRUNE et al., 2010). Os carotenoides exibem um caráter lipofílico, sendo considerados praticamente insolúveis em água. Embora a absorção intestinal destes compostos seja limitada quando consumidos na forma cristalina em frutas ou vegetais crus, a biodisponibilidade é melhorada quando os carotenoides são dissolvidos em óleos vegetais (AKHAVAN; JAFARI, 2017).

A administração de compostos bioativos, por exemplo, lipídios, vitaminas e antioxidantes, na sua forma "livre", pode resultar em uma biodisponibilidade baixa, devido ao baixo tempo de residência no trato gastrointestinal e permeabilidade reduzida. Outro problema é a degradação que pode ocorrer durante o processamento de alimentos devido à exposição a fatores como calor, oxigênio e luz, que podem induzir oxidação ou isomerização, reduzindo a bioatividade dos compostos (CERQUEIRA et al., 2017).

Uma possibilidade para reduzir este problema é o uso da nanotecnologia, a qual vem demonstrando potencial para melhorar processos, embalagens e estabilidade de vários compostos, incluindo carotenoides. Dentre os nanocarreadores estudados para carotenoides destacam-se as nanoemulsões (ANARJAN et al., 2010; GUAN; WU; ZHONG, 2016; YI et al., 2014). Nanoemulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis (água e óleo) estabilizadas por filmes interfaciais de moléculas de emulsificantes, com gotas de diâmetro médio de 100-500 nm (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017). Algumas vantagens delas são: (i) melhorar a biodisponibilidade de compostos; (ii) possui melhor estabilidade cinética em matrizes aquosas, devido a seu pequeno tamanho de partícula e elevada área superficial levando a maiores absorções; (iii) auxilia na solubilização de drogas lipofílicas; (iv) auxilia a mascarar sabores indesejáveis, entre outros (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

O desenvolvimento de nanoemulsões estáveis é de grande importância pois seu tamanho de partícula e distribuição pode influenciar de forma significativa a aparência, textura, reologia, estabilidade e *flavor* dos alimentos aos quais são adicionados (JO; KWON, 2014). Especificamente, a avaliação da estabilidade térmica e a luz de nanoemulsões é essencial devido ao fato de que durante o processo, transporte e utilização os produtos podem ser expostos a diferentes condições ambientais (SHU et al., 2018).

Durante o processamento, por exemplo, a aplicação de calor é usada na destruição de patógenos e inativação de enzimas visando a preservação dos alimentos. O tratamentos térmicos mais comuns são a pasteurização e a esterilização (MICALI; FIORINO; PARISI, 2016) sendo que o uso de temperatura pode afetar características físicas e o conteúdo de compostos bioativos nos alimentos (ACHIR et al., 2016; KOTÍKOVÁ et al., 2016) assim como a exposição de carotenoides a luz (UV e fluorescente), que é altamente danosa a esse composto (SCITA, 1992).

Várias nanoestruturas têm sido testadas como carreadoras de β -caroteno por sua estabilidade física contra diferentes condições de armazenamento e processamento, obtendo resultados promissores (FAN et al., 2017b; GOMES et al., 2017). No entanto, ainda são poucos os estudos que visam, além da estabilidade física das nanoestruturas, a proteção desse composto ativo durante o processamento térmico, utilizando principalmente nanoemulsões, sem a adição de qualquer tipo de material que pudesse formar uma barreira física, como proteínas (FAN et al., 2017a; SÁIZ-ABAJO et al., 2013) ou outros compostos que podem atuar como agentes de proteção (MENG et al., 2019). Sendo assim, com a intenção de desenvolver uma formulação de nanoemulsão simples, mas estável para aplicação em alimentos, a estabilidade física e química de nanoemulsões de β -caroteno após dois tipos de processamentos térmicos e armazenamento sob diferentes condições de temperatura e luz foram investigadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Óleo de milho (Cargill, Brasil); água ultrapura, obtida por sistema de filtração Millipore Milli-Q (Merck, Alemanha); Tween 20 (LabSynth, Brasil), Span 80 (Sigma-Aldrich, Alemanha), β -caroteno pureza ≥ 93 % (Sigma-Aldrich, Alemanha), acetronitrila, metanol e acetato de etila grau HPLC (Merck, Alemanha), Unidades filtrantes Ultrafree®-MC com poro de 0,1 μm . Os demais reagentes possuíam grau analítico.

2.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES

Para o preparo das nanoemulsões, a fase oleosa foi composta por (relação de massa do componente por massa total de fase oleosa - m m^{-1}): 70 % de óleo e 30 % de Span®

80 e a fase aquosa foi composta por 10 mL de água e 1 % (m v⁻¹ – relação massa de surfactante por volume de fase aquosa) de Tween 20. A fase oleosa foi aquecida a 60 °C juntamente com o β -caroteno (0,2 ou 0,5 mg mL⁻¹ de formulação final) e a fase aquosa foi aquecida a 80 °C, ambas sob agitação magnética. Depois da completa dissolução das fases, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa (relação de 10:1) sob agitação magnética constante (700 rpm). A emulsão formada foi homogeneizada por 2 min a 14.500 rpm em Ultra-turrax® (T10 basic, IKA) e na sequência foi submetida a seis ciclos de 20 s a 68,9 MPa em homogeneizador à alta pressão (EmulsiFlex-C3, Avestin) (MARTÍNEZ, 2016).

2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOEMULSÕES

O tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico médio) e o índice de polidispersão (IPD) foram determinados por espalhamento de luz dinâmico utilizando-se o equipamento Zetasizer S90 (Malvern Instruments, RU) em 0, 30, 60 e 90 d. As medições de tamanho de partícula foram realizadas a 25 °C após diluição adequada (100x) das amostras em NaCl 1 mM. Cada análise de tamanho teve a duração de 300s e foi realizada com ângulo de detecção de 90° (DORA et al., 2012).

O potencial ζ foi determinado por anemometria laser doppler, utilizando-se o equipamento Zetasizer S90 (Malvern Instruments, RU) em 0, 30, 60 e 90 d. Para as medições do potencial ζ , as amostras foram colocadas na célula electroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potencial ζ foram calculados como valores médios da mobilidade electroforética, utilizando-se a equação de Smoluchowski (DORA et al., 2012).

2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE β -CAROTENO POR COMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Determinações do teor de β -caroteno foram realizadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 d, segundo método descrito por Cipolatti (2012) com modificação no tempo total de corrida. Para isso foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Shimadzu LC-10), acoplado com detector arranjo de diodo (DAD) e coluna Discovery C8 (5 μ m, 15 cm x 4,6 mm), utilizando gradiente de eluição de acetronitrila (A), metanol (B) e acetato de etila (C). A eluição teve início com 70 % A e 30 % de B até 5 min (1,0 mL min⁻¹), mudou para 80 % A, 10 % B e 10 % C em 6 min (0,3 mL min⁻¹), então 30 % A, 20 % B e 30 % C entre 7-10 min (1,0 mL min⁻¹) retornando para 70 % A e 30 % B até 12 min (1,0 mL min⁻¹).

Para a quantificação do β -caroteno total a amostra foi diluída em acetronitrila:metanol (10:30) para a desestabilização das nanoemulsões. A fase aquosa foi separada da fase oleosa usando unidades filtrantes Ultrafree®-MC (0,1 μ m tamanho de poro), sendo o β -caroteno quantificado por CLAE utilizando uma curva padrão (APÊNDICE 4), para determinar a eficiência de encapsulamento através da Equação 1 (RAMYADEVI; RAJAN, 2015):

$$\text{Encapsulamento (\%)} = \frac{(\beta\text{-caroteno total}) - (\beta\text{-caroteno fase aquosa})}{\beta\text{-caroteno total}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: β -caroteno total é o conteúdo de carotenoide nas nanoemulsões.

2.5 ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES SUBMETIDAS A TRATAMENTOS TÉRMICOS

As nanoemulsões foram submetidas a dois processos térmicos para amostras aquosas (com pH entre 6-7) pelo método descrito por Sáiz-Abajo et al. (2013), com adaptações nos tempos de aquecimento, resfriamento e na utilização de banho termostático ao invés de autoclave para a simulação do processo de pasteurização.

O primeiro processo (PTA) foi realizado em autoclave previamente aquecida até 100 °C. Tubos de ensaio (borosilicato com tampa de rosca) contendo as amostras então foram colocados no equipamento e aquecidos até 121 °C (1,1 atm) e mantidos nessa condição por 9 min, com posterior resfriamento natural até 30 °C, sendo armazenados a 4 °C protegidas da luz até o momento das determinações analíticas.

O segundo processo térmico (PTB) foi realizado em banho previamente aquecido até 100 °C. As amostras então foram colocadas no banho termostático e mantidas nessa condição por 14 min, com posterior resfriamento natural até 30 °C, sendo mantidas a 4 °C protegidas da luz até o momento das determinações analíticas.

Após os tratamentos térmicos, as amostras foram caracterizadas conforme descrito no item 2.3 e o teor de β -caroteno quantificado por CLAE conforme item 2.4 e comparadas com amostras não submetidas a tratamentos térmicos (controle).

2.6 ESTABILIDADE FÍSICA DAS NANOEMULSÕES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Visando acompanhar a estabilidade física das nanoemulsões em diferentes condições ambientais, as amostras foram acondicionadas por 90 d em estufas ajustadas a 4 °C, 25 °C e 37 °C na ausência de luz (AFFANDI; JULIANTO; MAJEED, 2011). As três temperaturas escolhidas para simular condições de armazenamento foram definidas para observar o comportamento das nanoemulsões quando submetidas a refrigeração (o que pode causar mudanças físicas como precipitação) e temperaturas ambientes (que podem acelerar processos de degradação como a oxidação). Durante este período foram acompanhados os parâmetros: tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial ζ (item 2.3).

Com os dados de tamanho de partícula ao longo do armazenamento o modelo de Lifshitz–Slyozov–Wagner (LSW) foi utilizado para predizer a constante de Ostwald *ripening* (w) definida como a variação do raio ao cubo em função do tempo (TAYLOR, 2003).

$$w = \frac{dr_n^3}{dt} \quad (2)$$

Considerando a sensibilidade a luz dos carotenoides e considerando que durante o processamento dos produtos pode ocorrer exposição a luz, mesmo após a embalagem (quando utilizadas embalagens transparentes, por exemplo) foram realizados experimentos nos quais as nanoemulsões foram expostas as mesmas condições térmicas com e sem exposição à luz. Para avaliar a capacidade protetora das nanoemulsões sob o β -caroteno, as amostras foram submetidas às temperaturas de 4 °C, 25 °C e 37 °C com e sem exposição à luz (CHEN et al., 2007; SHU et al., 2018), sendo o carotenoide quantificado por CLAE (item 2.4).

Para esses experimentos, 10 mL de amostra foram colocadas em frascos de vidro transparente fechados com tampas de rosca e submetidos a incidência de luz por 24 h por até 90 d. Como fonte luminosa foram utilizadas lâmpadas LED de 12 W (Saveenergy - Caxias do Sul, Brasil), com temperatura de cor de 6500 K (luz fria), fluxo luminoso de 1055 lúmen (lm), posicionadas 15 cm acima das amostras. Para posterior comparação, os mesmos volumes de amostras foram acondicionados em frascos âmbar com tampa de rosca e cobertas por papel alumínio e submetidas as mesmas condições térmicas.

2.7 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO β -CAROTENO

Para a determinação do coeficiente de degradação (k), meia vida ($C_{1/2}$) e energia de ativação (E_a), as nanoemulsões foram armazenadas a 4 °C, 25 °C e 37 °C na presença e ausência de luz durante 30 d (como descrito no item 2.6). Para as determinações do teor total de β -caroteno alíquotas foram diluídas em metanol:clorofórmio (1:1) e a absorbância medida em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 450 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A concentração foi estimada usando uma curva padrão previamente construída (APÊNDICE 5).

O cálculo da taxa de degradação do carotenoide (k) foi realizado utilizando o modelo cinético de primeira ordem segundo Equação 3 (TEO et al., 2017).

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (3)$$

Onde C é a concentração (mg mL^{-1}) de β -caroteno no tempo “ t ”, C_0 é a concentração inicial (mg mL^{-1}) de β -caroteno, k é a taxa de degradação (d^{-1}), e t o tempo (d).

A meia-vida ($C_{1/2}$) do β -caroteno, que é o tempo requerido para que a concentração de β -caroteno atinja 50 %, calculado através da Equação 4:

$$C_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4)$$

A energia de ativação (E_a) foi calculada segundo equação de Arrhenius (Equação 5):

$$k = k_0 e^{-E_a/RT} \quad (5)$$

Onde k é a taxa de degradação nas temperaturas de 4 °C, 25 °C e 37 °C, T são as temperaturas em Kelvin e R é a constante universal dos gases ($8,3145 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) (TEO et al., 2017).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores analisados por análise de variância (ANOVA) e quando necessário Teste de Tukey ($\alpha=0,05$) ou teste t ($\alpha=0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES SUBMETIDAS A TRATAMENTOS TÉRMICOS

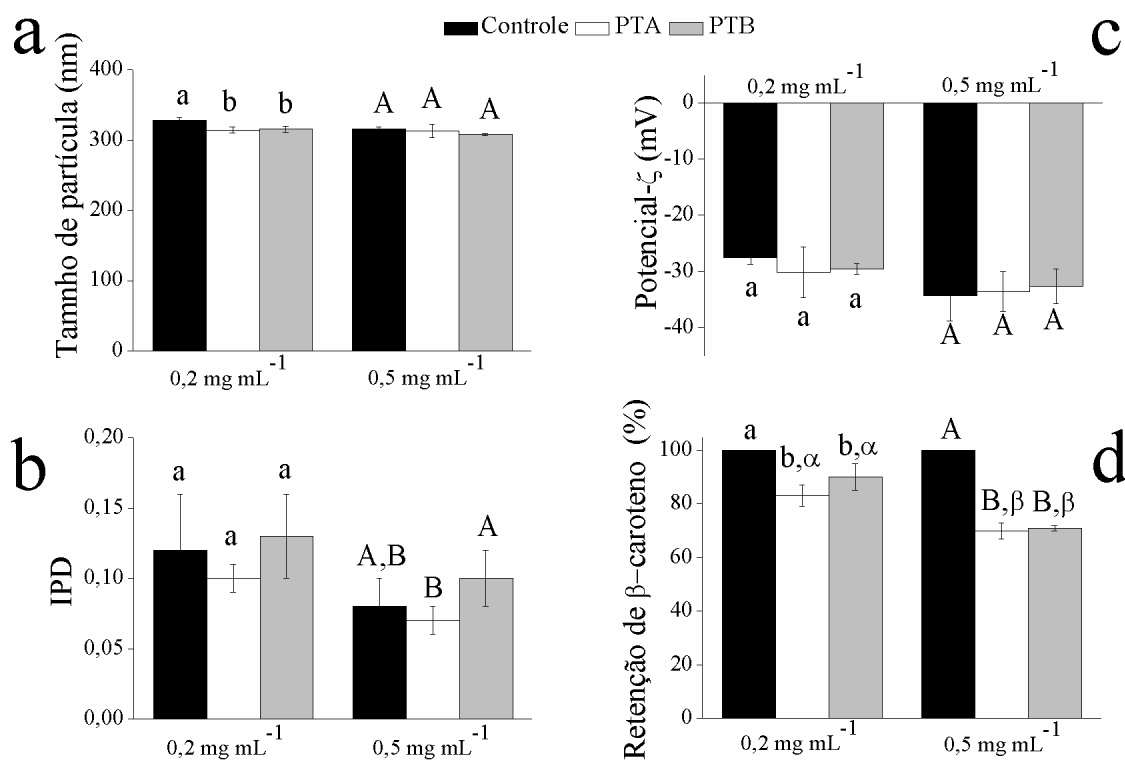
Para aplicações comerciais, é de grande importância que as nanoemulsões permaneçam física e quimicamente estáveis, especialmente quando expostas a condições ambientais durante as etapas de produção, estocagem, transporte e uso dos produtos aos quais foram adicionados. As propriedades das nanoemulsões podem acarretar mudanças na aparência, textura e liberação dos compostos bioativos afetando suas aplicações específicas (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018)

O tamanho de partícula é importante para a estabilidade cinética de emulsões (ZARDINI et al., 2018) e nenhuma diferença significativa foi observada ($p>0,05$) no tamanho de partícula das nanoemulsões com $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ após os tratamentos térmicos (Figura 1a). Porém, nas formulações com $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, as alterações no tamanho de partícula foram significativas ($p<0,05$) caracterizadas por um decréscimo (de $328,59\pm3,37 \text{ nm}$ das amostras controle para $314,50\pm4,35 \text{ nm}$ após PTA e $315,46\pm3,82 \text{ nm}$ após PTB), comportamento contrário ao descrito por outros autores, onde, após o aquecimento de nanoemulsões (com apenas Tween 20 como surfactante), um aumento no tamanho de partícula foi observado (CHEN et al., 2018; TEO et al., 2016).

Após os tratamentos, um pequeno halo alaranjado foi observado no topo das amostras submetidas a PTA e em algumas das amostras submetidas a PTB, como pode ser observada na Figura 2. A formação desse halo alaranjado é provavelmente consequência da temperatura utilizada nos tratamentos térmicos, superiores ao *cloud point* do Tween 20, que é em torno de 76°C (CHEN et al., 2018). Quando um surfactante não iônico alcança seu *cloud point*, suas pontes de hidrogênios são rompidas, e sua solubilidade em água diminui (RAHMAN et al., 2017). Assim, sua capacidade de promover a união das interfaces óleo/água sofre alteração, o que pode levar a processos de separação de fases, como observado no presente trabalho. A pequena camada oleosa formada no topo das amostras está provavelmente ligada à redução do

tamanho das partículas seja pela desestabilização de partículas maiores ou pela expulsão de parte da fase oleosa das gotículas, gerando uma população de tamanho médio um pouco menor.

Figura 1- Tamanho de partícula (a), potencial ζ (b), IPD (c) e retenção de β -caroteno (d) de nanoemulsões após tratamentos térmicos.



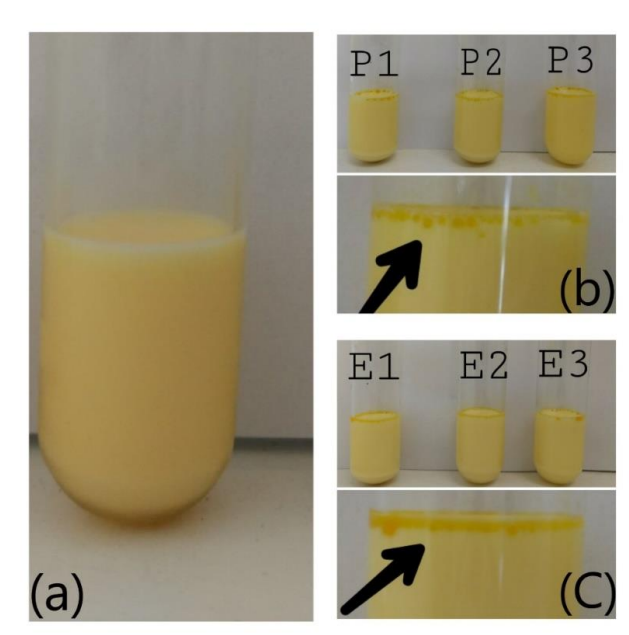
Média±desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos com concentração inicial de 0,2 mg mL⁻¹. Médias com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos para a concentração inicial de 0,5 mg mL⁻¹. Médias com diferentes letras gregas são significativamente diferentes ($p<0,05$) comparando-se as duas concentrações inicial de β -caroteno para o mesmo tratamento térmico.

Apesar do pequeno halo, uma separação total de fases descrita por outros autores quando o Tween 20 era o único surfactante (CHEN et al., 2018; TEO et al., 2016) não foi observada no presente trabalho. Esta estabilidade é provavelmente ligada ao uso concomitante do Tween 20 e Span 80, uma vez que a mistura de surfactantes com alto e baixo balanço hidrofílico-hidrofóbico formam emulsões mais estáveis do que quando apenas um surfactante é usado (ZARDINI et al., 2018). Assim, apesar da redução da atividade emulsificante do Tween 20, não houve desestabilização completa do sistema devido à presença do Span 80.

O processamento térmico não afetou significativamente ($p>0,05$) a homogeneidade das gotas, observado no IPD (Figura 1c) das duas formulações em

comparação com as amostras controle. Quando as amostras foram comparadas entre os tratamentos térmicos, apenas as nanoemulsões com $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ apresentaram uma significativa ($p < 0,05$) mudança de $0,07 \pm 0,01$ (PTA) para $0,10 \pm 0,02$ (PTB). Apesar desse aumento, os valores de IPD continuaram menores do que 0,20, o que demonstra um perfil monodisperso para o tamanho das partículas e fornece uma boa estabilidade física para as nanoemulsões (ARANCIBIA et al., 2017a).

Figura 2- Nanoemulsão ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) controle (a), após PTB (b) e PTA (c).



Outro parâmetro que pode ter auxiliado na estabilidade das nanoemulsões é seu potencial ζ negativo, que quanto mais alto, maior a repulsão entre as partículas, elevando assim a estabilidade das dispersões (ZARDINI et al., 2018; ZHAI et al., 2018). As cargas elétricas presentes nas nanogotas da emulsão não variaram significativamente ($p > 0,05$) durante o processo térmico, como pode ser observado na Figura 1B. Como os surfactantes utilizados eram não iônicos, essas cargas são proveniente de impurezas presentes nos óleos como ácidos graxos livres (ARANCIBIA et al., 2017a).

3.2 ESTABILIDADE FÍSICA DAS NANOEMULSÕES EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO

Emulsões podem facilmente sofrer desestabilizações em condições ambientais desfavoráveis devido a sua instabilidade termodinâmica (ZHAI et al., 2018). A presença de

altas temperaturas podem acelerar o movimento Browniano, aproximando as gotas um das outras (CARPENTER; SAHARAN, 2017), elevando as chances de ocorrência de processos de desestabilização. Por causa disso as estabilidades das nanoemulsões foram avaliadas por até 90 d a 4 °C, 25 °C e 37 °C (Tabela 1). Após o preparo, as duas formulações apresentaram boa estabilidade visual, sem separação e fases e com tamanho médio na faixa de 300 nm. Este tamanho está na faixa características (50-500 nm) de nanoemulsões usadas para preparações industriais como alimentos, cosméticos e farmacêuticos (CHAARI et al., 2018).

Tabela 1 – Tamanho de partícula, IPD e potencial ζ durante estocagem a 4 °C, 25 °C e 37 °C.

Nanoemulsões com 0,2 mg mL ⁻¹				
Tamanho de partícula (nm)				
Tempo (d)	0	30	60	90
4 °C	328,59±3,37 ^a	319,14±11,52 ^{a,A}	308,48±6,10 ^{a,A}	308,46±7,89 ^{a,A}
25 °C	328,59±3,37 ^a	321,23±7,81 ^{a,A}	323,41±12,16 ^{a,A}	299,16±6,56 ^{b,A}
37 °C	328,59±3,37 ^a	307,80±1,04 ^{b,A}	-	-
IPD				
Tempo (d)	0	30	60	90
4 °C	0,12±0,04 ^{a,b}	0,10±0,02 ^{b,A}	0,07±0,03 ^{b,A}	0,18±0,01 ^{a,A}
25 °C	0,12±0,04 ^a	0,08±0,02 ^{a,A}	0,08±0,01 ^{a,A}	0,14±0,05 ^{a,A}
37 °C	0,12±0,04 ^b	0,39±0,22 ^{a,A}	-	-
Potencial ζ (mV)				
Tempo (d)	0	30	60	90
4 °C	-27,50±1,22 ^a	-36,70±7,42 ^{a,A}	-43,91±13,09 ^{a,A}	-42,40±2,60 ^{a,A}
25 °C	-27,50±1,22 ^b	-32,61±0,87 ^{a,b,A}	-32,73±3,29 ^{a,b,A}	-37,36±1,96 ^{a,A}
37 °C	-27,50±1,22 ^b	-34,94±4,07 ^{a,A}	-	-
Nanoemulsões com 0,5 mg mL ⁻¹				
Tamanho de partícula (nm)				
Tempo (d)	0	30	60	90
4 °C	315,60±3,33 ^a	267,48±48,29 ^{a,A}	299,56±2,53 ^{a,A}	233,60±46,05 ^{a,A}
25 °C	315,60±3,33 ^a	198,39±18,59 ^{b,A}	298,13±1,69 ^{a,A}	227,82±16,71 ^{b,A}
37 °C	315,60±3,33	-	-	-
IPD				
Tempo (d)	0	30	60	90
4 °C	0,08±0,02 ^a	0,14±0,02 ^{a,A}	0,12±0,05 ^{a,A}	0,14±0,07 ^{a,A}
25 °C	0,08±0,02 ^b	0,17±0,05 ^{a,A}	0,10±0,01 ^{a,b,A}	0,14±0,03 ^{a,b,A}
37 °C	0,08±0,02	-	-	-
Potencial ζ (mV)				
Tempo (d)	0	30	60	90
4 °C	-34,26±4,49 ^a	-38,50±3,03 ^{a,A}	-34,98±5,68 ^{a,A}	-32,89±1,25 ^{a,A}
25 °C	-34,26±4,49 ^a	-35,07±6,70 ^{a,A}	-29,89±9,76 ^{a,A}	-31,81±0,60 ^{a,A}
37 °C	-34,26±4,49	-	-	-

Média±desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05) na linha. Médias com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05) na coluna (comparação do mesmo parâmetro e dia entre as temperaturas).

De acordo com Chaari et al. (2018), o controle do tamanho de partícula é importante para confirmar a estabilidade física da formulação durante a estocagem. Ostwald *ripening* é o principal processo de desestabilização de nanoemulsões. Graficando $r^3 \times t$ e aplicando-se uma regressão linear é possível calcular a velocidade de crescimento do tamanho das gotas (ÖZDEMİR et al., 2018). Como pode ser visto na Tabela 2, não ocorreram diferenças significativas ($p>0,05$) entre as temperaturas de 4 °C e 25 °C para as mesmas concentrações de β -caroteno. A concentração de ingredientes ativos pode afetar o tamanho de partícula (BADAWY et al., 2017), porém isto não foi observado no presente trabalho, e nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) ocorreu quando as quatro condições foram comparadas também.

Tabela 2- Taxa de Ostwald *ripening* rate (w) de nanoemulsões estocadas a 4 °C e 25 °C.

	0,2 mg mL ⁻¹		0,5 mg mL ⁻¹	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
w (nm ³ d ⁻¹)	-0,011±0,002 ^{A,a}	-0,011±0,003 ^{A,a}	-0,023±0,011 ^{a,a}	-0,021±0,010 ^{a,a}
R ²	0,80±0,14	0,80±0,20	0,91±0,11	0,80±0,10

Médias± desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p<0,05$) entre as temperaturas de estocagem para a concentração inicial de 0,2 mg mL⁻¹. Médias com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p<0,05$) entre as temperaturas de estocagem para a concentração inicial de 0,5 mg mL⁻¹. Médias com letras gregas diferentes são significativamente diferentes ($p<0,05$) entre as quatro condições.

As amostras mantidas a 4 °C (independente da concentração inicial de β -caroteno) não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) no tamanho de partícula durante os três meses de estocagem (Tabela 1). A 25 °C os tamanhos de partícula das duas amostras diminuíram significativamente ($p<0,05$) em 90 d e o mesmo comportamento foi observado nas amostras (0,2 mg mL⁻¹) mantidas a 37 °C após 30 d. Amostras mantidas a 37 °C foram avaliadas quanto a estabilidade física apenas durante o período no qual foi possível acompanhar o teor de carotenoides, como será discutido posteriormente.

ZARDINI et al. (2018) também descreve uma redução no tamanho de partícula de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo licopeno. Este comportamento ocorre por que o surfactante durante o período de estocagem pode penetrar a superfície das gotas e cobri-las completamente. Isso provavelmente foi o que aconteceu com as amostras a 25 °C, uma vez que os valores de IPD dessa amostra permaneceram abaixo de 0,2 apesar de variação significativa ($p<0,05$) desse parâmetro.

Porém, as amostras estocadas a 37 °C apresentaram um crescimento significativo ($p < 0,05$), alcançando valores superiores a 0,2, demonstrando características polidispersas (BADAWY et al., 2017), o que afeta diretamente as medidas de tamanho, pois a Equação de Stokes-Einsten, utilizada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico pelo Zetasizer é válida somente para monodispersões.

O IPD é uma medida adimensional (que varia entre zero e um) e reflete a distribuição do tamanho das partículas na formulação (BADAWY et al., 2017). De acordo com Danaei et al. (2018) são características físicas altamente críticas a serem consideradas na criação de produtos de grau alimentício ou farmacêuticos, devido ao seu efeito nas propriedades de volume, desempenho do produto, processabilidade, estabilidade e aparência do produto final, portanto análise confiável e reproduzível de seu diâmetro médio, heterogeneidade e carga são essenciais. O IPD das amostras (Tabela 1) teve de forma geral valores baixos, com características de monodispersão. Esse comportamento de baixa polidispersidade durante o encapsulamento de carotenoides em matrizes oleosas já foi observado por Chaari et al. (2018).

Os valores de potencial ζ inferiores a -30 mV indicam que a carga elétrica no sistema é suficiente para se assumir que as forças repulsivas entre as gotas é predominante. Essa carga elétrica permite uma melhor estabilidade física (ARANCIBIA et al., 2017a) e bioatividade em termos de ligação e absorção celular (HSU et al., 2017).

Nenhuma mudança significativa ($p > 0,05$) foi observada no potencial ζ (Tabela 1) das nanoemulsões com maior conteúdo de carotenoides estocadas a 4 °C e 25 °C. As formulações com menor teor de carotenoide apresentam uma mudança significativa quando mantidas a 25 °C, tornando-se mais negativas no fim do período de estocagem. Esse aumento na carga negativa é provavelmente relacionado com a elevação do teor de ácido graxos livres e não afeta a estabilidade das nanoemulsões.

Nanoemulsões de astaxantina e óleo de soja utilizando lecitina e caseinato de sódio como surfactantes foram estáveis por 30 d a 25 °C. Em adição ao pequeno tamanho de partícula e elevada eletronegatividade do potencial ζ (menores que -40 mV), a presença de triglicerídeos de cadeia longa presentes no óleo de soja ajudaram a estabilizar as gotas, retardando a ocorrência de Ostwald *ripening* (KHALID et al., 2017). O óleo de milho utilizado no presente estudo também era composto de triglicerídeos de cadeia longa, o que juntamente como o potencial ζ e pequeno tamanho de partícula contribui para a estabilização a longo prazo das nanoemulsões formuladas com o β -caroteno.

3.3 DEGRADAÇÃO DO β -CAROTENO DURANTE TRATAMENTOS TÉRMICOS E EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM

Na literatura é descrito que além de interferir na distribuição do tamanho de partículas, o número de ciclos do processo de HAP pode afetar o conteúdo de compostos bioativos, devido ao aumento de sua exposição a altas temperaturas e stress mecânico (RAHMAN et al., 2017). O mecanismo de oxidação dos carotenoides é similar ao dos lipídios (HONG et al., 2017), então quando exposto a calor, luz e oxigênio o β -caroteno pode sofrer oxidação e isomeração (CHEN; ZHONG, 2015). Assim, é importante destacar que no presente trabalho a variação do conteúdo teórico de β -caroteno (antes da homogeneização) e o conteúdo real (após a homogeneização) foi pequeno, em torno de 2 %, provavelmente porque não foi realizado o aquecimento do equipamento, sendo a amostra exposta apenas a energia térmica derivada da energia mecânica aplicada.

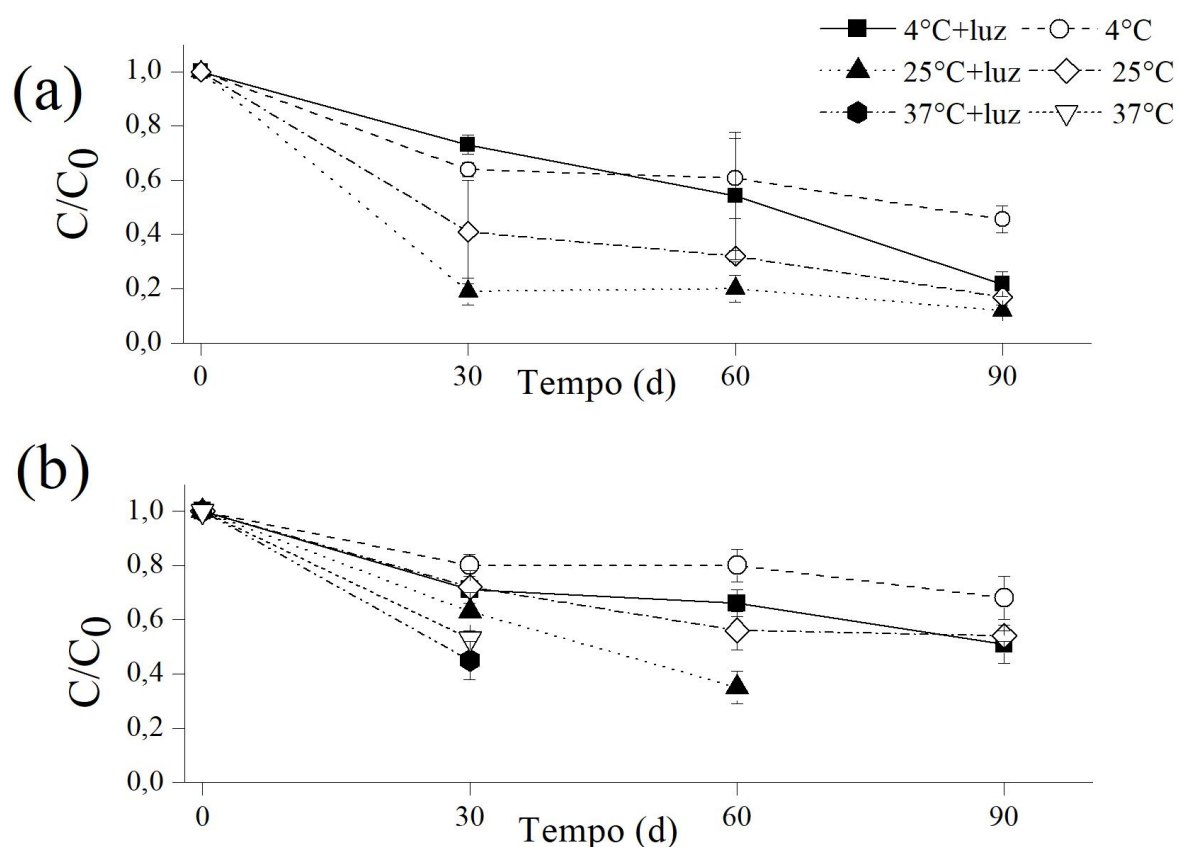
O conteúdo de β -caroteno (Figura 1d) nas nanoemulsões (independente da concentração inicial) teve um decréscimo quando comparada com as amostras controle após os processos térmicos. As nanoemulsões com concentração inicial de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, apresentaram uma perda em torno de 20 % e nenhuma diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tipos de tratamento térmico foi observada. Porém, quando as duas concentrações iniciais foram comparadas para o mesmo tratamento térmico, a degradação do β -caroteno nas nanoemulsões como $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ foi significativamente ($p < 0,05$) menor que a degradação nas nanoemulsões com $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para PTA e PTB.

Estudos cinéticos da degradação de carotenoides são essenciais para prever a perda desse composto bioativo durante o processamento (ACHIR et al., 2010). A relação entre a concentração inicial de β -caroteno (C_0) e a concentração em 30, 60 e 90 d (C) com e sem luz a 4°C , 25°C e 37°C pode ser observada na Figura 3. Amostras com concentração inicial de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 2a) mantidas a 37°C apresentaram ausência de coloração em 30 d, o que caracteriza a degradação química do β -caroteno (LUO et al., 2017). No mesmo tempo, as amostras mantidas a 25°C apresentaram relações C/C_0 menores que 0,5. Após 90 d de estocagem, a amostra mantida a 4°C sem luz possuía relação C/C_0 significativamente superior ($p < 0,05$) das demais amostras (4°C com luz e 25°C com e sem luz).

Amostras com concentração inicial de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 3b) mantidas a 37°C apresentaram ausência de cor (dados não apresentados) em 60 d. No mesmo tempo, as amostras mantidas a 25°C com luz apresentaram relações C/C_0 inferiores a 0,5. Em 90 d, apenas nas amostras mantidas a 4°C (com e sem luz) e a 25°C sem luz ainda era possível

observar coloração, com relações $C/C_0 \geq 0,5$. A relação C/C_0 das amostras mantidas a 4 °C sem luz foi significativamente superior ($p < 0,05$) do que as relações C/C_0 das amostras mantidas a 4 °C com luz.

Figura 3 - Degradação de β -caroteno nas nanoemulsões (concentração inicial = $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (a) e concentração inicial = $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (b)) durante o armazenamento a 4, 25 e 37 °C com e sem exposição à luz.



Nanoemulsões de astaxantina e óleo de soja estabilizadas como lecitina modificada e estocadas a 25 °C (sem luz) apresentaram, depois de 30 d, relação C/C_0 de 0,44 (KHALID et al., 2017), como observado no presente trabalho. A relação C/C_0 de nanoemulsões estabilizadas com saponinas ou *whey protein* também decaíram com a elevação das temperaturas de estocagens (4 °C, 25 °C e 55 °C) chegando a valores próximos de zero a 55 °C (LUO et al., 2017). Os autores descrevem que a estocagem em temperaturas mais baixas melhora a estabilidade do β -caroteno encapsulado frente aos processos de degradação, o que também foi observado no presente trabalho.

Mesmo usando uma técnica mais sensível, como CLAE, a degradação dos carotenoides a 37 °C foi extremamente acelerada, não sendo possível detectar o carotenoide

durante os 90 d de estocagem. Para calcular a taxa de degradação, o teor de carotenoides é necessário em diferentes tempos, de modo que o modelo foi ajustado usando os dados dos primeiros 30 d, onde todas as amostras puderam ser quantificadas (APÊNDICES 6 e 7). Esses dados foram ajustados ao modelo exponencial já descrito, e os valores da taxa de degradação (k) que é a velocidade da reação química (DA SILVA et al., 2017), meia-vida e energia de ativação estão apresentadas na Tabela 3. O modelo de primeira ordem proposto não foi capaz de representar a degradação das amostras armazenadas a 4 °C sem luz ($R^2 = 0,2-0,3$) e apresentou capacidade reduzida para descrever a degradação de carotenoides sob duas condições: a 25 °C sem luz (para ambas formulações) e a 4 °C com luz para as formulações com 0,2 mg mL⁻¹ ($R^2 = 0,7$).

Tabela 3 - Taxa de degradação, meia vida, energia de ativação e coeficiente de determinação das nanoemulsões de β -caroteno em diferentes temperaturas até 30 d de armazenamento.

M						
Condição de armazenamento	Com luz			Sem Luz		
	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
$-k \times 10^{-3} \text{ (d}^{-1}\text{)}$	9,1±0,7 ^{c,d}	16,7±2,8 ^{b,c}	27,1±4,1 ^a	-	5,8±0,5 ^d	20,8±5,4 ^{a,b}
R^2	0,7±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	0,2*	0,7±0,1	0,9±0,2
$E_{1/2}$	76±6 ^b	42±7 ^c	26±4 ^c	-	120±11 ^a	35±10 ^c
$E_a \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$		22,8±1,8 ^A			-	
R^2		0,9*			-	
Nanoemulsões com 0,5 mg mL ⁻¹						
Condição de armazenamento	Com luz			Sem Luz		
	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
$-k \times 10^{-3} \text{ (d}^{-1}\text{)}$	23,6±1,2 ^c	42,4±13,7 ^{b,c}	63,0±5,7 ^b	-	36,7±13,7 ^c	93,7±5,3 ^a
R^2	0,9*	0,9±0,1	0,9*	0,3±0,1	0,7±0,3	0,9*
$E_{1/2}$	29±2 ^a	17±5 ^{a,b}	11±1 ^{b,c}	-	21±9 ^{a,b,c}	7 ^{c**}
$E_a \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$		20,8±1,9 ^A			-	
R^2		0,9*			-	

Média±desvio padrão (n=3). *Desvio padrão <0,01. **Desvio padrão <1 Médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$) na linha. Médias de E_a com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$) entre as duas concentrações iniciais de β -caroteno.

Um ponto que pode ter sido determinante nessa menor capacidade de ajuste é que a degradação do β -caroteno é auto catalítica e dependente de um período de indução (no qual

ocorre o acúmulo de radicais) (GOLDMAN; HOREV; SAGUY, 1983). Assim, baixas temperaturas e/ou ausência de exposição à luz durante os primeiros 30 d não foram suficientes para acelerar a formação de radicais para induzir os processos oxidativos do carotenoide, levando a um comportamento de degradação não exponencial. Shi et al. (2002), avaliaram a cinética de degradação do licopeno em purê de tomate exposto a calor e irradiação luminosa, e descreveram que a irradiação foi mais prejudicial que o aquecimento.

Também é importante notar que as várias referências que descrevem modelos de degradação de carotenoides geralmente usam sistemas em que esses compostos são diluídos em solventes orgânicos, como ciclohexano (Minguez-Mosquera; Jaren-Galan, 1995), tetraidrofurano (Scita, 1992) e/ou submetido a temperaturas mais elevadas do que as utilizadas no presente trabalho (Ahmed; Shivhare; Sandhu, 2002; Henry; Catignani; Schwartz, 1998), o que leva a um comportamento de degradação mais acelerado. Os resultados observados reiteram, como já descrito por outros estudos, o excelente potencial das nanoemulsões como opções para proteção de compostos bioativos.

Independentemente da concentração inicial de carotenoides, as amostras estocadas a 37 °C apresentaram as maiores degradações. Apesar da tendência de aumento dos valores de k com a elevação da temperatura os valores encontrados no presente trabalho, mesmo nas condições mais severas, foram inferiores aos valores de k ($0,105 \pm 0,02$ e $0,137 \pm 0,08 \text{ d}^{-1}$) para micropartículas lipídicas de β -caroteno com α -tocoferol (nas razões 1:1 e 2:1 carotenoide:tocoferol) como agente antioxidante (BRITO-OLIVEIRA et al., 2017).

A degradação observada durante os tratamentos térmicos e estocagem é consequência de reações de isomeração e degradação sofridas pelo β -caroteno em temperaturas elevadas (CHEN et al., 2017b). Porém, os ácidos graxos presentes no óleo também podem sofrer processos oxidativos a altas temperaturas, sendo assim, além dos processos de auto-oxidação e foto-oxidação, a degradação do β -caroteno pode ter sido acelerada pela presença de espécies reativas como os radicais alquila e peroxila (HONG et al., 2017; SOUKOULIS et al., 2017).

Aumento dos processos de degradação como a elevação da temperatura eram esperados, porém a meia vida das amostras de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ estocadas a 37 °C com e sem luz foram 80 % maiores do que aquelas encontradas para as formulações contendo $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Comportamento similar também foi observado durante os processos térmicos, onde as taxas de retenção foram maiores para as formulações com $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Devido à ausência de grupos polares em sua estrutura, o β -caroteno tende a localizar-se na fase lipídica do sistema. Essa ligação à cadeia dos ácidos graxos ocorre por interações de Van der Waals

(TAN et al., 2014), assim os menores conteúdos iniciais de carotenoide permitiram um melhor contato com a cadeia lipídica como pode ser comprovado pelas eficiências de encapsulamento - EE (%) – observadas no presente trabalho. Os valores de EE (%) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas formulações, $98,1 \pm 0,1$ % ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e $98,5 \pm 0,2$ % ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) o que provavelmente auxiliou na redução da degradação do carotenoide na formulação com menor conteúdo inicial de β -caroteno.

Apesar disso, nenhuma diferença estatística significativa ($p > 0,05$) foi observada nos valores de E_a (Tabela 3). Quanto maior a energia de ativação maior a sensibilidade térmica (MINGUEZ-MOSQUERA; JAREN-GALAN, 1995; TEO et al., 2017), porque esses valores representam que a cada elevação de um grau na temperatura, maiores as velocidades de degradação (SIERRA, 2012). Os valores encontrados no presente trabalho, na faixa de 20 kJ mol^{-1} , são menores do que os descritos por Teo et al. (2017) para emulsões de luteína estocadas a 5°C , 20°C e 40°C . A maior estabilidade térmica das nanoemulsões desenvolvidas no presente trabalho podem estar relacionadas com o tamanho de partícula. Teo et al., (2017) observaram que emulsões como tamanho médio de $68,8 \pm 0,3 \text{ nm}$ apresentaram maior E_a ($45,4 \pm 8,5 \text{ kJ mol}^{-1}$) sob as mesmas condições de estocagem de emulsões com o tamanho médio de $147,3 \pm 0,6 \text{ nm}$ ($38,0 \pm 12,0 \text{ kJ mol}^{-1}$). Esse comportamento é relacionado ao aumento da área superficial das gotas com o decréscimo do diâmetro, o que eleva a área de contato do carotenoide como agentes oxidantes (XU et al., 2017).

É importante destacar o fato de que as nanoemulsões descritas no presente trabalho apresentarem a capacidade de manter 70-80 % (após os tratamentos térmicos) e 60-80 % (nanoemulsões com $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ estocadas a 4°C e 25°C) do conteúdo de carotenoide é bastante satisfatório, uma vez que nenhum material que agiria como uma barreira física, tais como as proteínas (FAN et al., 2017b) e carboidratos (LIM; ROOS, 2017) ou qualquer outros antioxidantes (BRITO-OLIVEIRA et al., 2017) que poderiam auxiliar na proteção do carotenoide foi utilizado. Os resultados do presente estudo confirmam o potencial da nanotecnologia para melhorar a aplicabilidade de carotenoides, elevando seu uso, uma vez que alimentos funcionais enriquecidos com compostos bioativos, como β -caroteno, podem além da nutrição básica, prover benefícios a saúde, auxiliando na prevenção de doenças (JANA; GANDY; JANA, 2017) sendo de grande interesse para a indústria de alimentos.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a bem-sucedida encapsulação (mais de 98 %) de β -caroteno em sistemas de liberação baseados em nanoemulsões produzidas por homogeneização à alta pressão. Utilizando duas diferentes concentrações de β -caroteno foi possível produzir nanoemulsões com tamanho de partícula na faixa de 300 nm, escala apropriada para aplicações industriais em alimentos e cosméticos. As gotas das nanoemulsões apresentavam uma significativa carga negativa (maior que -25 mV) e índice de polidispersão menor que 0,20, demonstrando seu perfil monodisperso. Todas as nanoemulsões apresentaram excelente estabilidade contra o processo de coalescência das gotas após os tratamentos térmicos e estocagem em diferentes condições com pequenos valores para taxa de Ostwald *ripening*. Porém, a retenção do β -caroteno nas nanoemulsões foi dependente da temperatura de estocagem, da ausência de luz e da eficiência de encapsulamento. As nanoemulsões formuladas com 0,2 mg mL⁻¹ apresentaram melhores retenções de β -caroteno durante os processamentos térmicos e estocagem do que as nanoemulsões formuladas com 0,5 mg mL⁻¹. Independente da concentração inicial do carotenoide a melhor condição de estocagem para as nanoemulsões foi a 4 °C sem luz. Em geral, nossas observações fornecem novas informações sobre a estabilidade física e química das nanoemulsões de β -caroteno durante processos térmicos tradicionais na indústria de alimentos e condições ambientais, o que pode ser útil para a determinação das futuras aplicações dessas nanoemulsões em alimentos e produtos farmacêuticos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHIR, N.; DHUIQUE-MAYER, C.; HADJAL, T.; MADANI, K.; PAIN, J.; DORNIER, M. Pasteurization of citrus juices with ohmic heating to preserve the carotenoid profile. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 397–404, 2016.
- ACHIR, N.; RANDRIANATOANDRO, V. A.; BOHUON, P.; LAFFARGUE, A.; AVALLONE, S. Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 3, 349–361.
- AFFANDI, M. M. R.; JULIANTO, T.; MAJEED, A. B. A. Development and stability evaluation of Astaxanthin nanoemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, n. SUPPL. 1, p. 143–148, 2011.

AHMED, J.; SHIVHARE, U. S.; SANDHU, K. S. Thermal Degradation Kinetics of Carotenoids and Visual Color of Papaya Puree. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2692–2695, 2002.

AKHAVAN, S.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of natural food colorants. In: JAFARI, S. M. (Ed.). **Nanoencapsulation of food bioactive ingredients**. Academic Press, 2017. p. 223–259.

ANARJAN, N.; MIRHOSSEINI, H.; BAHARIN, B. S.; TAN, C. P. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 477–483, 2010.

ARANCIBIA, C.; MIRANDA, M.; MATIACEVICH, S.; TRONCOSO, E. Physical properties and lipid bioavailability of nanoemulsion-based matrices with different thickening agents. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 243–254, 2017.

BADAWY, M. E. I.; SAAD, A. S. A.; TAYEB, E. H. M.; MOHAMMED, S. A.; ABD-ELNABI, A. D. Optimization and characterization of the formation of oil-in-water diazinon nanoemulsions: Modeling and influence of the oil phase, surfactant and sonication. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 52, n. 12, p. 896–911, 2017.

BRITO-OLIVEIRA, T. C.; MOLINA, C. V.; NETTO, F. M.; PINHO, S. C. Encapsulation of beta-carotene in lipid microparticles stabilized with hydrolyzed soy protein isolate: production parameters, alpha-tocopherol coencapsulation and stability under stress conditions. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 659–669, 2017.

CARDOSO, L. A.; KARP, S. G.; VENDRUSCOLO, F.; KANNO, K. Y. F.; ZOZ, L. I. C.; CARVALHO, J. C. Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. In: CVETKOVIC, D.; NIKOLIC, G. (Ed.). **Carotenoids**. InTech, 2017, p.125-141.

CARPENTER, J.; SAHARAN, V. K. Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 422–430, 2017.

CERQUEIRA, M A; PINHEIRO, A. C.; RAMOS, O. L.; SILVA, H.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A. Advances in Food Nanotechnology. In: BUSQUETS, R. (Ed.). **Emerging nanotechnologies in food science**. Elsevier, 2017. p. 11–33.

CHAARI, M.; THEOCHARI, I.; PAPADIMITRIOU, V.; XENAKIS, A.; AMMAR, E. Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro- and nano-emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, p. 219–227, 2018.

CHEN, H.; ZHONG, Q. Thermal and UV stability of β -carotene dissolved in peppermint oil microemulsified by sunflower lecithin and Tween 20 blend. **Food Chemistry**, v. 174, p. 630–636, 2015.

CHEN, J.; LI, F.; LI, Z.; McCLEMENTS, D. J.; XIA, H. Encapsulation of carotenoids in emulsion-based delivery systems: Enhancement of β -carotene water-dispersibility and chemical stability. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 49–55, 2017.

CHEN, X.; CHEN, R.; GUO, Z.; LI, C.; LI, P. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1580–1584, 2007.

CHEN, Z.; SHU, G.; TAARJI, N.; BARROW, C. J.; NAKAJIMA, M.; KHALID, N.; NEVES, M. A. Gypenosides as natural emulsifiers for oil-in-water nanoemulsions loaded with astaxanthin: Insights of formulation, stability and release properties. **Food Chemistry**, v. 261, p. 322–328, 2018.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012, 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

DA SILVA, M. M.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; RUTZ, J. K.; CANTILLANO, R. F. F.; NORA, L.; RIOS, A. O. Thermal and ultraviolet–visible light stability kinetics of co-nanoencapsulated carotenoids. **Food and Bioproducts Processing**, v. 105, p. 86–94, 2017.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEL, S.; DAVARANI, F. H.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KRORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 1–17, 2018.

DORA, C. L.; PUTAUX, J.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; DUBREUIL, F.; SOLDI, V.; BORSALI, R.; LEMOS-SENNA, E. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 1972–1981, 2012.

FAN, Y.; YI, J.; ZHANG, Y.; WEN, Z.; ZHAO, L. Physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of β -carotene nanoemulsions stabilized with whey protein-dextran conjugates. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 256–264, 2017.

GOLDMAN, M.; HOREV, B.; SAGUY, I. Decolorization of β -Carotene in Model Systems Simulating Dehydrated Foods. Mechanism and Kinetic Principles. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 751–754, 1983.

GOMES, G. V. D. L.; BORRIN, T. R.; CARDOSO, L. P.; SOUTO, E., DE PINHO, S. C. Characterization and shelf life of β -carotene loaded solid lipid microparticles produced with stearic acid and sunflower oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 663–671, 2013.

GOMES, G. V. L.; SOLA, M. R.; MAROSTEGAN, L. F. P.; JANGE, C. G.; CAZADO, C. P. S.; PINHEIRO, A. C.; VICENTE, A. A.; PINHO, S. C. Physico-chemical stability and in vitro digestibility of β -carotene- loaded lipid nanoparticles of cupuaçu butter (*Theobroma*

grandi florum) produced by the phase inversion temperature (PIT) method. **Journal of Food Engineering**, v. 192, p. 93–102, 2017.

GRUNE, T.; LIETZ, G.; PALOU, A.; ROSS, A. C.; STAHL, W.; THURNHAM, D.; YIN, S. A.; BIESALSKI, H. K. β -Carotene is an important vitamin a source for humans. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2268S–2285S, 2010.

GUAN, Y.; WU, J.; ZHONG, Q. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene. **Food Chemistry**, v. 194, p. 787–796, 2016.

HENRY, L. K.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Oxidative Degradation Kinetics of Lycopene, Lutein, and 9- cis and All- trans β -Carotene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 7, p. 823–829, 1998.

HONG, L.; ZHOU, C. L.; CHEN, F. P.; HAN, D.; WANG, C. Y.; LI, J. X.; CHI, Z.; LIU, C. G. Development of a carboxymethyl chitosan functionalized nanoemulsion formulation for increasing aqueous solubility, stability and skin permeability of astaxanthin using low-energy method. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 8, p. 707–721, 2017.

HSU, H. J.; HUANG, R. F.; KAO, T. H.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Preparation of carotenoid extracts and nanoemulsions from *Lycium barbarum* L. and their effects on growth of HT-29 colon cancer cells. **Nanotechnology**, v. 28, n. 13, p. 135103, 2017.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 8 abr. 2015.

JANA, S.; GANDY, A.; JANA, S. Nanotechnology in Bioactive Food Ingredients: Its Pharmaceutical and Biomedical Approaches. In: OPREA, A. E.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). **Nanotechnology Applications in Food: flavor, stability, nutrition and Safety**. Academic Press, 2017. p. 21–28.

JO, Y. J.; KWON, Y. J. Characterization of β -carotene nanoemulsions prepared by microfluidization technique. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 107–113, 2014.

KHALID, N.; SHU, G.; HOLLAND, B. J.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M.; BARROW, C. J. Formulation and characterization of O/W nanoemulsions encapsulating high concentration of astaxanthin. **Food Research International**, v. 102, n. April, p. 364–371, 2017.

KOTÍKOVÁ, Z.; ŠULC, M.; LACHMAN, J.; PIVEC, V.; ORSÁK, M.; HAMOUZ, K. Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. **Food Chemistry**, v. 197, p. 992–1001, 2016.

LIM, A. S. L.; ROOS, Y. H. Carotenoids stability in spray dried high solids emulsions using layer-by-layer (LBL) interfacial structure and trehalose-high DE maltodextrin as glass former. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 32–39, 2017.

LUO, X.; ZHOU, Y.; BAI, L.; LIU, F.; DENG, Y.; McCLEMENTS, D. J. Fabrication of β -carotene nanoemulsion-based delivery systems using dual-channel microfluidization: Physical and chemical stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 328–335, 2017.

MARTÍNEZ, J. M. H. **Nanocarreadores lipídicos contendo ácidos graxos insaturados provenientes de Tainha (*Mugil liza*) como transportadores de carotenoides**. 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

McCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. General aspects of nanoemulsions and their formulation. In: JAFARI, S. M.; MCCLEMENT, D. J. (Eds.). **Nanoemulsions: formulation, applications, and characterization**. Elsevier Inc., 2018. p. 3–20.

MENG, Q.; LONG, P.; ZHOU, J.; HO, C.; ZOU, X.; CHEN, B. Improved absorption of β -carotene by encapsulation in an oil-in-water nanoemulsion containing tea polyphenols in the aqueous phase. **Food Research International**, v. 116, n. June 2018, p. 731–736, 2019.

MICALI, M.; FIORINO, M.; PARISI, S. **The Chemistry of Thermal Food Processing Procedures**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

ÖZDEMİR, S.; ÇELİK, B.; SÜMER, E.; ACAR, E. T.; ÜNER, M. Eplerenone nanoemulsions for treatment of hypertension. Part II: Physical stability assessment and *in vivo* study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, n. November 2017, p. 287–295, 2018.

RAHMAN, M.; KHAN, M. A.; RUD, M. A.; HOQUE, M. A.; ASIRI, A. M. Investigation of the effect of various additives on the clouding behavior and thermodynamics of polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate in absence and presence of ceftriaxone sodium trihydrate drug. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 62, n. 4, p. 1464–1474, 2017.

RAMYADEVI, D.; RAJAN, K. S. Synthesis of hybrid polymer blend nanoparticles and incorporation into in situ gel foam spray for controlled release therapy using a versatile synthetic purine nucleoside analogue antiviral drug. **RSC Advances**, v. 5, n. 17, p. 12956–12973, 2015.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington D.C.: ILSI Press, 2001.

SÁIZ-ABAJO, M. J.; GONZÁLEZ-FERRERO, C.; MORENO-RUIZ, A.; ROMO-HUALDE, A., & GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1581–1587, 2013.

SCITA, G. Stability of β -carotene under different laboratory conditions. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 3, n. 3, p. 124–128, 1992.

SHAH, M. R.; IMRAN, M.; ULLAH, S. **Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis**. Elsevier, 2017.

SHI, J.; MAGUER, M. L. E.; BRYAN, M.; KAKUDA, Y. (2002). Kinetics of lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation. **Journal of Food Process Engineering**, 25, 485–498.

SHU, G.; KHALID, N.; CHEN, Z.; NEVES, M. A.; BARROW, C. J.; NAKAJIMA, M. Formulation and characterization of astaxanthin-enriched nanoemulsions stabilized using ginseng saponins as natural emulsifiers. **Food Chemistry**, v. 255, n. February, p. 67–74, 2018.

SIERRA, C. A. Temperature sensitivity of organic matter decomposition in the Arrhenius equation : some theoretical considerations. **Biogeochemistry**, v. 108, p. 1–15, 2012.

SOUKOULIS, C.; TSEVEDOU, M.; YONEKURA, L.; CAMBIER, S.; TAOKIS, P. S.; HOFFMANN, L. Does kappa-carrageenan thermoreversible gelation affect β -carotene oxidative degradation and bioaccessibility in o/w emulsions? **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 259–269, 2017.

TAN, C.; XUE, J.; LOU, X.; ABBAS, S.; GUAN, Y.; FENG, B.; ZHANG, X.; XIA, S. Liposomes as delivery systems for carotenoids: Comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1232–1240, 2014.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions: Estimation of solution thermodynamics of the disperse phase. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 106, n. 1–3, p. 261–285, 2003.

TEO, A.; GOH, K. K. T.; WEN, J.; OEY, I.; KO, S.; KWAK, H.; LEE, S. J. Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. **Food Chemistry**, v. 197, p. 297–306, 2016.

TEO, A.; LEE, S. J.; GOH, K. K. T.; WOLBER, F. M. Kinetic stability and cellular uptake of lutein in WPI-stabilised nanoemulsions and emulsions prepared by emulsification and solvent evaporation method. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1269–1276, 2017.

XU, D.; QI, Y.; WANG, X.; LI, X.; WANG, S.; CAO, Y.; WANG, C.; SUN, B.; DECKER, E.; PANYA, A. The influence of flaxseed gum on the microrheological properties and physicochemical stability of whey protein stabilized β -carotene emulsions. **Food and Function**, v. 8, n. 1, p. 415–423, 2017.

YI, J.; LAM, T. I.; YOKOYAMA, W.; CHENG, L. W.; ZHONG, F. Cellular Uptake of beta-Carotene from Protein Stabilized Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Homogenization-Evaporation Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1096–1104, 2014.

YI, J.; NING, J.; ZHU, Z.; CUI, L.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Impact of interfacial composition on co-oxidation of lipids and proteins in oil-in-water emulsions: Competitive displacement of casein by surfactants. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 20–28, 2019.

ZAMBIAZI, R. C.; Przybylski, Roman; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 111–120, 2007.

ZARDINI, A. A.; MOHEBBI, M.; FARHOOSH, R.; BOLURIAN, S. Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing

lycopene for food fortification. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 287–298, 2018.

ZHAI, X.; LIN, D.; LIU, D.; YANG, X. Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. **Food Research International**, v. 103, p. 12–20, 2018.

ARTIGO 3
ESTABILIDADE, REOLOGIA E TEXTURA DE IOGURTES ADICIONADOS DE
NANOEMULSÃO DE β -CAROTENO

RESUMO

Diferentes técnicas de nanoencapsulamento vêm demonstrando uma alta capacidade de proteger compostos bioativos durante o armazenamento e facilitar sua manipulação. No entanto, a adição dessas nanoestruturas, como nanoemulsões, pode afetar a aparência, textura e estabilidade dos produtos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do enriquecimento de iogurte com nanoemulsões de β -caroteno na viscosidade, textura e estabilidade do produto. As nanoemulsões foram formuladas com óleo de milho e β -caroteno por homogeneização à alta pressão, e quatro formulações de iogurte foram desenvolvidas: controle (IC), com amarelo tartrazina (IAT), com β -caroteno não encapsulado (I β) e com nanoemulsão de β -caroteno (IN β). Os iogurtes com nanoemulsões apresentaram comportamento semelhante nos parâmetros pH e acidez titulável às demais amostras. No entanto, a adição de nanoemulsões afetou significativamente ($p < 0,05$) a sinérese, reologia e textura do iogurte. As amostras com nanoemulsões apresentaram apenas uma pequena variação de cor ($\Delta E = 1,52 \pm 0,55$), com conteúdo de β -caroteno sem variações significativas durante o armazenamento. Os resultados mostram que o uso de nanoemulsões como carreadores de compostos lipofílicos, como os carotenoides, pode melhorar a dispersão e a estabilidade desses compostos em produtos ácidos, como o iogurte, reduzindo o processo de degradação desses bioativos.

Palavras-chave: Carotenoides. Corantes. Lácteos. Nanotecnologia.

1 INTRODUÇÃO

Carotenoides possuem estrutura básica formada por unidades de isopreno ligadas covalentemente (CARDOSO et al., 2017) e sua longa cadeia de duplas ligações tornam esses compostos suscetíveis a degradações químicas por diferentes fatores como pH, luz, oxigênio e metais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Além disso, a característica lipofílica da maioria dos carotenoides dificulta sua incorporação em alimentos e bebidas (BOON et al., 2009) e outras formulações aquosas (VELIKOV; PELAN, 2008).

A deficiência de vitamina A é uma das maiores preocupações mundiais especialmente em países subdesenvolvidos e considerada um problema de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). O β -caroteno é o principal precursor da vitamina A dentre os 50 carotenoides que possuem essa capacidade (CARDOSO et al., 2017), sendo naturalmente encontrado em alimentos como repolho, nabo, espinafre, alface, manga, melão, pimentão, cenoura e batata doce (BOON et al., 2010).

Alimentos funcionais enriquecidos com componentes bioativos, como carotenoides (BORRIN et al., 2018; MEZQUITA et al., 2015; RUTZ et al., 2016; ZARDINI et al., 2018), podem prover além da nutrição básica benefícios a saúde, assistindo na prevenção de doenças (JANA; GANDY; JANA, 2017) sendo assim de grande interesse para a indústria de alimentos. Alguns estudos descrevendo o enriquecimento de iogurtes com carotenoides podem ser encontrados na literatura (DOMINGOS et al., 2014; FENG et al., 2018; MEZQUITA et al., 2014). Para superar sua baixa solubilidade em sistemas aquosos e alta degradação, algumas tecnologias como a microencapsulação são utilizadas (RUTZ et al., 2016). Outra opção, ainda pouco explorada para produtos lácteos, é o uso de nanocarreadores, já utilizados em bebidas isotônicas (BOVI; PETRUS; PINHO, 2017) e suco de laranja (ZARDINI et al., 2018) para carrear carotenoides e para incorporar outros compostos bioativos como curcumina em sorvetes (BORRIN et al., 2018) e óleo de peixe em iogurtes (GHORBANZADE et al., 2017).

Nanoemulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis (água e óleo) estabilizadas por um filme interfacial de surfactante, com gotas de tamanho médio de 100-500 nm (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017). O desenvolvimento de nanoemulsões de β -caroteno pode melhorar a biodisponibilidade (YI et al., 2014) além de apresentar capacidade de proteger os carotenoides (GUAN; WU; ZHONG, 2016). Porém, a adição de nanoestruturas, como as nanoemulsões, pode afetar a aparência, textura e estabilidade dos

produtos. Assim o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de nanoemulsões de β -caroteno em parâmetros tecnológicos e estabilidade de iogurtes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Óleo de milho (Cargill, Mato Grosso, Brasil), Tween 20 (LabSynth, São Paulo, Brasil), Span 80 (Sigma–Aldrich, Hessen, Alemanha), β -caroteno (Sigma–Aldrich), água ultra pura obtida em sistema de filtração Millipore Milli-Q (Merck, Hessen, Alemanha), leite integral em pó instantâneo, gentilmente cedido pela empresa CCGL (Cruz Alta, Brasil), mix de cultura láctea BioRich® gentilmente cedida pela empresa Chr. Hansen (Hoersholm, Dinamarca). Todos os outros reagentes eram de grau analítico.

2.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES

Para o preparo das nanoemulsões, a fase oleosa foi composta por (relação de massa do componente por massa total de fase oleosa - $m\ m^{-1}$): 70 % de óleo e 30 % de Span® 80 e a fase aquosa foi composta por 10 mL de água e 1 % ($m\ v^{-1}$ – relação massa de surfactante por volume de fase aquosa) de Tween 20. A fase oleosa foi aquecida a 60 °C juntamente com o β -caroteno (0,2 mg mL^{-1} de formulação final) e a fase aquosa foi aquecida a 80 °C, ambas sob agitação magnética. Depois da completa dissolução das fases, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa (relação de 10:1) sob agitação magnética constante (700 rpm). A emulsão formada foi homogeneizada por 2 min a 14.500 rpm em Ultra-turrax® (T10 basic, IKA) e na sequência foi submetida a seis ciclos de 20 s a 68,9 MPa em homogeneizador à alta pressão (EmulsiFlex-C3, Avestin) (MARTÍNEZ, 2016).

O tamanho de partícula das nanoemulsões foram determinadas em triplicata por espalhamento de luz dinâmico, utilizando o equipamento Zetasizer (Nano-ZS90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). A morfologia foi observada utilizando um Microscópio de transmissão eletrônico (120 keV, Jeol, JEM-1400, acoplado com microprobe EDS) após preparo das amostras indicado pelo Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL). Os grids foram primeiramente expostos por 20 min a luz UV e após adicionada 1 gota da amostra (diluída 40x em água destilada) no grid, exposto novamente a 20 minutos a luz UV

para fixação da amostra aos grids) e então retirado o excesso de líquido da formulação com papel absorvente. Fez-se então a adição de uma gota do corante acetato de uranila no grid contendo as amostras e após 10 minutos retirou-se o excesso de corante com papel absorvente e deixou-se em repouso por 20 minutos. O grid com as formulações já coradas foi colocado em dessecador e aguardado 24 h antes da análise no MET.

2.3 PREPARO DO IOGURTE

No preparo do iogurte integral foi utilizado leite integral em pó instantâneo, gentilmente cedido pela empresa CCGL (Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil), reconstituído conforme instruções do fabricante. O leite foi aquecido até 45 °C e adicionado do mix de cultura láctea BioRich® gentilmente cedida pela empresa Chr. Hansen (Hoersholm, Dinamarca). Durante o processo de fermentação a temperatura foi mantida a 45 °C e ao longo do processo o pH foi determinado até atingir valor de 4,7, quando foi interrompida a fermentação via resfriamento rápido até 8 °C (MARTINS et al., 2012).

Foram desenvolvidas 4 formulações: iogurte integral sem adição de corante considerado como controle (IC), iogurte adicionado de 15 % (v v⁻¹) de nanoemulsão de β -caroteno (IN β), iogurte com adição de β -caroteno não encapsulado (I β) adicionado na mesma concentração final de carotenoide que o adicionado ao IN β (30 mg L⁻¹) e iogurte adicionado de 1 mg L⁻¹ de corante amarelo tartrazina (IAT) gentilmente cedido pela empresa Duas Rodas (Jaguará do Sul, Santa Catarina, Brasil).

As amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno (70 mL) estéreis e armazenadas a 4 °C durante 4 semanas. Durante o período de armazenamento foram acompanhados para todas as formulações os parâmetros pH, acidez titulável e sinérese. Determinação do teor de carotenoides foram realizados nas amostras IN β . Enquanto a variação de cor foi determinada para a formulação controle (IC) no início do armazenamento (t=0 d) e nas formulações IN β , I β e IAT ao longo de 30 d (t= 0, 7, 21 e 30 d).

2.4 DETERMINAÇÃO DE pH E ACIDEZ TITULÁVEL

O pH das amostras foi determinado ao longo da fermentação láctica e no produto por leitura em pHmetro digital (AOAC, 2000).

Para análise da acidez titulável foram pesados 10 g da amostra, adicionados 10 mL de água isenta de gás carbônico e 4 a 5 gotas do indicador fenolftaleína. A mistura foi

titulada com solução padronizada de hidróxido de sódio sob agitação, até ponto final detectável pelo aparecimento de coloração rósea (AOAC, 2000).

2.5 SINÉRESE

Para a análise de sinérese foram pesados aproximadamente 10 g de amostra em tubos de centrífuga de 50 mL, homogeneizadas com bastão de vidro, sendo agitados 20 vezes no sentido horário e 20 no sentido anti-horário. Após a homogeneização as amostras foram armazenadas por 2 h a 4 °C para estabilização. Decorrido o período de estabilização as amostras foram centrifugadas a 10 °C, 3237×g por 12 min. O soro separado foi pesado e a sinérese expressa conforme a Equação 1 (AMATAYAKUL; SHERKAT; SHAH, 2006):

$$\text{Sinérese (\%)} = \frac{\text{massa de soro}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad (1)$$

2.6 ACOMPANHAMENTO DE β -CAROTENO

O acompanhamento do teor de carotenoides nos iogurtes foi realizado por método descrito por Mezquita et al. (2015) com modificações. Para isso 4 g de amostra foram misturadas com 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 3 mL de acetona, 2 mL de solução de NaCl 20 % (m v⁻¹) e 2 mL de hexano em tubos cônicos de 15 mL. A mistura foi agitada em vórtex por 15 s e centrifugada a 2147×g por 5 min. A fase hexano contendo os carotenoides foi removida e armazenada. Extrações sucessivas da mistura foram realizadas com 2 mL de hexano, até não ser observada nenhuma coloração.

A determinação da concentração de carotenoides totais no hexano foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) utilizando a Equação 2, de acordo com Davies (1976):

$$CT = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{A_1^{1\%} \cdot 100 \cdot m} \quad (2)$$

Onde: CT = concentração de carotenoides totais (µg g⁻¹); A = absorbância; V = volume (mL); m = massa da amostra (g); $A_1^{1\%}$ = absortividade específica β -caroteno em hexano (2592).

2.7 VARIAÇÃO DE COR

A variação de cor dos iogurtes foram determinadas utilizando-se calorímetro Minolta (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Osaka, Japão) em sistema CIELab (iluminante D65), onde a^* indica a região do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$), b^* indica a região do amarelo ($+b^*$) ao azul ($-b^*$) e L^* a luminosidade.

A partir desses parâmetros calculou-se a diferença de cor (ΔE) pela da Equação 3 (YUAN et al., 2018), o Croma pela Equação 4 e ângulo Hue pela Equação 5 (TUPUNA et al., 2018).

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (3)$$

$$\text{Croma} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

$$\text{Hue} = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (5)$$

Onde: L_0^* , a_0^* e b_0^* são os parâmetros no tempo inicial da amostra e L^* , a^* e b^* são os parâmetros no tempo em que está sendo feita a determinação.

2.8 REOLOGIA EM ESTADO ESTACIONÁRIO

Para a análise de viscosidade utilizou-se reômetro rotacional Brookfield (modelo DV-III, Brookfield Engineering Laboratories Inc., USA) equipado com um eixo cônico CP51 (com ângulo 1.565° e 1,2 cm de raio) com adaptador para pequenas amostras (0,5 mL). As leituras foram realizadas em intervalos de 15 s e a taxa de cisalhamento variou de 0 a 100 s^{-1} (TRINDADE; MUNHOZ; BURKERT, 2018).

A partir das curvas de viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento (APÊNDICE 8) testou-se o modelo Ostwald de Waele (Equação 6) e a viscosidade aparente foi estimada através da Equação 7:

$$\sigma = K \dot{\gamma}^n \quad (6)$$

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (7)$$

Onde: σ = tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento (s^{-1}), η = viscosidade aparente (Pa s); K = índice de consistência ($Pa.s^n$); n =índice de comportamento de fluco (adimensional).

2.9 PERFIL DE TEXTURA

A textura do iogurte foi determinada por ensaios de penetração em texturômetro (TA.XT plus, Stable Micro Systems Ltd., Inglaterra). Os ensaios foram conduzidos nas condições descritas pelo software do equipamento para análise de iogurte, sendo elas: probe em formato de disco com 35 mm de diâmetro, velocidade de penetração de $1,0 \text{ mm s}^{-1}$, distância de penetração de 30 mm. Para cada ensaio foram utilizados 100 g de amostra e quatro parâmetros foram determinados: firmeza (N) que representa a força necessária durante a “primeira mordida” (PONS; INDUSTRIES; FISZMAW, 1996), consistência ($N s^{-1}$) que representa o trabalho ou energia necessário para comprimir a amostra (NASARUDDIN et al., 2012), coesividade (N) que representa quantidade de deformação exigida antes da ruptura da amostra (NASARUDDIN, et al. 2012) e índice de viscosidade ($N s^{-1}$) que fisicamente determina a resistência ao escoamento exercida pela amostra.

2.10 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

Umidade, cinzas, proteínas e conteúdo lipídico foram determinados segundo AOAC (2000) e o teor de carboidratos foi estimado por diferença dos demais componentes.

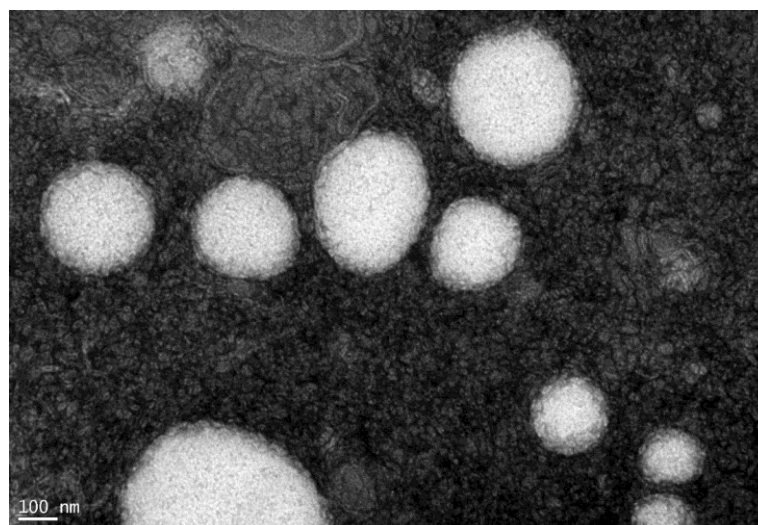
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos e análises foram realizados em triplicata e os dados analisados por análise de variância (ANOVA) e se necessário submetidos a teste de Tukey ($p < 0,05$) ou teste t ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanoemulsões de β -caroteno e óleo de milho apresentavam tamanho médio na faixa de 300 nm e sua estrutura pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Microscopia de Transmitância Eletrônica - MET (x100) de nanoemulsões de β -caroteno e óleo de milho.



Os iogurtes adicionados de nanoemulsões apresentaram-se visualmente homogêneos, sem separação de fases até o 21º d de estocagem, quando foi observada a formação de um pequeno halo oleoso na parte superior das amostras, que desaparecia com a agitação da amostra. Essa boa homogeneidade pode estar ligada ao fato de que emulsões estabilizadas com surfactantes não iônicos como o Tween 20 e o Span 80 apresentam elevada estabilidade a baixos pH, como por exemplo os encontrados em produtos como o iogurte e em condições gástricas (GOLDING et al., 2011; SALVIA-TRUJILLO et al., 2018).

Quando o β -caroteno foi adicionado na forma não encapsulada (I β) os iogurtes apresentaram um aspecto heterogêneo, com partículas de carotenoides não solubilizados. Comportamento semelhante ao deste trabalho ocorreu em bebidas de laranja fortificadas com licopeno não encapsulado em comparação com o uso de nanocápsulas de licopeno. Sendo que, o encapsulamento do carotenoide permitiu eliminar algumas desvantagens como sabor residual e a baixa solubilidade do licopeno na matriz alimentícia (ZARDINI et al., 2018).

A diferença de homogeneidade das amostras adicionadas com nanoemulsões ou somente carotenoides demonstra uma importante vantagem do uso de nanoencapsulação para produzir carreadores de compostos lipofílicos, que podem ajudar e simplificar a manipulação,

aplicação e dispersão destes compostos em diferentes matrizes alimentares (GHAYOUR et al., 2019). Além disso, a biodisponibilidade do β -caroteno na forma cristalina é bastante reduzida (PARADA, AGUILERA, 2007), assim sua solubilização em lipídeos (como ocorre na formulação de nanoemulsões), especialmente os compostos por triglicerídeos de cadeia longa como o óleo de milho, é considerada um cofator extremamente importante, elevando consideravelmente a biodisponibilidade do carotenoide (RAO et al. 2013).

Na Figura 2 estão apresentados os acompanhamentos de acidez titulável, pH e sinérese das quatro formulações de iogurte desenvolvidas: IC (a), I β (b), IN β (c) e IAT (d) durante 30 d de armazenamento. De forma geral não foram verificadas alterações significativas ($p>0,05$) na acidez titulável dos iogurtes ao longo do período de armazenamento, ficando na faixa de 0,6-0,7 %. Comparando-se entre os iogurtes, a formulação IAT apresentou acidez titulável significativamente ($p<0,05$) mais elevada no início do armazenamento em comparação as demais formulações, não sendo observada diferença significativa ($p>0,05$) no fim do período de estocagem.

Os valores de pH variaram de 4,2 a 4,4, sendo que no tempo zero a formulação I β apresentou valor de pH significativamente ($p<0,05$) mais alto que as demais. Após 30 d de estocagem as amostras IC e I β apresentaram pH ($4,39\pm0,01$) mais alto ($p<0,05$) do que as amostras IN β e IAT ($4,33\pm0,02$).

Um dos defeitos encontrados em iogurtes é a separação de soro, chamado de sinérese (AMATAYAKUL; SHERKAT; SHAH, 2006). Nesse parâmetro não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) comparando a mesma amostra nos tempos 0 e 30 d. Porém a amostra adicionada de nanoemulsão (IN β) apresentou uma sinérese aproximadamente 11,7 % e 10,9 % superior ($p<0,05$) as demais amostras nos tempos 0 e 30 d, respectivamente.

Assim como a sinérese, os parâmetros de textura e reologia foram significativamente ($p<0,05$) influenciados pela adição de nanoemulsão (Tabela 1). O iogurte com nanoemulsão (IN β) apresentou redução de 43 % na firmeza (PONS; INDUSTRIES; FISZMAW, 1996). Isso pode estar ligado a redução do teor de proteínas e aumento dos lipídios, observado na formulação com nanoemulsão (Tabela 2), uma vez que a rede de proteínas recobre os glóbulos de gordura o que melhora a interação proteína-proteína e por consequência eleva a firmeza (IZADI; NASIRPOUR; GAROOSI, 2015). Esta mesma formulação apresentou redução de 55 % na consistência, elevação de 39 % coesividade e um índice de viscosidade 66 % superior a amostra sem nanoemulsão.

Figura 2 - Acompanhamento da acidez titulável, pH e sinérese dos iogurtes IC (a), I β (b), IN β (c) e IAT (d) durante 30 d de armazenamento.

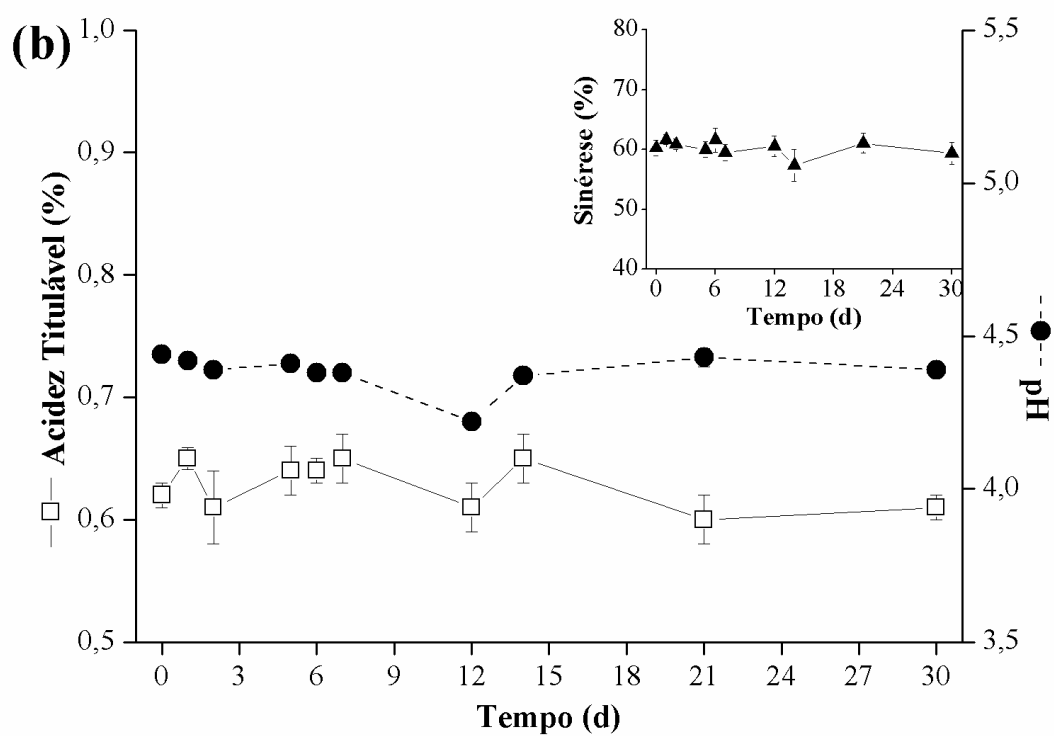
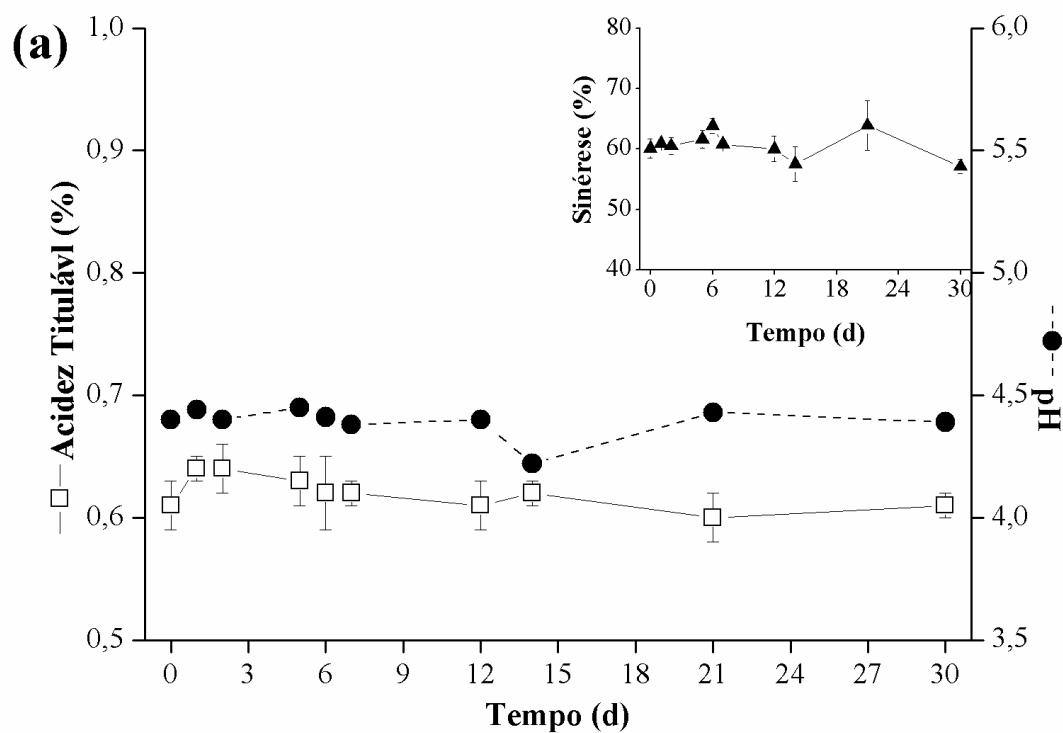


Figura 2 cont. - Acompanhamento da acidez titulável, pH e sinérese dos iogurtes IC (a), I β (b), IN β (c) e IAT (d) durante 30 d de armazenamento dos iogurtes.

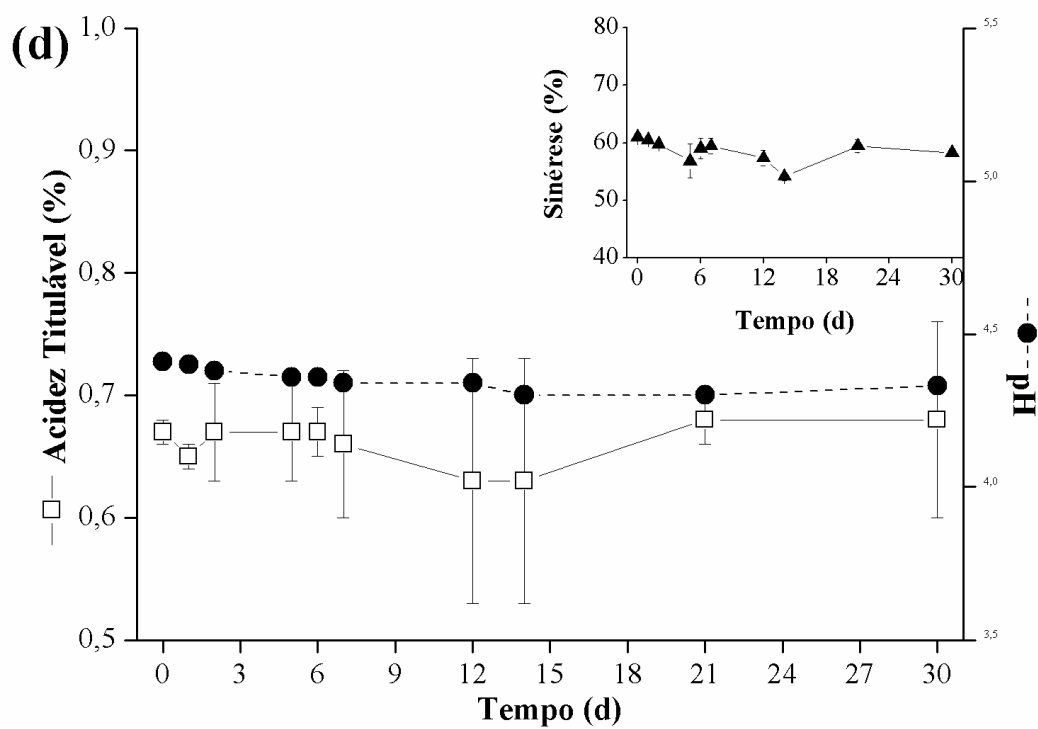
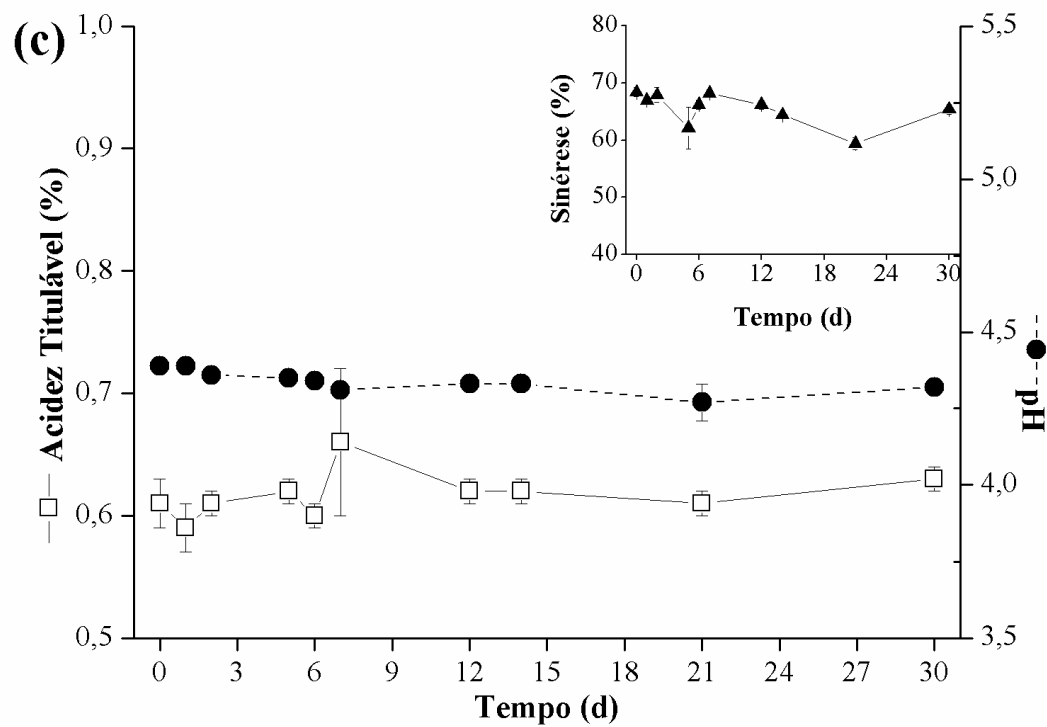


Tabela 1 - Parâmetros de textura do iogurte com e sem nanoemulsões.

Parâmetros	Formulação	
	Sem nanoemulsão (IC)	Com nanoemulsão (INβ)
Firmeza (N)	0,23±0,01 ^a	0,13±0,01 ^b
Consistência (N s ⁻¹)	5,29±0,36 ^a	2,38±0,27 ^b
Coesividade (N)	-0,19±0,01 ^b	-0,12±0,07 ^a
Índice de viscosidade (N s ⁻¹)	-0,43±0,03 ^b	-0,14±0,02 ^a

Média±desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística (p<0,05) pelo teste t.

Tabela 2 - Caracterização (base seca) das amostras de iogurte com e sem adição de nanoemulsão.

Composição (%)	Amostra	
	Sem nanoemulsão (IC)	Com Nanoemulsão (INβ)
Cinzas	0,6* ^a	0,5* ^b
Proteína	26,5±1,5 ^a	21,3±2,1 ^b
Lipídios	8,0±0,6 ^b	23,8±3,7 ^a
Carboidratos**	64,8	54,3

Média±desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística (p<0,05) pelo teste t. *desvio padrão<0,1. **Valores obtidos por diferença dos demais componentes.

Na Tabela 3 estão apresentados valores de η em quatro taxas de cisalhamento retirados das curvas plotadas a partir dos experimentos de reologia (APÊNDICE 8). Foi possível perceber que, independente da variação da taxa de cisalhamento, os iogurtes adicionados de nanoemulsão apresentaram menores viscosidades do que as amostras sem adição de nanoemulsão. Por exemplo, na faixa estudada que está dentro do considerado como as taxas de cisalhamento que ocorrem durante a mastigação, que fica entre 50 e 200 s⁻¹ (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004), os valores de viscosidade dos iogurtes com nanoemulsão foram 52% (50 s⁻¹) e 55 % (99 s⁻¹) menores.

Iogurtes com e sem adição de nanoemulsão apresentaram bom ajuste ao modelo Ostwald de Waele ($R^2=0,98$ e $0,87$, respectivamente) (Tabela 4). A adição de nanoemulsões reduziram significativamente (p<0,05) o coeficiente de consistência (K), de 6,93 Pa sⁿ (sem

nanoemulsão - IC) para 3,68 Pa sⁿ (com nanoemulsão - IN β). O valor de K demonstra a resistência ao cisalhamento do material (DE OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018), o que significa que a resistência à deformação das formulações sem nanoemulsões é maior que a das formulações com nanoemulsões.

Tabela 3- Viscosidades aparentes em diferentes taxas de cisalhamento de iogurtes sem e com adição nanoemulsão

Taxa de cisalhamento (s ⁻¹)	η (mPa s)	
	Sem nanoemulsão (IC)	Com nanoemulsão (IN β)
7	1370,9 $\pm$ 299,3 ^a	453,7 $\pm$ 17,1 ^b
34	255,0 $\pm$ 13,6 ^a	115,7 $\pm$ 3,4 ^b
50	176,2 $\pm$ 4,6 ^a	84,8 $\pm$ 2,3 ^b
99	93,3 $\pm$ 4,6 ^a	51,7 $\pm$ 2,9 ^b

Média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística (p<0,05) pelo teste t.

A adição de nanoemulsão aumentou significativamente (p <0,05) o índice de comportamento do fluxo (n), que designa o desvio do fluxo newtoniano (DE OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018), de 0,07 (sem nanoemulsão) para 0,20 (com nanoemulsão) (Tabela 4). Esse parâmetro, com valores menores que 1, demonstrou que ambas as formulações de iogurte estudadas apresentaram comportamento de fluidos pseudoplásticos (PASEEPHOL; SMALL; SHERKAT, 2008).

Tabela 4 – Parâmetros reológicos de iogurtes com e sem adição de nanoemulsões.

Amostra	K	n	R ²
Sem nanoemulsão (IC)	6,93 $\pm$ 1,14 ^a	0,07 $\pm$ 0,01 ^b	0,87 $\pm$ 0,05
Com Nanoemulsão (IN β)	3,68 ^{b*}	0,20 ^{a*}	0,98*

Média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística (p<0,05) pelo teste t. *desvio padrão < 0,01.

O aumento da expulsão do soro através da sinérese, o efeito na reologia e textura do produto podem também estar relacionados à água adicionada ao produto a partir da nanoemulsão, que não pode ser retida pela matriz do gel resultando em aumento da sinérese e/ou por uma redução no conteúdo de sólidos (VARELTZIS et al., 2016). Outra causa do

aumento da sinérese poderia ser o fato de que durante a mistura das nanoemulsões a estrutura do gel formado pode ter sido danificada, reduzindo sua capacidade de retenção (ZHONG et al., 2018).

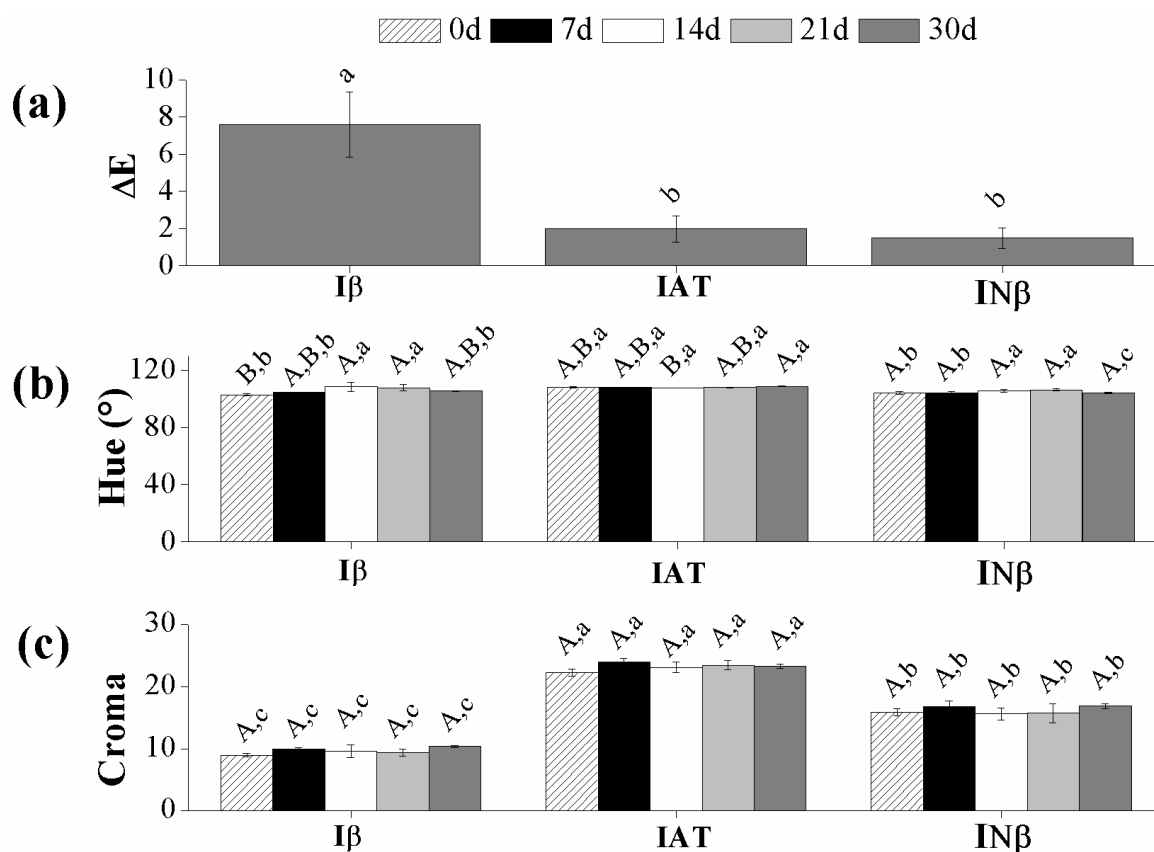
Outros trabalhos com iogurtes adicionados de nanoestruturas descrevem valores de sinérese bem inferiores aos encontrados neste trabalho, por exemplo, 10 % para iogurtes adicionados de nanoemulsões de óleo de peixe e γ -oryzanol (ZHONG et al., 2018) e 30 % para iogurtes adicionados de nanolipossomas de óleo de peixe (GHORBANZADE, et al. 2017). Porém é necessário destacar que no primeiro caso foi utilizada uma metodologia onde não se faz uso da força centrífuga, o que diminui a separação do soro e no segundo caso, o iogurte ao qual os lipossomas foram adicionados não foi produzido pelos autores e sim adquirido comercialmente.

Sendo assim é de grande importância ressaltar que as formulações desenvolvidas no presente trabalho não possuíam nenhum agente estabilizante ou espessante, que pudesse auxiliar na redução da sinérese ou aumento de textura, assim como foram submetidas a forças externas bem superiores (através da aplicação de força centrípeta) do que normalmente ocorreriam durante o período de estocagem de produtos comerciais. Tais interferências nos parâmetros de sinérese, reologia e textura podem ser contornados pelo aumento dos sólidos totais ou adição de agentes estabilizantes ou espessantes (IZADI; NASIRPOUR; GAROOSI, 2015).

O enriquecimento de produtos alimentícios com β -caroteno é bastante atrativo tanto do ponto de vista nutricional, pois esse carotenoide é um precursor da vitamina A, assim como o aspecto sensorial, por sua ação como corante. As alterações de cor das amostras I β , IAT e IN β foram determinadas pelos parâmetros ΔE (entre $t=0$ e $t=30$ d), ângulo Hue e croma no período de armazenamento (Figura 3) utilizando os valores de $L^*a^*b^*$ (APÊNDICE 9).

A formulação I β apresentou após 30 d uma variação de cor de $7,59 \pm 1,77$, expressa pelos valores de ΔE , significativamente ($p < 0,05$) maior em comparação com as amostras IAT ($1,96 \pm 0,69$) e IN β ($1,52 \pm 0,55$). Segundo Barba; Esteve; Frigola (2013), a variação da cor da formulação I β pode ser classificada como elevada (maior que 6), e embora a variação de cor das outras duas formulações seja menor que a I β , elas podem ser notadas (ΔE entre 1,5-3,0). O mesmo comportamento foi observado em sorvetes de abacaxi acrescidos de nanoemulsões de curcumina (substituindo 50 e 100 % mistura comercial de corantes amarelos), que apresentaram um menor ΔE ($p < 0,05$) ($4,57 \pm 0,01$ e $4,95 \pm 0,03$), do que as amostras com curcumina livre ($\Delta E = 7,72 \pm 0,04$) (BORRIN et al., 2018).

Figura 3 - Variação de cor (a), Hue (b) e croma (c) durante 30 d de estocagem.



Média±desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$) entre as amostras para o mesmo tempo. Médias com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$) da mesma amostra entre os tempos.

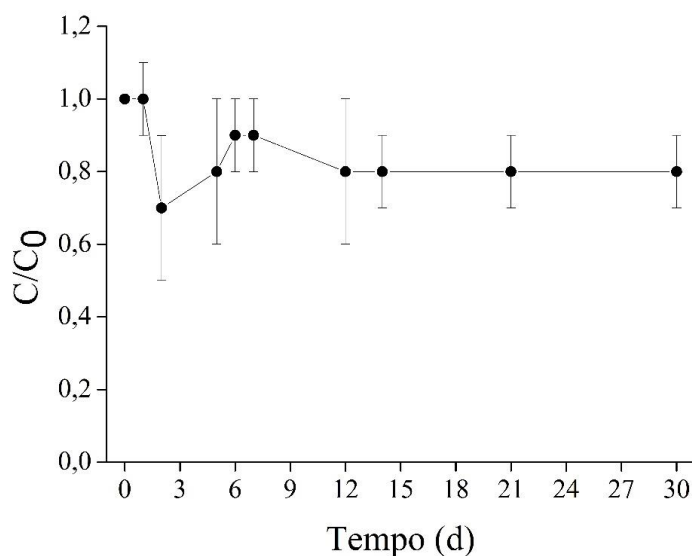
Os valores de ângulo Hue indicam a tonalidade da cor da amostra (TUPUNA et al., 2018). Todas as amostras apresentaram valores de Hue próximos a 90°, demonstrando uma coloração amarelada mesmo após 30 d de estocagem. Porém, as amostras IAT apresentaram uma diferença significativa ($p<0,05$) em comparação as amostras Iβ e INβ em $t=0$ d. Apesar da coloração amarela, a saturação da cor, indicada pelos valores de croma (TUPUNA et al., 2018), foram significativamente ($p<0,05$) diferente entre as três formulações. A saturação da amostra IAT foi maior, seguida pela amostra INβ e Iβ. Além disso, o período de armazenamento não teve efeito significativo ($p>0,05$) no croma das amostras.

A mudança de cor das amostras com carotenoide não encapsulado (Iβ) pode estar relacionada à hidrofobicidade, que dificulta sua dispersão, podendo ser resolvido com o encapsulamento (FENG et al., 2018). Este processo pode reduzir a degradação oxidativa devido à presença de pH ácido, encontrado no iogurte, e da ação do oxigênio. O melhor desempenho do β-caroteno nanoencapsulado em comparação com sua forma "livre" também foi descrito por Assis et al. (2018) quando aplicaram o carotenoide como antioxidante em

filmes biodegradáveis. Os autores observaram que, além de melhor homogeneidade de dispersão, o uso de β -caroteno encapsulado aumenta a intensidade da cor dos filmes e o alongamento na ruptura, diminui a transmissão de luz e apresenta maior proteção para óleo de girassol, com a menor formação de produtos de oxidação.

Os baixos valores de ΔE foram confirmados pela pouca redução do teor de β -caroteno encapsulado com nanoemulsão, sendo observado na Figura 4, que mostra a relação C/C_0 para os iogurtes enriquecidos com nanoemulsões durante 30 d de armazenamento. Após esse período, os iogurtes apresentaram uma razão C/C_0 de $0,8 \pm 0,1$, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) do conteúdo inicial. Devido à alta heterogeneidade das amostras com adição de β -caroteno não encapsulado, a teor do composto nesta amostra não foi avaliado.

Figura 4 - Relação C/C_0 ao longo dos 30 d de armazenamento do iogurte adicionado nanoemulsões de β -caroteno (IN β).



Essa distribuição heterogênea do carotenoide no produto, além de interferir no aspecto visual do produto pode prejudicar a absorção do carotenoide no trato intestinal dos consumidores. Isto porque para serem absorvidos, é necessário que os carotenoides sejam extraídos da matriz alimentar e incorporados em micelas mistas no lúmen o que é afetado diretamente por diferenças de localização na matriz alimentar e forma física, impactando diretamente em sua bioacessibilidade (DESMARCHELIER; BOREL, 2017).

A proteção do β -caroteno encapsulados por nanoemulsões em faixas de pH entre 3-8 foi estudada por Qian et al. (2012), durante 5 d de armazenamento a 25 °C. Segundo os autores, o ΔE durante o armazenamento foi relativamente pequeno (<10) em todas as amostras em pH 4-8, consequência da ação de proteção das nanogotas, o que reduz a protonação dos carotenoides, evitando/reduzindo a isomerização cis-trans e outras reações de degradação.

4 CONCLUSÃO

A aplicação de nanoemulsões como carreadores de β -caroteno aumentou significativamente ($p < 0,05$) a sinérese, índice de comportamento a coesividade e índice de viscosidade do fluxo e reduziu ($p < 0,05$) os parâmetros firmeza e consistência, sendo que esses parâmetros tecnológicos podem ser corrigidos com adição de estabilizantes. Os carotenoides nanoencapsulados tornaram o produto mais homogêneo em comparação com a formulação adicionada de β -caroteno não encapsulado. As nanoemulsões protegeram o carotenoide, sem variação significativa ($p > 0,05$) no conteúdo de β -caroteno após 30 d de armazenamento na ausência de luz a 4 °C, com uma pequena variação de cor, semelhante à obtida com o corante amarelo de tartrazina. O uso de nanoemulsões como carreadores de compostos lipofílicos, como os carotenoides, é promissor e pode melhorar a dispersão e a estabilidade desses compostos em produtos ácidos, como o iogurte, reduzindo o processo de degradação desses compostos bioativos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N. P. Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 3, p. 216–221, 2006.

AOAC - ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Ed.17, Washington, D.C., CD-ROM, 2000.

ASSIS, R. Q.; PAGNO, C. H.; COSTA, T. M. H.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. O. Synthesis of biodegradable films based on cassava starch containing free and nanoencapsulated β - carotene. **Packaging Technology and Science**, v. 31, n. 3, p. 8–10, 2018.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 545–549, 2013.

BOON, C. S.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Role of iron and hydroperoxides in the degradation of lycopene in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2993–2998, 8 abr. 2009.

BOON, C. S.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 515–532, 2010.

BORRIN, T. R.; GEORGES, E. L.; BRITO-OLIVEIRA, T. C.; MORAES, I. C. F.; PINHO, S. Technological and sensory evaluation of pineapple ice creams incorporating curcumin-loaded nanoemulsions obtained by the emulsion inversion point method. **International Dairy Journal Technology**, v. 71, n. 2, p. 491–500, 2018.

BOVI, G. G.; PETRUS, R. R.; PINHO, S. C. Feasibility of incorporating buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil nanoemulsions in isotonic sports drink. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 2201–2209, 2017.

CARDOSO, L. A. A.; KARP, S. G.; VENDRUSCOLO, F.; KANNO, K. Y. F.; ZOZ, L. I. C.; CARVALHO, J. C. Biotechnological production of carotenoids and their applications in food and pharmaceutical products. [s.l.] InTech, 2017.

DE OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, S. A.; BURKERT, C. A. V. Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2180–2187, 2018.

DESMARCHELIER, C.; BOREL, P. Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 270–280, 2017.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Xanthan rheological: a review about the influence of electrolytes on the viscosity of aqueous solutions of xanthan gums. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 15–28, 2004.

DOMINGOS, L. D.; XAVIER, O.; H, W. Oxidative stability of yogurt with added lutein dye. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 616–623, 2014.

FENG, Z. Z.; LI, M. Y.; WANG, Y. T.; ZHU, M. J. Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*: microencapsulation with carboxymethyl cellulose sodium and microcrystalline cellulose and effects of microencapsulated astaxanthin on yogurt properties. **LWT- Food Science and Technology**, v. 96, p. 152–160, 2018.

GHAYOUR, N.; HOSSEINI, S. M. H.; ESKANDARI, M. H.; ESTEGHLAL, S.; NEKOEI, A.; GAHRUIE, H. H.; TATAR, M.; NAGHIBALHOSSAINI, F. Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 394–403, 2019.

GHORBANZADE, T.; JAFARI, S. M.; AKHAVAN, S. M.; HADAVI, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

- GOLDING, M.; WOOSTER, T. J.; DAY, L.; XU, M.; LUNDIN, L.; KEOGH, J.; CLIFTONX, P. Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. **Soft Matter**, v. 7, n. 7, p. 3513–3523, 2011.
- GUAN, Y.; WU, J.; ZHONG, Q. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene. **Food Chemistry**, v. 194, p. 787–796, 2016.
- IZADI, Z.; NASIRPOUR, A.; GAROOSI, G. A. Rheological and physical properties of yogurt enriched with phytosterol during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 5341–5346, 2015.
- JANA, S.; GANDY, A.; JANA, S. Nanotechnology in Bioactive Food Ingredients: Its Pharmaceutical and Biomedical Approaches. In: OPREA, A. E.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). **Nanotechnology Applications in Food? flavor, stability, nutrition and Safety**. Academic Press, 2017. p. 21–28.
- MARTÍNEZ, J. M. H. **Nanocarreadores lipídicos contendo ácidos graxos insaturados provenientes de Tainha (*Mugil liza*) como transportadores de carotenoides**. 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.
- MARTINS, A. R.; MONTEIRO, R. L.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Hidrólise enzimática e fermentação láctica simultâneas na obtenção de um iogurte com baixo teor de lactose. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 5, p. 551–559, 2012.
- MCLELLAN, M. R.; LIND, L. R.; KIME, R. W. Hue angle determinations and statistical. **Journal of Food Quality**, v. 18, p. 235–240, 1995.
- MEZQUITA, P. C.; BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; RAMIRES, J. P.; HINOJOSA, C. O. Stability of astaxanthin in yogurt used to simulate apricot color, under refrigeration. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 559–565, 2014.
- MEZQUITA, P. C.; HUERTA, B. E. B.; RAMÍREZ, J. C. P.; HINOJOSA, C. P. O. Milks pigmentation with astaxanthin and determination of colour stability during short period cold storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1634–1641, 2015.
- NASARUDDIN, F.; HUERTA, B. E. B.; RAMÍREZ, J. C. P.; HINOJOSA, C. P. O. Effect of processing on instrumental textural properties of traditional dodol using back extrusion. **International Journal of Food Properties**, v. 15, p. 495–506, 2012.
- PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 21–32, 2007.
- PASEEPHOL, T.; SMALL, D. M.; SHERKAT, F. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. **Journal of Texture Studies**, v. 39, p. 617–634, 2008.
- PONS, M.; INDUSTRIES, S. B.; FISZMAW, S. M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, v. 27, p. 597–624, 1996.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1221–1229, 2012.

RAO, J.; DECKER, R. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical nanoemulsions: influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β -carotene bioavailability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3175–3183, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. ISLI Press, 2001

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBAZI, R. C.; CLEONICE, G.; MÉDELIN, M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324–333, 2016.

SALVIA-TRUJILLO, L.; VERKEMPINCK, S. H. E.; ZHANG, X.; VAN LOEY, A. M.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M. E. Comparative study on lipid digestion and carotenoid bioaccessibility of emulsions, nanoemulsions and vegetable-based in situ emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 119–128, 2018.

SHAH, M. R.; IMRAN, M.; ULLAH, S. **Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis**. Elsevier, 2017.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Impact of a carbon source and stress conditions on some properties of xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 167–172, 2018.

TUPUNA, D. S.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. O. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 846–855, 2018.

VARELTZIS, P.; ADAMOPOULOS, K.; STAVRAKAKIS, E.; STEFANAKIS, A.; GOULA, A. M. Approaches to minimize yoghurt syneresis in simulated tzatziki sauce preparation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 2, p. 191–199, 2016.

VELIKOV, K. P.; PELAN, E. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. **Soft Matter**, v. 4, n. 10, p. 1964, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency**. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/44110>>. Acesso: Janeiro/2019

YI, J.; LAM, T. I.; YOKOYAMA, W.; CHENG, L. W.; ZHONG, F. Cellular Uptake of beta-Carotene from Protein Stabilized Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Homogenization-Evaporation Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1096–1104, 2014.

YUAN, B.; DANAIO, M. G. C.; LU, M.; WEIER, S. A.; STRATTON, J. E.; WELLER, C. L. High pressure processing (HPP) of aronia berry puree: Pilot scale processing and a shelf-life study. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, p. 241–248, 2018.

ZARDINI, A. A.; MOHEBBI, M.; FARHOOSH, R.; BOLURIAN, S. Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 287–298, 2018.

ZHONG, J., YANG, R.; CAO, X.; LIU, X.; QIN, X. Improved physicochemical properties of yogurt fortified with fish oil/ γ -oryzanol by nanoemulsion technology. **Molecules**, v. 23, n. 56, 2018.

ARTIGO 4
AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DE SORVETES TIPO GELATO ADICIONADO DE
NANOEMULSÃO DE β -CAROTENO

RESUMO

Alguns trabalhos demonstram a aplicação de nanoestruturas, como nanofibrilas, nanocápsulas e nanoemulsões em sorvetes. Sendo a última, uma das formas mais simples e economicamente produtivas de controlar a estabilidade e a biodisponibilidade de compostos bioativos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver sorvetes tipo gelato com a adição de nanoemulsões de β -caroteno para determinar a influência dessas nanoestruturas nos parâmetros físico-químicos do produto. A produção de nanoemulsões ocorreu com óleo de milho e $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de β -caroteno por homogeneização à alta pressão. As três formulações desenvolvidas (controle, com nanoemulsões e com β -caroteno sem encapsulamento) foram mantidas a -18°C por 28 d e avaliados os parâmetros tecnológicos, colorimétricos e texturais. A adição de nanoemulsão permitiu aumentar o rendimento do produto pelo aumento do *overrun*, sem afetar os parâmetros de estabilidade como pH, sólidos solúveis, firmeza e derretimento ($p>0,05$). Embora não tenha sido observada diferença significativa ($p>0,05$) na proteção dos carotenoides, o uso de nanoemulsões melhorou a parte sensorial do produto, aumentando a dispersão do carotenoide, que por consequência gerou um gelato com maior homogeneidade e coloração mais intensa. Assim, as nanoemulsões apresentaram potencial promissor para serem aplicadas em alimentos, desempenhando o papel de carreadores de biocompostos, bem como melhoradores tecnológicos do gelato.

PALAVRAS-CHAVE: Carotenoides. Nanotecnologia. Óleo de milho.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Goff; Verespej; Smith, (2000) “sorvete é um alimento coloidal complexo, formado por glóbulos de gordura, bolhas de ar e cristais de gelo dispersos em uma solução/dispersão congelada e concentrada de proteínas, sais, mono e polissacarídeos.” O gelato é um sorvete de origem italiana com um teor de açúcar um pouco maior em comparação aos sorvetes tradicionais (ALIKA; ATMA, 2018). A adição de frutas (SUN-WATERHOUSE et al., 2013), proteínas (ALFAIFI; STATHOPOULOS, 2010), probióticos (AKALIN et al., 2018), prebióticos (BALTHAZAR et al., 2018) e curcumina (BORRIN et al., 2018) podem auxiliar na produção de sorvetes saudáveis, e para esse propósito mais estudos de formulação são necessários.

Os carotenoides possuem uma estrutura básica formada por unidades de isopreno ligadas covalentemente, criando uma molécula de 40 carbonos, com importantes aplicações como corante, antioxidante e precursor de vitamina A (principalmente o β -caroteno) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Esses compostos podem proteger as células contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres, prevenindo a degradação da retina, cânceres como o de fígado e melhorando o sistema imunológico (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; NISHINO et al., 2009; RAO; RAO, 2007). Devido a sua cadeia altamente insaturada, os carotenoides são bastante suscetíveis a processos de isomeração e oxidação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Um promissora solução descrita na literatura é o uso de nanoestruturas para melhoria de características como estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade desses compostos (CHUANG et al., 2018). Alguns trabalhos foram desenvolvidos com o uso de nanoestruturas em sorvetes, dentre eles, a influência das nanofibras de celulose sobre os elementos estruturais do sorvete (VELÁSQUEZ-COCK et al., 2019), incorporação de curcumina nanoencapsulada (BORRIN et al., 2018) e propriedades físicas de *frozen yogurt* fortificado com nanoemulsão de óleo de farelo de arroz roxo (ALFARO et al., 2015).

Entre essas nanoestruturas, as nanoemulsões são uma das formas mais simples e economicamente produtivas de controlar a estabilidade e a biodisponibilidade de compostos ativos (MCCLEMENTS; XIAO, 2012). Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver sorvetes tipo gelato com adição de nanoemulsões de β -caroteno, a fim de determinar a influência dessas nanoestruturas sobre os parâmetros físico-químicos do produto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Óleo de milho (Cargill, Mato Grosso, Brasil), Tween 20 (LabSynth, São Paulo, Brasil), Span 80 (Sigma–Aldrich, Hessen, Alemanha), β -caroteno (Sigma–Aldrich), água ultra pura obtida em sistema de filtração Millipore Milli-Q (Merck, Hessen, Alemanha), base semi-pronta para gelato (Duas Rodas, Jaguará do Sul, Brasil) e açúcar refinado (Caravelas, Florianópolis, Brasil). Todos os outros reagentes eram de grau analítico.

2.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES

Para o preparo das nanoemulsões, a fase oleosa foi composta por (relação de massa do componente por massa total de fase oleosa - $m\ m^{-1}$): 70 % de óleo e 30 % de Span® 80 e a fase aquosa foi composta por 10 mL de água e 1 % ($m\ v^{-1}$ – relação massa de surfactante por volume de fase aquosa) de Tween 20. A fase oleosa foi aquecida a 60 °C juntamente com o β -caroteno (0,2 mg mL^{-1} de formulação final) e a fase aquosa foi aquecida a 80 °C, ambas sob agitação magnética. Depois da completa dissolução das fases, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa (relação de 10:1) sob agitação magnética constante (700 rpm). A emulsão formada foi homogeneizada por 2 min a 14.500 rpm em Ultra-turrax® (T10 basic, IKA) e na sequência foi submetida a seis ciclos de 20 s a 68,9 MPa em homogeneizador à alta pressão (EmulsiFlex-C3, Avestin) (MARTÍNEZ, 2016).

2.3 GELATO

Para o preparo do gelato foi utilizada uma base semi-pronta (Specialitá Gelato Aqua®) gentilmente cedida pela empresa Duas Rodas (Jaguará do Sul, Brazil). Foram produzidas três formulações: GC (controle) GN β (com nanoemulsão de β -caroteno de tamanho na faixa de 300 nm) e G β (com β -caroteno não encapsulado) de acordo com o Tabela 1.

Inicialmente, todos os ingredientes foram dispersos em água e homogeneizados utilizando batedeira planetária (modelo Arno Bpa), e as misturas obtidas foram resfriados aproximadamente -5 °C (COTTRELL; PASS; PHILLIPS, 1979). Após, as misturas foram

homogeneizadas por 7 min (BORRIN et al., 2018) em batedeira planetária. As formulações foram então acondicionadas em potes de polipropileno de 2 L e estocadas a -18 °C por 28 d.

Tabela 1 - Composição do gelato.

Ingrediente	Formulação		
	GC	GNβ	Gβ
Base Specialitá Gelato Aqua®) (g)	100	100	100
Açúcar refinado (g)	250	250	250
Nanoemulsão (mL)	-	240	-
β-caroteno não encapsulado (mg)	-	-	48
Água (mL)	1000	760	1000

2.4 pH, SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS, *OVERRUN* E DERRETIMENTO

O pH das amostras foi determinado utilizando pHmetro digital (AOAC, 2000). Os teor de sólidos solúveis totais foi medido utilizando um refratômetro portátil e o *overrun* das amostras pela Equação 1 (SUN-WATERHOUSE et al., 2013):

$$\text{Overrun (\%)} = \frac{\text{Volume do gelato} - \text{Volume da mistura}}{\text{Volume da mistura}} \times 100 \quad (1)$$

O comportamento de derretimento foi avaliado de acordo com (RINALDI et al., 2014) com modificações. Amostras de gelato (75±2,0 g; -18 °C) com e sem nanoemulsão foram colocados em peneira (abertura de 1 mm²) e mantidas em ambiente climatizado a 20 °C. A massa derretida foi pesada (a cada 15 min) durante 120 min e os dados expressos em porcentagem do volume derretido em relação ao inicial. A taxa de derretimento (g min⁻¹) foi determinada de acordo com Amador; Hartel; Rankin (2017) pelo plote da porção linear da curva de peso da porção derretida (g) X tempo (min).

2.5 TEOR DE CAROTENOIDE

Os conteúdos de β-caroteno nas amostras de gelato foram monitoradas pela metodologia descrita por (MEZQUITA et al., 2015) com modificações. Para isso 4 g de amostra foram misturadas com 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 3 mL de acetona, 2 mL de

solução de NaCl 20 % (m v⁻¹) e 2 mL de hexano em tubos cônicos de 15 mL. A mistura foi agitada em vórtex por 15 s e centrifugada a 2147×g por 5 min. A fase hexano contendo os carotenoides foi removida e armazenada. Extrações sucessivas da mistura foram realizadas com 2 mL de hexano, até não ser observada nenhuma coloração.

A determinação da concentração de carotenoides totais no hexano foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) utilizando a Equação 2, de acordo com Davies (1976):

$$CT = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{A_{1\%}^{1\text{cm}} \cdot 100 \cdot m} \quad (2)$$

Onde: CT = concentração de carotenoides totais (µg g⁻¹); A = absorbância; V = volume (mL); m = massa da amostra (g); $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ = absortividade específica β-caroteno em hexano (2592).

2.6 VARIAÇÃO DE COR

A variação de cor dos gelatos foi analisada utilizando-se colorímetro Minolta (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Osaka, Japão) em sistema CIELab (iluminante D65), onde a* indica a região do vermelho (+a*) ao verde (-a*), b* indica a região do amarelo (+b*) ao azul (-b*) e L* a luminosidade.

A partir desses parâmetros calculou-se a diferença de cor (ΔE) pela Equação 3 (YUAN et al., 2018), o Croma através da Equação 4 e ângulo Hue através da Equação 5 (TUPUNA et al., 2018).

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (3)$$

$$\text{Croma} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

$$\text{Hue} = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (5)$$

Onde: L_0^* , a_0^* e b_0^* são os parâmetros no tempo inicial da amostra e L^* , a^* e b^* são os parâmetros no tempo em que está sendo feita a análise.

2.7 ANÁLISE DE TEXTURA

O perfil de textura do gelatos com e sem nanoemulsão foi feito em texturômetro (TA.XT plus, Stable Micro Systems Ltd., Inglaterra). Os ensaios de penetração foram conduzidos nas condições descritas por Alfaifi; Stathopoulos, (2010): probe com 2 mm de diâmetro penetrou 10 mm das amostras com uma carga de 250 N, velocidade da probe de 22 mm min⁻¹ e saída de 400 mm min⁻¹ e quatro parâmetros foram determinados: firmeza (N), consistência (N s⁻¹), coesividade (N) e índice de viscosidade (N s⁻¹).

2.8 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

Umidade, cinzas, proteínas e conteúdo lipídico foram determinados segundo AOAC (2000) e o teor de carboidratos foi estimado por diferença dos demais componentes.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

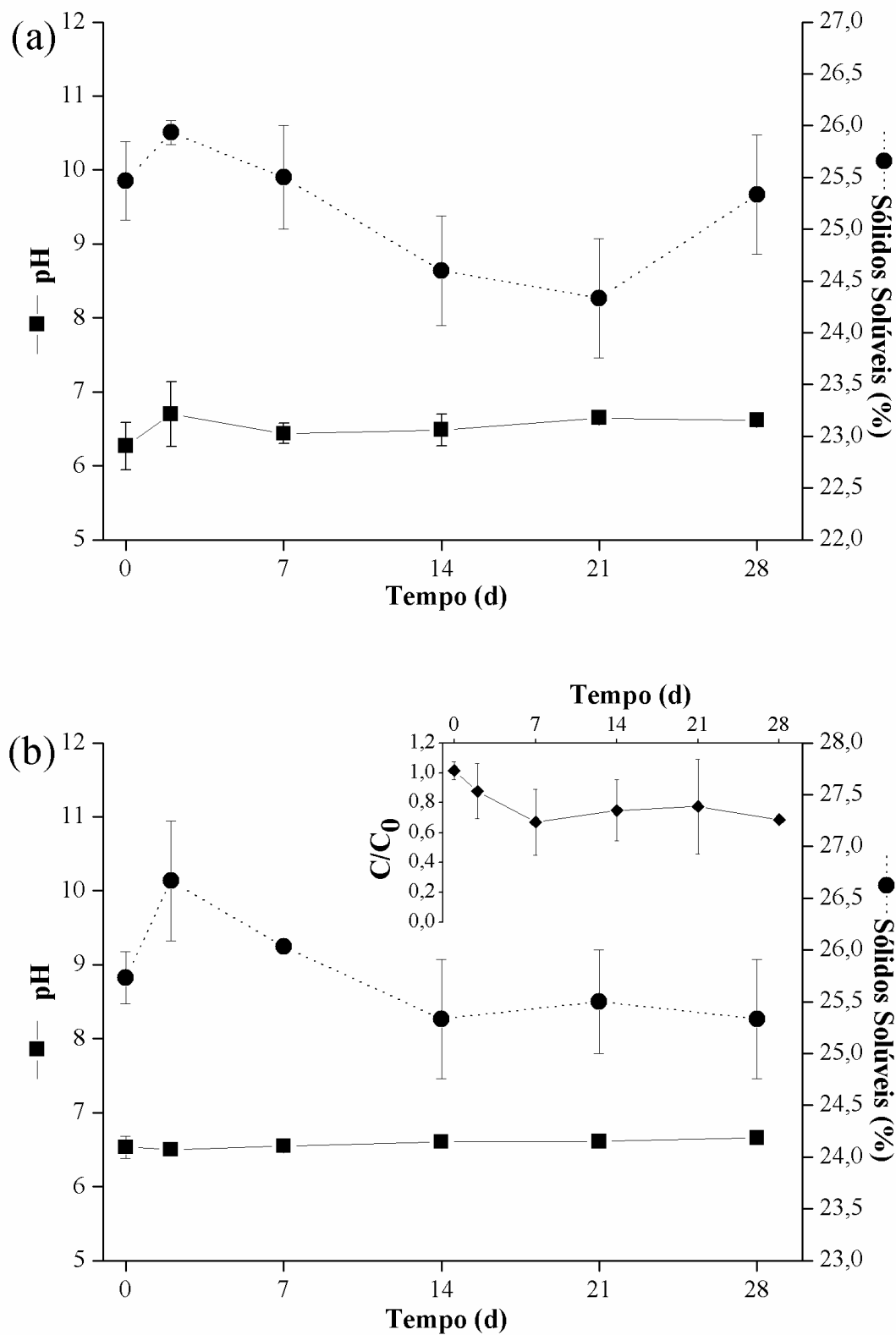
Os experimentos e análises foram realizados em triplicata e os dados analisados por análise de variância (ANOVA) e se necessário submetidos a teste de Tukey ($p < 0,05$) ou teste t ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

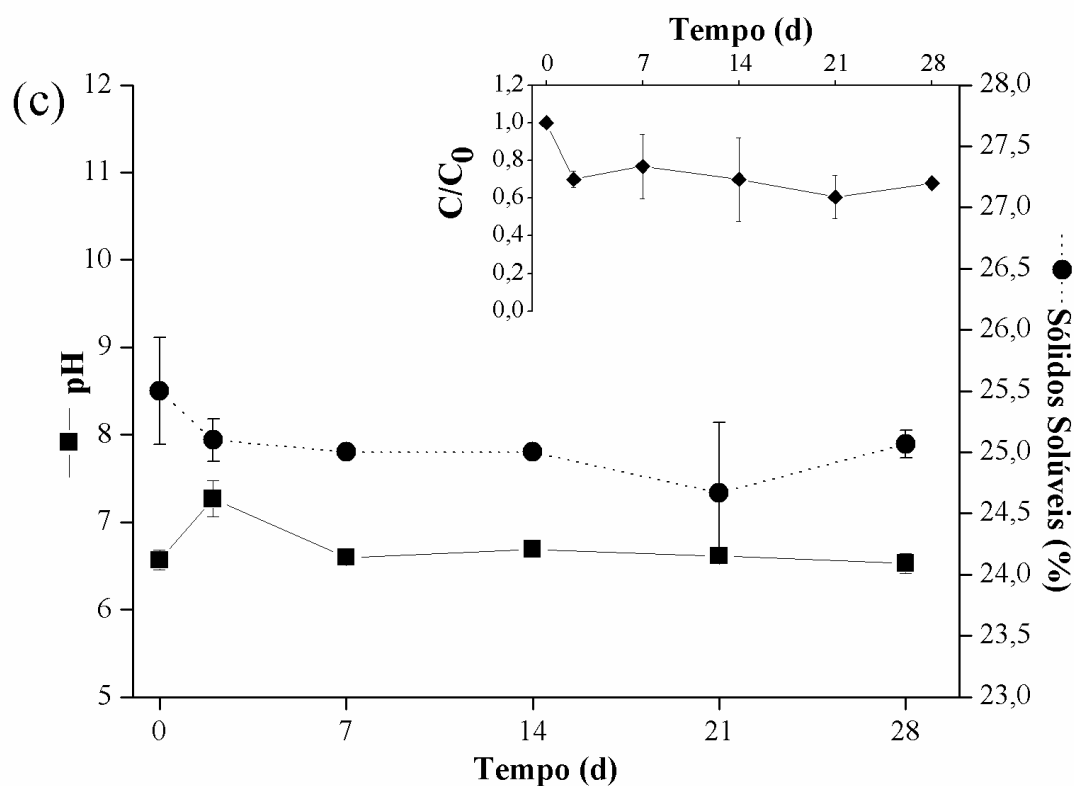
Os três parâmetros, pH, sólidos solúveis e conteúdo de carotenoides acompanhados durante os 28 d de armazenamento, estão mostrados na Figura 1. No início do armazenamento ($t=0$) o pH das amostras estava entre 6,27 e 6,57, após 28 d os valores variaram de 6,53 a 6,66, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Os sólidos solúveis totais, derivados principalmente de açúcares, estabilizantes e emulsificantes (LIMA; BRITO-OLIVEIRA; PINHO, 2016) estavam em torno de 25 ° Brix para as três formulações, sem alteração significativa ($p > 0,05$) após 28 d.

Figura 1 - Acompanhamento de pH, sólidos solúveis e carotenoides das formulações GC (a), GN β (b) e G β (c).



Cont. Figura 1 - Acompanhamento de pH, sólidos solúveis e carotenoides das formulações GC (a), GN β (b) e G β (c).

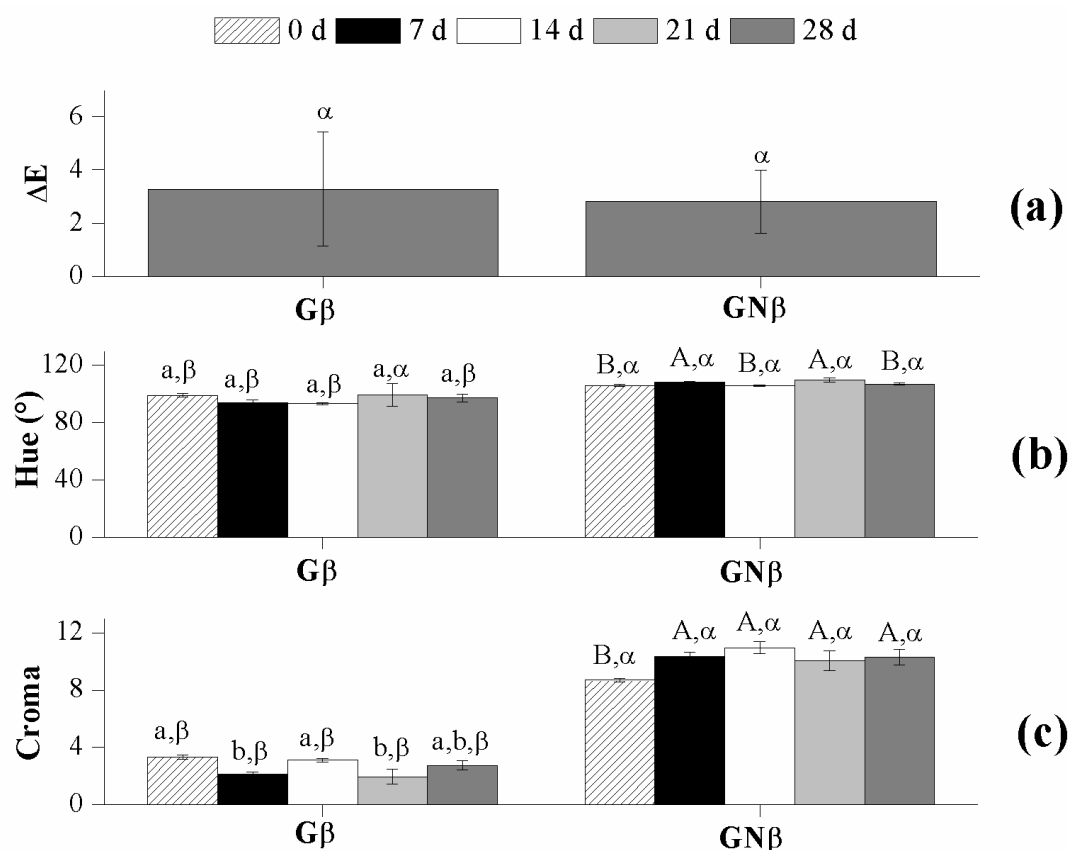


Os teores de carotenoides diminuíram significativamente ($p < 0,05$), em torno de 30 % nas formulações GN β e G β após 28 d (Figura 1b e Figura 1c), o que levou a variações de cor - ΔE (Figura 2a) de $2,61 \pm 0,82$ (GN β) e $3,68 \pm 1,98$ (G β) após 28 d. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o uso de nanoemulsão ou o β -caroteno não encapsulado nos parâmetros teor de β -caroteno e ΔE . No entanto, é fundamental destacar que a amostra com nanoemulsão apresentou um aspecto mais homogêneo que a amostra com o carotenoide não encapsulado (na qual foi possível observar pequenos pontos laranjas), o que pode ter interferido na quantificação de carotenoides.

Outro aspecto visualmente observado foi a coloração das amostras. A amostra de GC era branca, como a base usada para a preparação da amostra. A amostra G β tinha uma coloração levemente alaranjada, enquanto a amostra GN β apresentava uma coloração amarela. A cor é um atributo importante nos alimentos e frequentemente influencia a preferência do consumidor (BALTHAZAR et al., 2018; ÇAKMAKÇI et al., 2016). A tonalidade das amostras indicada pelos valores do ângulo Hue (TUPUNA et al., 2018) calculado a partir dos valores de $L^*a^*b^*$ (APÊNDICE 10), que foram de aproximadamente

90 ° (Figura 2b), demonstram uma coloração amarelada (Balthazar et al., 2015), mesmo após 28 d de armazenamento. No entanto, a amostra G β estava mais próximo da cor laranja enquanto a amostra GN β tendia ao amarelo.

Figura 2 - Variação de cor (a), ângulo Hue (b) e croma (c) durante 28 d de estocagem.



Média±desvio padrão (n=3). Letras gregas iguais representaram resultados estatisticamente iguais ($p>0,05$) entre as duas formulações para o mesmo tempo. Letras maiúsculas iguais representam resultados estatisticamente iguais ($p>0,05$) para a amostra GN β em tempos diferentes. Letras minúsculas iguais representam resultados estatisticamente iguais ($p>0,05$) para a amostra G β em tempos diferentes.

Embora o ângulo de matiz fosse similar, a saturação de cor indicada pelos valores de croma (TUPUNA et al., 2018), foram significativamente ($p<0,05$) diferentes entre as amostras, com os valores de GN β sendo superiores a G β (Figura 2c). Além disso, o período de armazenamento teve diferentes efeitos no croma das amostras. GN β apresentou um aumento significativo ($p<0,05$), enquanto a amostra G β apresentou uma redução significativa ($p<0,05$). Rinaldi et al. (2014) descreveu um aumento na saturação de cores de amostras de gelato formuladas com quatro surfactantes (mono- e diglicerídeos de ácidos graxos saturados, fosfolipídios de soja, leite e arroz) após quatro semanas de armazenamento, sendo estas alterações descritas pelo autor como provavelmente relacionadas a fenômenos iniciais de oxidação de gordura. Em contraste, uma diminuição dos valores de croma após 45 d de

armazenamento foi descrita por Lima; Brito-Oliveira; Pinho (2016) em sorvetes com β -caroteno, o que de acordo com os autores podem indicar a oxidação do carotenoide. Quanto maior o valor de croma, maior a intensidade de cor percebida pelo olho humano, então a amostra GN β apresentou cor mais intensa que o G β (BALTHAZAR et al., 2017).

O teor de macromoléculas na formulação tem grande importância, pois é atribuído a essas moléculas o desenvolvimento da estrutura dos sorvetes (ADAPA et al., 2000). A composição proximal das formulações pode ser observada na Tabela 2.

Nos teores de proteína e cinzas, não foram observadas alterações significativas ($p>0,05$) entre as formulações. O gelato enriquecido com nanoemulsões de β -caroteno apresentou cerca de 15 % a mais de lipídios ($p<0,05$) do que a amostra sem adição de nanoemulsão. Esse aumento no teor de lipídios era esperado em consequência da presença da fase oleosa da nanoemulsão já tendo sido descrito em sorvete de abacaxi enriquecido com nanoemulsão de curcumina (BORRIN et al., 2018). Essa diferença no conteúdo lipídico pode afetar dois importantes parâmetros tecnológicos: o *overrun* (BORRIN et al., 2018; SUN-WATERHOUSE et al., 2013) e textura (ADAPA et al., 2000)

Tabela 2 - Caracterização (base seca) dos gelatos sem (GC) e com (GN β) adição de nanoemulsão.

Parâmetros (%)	Formulação	
	Sem nanoemulsão	Com nanoemulsão
Cinzas*	0,05 ^a	0,04 ^a
Lipídios	23,8 $\pm$ 1,4 ^b	38,6 $\pm$ 2,1 ^a
Proteínas	1,9 $\pm$ 0,3 ^a	1,8 $\pm$ 0,4 ^a
Carboidratos**	74,2	59,6

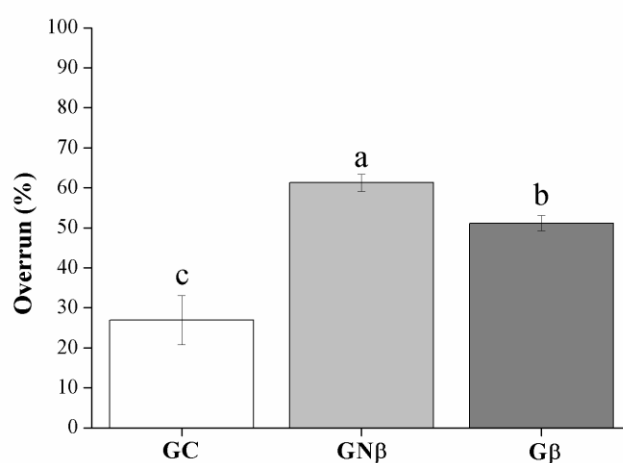
Média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística ($p<0,05$) pelo teste t. *desvio padrão $<0,1$. **Valores obtidos por diferença dos demais componentes.

Overrun é o cálculo industrial do ar adicionado aos produtos congelados e a quantificação e controle da incorporação de ar no sorvete é muito importante para a qualidade e estabilidade do produto (MARSHALL; GOFF; HARTE, 2003). A adição de nanoemulsões no sorvete impactou nesse parâmetro (Figura 3), com um aumento significativo ($p<0,05$) de 34 % em comparação com a amostra controle. A amostra com β -caroteno sem encapsulamento também mostrou um aumento significativo ($p<0,05$) em relação às amostras controle. No entanto, esse incremento, em torno de 24 %, foi menor que o ocorrido com a

adição de nanoemulsão. Comportamento semelhante ocorreu em sorvetes adicionados com nanoemulsões de curcumina e curcumina livre com um aumento de 8 % no *overrun* (BORRIN et al., 2018).

Gelatos comumente apresentam *overrun* ≤ 30 % e sorvetes tradicionais entre 50-100% (RINALDI et al., 2014). O *overrun* observado nas amostras com nanoemulsões, próximo aos valores de sorvete tradicional, foi provavelmente uma consequência do fato de que o alto teor de gordura permitiu maior coalescência entre as gotas de gordura melhorando o aprisionamento de bolhas de ar no gelato (SUN-WATERHOUSE et al., 2013). Por outro lado, os valores mais baixos de *overrun* para amostras com carotenoide sem encapsulamento, podem ser atribuídos ao aumento da viscosidade das mistura sugerido por Rizk; El-Kady; El-Bialy (2014) que observaram uma redução de 46,32 % para 34,62 % no *overrun* de sorvetes fabricados com diferentes níveis (0-5 %) de licopeno.

Figura 3 - *Overrun* das amostras de gelato controle (GC), com adição de nanoemulsões de β -caroteno (GN β) e com adição de β -caroteno sem encapsulamento (G β).



Média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os parâmetros firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade estão apresentados na Tabela 3. O *overrun* pode afetar a firmeza do sorvete (ALFARO et al., 2015), mas comparando as duas formulações, não foi observada alteração significativa ($p > 0,05$) desse parâmetro, mesmo com o maior *overrun* observado na amostra com nanoemulsão. Provavelmente devido a outros parâmetros como o tamanho dos cristais de gelo, que podem afetar a penetração da probe e a viscosidade do produto (AMADOR; HARTEL; RANKIN,

2017). Não houve também variação significativa ($p>0,05$) na firmeza de sorvetes com a adição de 0,15 e 0,3 % (m m^{-1}) de nanofibras de celulose (VELÁSQUEZ-COCK et al., 2019). E valores similares de firmeza (em torno de 5 N) foram observados em amostras de sorvetes probióticos com 2 % de fibra de maçã ou aveia (AKALIN et al., 2018) e em sorvetes tratados com campo elétrico pulsado com e sem suplementação de íons de zinco (aproximadamente 6 N) (PANKIEWICZ et al., 2019).

No entanto, a adição de nanoemulsões apresentou efeito significativo ($p<0,05$) sobre os outros três parâmetros. A consistência foi 45 % menor na amostra com nanoemulsão. Fisicamente, isso significa que menos trabalho é necessário para comprimir essa amostra (NASARUDDIN et al., 2012) em comparação com a amostra controle. A coesividade foi 27 % maior na amostra GN β , portanto, maior quantidade de deformação é necessária antes da ruptura (NASARUDDIN et al., 2012) desta amostra. É exercida também maior resistência ao escoamento pela amostra com nanoemulsões do que pela amostra controle, pois o índice de viscosidade dessa amostra foi 47 % maior. Isto é provavelmente causado pelo fato de que a diminuição do diâmetro das gotas de óleo (como observado nas nanoemulsões) leva a uma maior superfície de contato, o que gera uma importante força de atrito, que se opõe ao fluxo livre da emulsão em um campo de cisalhamento. aumentando sua viscosidade (LIU; XU; GUO, 2007).

Tabela 3 - Parâmetros de textura do gelato sem (GC) e com (GN β) adição de nanoemulsões.

Parâmetros	Formulação	
	Sem nanoemulsão	Com nanoemulsão
Firmeza (N)	5,13 $\pm$ 0,49 ^a	4,71 $\pm$ 0,72 ^a
Consistência (N s ⁻¹)	11,66 $\pm$ 0,30 ^a	6,38 $\pm$ 0,69 ^b
Coesividade (N)	-0,60 $\pm$ 0,07 ^a	-0,44 $\pm$ 0,03 ^b
Índice de viscosidade (N s ⁻¹)	-0,014 $\pm$ 0,001 ^a	-0,007 $\pm$ 0,001 ^b

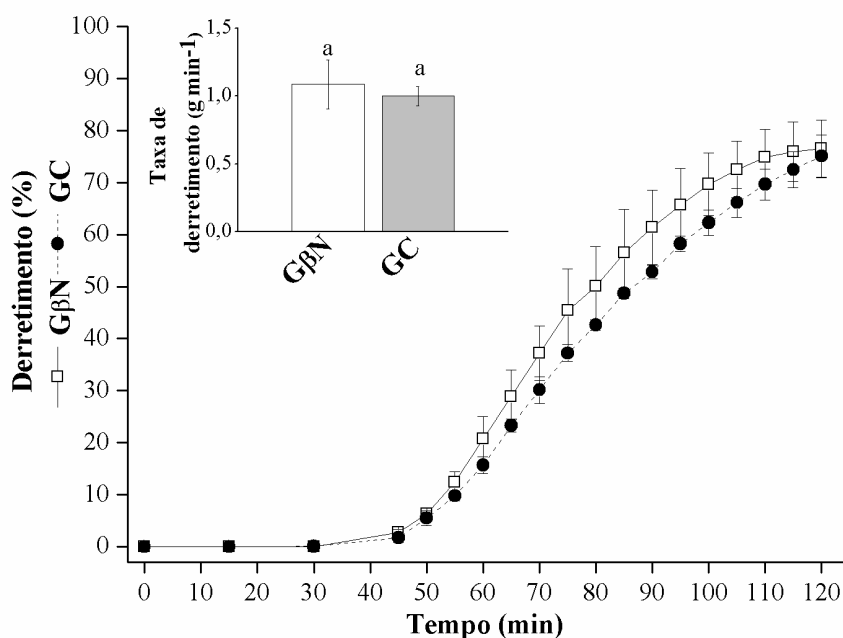
Média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística ($p<0,05$).

Estas mudanças nos parâmetros de textura podem estar relacionadas também a mudanças na temperatura de cristalização das amostras. Truong et al. (2014) avaliaram os efeitos do tamanho das gotículas de emulsão na cristalização da gordura do leite e observaram uma tendência de redução da temperatura de cristalização com redução do tamanho das gotículas. Os autores propõem que esta modificação na temperatura de cristalização entre as

nanoemulsões e emulsões convencionais poderia ser usada para modificar as propriedades físicas e funcionais de produtos alimentícios contendo gordura ou sistemas de encapsulamento e carreadores lipídicos, produzidos por diferentes tipos de emulsões.

Segundo Warren; Hartel (2018) o processo de derretimento de sorvete é bastante complexo. Na Figura 4 estão apresentados os comportamentos de descongelamento das amostras com (GN β) e sem (GC) nanoemulsão. A primeira gota das duas formulações foi observada entre 35-40 min, o derretimento de 50 % foi observado a $88,3 \pm 2,8$ min e $83,3 \pm 7,6$ min para GC e GN β , respectivamente, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na taxa de derretimento das formulações GB e GN β , com valores em torno de 1 g min^{-1} , semelhante à descrita por outros autores como Amador; Hartel; Rankin (2017) $1,28\text{-}0,98 \text{ g min}^{-1}$, Balthazar et al (2015) $1,15 \text{ g min}^{-1}$ (sorvete com adição de 1,5 % de galactooligossacarídeos), e Warren; Hartel (2018) $1,13 \text{ g min}^{-1}$ (sorvetes com 50 % de *overrun* e produzidos a velocidades de 500 e 750 RPM).

Figura 4 - Monitoramento do derretimento dos gelatos com (GN β) e sem (GC) a adição de nanoemulsões de β -caroteno durante 120 min e taxa de derretimento (g min^{-1}).



Média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença estatística ($p > 0,05$).

O derretimento pode ser afetado pela composição do sorvete. As primeiras gotas de derretimento de sorvete com *Fortunella margarita* ocorreu entre 14-18 min, sendo que este

valor aumentou com o aumento da adição do fruto (ÇAKMAKÇI et al., 2016). Esse menor tempo de derretimento em relação ao encontrado no presente trabalho pode estar relacionado ao menor teor de gordura (12-13 %) do sorvete com *Fortunella margarita*, já que esse componente forma uma grande rede entre os cristais de gelo e bolhas de ar aumentando a estabilidade do sorvete (AMADOR; HARTEL; RANKIN, 2017).

4 CONCLUSÃO

A adição de nanoemulsões de β -caroteno em sorvetes tipo gelato gerou efeitos significativos sobre parâmetros tecnológicos críticos. A adição de nanoemulsão permitiu aumentar o rendimento do produto incrementando o *overrun*, sem afetar os parâmetros de estabilidade como pH, sólidos solúveis, firmeza e derretimento. Embora não tenha sido observada diferença significativa ($p>0,05$) na proteção dos carotenoides, o uso de nanoemulsões aumentou a dispersão do carotenoide, que por consequência gerou um gelato com maior homogeneidade e coloração mais intensa, portanto, influenciando o atributo da aparência sensorial do produto. Assim, as nanoemulsões demonstram bom potencial para serem aplicadas em alimentos, desempenhando o papel de carreadores de biocompostos, bem como melhoradores de características tecnológicas

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAPA, S.; DINGELDEIN, H.; SCHMIDT, K. A.; HERALD, T. J. Rheological Properties of Ice Cream Mixes and Frozen Ice Creams Containing Fat and Fat Replacers. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2224–2229, 2000.
- AKALIN, A. S.; KESENKAS, H.; DINKCI, N.; UNAL, G.; OZER, E.; KINIK, O. Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. **Journal of Dairy Science**, n. 101, p. 1–10, 2018.
- ALFAIFI, M. S.; STATHOPOULOS, C. E. Effect of egg yolk substitution by sweet whey protein concentrate (WPC), on physical properties of Gelato ice cream. **International Food Research Journal**, v. 17, n. 3, p. 787–793, 2010.
- ALFARO, L.; HAYES, D.; BOENEKE, C.; XU, Z.; BANKSTON, D.; BECHTEL, P. J.; SATHIVEL, S. Physical properties of a frozen yogurt fortified with a nano-emulsion containing purple rice bran oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 1184–1191, 2015.

ALIKA, V. A.; ATMA, Y. The Organoleptic and Physicochemical Characteristic of Gelato by Fish Bone Gelatin Addition. **Journal of Applied Sciences and Advanced**, v. 1, n. 1, p. 31–38, 2018.

AMADOR, J.; HARTEL, R.; RANKIN, S. The Effects of Fat Structures and Ice Cream Mix Viscosity on Physical and Sensory Properties of Ice Cream. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 8, p. 1851–1860, 2017.

AOAC - ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Ed. 17, Washington, D.C., CD-ROM, 2000.

BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L. A.; CELEGUINI, R. M. S.; SANTOS, R.; PASTORE, G. M.; FREITAS, M. Q.; NOGUEIRA, L. C.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Effect of galactooligosaccharide addition on the physical, optical, and sensory acceptance of vanilla ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1–7, 2015.

BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L. A.; VIEIRA, A. H.; NETO, R. P. C.; CAPPATO, L. P.; COIMBRA, P. T.; MORAES, J.; ANDRADE, M. M.; CALADO, V. M. A.; GRANATO, D.; FREITAS, M. Q.; TAVARES, M. I. B.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. **Food Research International**, v. 91, p. 38–46, 2017.

BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L. A.; ESMERINO, E. A.; ROCHA, R. S.; MORAES, J.; CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; CAMPS, I.; ABUD, Y. K. D.; SANT'ANNA, C.; FRANCO, R. M.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; ESCHER, G. B.; GRANATO, D.; RANADHEERA, C. S.; NAZARRO, F.; CRUZ, A. G. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. **Food Chemistry**, v. 246, n. August 2017, p. 464–472, 2018.

BORRIN, T. R.; GEORGES, E. L.; BRITO-OLIVEIRA, T. C.; MORAES, I. C. F.; PINHO, S. Technological and sensory evaluation of pineapple ice creams incorporating curcumin-loaded nanoemulsions obtained by the emulsion inversion point method. **International Dairy Journal Technology**, v. 71, n. 2, p. 491–500, 2018.

ÇAKMAKÇI, S.; TOPDAS, E. F.; ÇAKIR, Y.; KALIN, P. Functionality of kumquat (*Fortunella margarita*) in the production of fruity ice cream. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1451–1458, 2016.

CHUANG, E.; CHUANG, E.; LIN, K.; HUANG, T.; CHEN, H.; MIAO, Y.; LIN, P.; CHEN, C.; JUANG, J.; SUNG, H. An Intestinal “Transformers” -Like Nanocarrier System for Enhancing the Oral Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. **ACS Nano**, v. 12, n. 7, p. 6389–6397, 2018.

COTTRELL, J. I. L.; PASS, G.; PHILLIPS, G. Assessment of Polysaccharides as Ice Cream Stabilisers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 1085–1088, 1979.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; JARÉN-GALÁN, M.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research**, v. 46, n. 2, p. 438–450, 2012.

GOFF, H. D.; VERESPEJ, E.; SMITH, A. K. A study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 817–829, 2000.

KUMAR, D. D.; MANN, B.; POTHURAJU, R.; SHARMA, R.; BAJAJ, R. Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream. **Food & Function**, v. 7, p. 417–424, 2016.

LIMA, J. G. DE; BRITO-OLIVEIRA, T. C.; PINHO, S. C. DE. Characterization and evaluation of sensory acceptability of ice creams incorporated with beta-carotene encapsulated in solid lipid microparticles. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 4, p. 664–671, 2016.

LIU, H.; XU, X. M.; GUO, S. D. Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 946–954, 2007.

MARSHALL, R. T.; GOFF, D. H.; HARTEL, R. W. **Ice Cream**. Springer Science+Business Media New York, 6^a Ed., 2003.

MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: Influence of particle characteristics. **Food and Function**, v. 3, n. 3, p. 202–220, 2012.

MCLELLAN, M. R.; LIND, L. R.; KIME, R. W. Hue angle determinations and statistical. **Journal of Food Quality**, v. 18, p. 235–240, 1995.

MEZQUITA, P. C.; HUERTA, B. E. B.; RAMÍREZ, J. C. P.; HINOJOSA, C. P. O. Milks pigmentation with astaxanthin and determination of colour stability during short period cold storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1634–1641, 2015.

NASARUDDIN, F.; HUERTA, B. E. B.; RAMÍREZ, J. C. P.; HINOJOSA, C. P. O. Effect of processing on instrumental textural properties of traditional dodol using back extrusion. **International Journal of Food Properties**, v. 15, p. 495–506, 2012.

NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. Cancer prevention by carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, n. 2, p. 165–168, 2009.

PANKIEWICZ, U.; MAŁGORZATA, G.; KOZŁOWICZ, K.; GÓRAL, D. Novel method of zinc ions supplementing with fermented and unfermented ice cream with using PEF. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–10, 2019.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 207–216, 2007.

RINALDI, M.; ASTA, C. D.; PACIULLI, M.; GUIZZETTI, S.; BARBANTI, D.; CHIAVARO, E. Innovation in the Italian ice cream production: effect of different phospholipid emulsifiers. **Dairy Science & Technology**, p. 33–49, 2014.

RIZK, E. M.; EL-KADY, A. T.; EL-BIALY, A. R. Characterization of carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 1, p. 53–61, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. A. **Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. ISLI Press, 2001.

SUN-WATERHOUSE, D.; EDMONDS, L.; WADHWA, S. S.; WIBISONO, R. Producing ice cream using a substantial amount of juice from kiwifruit with green, gold or red flesh. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 647–656, 2013.

TRUONG, T.; BANSAL, N.; SHARMA, R.; PALMER, M.; BHANDARI, B. Effects of emulsion droplet sizes on the crystallization of milk fat. **Food Chemistry**, v. 145, p. 725–735, 2014.

TUPUNA, D. S.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. DE O. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 846–855, 2018.

VELÁSQUEZ-COCK, J.; SERPA, A.; VÉLEZ, L.; GAÑÁN, P.; GÓMEZ HOYOS, C.; CASTRO, C.; DUIZER, L.; GOFF, H. D.; ZULUAGA, R. Influence of cellulose nanofibrils on the structural elements of ice cream. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 204–213, 2019.

WARREN, M. M.; HARTEL, R. W. Effects of Emulsifier, Overrun and Dasher Speed on Ice Cream Microstructure and Melting Properties. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 639–647, 2018.

YUAN, B.; DANAIO, M. G. C.; LU, M.; WEIER, S. A.; STRATTON, J. E.; WELLER, C. L. High-pressure processing (HPP) of aronia berry puree: Pilot scale processing and a shelf-life study. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, n. January, p. 241–248, 2018.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

4 CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo demonstrou a formação de emulsões em escala nanométrica, utilizando como fase oleosa lipídios de origem vegetal, (óleos de arroz, milho e soja) de grau alimentício. A eficiência de encapsulamento de β -caroteno no óleo de milho foi de 98 % utilizando a técnica de homogeneização à alta pressão. As nanoemulsões produzidas apresentaram tamanho na faixa de 300 nm, com distribuição de tamanho monodisperso ($IPD < 0,2$) e potencial ζ negativa. Essas características permaneceram inalteradas com a adição do β -caroteno.

Os três óleos apresentaram capacidade de proteção do carotenoide, com manutenção de mais de 50 % do teor inicial após 90 d a 4 °C. Porém o óleo de milho destacou-se dos demais sem nenhuma perda significativa ($p > 0,05$) de β -caroteno ao término deste armazenamento. A atividade antioxidante da nanoemulsão formulada com óleo de soja, reduziu 33 % o teor de peróxidos gerados em azeite de oliva.

A ação protetiva das nanoemulsões sob o carotenoide, frente à exposição a fatores críticos a sua estabilidade como luz (fluxo luminoso de 1055 lumen) e diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C), assim como sua estabilidade física nessas condições, também foram determinados no presente trabalho. As nanoemulsões estudadas apresentaram estabilidade física satisfatória, com baixa incidência de processos de desestabilização como coalescência e Ostwald *ripening* (com valores de w entre $-0,008$ e $-0,023 \text{ nm}^3\text{d}^{-1}$). A formulação com $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ apresentou melhor estabilidade do carotenoide, com retenções de β -caroteno de aproximadamente 80 % durante os processamentos térmicos e estocagem durante 90 d. Independente da concentração inicial do carotenoide ($0,2$ ou $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) a melhor condição de estocagem, dentro dos 90 d testados, foi a 4 °C sem luz.

A partir dessas informações foi possível sugerir duas matrizes alimentícias, iogurte e gelato, para verificar os efeitos tecnológicos da adição dessas nanoemulsões, sendo observados significativos ($p < 0,05$) sobre parâmetros tecnológicos importantes. A adição de nanoemulsões de β -caroteno proporcionou um aumento da dispersão do carotenoide no iogurte tornando-o mais homogêneo, em comparação com a formulação adicionada de β -caroteno não encapsulado, porém, ocorreu o aumento da sinérese, e reduções da firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade. Esses problemas tecnológicos provavelmente foram decorrentes da elevação no teor de água proveniente da adição da nanoemulsão. As nanoemulsões protegeram o carotenoide, sem variação significativa ($p > 0,05$) no conteúdo de β -caroteno após 30 d de armazenamento (4 °C em embalagens de

polipropileno), com uma pequena variação de cor, semelhante à obtida com o corante amarelo de tartrazina.

No gelato o enriquecimento com nanoemulsões de β -caroteno além de promover o incremento positivo na incorporação de ar (*overrun*), não modificou parâmetros de estabilidade importantes como pH, sólidos solúveis, firmeza e derretimento. Provavelmente porque as nanoemulsões substituíram parte da água utilizada na formulação desse produto. O teor de β -caroteno apresentou uma tendência de maior redução no sorvete do que no iogurte, o provavelmente devido à incorporação de ar inerente ao processamento.

Do ponto de vista sensorial, onde a cor do produto exerce influência sob o consumidor, foi observado que as nanoemulsões permitem uma coloração mais homogênea que o β -caroteno não encapsulado para ambos os produtos, iogurte e gelato. Dessa forma, o presente trabalho demonstrou que o uso de nanoemulsões como carreadores de compostos lipofílicos, como os carotenoides, são promissores e podem melhorar a dispersão e a estabilidade desses compostos.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar a estabilidade físico-química de nanoemulsões formuladas com óleo de soja e arroz durante armazenamento e tratamento térmico;
- Testar a estabilidade físico-química de nanoemulsões frente a outros tipos de processos utilizados na indústria de alimentos;
- Avaliar a liberação *in vitro* do carotenoide nanoemulsionado;
- Avaliar a estabilidade das nanoemulsões em diferentes condições e pH e na presença de sais.
- Avaliar o efeito da substituição de parte da água da formulação do iogurte por nanoemulsões, assim como seu comportamento durante o processo fermentativo;
- Verificar as mudanças estruturais nos gelatos com adição de nanoemulsões (tamanho dos cristais de gelo formados);
- Verificar a interferência das nanoemulsões no comportamento reológico do gelato;
- Estudar o desenvolvimento de formulações com adição de carotenoides naturais.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOU, E. M.; KANDIL, S. M.; MINIAWY, H. M. F. E. Brain targeting efficiency of antimigrain drug loaded mucoadhesive intranasal nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 667–677, 2017.
- ABDOU, E. S.; GALHOUM, G. F.; MOHAMED, E. N. Curcumin loaded nanoemulsions/pectin coatings for refrigerated chicken fillets. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 445–453, 2018.
- ACHIR, N.; RANDRIANATOANDRO, V. A.; BOHUON, P.; LAFFARGUE, A.; AVALLONE, S. Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 349–361, 2010.
- ACHIR, N.; DHUIQUE-MAYER, C.; HADJAL, T.; MADANI, K.; PAIN, J. P.; DORNIER, M. Pasteurization of citrus juices with ohmic heating to preserve the carotenoid profile. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 397–404, 2016.
- ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 1, p. 3–15, 2009.
- ADAPA, S. DINGELDEIN, H.; SCHMIDT, K. A.; HERALD, T. J. Rheological Properties of Ice Cream Mixes and Frozen Ice Creams Containing Fat and Fat Replacers. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2224–2229, 2000.
- AFFANDI, M. M. R.; JULIANTO, T.; MAJEED, A. B. A. Development and stability evaluation of astaxanthin nanoemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, n. SUPPL. 1, p. 143–148, 2011.
- AGANOVIC, K.; BINDRICH, U.; HEINZ, V. Ultra-high pressure homogenization process for production of reduced fat mayonnaise with similar rheological characteristics as its full fat counterpart. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 208–214, 2018.
- AGRAWAL, N.; MADDIKERI, G. L.; PANDIT, A. B. Sustained release formulations of citronella oil nanoemulsion using cavitation techniques. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 367–374, 2017.
- ALKILANI, A. Z.; HAMED, R.; AL-MARABEH, S.; KAMAL, A.; ABU-HUWAIJ, R.; HAMAD, I. Nanoemulsion-based film formulation for transdermal delivery of carvedilol. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, n. May, p. 122–128, 2018.
- AHMED, K.; LI, Y.; McCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 799–807, 2012.
- AKALIN, A. S.; KESENKAS, H.; DINKCI, N.; UNAL, G.; OZER, E.; KINIK, O. Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. **Journal of Dairy Science**, n. 101, p. 1–10, 2018.

AKBAS, E.; SOYLER, B.; OZTOP, M. H. Formation of capsaicin loaded nanoemulsions with high pressure homogenization and ultrasonication. **LWT- Food Science and Technology**, v. 96, p. 266–273, 2018.

AKBAS, E.; SOYLER, U. B.; OZTOP, M. H. Capsaicin emulsions: formulation and characterization. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 8, p. 1079–1086, 3 ago. 2017.

AKHAVAN, S.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of natural food colorants. In: JAFARI, S. M. (Ed.). **Nanoencapsulation of food bioactive ingredients**. Academic Press, 2017. p. 223–259.

ALCÁZAR-VARA, L. A.; ZAMUDIO-RIVERA, L. S.; BUENROSTRO-GONZÁLEZ, E. Effect of asphaltenes and resins on asphaltene aggregation inhibition, rheological behaviour and waterflood oil-recovery. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 37, n. 11, p. 1544–1554, 2016.

ALFAIFI, M. S.; STATHOPOULOS, C. E. Effect of egg yolk substitution by sweet whey protein concentrate (WPC), on physical properties of gelato ice cream. **International Food Research Journal**, v. 17, n. 3, p. 787–793, 2010.

ALFARO, L.; HAYES, D.; BOENEKE, C.; XU, Z.; BANKSTON, D.; BECHTEL, P. J.; SATHIVEL, S. Physical properties of a frozen yogurt fortified with a nano-emulsion containing purple rice bran oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 1184–1191, 2015.

ALHREEZ, M.; WEN, D. Controlled releases of asphaltene inhibitors by nanoemulsions. **Fuel**, v. 234, p. 538–548, 2018.

ALIKA, V. A.; ATMA, Y. The Organoleptic and Physicochemical Characteristic of Gelato by Fish Bone Gelatin Addition. **Journal of Applied Sciences and Advanced**, v. 1, n. 1, p. 31–38, 2018.

AMADOR, J.; HARTEL, R.; RANKIN, S. The Effects of Fat Structures and Ice Cream Mix Viscosity on Physical and Sensory Properties of Ice Cream. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 8, p. 1851–1860, 2017.

AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N. P. Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 3, p. 216–221, 2006.

ANARJAN, N.; MIRHOSSEINI, H.; BAHARIN, B. S.; TAN, C. P. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 477–483, 2010.

AOAC - ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Ed. 17, Washington, D.C., CD-ROM, 2000.

ARANCIBIA, C.; MIRANDA, M.; MATIACEVICH, S.; TRONCOSO, E. Physical properties and lipid bioavailability of nanoemulsion-based matrices with different thickening agents. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 243–254, 2017a.

ARANCIBIA, RIQUELME, N.; ZÚÑIGA, R.; MATIACEVICH, S. Comparing the effectiveness of natural and synthetic emulsifiers on oxidative and physical stability of avocado oil-based nanoemulsions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 44, p. 159–166, 2017b.

ARANTES, P. DE O.; DOS SANTOS, Q. N.; DE FREITAS, Z. M.; PYRRHO, A. DOS. S.; CERQUEIRA-COUTINHO, C.; VILA, A. L. V.; DOS SANTOS, E. P.; RICCI JÚNIOR, E. Promotion of cutaneous penetration of nifedipine for nanoemulsion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 2, p. 1–12, 2017.

ARGENTA, D. F.; BIDONE, J.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; SIMÕES, C. M. O.; TEIXEIRA, H. F. Topical Delivery of Coumestrol from Lipid Nanoemulsions Thickened with Hydroxyethylcellulose for Antiherpes Treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 1, p. 192–200, 2018.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; GUERRA-ROSAS, M. I.; MORALES-CASTRO, J.; SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO, O. Influence of essential oils and pectin on nanoemulsion formulation: A ternary phase experimental approach. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 209–219, 2018.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELOSO, O. Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 191–200, 2017.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; LANJARI-PÉREZ, Y.; MARTÍN-BELLOSO, O. Curcumin-loaded nanoemulsions stability as affected by the nature and concentration of surfactant. **Food Chemistry**, v. 266, p. 466–474, 2018.

ASENSIO, C. M.; QUIROGA, P. R.; HUANG, Q.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Fatty acids, volatile compounds and microbial quality preservation with an oregano nanoemulsion to extend the shelf life of hake (*Merluccius hubbsi*) burgers. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–12, 2018.

ASSIS, R. Q.; PAGNO, C. H.; COSTA, T. M. H.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. O. Synthesis of biodegradable films based on cassava starch containing free and nanoencapsulated β - carotene. **Packaging Technology and Science**, v. 31, n. 3, p. 8–10, 2018.

AZAMI, S. J.; AMANI, A.; KESHAVARZ, H.; NAJAFI-TAHER, R.; MOHEBALI, M.; FARAMARZI, M. A.; MAHMOUDI, M.; SHOJAEI, S. Nanoemulsion of atovaquone as a promising approach for treatment of acute and chronic toxoplasmosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 117, p. 138–146, 2018.

BADAWY, M. E. I.; SAAD, A. S. A.; TAYEB, E. H. M.; MOHAMMED, S. A.; ABD-ELNABI, A. D. Optimization and characterization of the formation of oil-in-water diazinon nanoemulsions: Modeling and influence of the oil phase, surfactant and sonication. **Journal**

of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v. 52, n. 12, p. 896–911, 2017.

BAKRY, A. M.; FANG, Z.; KHAN, M. A.; CHEN, Y.; CHEN, Y. Q.; LIANG, L. Tuna oil and *Mentha piperita* oil emulsions and microcapsules stabilized by whey protein isolate and inulin: characterization and stability. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 494–503, 2017.

BALTA, I.; BRINZAN, L.; STRATAKOS, A. C.; LINTON, M.; KELLY, C.; PINKERTON, L.; CONCIONIVOSCHI, N. Geraniol and linalool loaded nanoemulsions and their antimicrobial activity. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, v. 74, n. 2, p. 157–161, 2017.

BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L. A.; CELEGUINI, R. M. S.; SANTOS, R.; PASTORE, G. M.; FREITAS, M. Q.; NOGUEIRA, L. C.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Effect of galactooligosaccharide addition on the physical, optical, and sensory acceptance of vanilla ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1–7, 2015.

BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L. A.; VIEIRA, A. H.; NETO, R. P. C.; CAPPATO, L. P.; COIMBRA, P. T.; MORAES, J.; ANDRADE, M. M.; CALADO, V. M. A.; GRANATO, D.; FREITAS, M. Q.; TAVARES, M. I. B.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. **Food Research International**, v. 91, p. 38–46, 2017.

BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L. A.; ESMERINO, E. A.; ROCHA, R. S.; MORAES, J.; CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; CAMPS, I.; ABUD, Y. K. D.; SANT'ANNA, C.; FRANCO, R. M.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; ESCHER, G. B.; GRANATO, D.; RANADHEERA, C. S.; NAZARRO, F.; CRUZ, A. G. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. **Food Chemistry**, v. 246, n. August 2017, p. 464–472, 2018.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 545–549, 2013.

BCC RESEARCH MARKET FORECASTING. **The Global Market for Carotenoids**. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025e.html>>.

BCC RESEARCH MARKET FORECASTING. **The Maturing Nanotechnology Market: Products and Application**. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanotechnology-market-products-applications-report-nan031g.html>>.

BERNARDI, D. S.; PEREIRA, T. A.; MACIEL, N. R.; BORTOLOTO, J.; VIERA, G. S.; OLIVEIRA, G. C.; ROCHA-FILHO, P. A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: In vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p. 1–9, 2011.

BOON, C. S.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Role of Iron and Hydroperoxides in the Degradation of Lycopene in Oil-in-Water Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2993–2998, 8 abr. 2009.

BOON, C. S.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 515–532, 2010.

BORRIN, T. R.; GEORGES, E. L.; BRITO-OLIVEIRA, T. C.; MORAES, I. C. F.; PINHO, S. Technological and sensory evaluation of pineapple ice creams incorporating curcumin-loaded nanoemulsions obtained by the emulsion inversion point method. **International Dairy Journal Technology**, v. 71, n. 2, p. 491–500, 2018.

BOUTS, M. N.; WIERMSMA, R. J.; MUIJS, H. M.; SAMUEL, A. J. An evaluation of new asphaltene inhibitors; laboratory study and field testing. **Journal of Petroleum Technology**, v. 47, n. 09, p. 782–787, 1 set. 1995.

BOVI, G. G.; PETRUS, R. R.; PINHO, S. C. Feasibility of incorporating buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil nanoemulsions in isotonic sports drink. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 2201–2209, 2017.

BRAGA, L. T. **Microencapsulação de extratos carotenogênicos produzidos por *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa***. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

BRASIL. **PL 5133/2013**. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=567257> Acesso em: 19 nov. 2018.

BRASIL. **Manual de Condutas Gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A**. 2013. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_condutas_suplementacao_vitamina_a.pdf

BRASIL. Instrução Normativa nº 1, de 30 de janeiro de 2012. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 01 fev. 2012. Seção 1, p. 5.

BRITO-OLIVEIRA, T. C.; MOLINA, C. V.; NETTO, F. M.; PINHO, S. C. Encapsulation of β -carotene in lipid microparticles stabilized with hydrolyzed soy protein isolate: production parameters, alpha-tocopherol coencapsulation and stability under stress conditions. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 659–669, 2017.

BUSQUETS, R.; MBUNDI, L. Concepts of Nanotechnology. In: BUSQUETS, R. (Ed.). **Emerging nanotechnologies in food science**. Elsevier, 2017. p. 1–10.

ÇAKMAKÇI, S.; TOPDAS, E. F.; ÇAKIR, Y.; KALIN, P. Functionality of kumquat (*Fortunella margarita*) in the production of fruity ice cream. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1451–1458, 2016.

CALLIGARIS, S.; PLAZZOTTA, S.; BOT, F.; GRASSELLI, S.; MALCHIODI, A.; ANESE, M. Nanoemulsion preparation by combining high pressure homogenization and high power ultrasound at low energy densities. **Food Research International**, v. 83, p. 25–30, 2016.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2–3, p. 125–155, 2004.

CARDOSO, L. A.; KARP, S. G.; VENDRUSCOLO, F.; KANNO, K. Y. F.; ZOZ, L. I. C.; CARVALHO, J. C. Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. In: CVETKOVIC, D.; NIKOLIC, G. (Ed.). **Carotenoids**. InTech, 2017, p.125-141.

CARPENTER, J.; SAHARAN, V. K. Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 422–430, 2017.

CERQUEIRA, M A; PINHEIRO, A. C.; RAMOS, O. L.; SILVA, H.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A. Advances in Food Nanotechnology. In: BUSQUETS, R. (Ed.). **Emerging nanotechnologies in food science**. Elsevier, 2017. p. 11–33.

CHAARI, M.; THEOCHARI, I.; PAPADIMITRIOU, V.; XENAKIS, A.; AMMAR, E. Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro- and nano-emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, p. 219–227, 2018.

CHEN, F.; FAN, G. Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, R.; DENG, Z. Y.; McCLEMENTS, D. J. Encapsulation of omega-3 fatty acids in nanoemulsions and microgels: Impact of delivery system type and protein addition on gastrointestinal fate. **Food Research International**, v. 100, p. 387–395, 2017a.

CHEN, H.; ZHONG, Q. Thermal and UV stability of β -carotene dissolved in peppermint oil microemulsified by sunflower lecithin and Tween 20 blend. **Food Chemistry**, v. 174, p. 630–636, 2015.

CHEN, J.; LI, F.; LI, Z.; McCLEMENTS, D. J.; XIA, H. Encapsulation of carotenoids in emulsion-based delivery systems: Enhancement of β -carotene water-dispersibility and chemical stability. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 49–55, 2017b.

CHEN, X.; CHEN, R.; GUO, Z.; LI, C.; LI, P. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1580–1584, 2007.

CHEN, Z.; SHU, G.; TAARJI, N.; BARROW, C. J.; NAKAJIMA, M.; KHALID, N.; NEVES, M. A. Gypenosides as natural emulsifiers for oil-in-water nanoemulsions loaded with astaxanthin: Insights of formulation, stability and release properties. **Food Chemistry**, v. 261, p. 322–328, 2018.

CHEONG, A. M.; TAN, C. P.; NYAM, K. L. Physicochemical, oxidative and anti-oxidant stabilities of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions under different storage temperatures. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 374–382, 2017.

CHUANG, E.; CHUANG, E.; LIN, K.; HUANG, T.; CHEN, H.; MIAO, Y.; LIN, P.; CHEN, C.; JUANG, J.; SUNG, H. An Intestinal “Transformers” -Like Nanocarrier System for Enhancing the Oral Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. **ACS Nano**, v. 12, n. 7, p. 6389–6397, 2018.

CHUESIANG, P.; SIRIPATRAWAN, U.; SANGUANDEEKUL, R.; MCLANDSBOROUGH, L.; McCLEMENTS, D. J. Optimization of cinnamon oil nanoemulsions using phase inversion temperature method: Impact of oil phase composition and surfactant concentration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 514, p. 208–216, 2018.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

COSTA, A. M.; BUENO, K. T. L.; DA ROSA, A. P. C.; COSTA, J. A. V. The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina* sp. LEB18. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 173–178, 2019.

COTTRELL, J. I. L.; PASS, G.; PHILLIPS, G. assessment of polysaccharides as ice cream stabilizers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 1085–1088, 1979.

DA SILVA, M. M.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; RUTZ, J. K.; CANTILLANO, R. F. F.; NORA, L.; RIOS, A. O. Thermal and ultraviolet–visible light stability kinetics of co-nanoencapsulated carotenoids. **Food and Bioproducts Processing**, v. 105, p. 86–94, 2017.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. **Fennema’s Food Chemistry**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEL, S.; DAVARANI, F. H.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KRORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 1–17, 2018.

DEĞERLI, K.; KILIMCIOĞLU, A. A.; KURT, Ö.; TAMAY, A. T.; ÖZBILGIN, A. Efficacy of azithromycin in a murine toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from Turkey. **Acta Tropica**, v. 88, n. 1, p. 45–50, 2003.

DE OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, S. A.; BURKERT, C. A. V. Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2180–2187, 2018.

DESMARCHELIER, C.; BOREL, P. Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 270–280, 2017.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Xanthan rheological: a review about the influence of electrolytes on the viscosity of aqueous solutions of xanthan gums. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 15–28, 2004.

DOMINGOS, L. D.; XAVIER, O.; MERCADANTE, A. Z.; PETENTE, A. J.; JORGE, R.A.; VIOTTO, W. H. Oxidative stability of yogurt with added lutein dye. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 616–623, 2014.

DOMÍNGUEZ-HERNÁNDEZ, C. R.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; SALGADO-CERVANTES, M. A.; BERISTÁIN, C. I. Stability, antioxidant activity and bioavailability of nano-emulsified astaxanthin | Estabilidad, actividad antioxidante y biodisponibilidad de astaxantina nano-emulsificada. **Revista Mexicana de Ingeniera Química**, v. 15, n. 2, 2016.

DONSÌ, F.; FERRARI, G.; LENZA, E.; MARESCA, P. Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: operating parameters and scale of operation. **Chemical Engineering Science**, v. 64, p. 520–532, 2009.

DORA, C. L. PUTAUX, J.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; DUBREUIL, F.; SOLDI, V.; BOSALI, R.; LEMOS-SENNA, E. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 1972–1981, 2012.

DOS SANTOS, P. P.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; JEBLONSKI, A.; FLÓRES, S. H.; RIOS, A. O. Stability study of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules under temperature and photosensitization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 190–195, 2016.

EL KINAWY, O. S.; PETERSEN, S.; HELMDACH, L.; ULRICH, J. Parameter selection of emulsification processes: conditions for nano- and macroemulsions. **Chemical Engineering and Technology**, v. 35, n. 9, p. 1604–1608, 2012.

FAN, Y.; GAO, L. YI, J.; ZHANG, Y. YOKOYOMA, W. Development of β -carotene-loaded organogel-based nanoemulsion with improved in vitro and in vivo bioaccessibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 30, p. 6188–6194, 2017a.

FAN, Y.; YI, J.; ZHANG, Y.; WEN, Z.; ZHAO, L. Physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of β -carotene nanoemulsions stabilized with whey protein-dextran conjugates. **Food Hydrocolloids**, v. 63, n. 2017, p. 256–264, 2017b.

FANTIN, E. **MCTIC avança na elaboração de marco regulatório para nanotecnologia**. Disponível em: <<http://www.fiepr.org.br/boletins-setoriais/7/especial/mctic-avanca-na-elaboracao-de-marco-regulatorio-para-nanotecnologia-2-32023-363297.shtml>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

FENG, Z. Z.; LI, M. Y.; WANG, Y. T.; ZHU, M. J. Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*: Microencapsulation with carboxymethyl cellulose sodium and microcrystalline cellulose and effects of microencapsulated astaxanthin on yogurt properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 152–160, 2018.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; JARÉN-GALÁN, M.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research**, v. 46, n. 2, p. 438–450, 2012.

FRASER, P.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 228–265, 2004.

GADKARI, P. V.; SHASHIDHAR, M. G.; BALARAMAN, M. Delivery of green tea catechins through oil-in-water (O/W) nanoemulsion and assessment of storage stability. **Journal of Food Engineering**, v. 199, p. 65–76, 2017.

GALVÃO, K. C. S.; VICENTE, A. A.; SOBRAL, P. J. A. development, characterization, and stability of o/w pepper nanoemulsions produced by high-pressure homogenization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 2, p. 355–367, 2018.

GANI, A.; BENJAKUL, S. Impact of virgin coconut oil nanoemulsion on properties of croaker surimi gel. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 34–44, 2018.

GHANI, S.; BARZEGAR, H.; NOSHAD, M.; HOJJATI, M. The preparation, characterization and in vitro application evaluation of soluble soybean polysaccharide films incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 197–202, 2018.

GHARENAGHADEH, S.; KARIMI, N.; FORGHANI, S.; NOURAZARIAN, M.; GHAREHNAGHADEH, S.; JABBARI, V.; KHIABANI, M. S.; KAFIL, H. S. Application of *Salvia multicaulis* essential oil-containing nanoemulsion against food-borne pathogens. **Food Bioscience**, v. 19, n. June, p. 128–133, 2017.

GHAYOUR, N.; HOSSEINI, S. M. H.; ESKANDARI, M. H.; ESTEGHLAL, S.; NEKOEI, A.; GAHRUIE, H. H.; TATAR, M.; NAGHIBALHOSSAINI, F. Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 394–403, 2019.

GHORBANZADE, T.; JAFARI, S. M.; AKHAVAN, S. M.; HADAVI, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

GOFF, H. D.; VERESPEJ, E.; SMITH, A. K. A study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 817–829, 2000.

GOLDING, M.; WOOSTER, T. J.; DAY, L.; XU, M.; LUNDIN, L.; KEOGH, J.; CLIFTONX, P. Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. **Soft Matter**, v. 7, n. 7, p. 3513–3523, 2011.

GOLDMAN, M.; HOREV, B.; SAGUY, I. Decolorization of β -Carotene in model systems simulating dehydrated foods. mechanism and kinetic principles. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 751–754, 1983.

GOMES, G. V. L.; SOLA, M. R.; MAROSTEGAN, L. F. P.; JANGE, C. G.; CAZADO, C. P. S.; PINHEIRO, A. C.; VICENTE, A. A.; PINHO, S. C. Physico-chemical stability and in vitro digestibility of beta-carotene- loaded lipid nanoparticles of cupuacu butter (*Theobroma grandiflorum*) produced by the phase inversion temperature (PIT) method. **Journal of Food Engineering**, v. 192, p. 93–102, 2017.

- GÓMEZ-GARCÍA, M. R.; OCHOA-ALEJO, N. biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 19025–19053, 2013.
- GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311–326, 1949.
- GRUNE, T.; LIETZ, G.; PALOU, A.; ROSS, C.; STAHL, W.; TANG, G.; THURNHAM, D.; YIN, S.; BIESALSKI, H. K. β -Carotene is an important vitamin a source. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2268S–2285S, 2010.
- GU, L.; PAN, C.; SU, Y.; ZHANG, R.; XIAO, H.; McCLEMENTS, D. J.; YANG, Y. In Vitro bioavailability, cellular antioxidant activity, and cytotoxicity of β -carotene-loaded emulsions stabilized by catechin-egg white protein conjugates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 7, p. 1649–1657, 2018.
- GUAN, Y.; WU, J.; ZHONG, Q. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene. **Food Chemistry**, v. 194, p. 787–796, 2016.
- GUL, K.; TAK, A.; SINGH, A. K.; SINGH, A. K.; YOUSUF, B.; WANI, A. A. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene - A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2015.
- GÜNDEL, S.; VELHO, M. C.; DIEFENTHALER, M. K.; FAVARIN, F. R.; COPETTI, P. M.; FOGAÇA, A. O.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; SAGRILLO, M. R.; OURIQUE, A. F. Basil oil-nanoemulsions: development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, n. March, p. 378–383, 2018.
- GUTIÉRREZ, F. J.; ALBILLOS, S. M.; CASAS-SANZ, E.; CRUZ, Z.; GARCÍA-ESTRADA, A.; GARCÍA-GUERRA; GARCÍA-REVERTER, J.; GARCÍA-SUAREZ, M. GATÓN, P.; GONZÁLEZ-FERRERO. OLABARRIETA, I.; OLASAGASTI, M.; RAINIERI, S.; RIVERA-PATIÑO, D.; ROJO, R.; ROOM-HUALDE, A.; SÁIZ-ABAJO, M. J.; MUSSONS, M. L. Methods for the nanoencapsulation of β -carotene in the food sector. **Trends in Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 73–83, 2013.
- HÅKANSSON, A. Can high-pressure homogenization cause thermal degradation to nutrients? **Journal of Food Engineering**, v. 240, n. July 2018, p. 133–144, 2019.
- HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenization of raw whole bovine milk Effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 297–305, 2003.
- HONG, L.; ZHOU, C. L.; CHEN, F. P.; HAN, D.; WANG, C. Y.; LI, J. X.; CHI, Z.; LIU, C. G. Development of a carboxymethyl chitosan functionalized nanoemulsion formulation for increasing aqueous solubility, stability and skin permeability of astaxanthin using low-energy method. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 8, p. 707–721, 2017.

HSU, H. J.; HUANG, R. F.; KAO, T. H.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Preparation of carotenoid extracts and nanoemulsions from *Lycium barbarum* L. and their effects on growth of HT-29 colon cancer cells. **Nanotechnology**, v. 28, n. 13, p. 135103, 2017.

IZADI, Z.; NASIRPOUR, A.; GAROOSI, G. A. Rheological and physical properties of yogurt enriched with phytosterol during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 5341–5346, 2015.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 1, p. 388–394, 2005.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 8 abr. 2015.

JANA, S.; GANDY, A.; JANA, S. Nanotechnology in Bioactive Food Ingredients: Its Pharmaceutical and Biomedical Approaches. In: OPREA, A. E.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). **Nanotechnology Applications in Food: flavor, stability, nutrition and Safety**. Academic Press, 2017. p. 21–28.

JO, Y. J.; KWON, Y. J. Characterization of β -carotene nanoemulsions prepared by microfluidization technique. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 107–113, 2014.

KACI, M.; BELHAFFEF, A.; MEZIANE, G.; DOSTERT, G.; MENU, P.; VELOT, E.; DESOBRY, S.; RAB-TEHRANY, E. A. Nanoemulsions and topical creams for the safe and effective delivery of lipophilic antioxidant coenzyme Q10. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 165–175, 2018.

KHALID, N.; SHU, G.; HOLLAND, B. J.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M.; BARROW, C. J. Formulation and characterization of O/W nanoemulsions encapsulating high concentration of astaxanthin. **Food Research International**, v. 102, n. April, p. 364–371, 2017.

KIM, D. M.; HYUN, S. S.; LEE, C. H.; BYUN, S. Y. Identification of an emulsifier and conditions for preparing stable nanoemulsions containing the antioxidant astaxanthin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 1, p. 64–73, 2012.

KIM, S.; JEONG, M.; LEE, J. J. Development of nanoemulsion CO₂ absorbents for mass transfer performance enhancement. **International Communications in Heat and Mass Transfer**, v. 94, p. 24–31, 2018.

KIRSH, V. A.; MAYNE, S. T.; PETERS, U.; CHATTERJEE, N.; LEITZMANN, M. F. A prospective study of lycopene and tomato product intake and risk of prostate cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 1, p. 92–8, 2006.

KOTÍKOVÁ, Z.; ŠULC, M.; LACHMAN, J.; PIVEC, V.; ORSÁK, M.; HAMOUZ, K. Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. **Food Chemistry**, v. 197, p. 992–1001, 2016.

KOURNIATIS, L. R. et al. Formation of orange oil-in-water nanoemulsions using nonionic surfactant mixtures by high pressure homogenizer. **Colloid Journal**, v. 72, n. 3, p. 396–402, 2010.

KRISHNAMOORTHY, R.; ATHINARAYANAN, J; PERIYASAMY, V. S.; ADISA, A. R.; AL-SHUNIABER, M. A.; GASSEN, M. A.; ALSHATWI, A. A. Antimicrobial activity of nanoemulsion on drug-resistant bacterial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, p. 85–96, 2018.

KUMAR, B.; SMITA, K. Scope of Nanotechnology in Nutraceuticals. In: OPRERA, A. E.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). **Nanotechnology Applications in Food: flavor, stability, nutrition and Safety**. 2017. p. 43–59.

LAI, R. W. S.; YEUNG, K. W. Y.; YUNG, M. M. N.; DJURIŠIĆ, A. B.; GIESY, J. P.; LEUNG, K. M. Y. Regulation of engineered nanomaterials: current challenges, insights and future directions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 4, p. 3060–3077, 2018.

LEE, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 6–7, p. 560–569, 2010.

LETSIDIDI, K. S.; LOU, Z.; LETSIDIDI, R.; MOHAMMED, K.; MAGUY, B. L. Antimicrobial and antibiofilm effects of trans-cinnamic acid nanoemulsion and its potential application on lettuce. **LWT - Food Science and Technology**, v. 94, p. 25–32, 2018.

LI, Y.; LIU, B.; JIANG, L.; REGENSTEINS, J. M.; JIANG, N.; POIAS, V.; ZHANG, X.; QI, B.; LI, A. WANG, Z. Interaction of soybean protein isolate and phosphatidylcholine in nanoemulsions: A fluorescence analysis. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 814–829, 2018.

LIM, A. S. L.; ROOS, Y. H. Carotenoids stability in spray dried high solids emulsions using layer-by-layer (LBL) interfacial structure and trehalose-high DE maltodextrin as glass former. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 32–39, 2017.

LIMA, J. G. DE; BRITO-OLIVEIRA, T. C.; PINHO, S. C. DE. Characterization and evaluation of sensory acceptability of ice creams incorporated with beta-carotene encapsulated in solid lipid microparticles. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 4, p. 664–671, 2016.

LIU, H.; XU, X. M.; GUO, S. D. Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 946–954, 2007.

LLINARES, R.; SANTOS, J.; TRUJILLO-CAYADO, L. A.; RAMÍREZ, P.; MUÑOZ, J. Enhancing rosemary oil-in-water microfluidized nanoemulsion properties through formulation optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 370–375, 2018.

LU, W. C.; HUANG, D.; WANG, C. C. R.; YEH, C. H.; TSAI, J. C.; HUANG, Y. T.; LI, P. H. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82–89, 2018.

LUO, X. ZHOU, Y.; BAI, L.; LIU, F.; DENG, Y.; McCLEMENTS, D. J. Fabrication of β -carotene nanoemulsion-based delivery systems using dual-channel microfluidization: physical and chemical stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 328–335, 2017.

MANGEMATIN, V.; WALSH, S. The future of nanotechnologies **Technovation, Elsevier**, v. 32, p. 157–160, 2012.

MARCIAL, S. DE S. P.; CARNEIRO, G.; LEITE, E. A. Lipid-based nanoparticles as drug delivery system for paclitaxel in breast cancer treatment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, n. 10, 2017.

MARSHALL, R. T.; GOFF, H. D.; HARTE, R. W. **Ice Cream**. 6. ed. Springer US, 2003.

MARTÍNEZ, J. M. H. **Nanocarreadores lipídicos contendo ácidos graxos insaturados provenientes de Tainha (*Mugil liza*) como transportadores de carotenoides**. 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

MARTINS, A. R.; MONTEIRO, R. L.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Hidrólise enzimática e fermentação láctica simultâneas na obtenção de um iogurte com baixo teor de lactose. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 5, p. 551–559, 2012.

MASSAROLO, K. C.; SOUZA, T. D.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S. Influence of cultivation *Rhizopus oryzae* on rice bran on lipid fraction: Fatty acids and phospholipids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, n. July, p. 204–208, 2016.

MAZZARINO, L.; PITZ, H. DA S.; VOYTENA, A. P. L.; TREVISAN, A. C. D.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M.; MARASCHIN, M. Jaboticaba (*Plinia peruviana*) extract nanoemulsions: development, stability, and in vitro antioxidant activity. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 4, p. 643–651, 2018.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques**. CRC Press, 2015. 690 p.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. In: JAFARI, S. M.; MCCLEMENT, D. J. (Eds.). **Nanoemulsions: formulation, applications, and characterization**. Elsevier Inc., 2018. p. 3–20.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011.

MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: Influence of particle characteristics. **Food and Function**, v. 3, n. 3, p. 202–220, 2012.

- MCLEOD, R.; KHAN, A. R.; NOBLE, G. A.; LATKANY, P.; JALBRZIKOWSKI, J.; BOYER, K. Severe sulfadiazine hypersensitivity in a child with reactivated congenital toxoplasmic chorioretinitis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, n. 3, p. 270–272, 2006.
- MENG, Q; LONG, P.; ZHOU, J.; HO, C.; ZOU, X.; CHEN, B. Improved absorption of β -carotene by encapsulation in an oil-in-water nanoemulsion containing tea polyphenols in the aqueous phase. **Food Research International**, v. 116, p. 731–736, 2019.
- METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514–515, 1966.
- MEZQUITA, P. C.; BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; RAMIRES, J. P.; HINOJOSA, C. O. Stability of astaxanthin in yogurt used to simulate apricot color, under refrigeration. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 559–565, 2014.
- MEZQUITA, P. C.; HUERTA, B. E. B.; RAMÍREZ, J. C. P.; HINOJOSA, C. P. O. Milks pigmentation with astaxanthin and determination of colour stability during short period cold storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1634–1641, 2015.
- MICALI, M.; FIORINO, M.; PARISI, S. **The Chemistry of Thermal Food Processing Procedures**. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; JAREN-GALAN, M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, p. 153–161, 1995.
- MISHRA, P.; SAMUEL, M. K.; REDDY, R.; TYAGI, B. K.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Environmentally benign nanometric neem-laced urea emulsion for controlling mosquito population in environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 3, p. 2211–2230, 2018.
- MISTRY, P. H.; MOHAPATRA, S. K.; DASH, A. K. Effect of high-pressure homogenization and stabilizers on the physicochemical properties of curcumin-loaded glycerol monooleate/chitosan nanostructures. **Nanomedicine**, v. 7, n. 12, p. 1863–1876, 2012.
- MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; HARIGAE, T.; ONUMA, R.; KIMURA, F.; FUJII, T.; MIYAZAWA, T. Distribution of β -carotene-encapsulated polysorbate 80-coated poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in rodent tissues following intravenous administration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7223–7230, 2015.
- MORAES, A. R. D. P.; TAVARES, G. D.; ROCHA, F. J. S.; DE PAULA, E.; GIORGIO, S. Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. **Experimental Parasitology**, v. 187, p. 12–21, 2018.
- MUTSOKOTI, L.; PANOZZO, A.; MUSABE, E. T.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Carotenoid transfer to oil upon high pressure homogenization of tomato and carrot-based matrices. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 775–785, 2015.

NAPPER, D. H. Steric stabilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 58, n. 2, p. 390–407, 1977.

NASARUDDIN, F.; HUERTA, B. E. B.; RAMÍREZ, J. C. P.; HINOJOSA, C. P. O. Effect of processing on instrumental textural properties of traditional dodol using back extrusion. **International Journal of Food Properties**, v. 15, p. 495–506, 2012.

NAVARRO, S. L. B.; CAPELLINI, M. C.; ARACAVA, K. K.; RODRIGUES, C. E. C. Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 185–194, 2016.

NIRMAL, N. P.; MEREDDY, R.; LI, L.; SULTUNBAWA, Y. Formulation, characterization and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 254, p. 1–7, 2018.

NISHINO, H. MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. Cancer prevention by carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, n. 2, p. 165–168, 2009.

NOGUEIRA, M. B.; PRESTES, C. F.; BURKERT, J. F. DE M. Microencapsulation by lyophilization of carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* with soy protein as the encapsulating agent. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 1–4, 2017.

NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food Control**, v. 84, p. 312–320, 2018.

ÖZDEMİR, S.; ÇELİK, B.; SÜMER, E.; ACAR, E. T.; ÜNER, M. Eplerenone nanoemulsions for treatment of hypertension. Part II: Physical stability assessment and in vivo study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, n. November 2017, p. 287–295, 2018.

ÖZOGUL, Y.; DUMUS, M.; UCAR, Y.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Comparative study of nanoemulsions based on commercial oils (sunflower, canola, corn, olive, soybean, and hazelnut oils): effect on microbial, sensory, and chemical qualities of refrigerated farmed sea bass. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 422–430, 2016.

OZTURK, B.; ARGİN, S.; OZILGEN, M. MCCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. **Journal of Food Engineering**, v. 142, p. 57–63, 2014.

OZTURK, B.; MCCLEMENTS, D. J. Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 1–6, 2016.

PANKIEWICZ, U.; MAŁGORZATA, G.; KOZŁOWICZ, K.; GÓRAL, D. Novel method of zinc ions supplementing with fermented and unfermented ice cream with using PEF. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–10, 2019.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 21-32, 2007.

PARK, S.; MUN, S.; KIM, Y. R. Emulsifier dependent in vitro digestion and bioaccessibility of β -carotene loaded in oil-in-water emulsions. *food biophysics*, v. 13, n. 2, p. 147–154, 2018.

PASEEPHOL, T.; SMALL, D. M.; SHERKAT, F. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. **Journal of Texture Studies**, v. 39, p. 617–634, 2008.

PATHAK, M. Nanoemulsions and Their Stability for Enhancing Functional Properties of Food Ingredients. In: OPREA, A. E.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). **Nanotechnology Applications in Food: flavor, stability, nutrition and Safety**. Elsevier p. 87–103.

PENGON, S.; CHINATANGKUL, N.; LIMMATVAPIRAT, C.; LIMMATVAPIRAT, S. The effect of surfactant on the physical properties of coconut oil nanoemulsions. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 5, p. 409-414, 2018.

PHIPPS, L. W. The fragmentation of oil drops in emulsions by a high-pressure homogenizer. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 8, n. 4, p. 448–462, 1975.

POLYCHNIATOU, V.; TZIA, C. Evaluation of surface-active and antioxidant effect of olive oil endogenous compounds on the stabilization of water-in-olive-oil nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1146–1153, 2018.

PONS, M.; INDUSTRIES, S. B.; FISZMAW, S. M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, v. 27, p. 597–624, 1996.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions : Influence of pH , ionic strength , temperature , and emulsifier type. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1221–1229, 2012.

QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1000–1008, 2011.

RAHMAN, M.; KHAN, M. A.; RUD, M. A.; HOQUE, M. A.; ASIRI, A. M. Investigation of the effect of various additives on the clouding behavior and thermodynamics of polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate in absence and presence of ceftriaxone sodium trihydrate drug. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 62, n. 4, p. 1464–1474, 2017.

RAMYADEVI, D.; RAJAN, K. S. Synthesis of hybrid polymer blend nanoparticles and incorporation into in situ gel foam spray for controlled release therapy using a versatile synthetic purine nucleoside analogue antiviral drug. **RSC Advances**, v. 5, n. 17, p. 12956–12973, 2015.

RAO, A. V; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 207–216, 2007.

RAUSCHER, H.; RASMUSSEN, K.; SOKULL-KLÜTTGEN, B. Regulatory Aspects of Nanomaterials in the EU. **Chemie-Ingenieur-Technik**, v. 89, n. 3, p. 224–231, 2017.

RICAURTE, L.; HERNÁNDEZ-CÁRRION, M.; MOYANO-MOLANO, M.; CLAVIJO-ROMERO, A. Physical, thermal and thermodynamical study of high oleic palm oil nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 256, p. 62–70, 2018.

RINALDI, M. Innovation in the Italian ice cream production: effect of different phospholipid emulsifiers. **Dairy Science & Technology**, p. 33–49, 2014.

RIZK, E. M.; EL-KADY, A. T.; EL-BIALY, A. R. Characterization of carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 1, p. 53–61, 2014.

ROBLEDO, N.; VERA, P.; LÓPEZ, L.; YAZDANI-PEDRAM, M.; TAPIA, C.; ABUGOCH, L. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, v. 246, p. 211–219, 2018.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington D.C.: ILSI Press, 2001.

ROSEN, M. J.; KUNJÁPPU, J. T. **Surfactants and interfacial phenomena**. 4. ed. Wiley, 2012.

RUIZ-MONTAÑEZ, G.; RAGAZZO-SANCHEZ, J. A.; PICART-PALMADE, L.; CALDERÓN-SANTOYO, M.; CHEVALIER-LUCIA, D. Optimization of nanoemulsions processed by high-pressure homogenization to protect a bioactive extract of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 40, p. 35–41, 2017.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; CLEONICE, G.; MÉDELIN, M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324–333, 2016.

RYU, V.; MCCLEMENTS, D. J.; Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 245, p. 104–111, 2018.

SÁIZ-ABAJO, M. J.; GONZÁLEZ-FERRERO, C.; MORENO-RUIZ, A.; ROMO-HUALDE, A., & GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1581–1587, 2013.

SALVIA-TRUJILLO, L.; VERKEMPINCK, S. H. E.; ZHANG, X.; VAN LOEY, A. M.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M. E. Comparative study on lipid digestion and carotenoid bioaccessibility of emulsions, nanoemulsions and vegetable-based in situ emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 119–128, 2018.

SANTOS, C. A. DOS; MING, C. C.; GONÇALVES, L. A. G. Emulsificantes: atuação como modificadores do processo de cristalização de gorduras. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 567–574, 2014.

SCHUH, R. S.; BRUXEL, F.; TEIXEIRA, H. F. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1193–1198, 2014.

SCITA, G. Stability of β -carotene under different laboratory conditions. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 175–185, 1992.

SHADMAN, S. et al. Evaluation of the effect of a sunflower oil-based nanoemulsion with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the physicochemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during cold storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 511–517, 2017.

SHAH, M. R.; IMRAN, M.; ULLAH, S. **Lipid-based nanocarriers for drug delivery and diagnosis**. Elsevier, 2017.

SHAO, Y.; WU, C.; WU, T.; LI, Y.; CHEN, S.; Y. C. HU, Y. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, p. 144–152, 2018.

SHI, J.; MAGUER, M. L.; BRYAN, M.; KAKUDA, Y. Kinetics of lycopene degradation in tamato puree by heat and light irradiation. **Journal of Food Process Engineering**, v. 25, p. 485–498, 2002.

SHU, G. KHALID, N.; CHEN, Z.; NEVES, M. A.; BARROW, C. J.; NAKAJIMA, M. Formulation and characterization of astaxanthin-enriched nanoemulsions stabilized using ginseng saponins as natural emulsifiers. **Food Chemistry**, v. 255, p. 67–74, 2018.

SHUBAR, H. M.; LACHENMAIER, S.; HEIMESAAT, M. M.; LOHMAN, U.; MAULUDIN, R.; MUELLER, R. H.; FITZNER, R.; BORBER, K.; LIESENFELD, O. SDS-coated atovaquone nanosuspensions show improved therapeutic efficacy against experimental acquired and reactivated toxoplasmosis by improving passage of gastrointestinal and blood–brain barriers. **Journal of Drug Targeting**, v. 19, n. 2, p. 114–124, 2011.

SIERRA, C. A. Temperature sensitivity of organic matter decomposition in the Arrhenius equation: some theoretical considerations. **Biogeochemistry**, v. 108, p. 1–15, 2012.

SILVA, H. D.; POEJO, J.; PINHEIRO, A. C.; DONSI, F.; SERRA, A. T.; DUARTE, C. M. M.; FERRARI, G.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Evaluating the behaviour of curcumin nanoemulsions and multilayer nanoemulsions during dynamic in vitro digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 605–613, 2018.

SMISMANS, S.; STOKES, E. Innovation Types and Regulation: The Regulatory Framing of Nanotechnology as “incremental” or “radical” **Innovation. European Journal of Risk Regulation**, v. 8, n. 2, p. 364–386, 2017.

SONU, K. S.; MANN, B.; SHARMA, R.; KUMAR, R.; SINGH, R. Physico-chemical and antimicrobial properties of d-limonene oil nanoemulsion stabilized by whey protein–maltodextrin conjugates. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1–9, 2018.

SOTOMAYOR-GERDING, D.; OOMAH, B.D.; High carotenoid bioaccessibility through linseed oil nanoemulsions with enhanced physical and oxidative stability. **Food Chemistry**, v. 199, p. 463–470, 2016.

SOUKOULIS, C.; TSEVEDOU, M.; YONEKURA, L.; CAMBIER, S.; TAOKIS, P. S.; HOFFMANN, L. Does kappa-carrageenan thermoreversible gelation affect β -carotene oxidative degradation and bioaccessibility in o/w emulsions? **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 259–269, 2017.

SUGUMAR, S. SINGH, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 1, p. 113–120, 2016.

SUN-WATERHOUSE, D.; EDMONDS, L.; WADHWA, S. S.; WIBISONO, R. Producing ice cream using a substantial amount of juice from kiwifruit with green, gold or red flesh. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 647–656, 2013.

SUN, W.; DACEK, S. T.; ONG, S. P.; HAUTIER, G.; JAIN, A.; RICHARDS, W. D.; GAMST, A. C.; PERSSON, K. A.; CEDER, G. The thermodynamic scale of inorganic crystalline metastability. **Science Advances**, v. 2, n. 11, p. 1-8, 2016.

SUN, Y.; XIA, Z.; ZHENG, J.; QIU, P.; ZHANG, L.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Nanoemulsion-based delivery systems for nutraceuticals: Influence of carrier oil type on bioavailability of pterostilbene. **Journal of Functional Foods**, v. 13, p. 61–70, 2015.

TAARJI, N. et al. Formulation and stabilization of oil-in-water nanoemulsions using a saponins-rich extract from argan oil press-cake. **Food Chemistry**, v. 246, n. June 2017, p. 457–463, 2018.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUEMA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAN, C.; XUE, J.; LOU, X.; ABBAS, S.; GUAN, Y.; FENG, B.; ZHANG, X.; XIA, S. Liposomes as delivery systems for carotenoids: Comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1232–1240, 2014.

TAN, T. B.; YUSSOF, N. S.; ABAS, F.; MIRHOSSEINI, H.; NEHDI, I. A.; TAN, C. P. Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: The effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. **Food Chemistry**, v. 194, p. 416–423, 2016.

TANG, G. Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 5, p. 1468S–1473S, 2010.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 2, p. 107–163, 1998.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions: Estimation of solution thermodynamics of the disperse phase. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 106, n. 1–3, p. 261–285, 2003.

TEO, A.; GOH, K. K. T.; WEN, J.; OEY, I.; KO, S.; KWAK, H.; LEE, S. J. Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. **Food Chemistry**, v. 197, p. 297–306, 2016.

TEO, A.; LEE, S. J.; GOH, K. K. T.; WOLBER, F. M. Kinetic stability and cellular uptake of lutein in WPI-stabilised nanoemulsions and emulsions prepared by emulsification and solvent evaporation method. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1269–1276, 2017.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Impact of a carbon source and stress conditions on some properties of xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 167–172, 2018.

TRONCOSO, E.; AGUILERA, J. M.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 355–363, 2012.

TRUONG, T.; BANSAL, N.; SHARMA, R.; PALMER, M.; BHANDARI, B. Effects of emulsion droplet sizes on the crystallization of milk fat. **Food Chemistry**, v. 145, p. 725–735, 2014.

TUBTIMSRI, S.; LIMMATVAPIRAT, C.; LIMSIRICHAIKUL, S.; AKKARAMONGKOLPORN, P.; INOUE, Y.; LIMMATVAPIRAT, S. Fabrication and characterization of spearmint oil loaded nanoemulsions as cytotoxic agents against oral cancer cell. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 000, p. 1–13, 2018.

TUPUNA, D. S.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. DE O. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 846–855, 2018.

URBINA-VILLALBA, G.; RAHN-CHIQUÉ, K. Short-time evolution of alkane-in-water nanoemulsions. **Condensed Matter**, v. 1, p. 1–14, 2013.

VAN DE VOORT, F. R.; ISMAIL, A. A.; DUBOIS, J.; NICODEMO, T. Determination of peroxide value by fourier transform near-infrared spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 9, p. 921–926, fev. 1994.

VARELTZIS, P.; ADAMOPOULOS, K.; STAVRAKAKIS, E.; STEFANAKIS, A.; GOULA, A. M. Approaches to minimise yoghurt syneresis in simulated tzatziki sauce preparation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 2, p. 191–199, 2016.

VELÁSQUEZ-COCK, J.; SERPA, A.; VÉLEZ, L.; GAÑÁN, P.; GÓMEZ HOYOS, C.; CASTRO, C.; DUIZER, L.; GOFF, H. D.; ZULUAGA, R. Influence of cellulose nanofibrils on the structural elements of ice cream. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 204–213, 2019.

VELIKOV, K. P.; PELAN, E. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. **Soft Matter**, v. 4, n. 10, p. 1964, 2008.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; DE AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 3838, n. 44, p. 1184–1192, 2008.

WANG, W. et al. Nutritional biomarkers in Alzheimer's disease: the association between carotenoids, n-3 fatty acids, and dementia severity. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 13, n. 1, p. 31–38, 2008.

WARREN, M. M.; HARTEL, R. W. Effects of emulsifier, overrun and dasher speed on ice cream microstructure and melting properties. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 639–647, 2018.

WELTI-CHANES, J.; OCHOA-VELASCO, C. E.; GUERRERO-BELTRÁN, J. Á. High-pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 457–462, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency**. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/44110>>. Acesso: Janeiro/2019

XU, D.; QI, Y.; WANG, X.; LI, X.; WANG, S.; CAO, Y.; WANG, C.; SUN, B.; DECKER, E.; PANYA, A. The influence of flaxseed gum on the microrheological properties and physicochemical stability of whey protein stabilized β -carotene emulsions. **Food and Function**, v. 8, n. 1, p. 415–423, 2017.

XU, J.; MUKHERJEE, D.; CHANG, S. K. C. Physicochemical properties and storage stability of soybean protein nanoemulsions prepared by ultra-high-pressure homogenization. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1005–1013, 2018.

YANG, Y.; ZHAO, C.; TIAN, G.; LU, C.; LI, C.; BAO, Y.; TANG, Z.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H.; ZHENG, J. Characterization of physical properties and electronic sensory analyses of citrus oil-based nanoemulsions. **Food Research International**, v. 109, p. 149–158, 2018.

YAP, B. H. J.; DUMSDAY, G. J.; SCALES, P. J.; MARTIN, G. J. O. Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenization. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 280–285, 2015.

YI, J.; LAM, T. I.; YOKOYAMA, W.; CHENG, L. W.; ZHONG, F. Cellular Uptake of beta-carotene from protein stabilized solid lipid nanoparticles prepared by homogenization-evaporation method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1096–1104, 2014.

YI, J.; ZHONG, F.; ZHANG, Y.; YOKOYAMA, W.; ZHAO, L. Effects of Lipids on in Vitro Release and Cellular Uptake of β -Carotene in Nanoemulsion-Based Delivery Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 50, p. 10831–10837, 2015.

YI, J.; FAN, Y.; YOKOYAMA, W.; ZHANG, Y.; ZHAO, L. Thermal degradation and isomerization of β -carotene in oil-in-water nanoemulsions supplemented with natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 9, p. 1970–1976, 2016.

YI, J.; NING, J.; ZHU, Z.; CUI, L.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of interfacial composition on co-oxidation of lipids and proteins in oil-in-water emulsions:

Competitive displacement of casein by surfactants. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 20–28, 2019.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20–27, 2001.

YUAN, B.; DANAIO, M. G. C.; LU, M.; WEIER, S. A.; STRATTON, J. E.; WELLER, C. L. High pressure processing (HPP) of aronia berry puree: Pilot scale processing and a shelf-life study. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, p. 241–248, 2018.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 61–68, 2008.

ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 111–120, 2007.

ZARDINI, A. A.; MOHEBBI, M.; FARHOOSH, R.; BOLURIAN, S. Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 287–298, 2018.

ZHAI, X.; LIN, D.; LIU, D.; YANG, X. Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. **Food Research International**, v. 103, p. 12–20, 2018.

ZHANG, S.; ZHANG, M.; FANG, Z.; LIU, Y. Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 316–322, 2017.

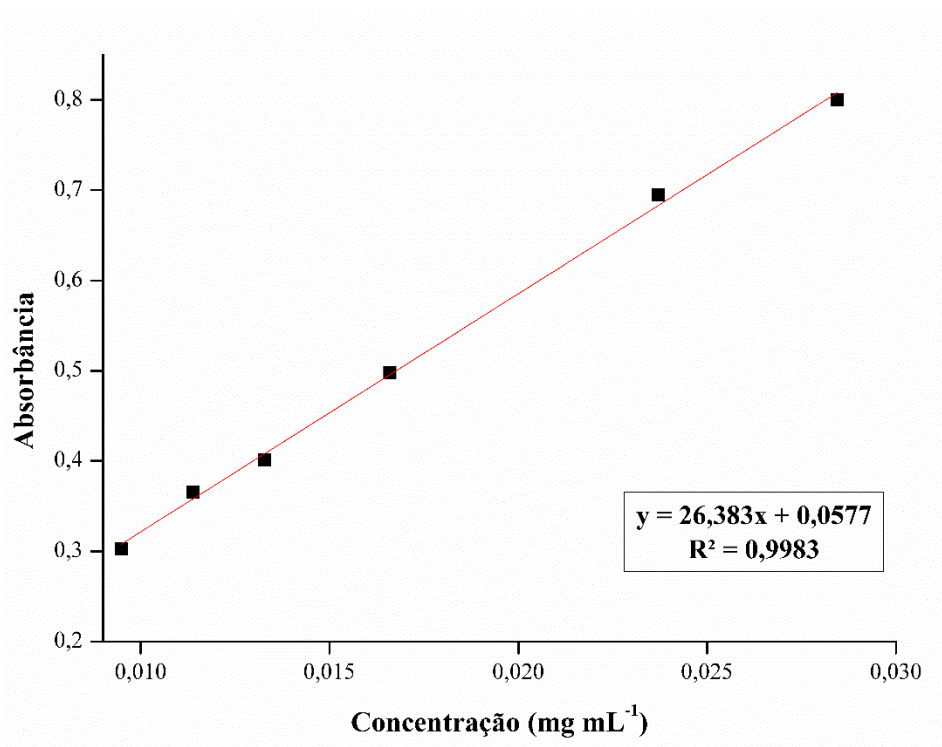
ZHANG, Z.; MCCLEMENTS, D. J. Overview of Nanoemulsion Properties: Stability, Rheology, and Appearance. In: JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. (Eds.). **Nanoemulsions: formulation, applications, and characterization**. Elsevier Inc., 2018. p. 21–49.

ZHONG, J.; YANG, R.; CAO, X.; LIU, X.; QIN, X. Improved physicochemical properties of yogurt fortified with fish oil/ γ -oryzanol by nanoemulsion technology. **Molecules**, v. 23, n. 56, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Curva padrão de β -caroteno em metanol utilizando espectrofotômetro ($\lambda=450$ nm).



APÊNDICE 2

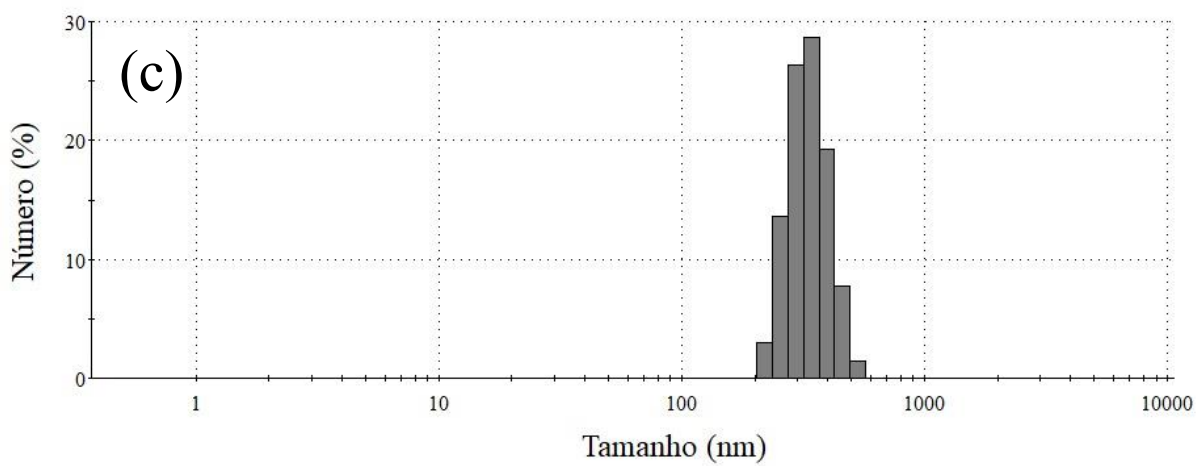
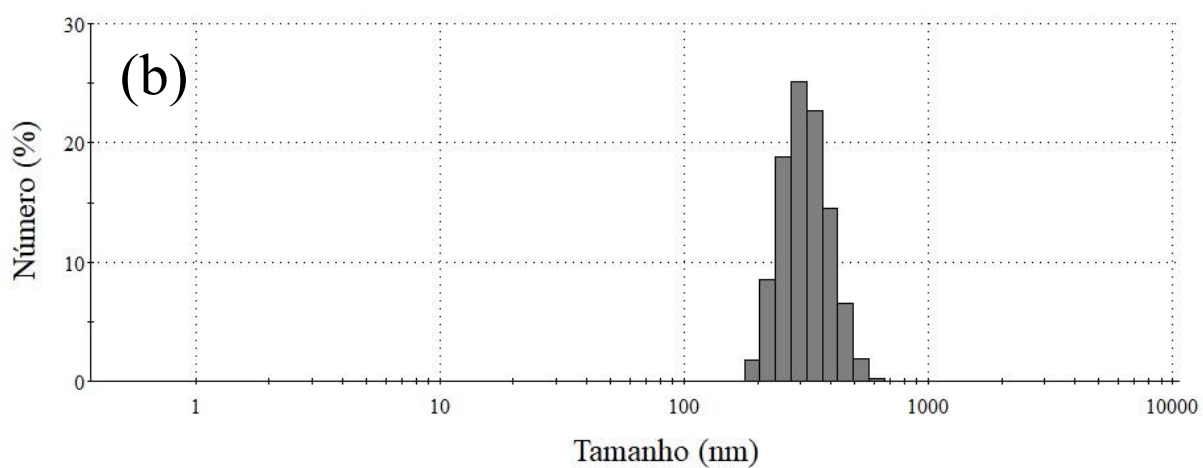
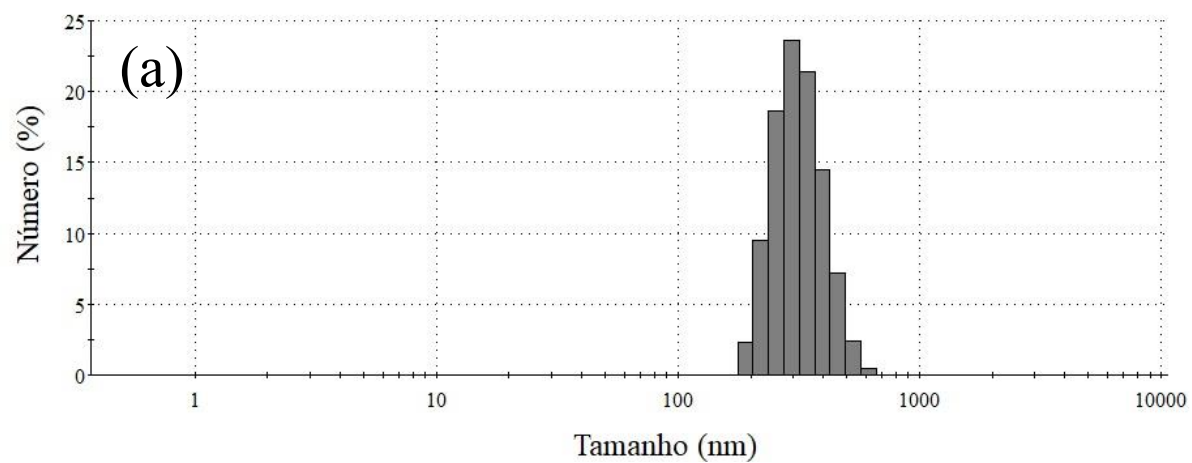
Principais ácidos graxos (%) presentes nos óleos de arroz, canola, gergelim, girassol, linhaça, milho e soja.

Ácidos Graxos	Arroz	Canola	Gergelim	Girassol	Linhaça	Milho	Soja
C16:1	20,5	5,1	10,1	5,5	9,1	11,6	5
C18:1	34,6	30,3	41,7	45,1	-	49,7	30
C18:2	41,3	60,4	42,1	45,2	82,0	36,0	60
C18:3	1,6	2,7	5,2	3,0	7,3	0,8	3
Outros	2,1	1,5	0,9	1,2	1,7	1,9	1,5

Valores médios (n=2).

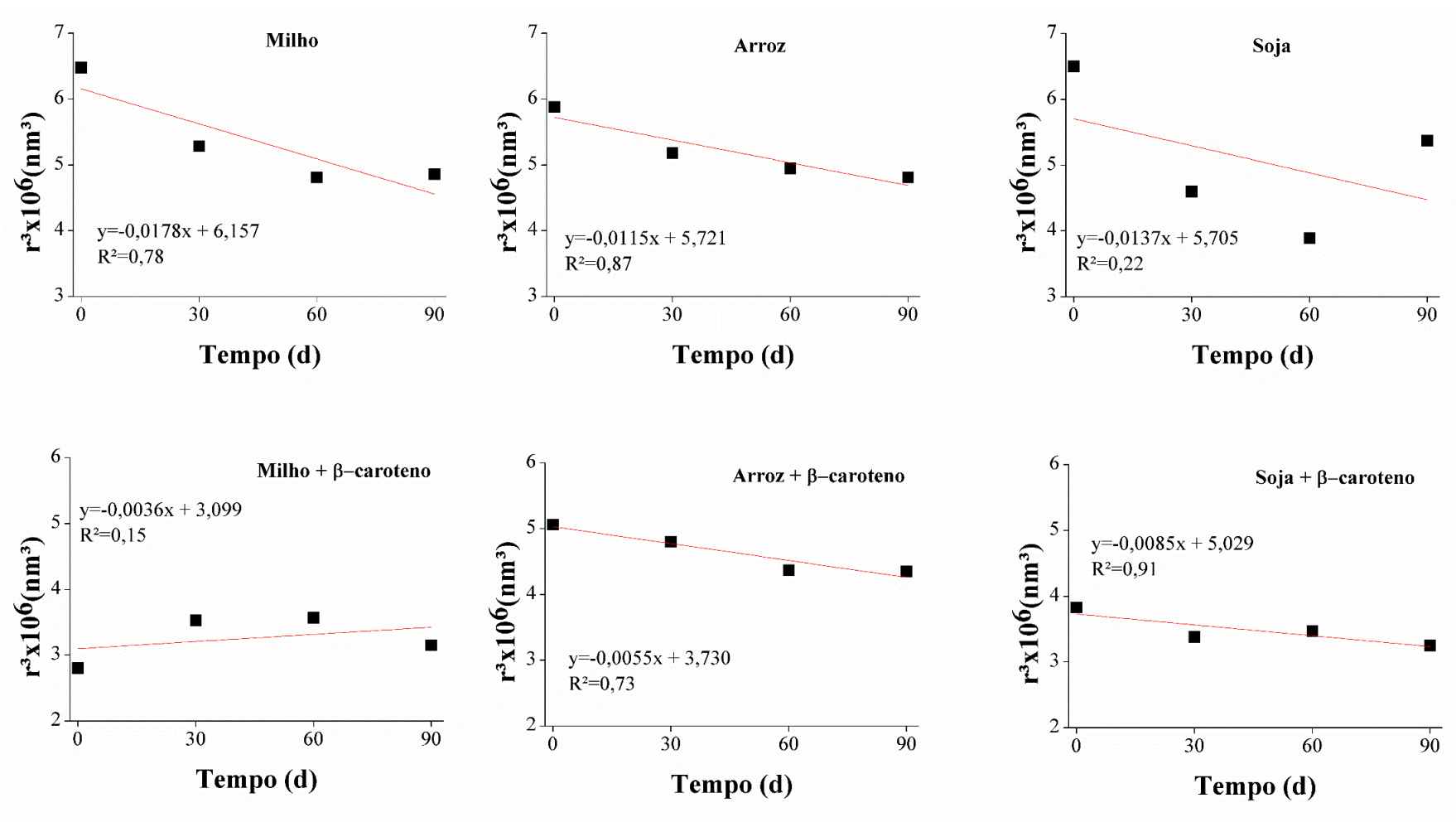
APÊNDICE 3

Exemplo de histogramas de distribuição de tamanho de nanoemulsões com óleo de arroz (a), milho (b) e soja sem β -caroteno em $t=0$



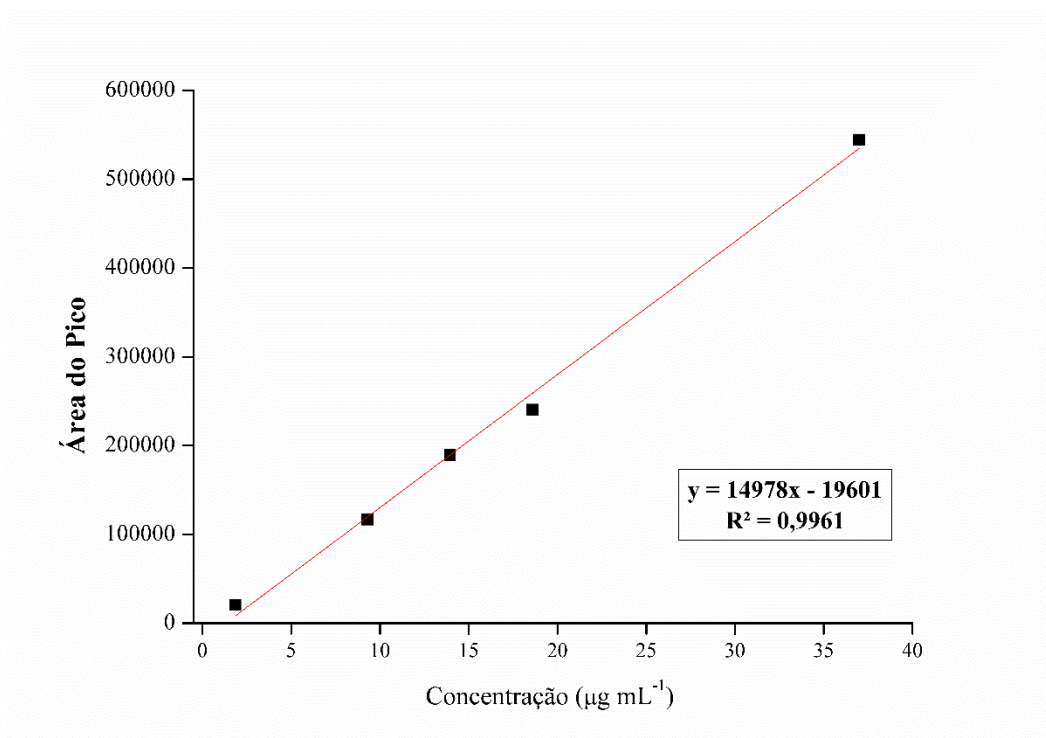
APÊNDICE4

Ajustes lineares de $r^3 \times 10^6 \text{ (nm}^3\text{)}$ X tempo (d)

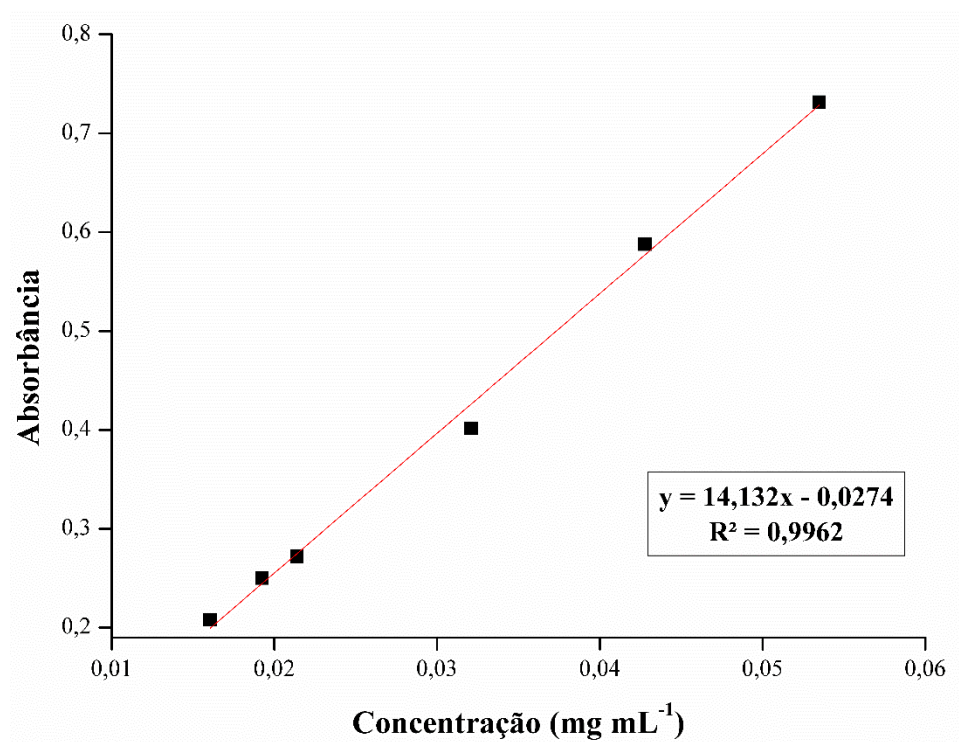


APÊNDICE 5

Curva padrão de β -caroteno em CLAE.

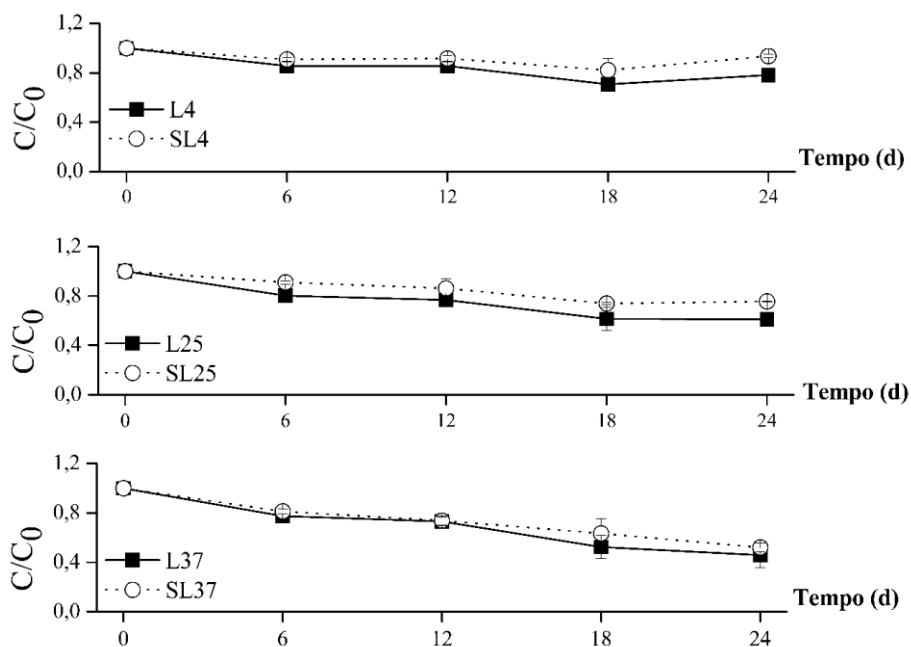
**APÊNDICE 6**

Curva padrão de β -caroteno em metanol:clorofórmio (1:1) utilizando espectrofotômetro ($\lambda=450\text{ nm}$).



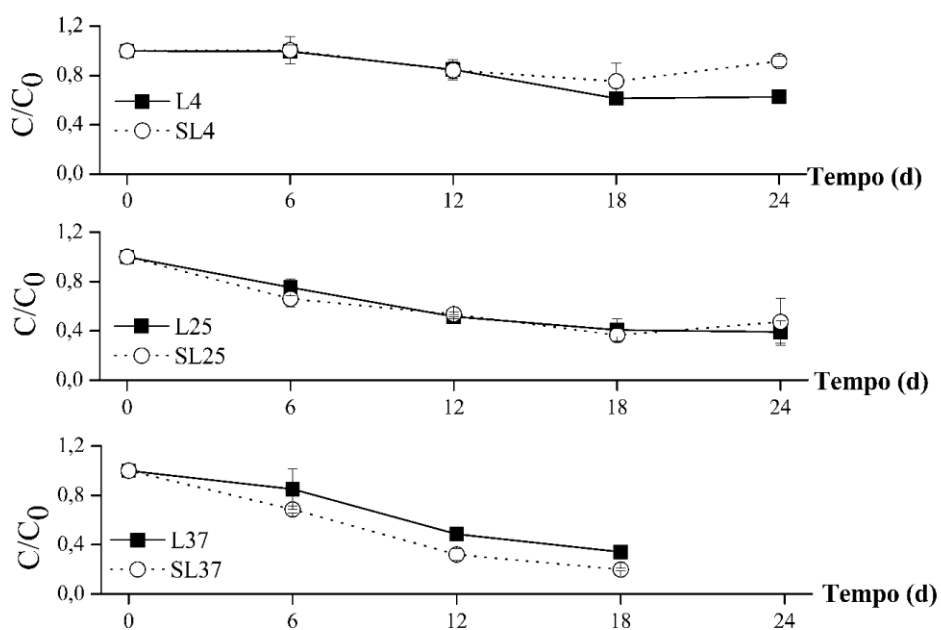
APÊNDICE 7

Relação C/C_0 das nanoemulsões de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ durante 30 d de armazenamento a 4, 25 e 37°C (com e sem luz).



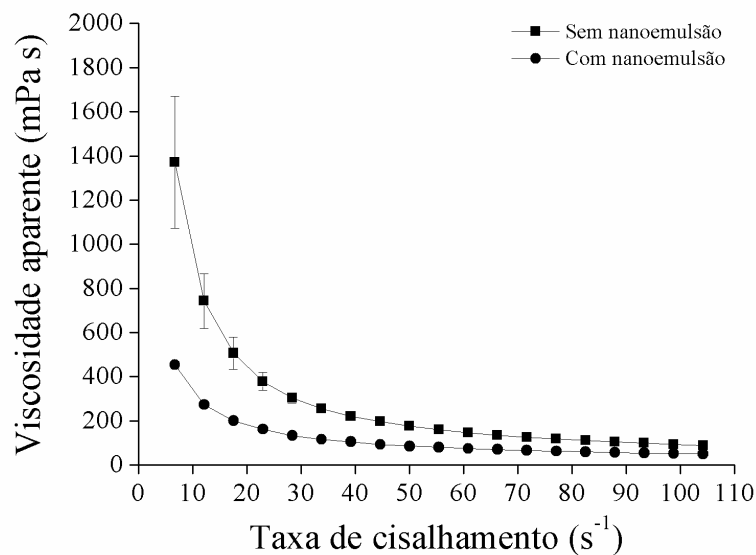
APÊNDICE 8

Relação C/C_0 das nanoemulsões de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ durante 30 d de armazenamento a 4, 25 e 37°C (com e sem luz).



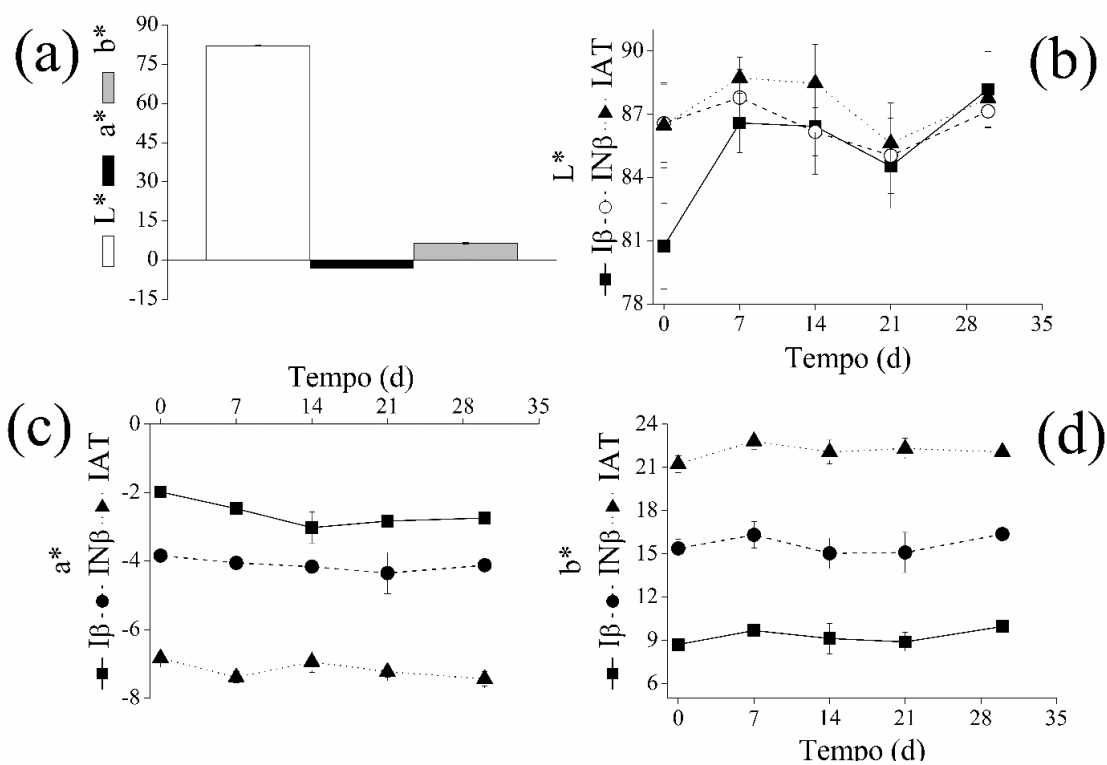
APÊNDICE 9

Curvas de viscosidade aparente (mPa s) em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}) para iogurtes com e sem nanoemulsão.



APÊNDICE 10

Valores de $L^*a^*b^*$ para amostra IB (a) em $t=0$ e valores de L^* (b), a^* (c), b^* (d) durante 30 d das amostras I β IN β e IAT.



APÊNDICE 11

Valores de L^* (a) a^* (b) e b^* (c) GC, $GN\beta$ e $G\beta$

