



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

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS À BASE DE QUITOSANA E
GELATINA PARA O CARREAMENTO DE LICOPENO

CORINA ESTEFANIA BERROCAL ROJAS

LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO
Orientador

RIO GRANDE, RS

2021

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

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS À BASE DE QUITOSANA E
GELATINA PARA O CARREAMENTO DE LICOPENO**

CORINA ESTEFANIA BERROCAL ROJAS

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre
em Engenharia e Ciência de
Alimentos

LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO
Orientador

RIO GRANDE, RS
2021

II. FICHA CATALOGRÁFICA (VERSO DA FOLHA DE ROSTRO)

Ficha Catalográfica

B533d Berrocal Rojas, Corina Estefania.
Desenvolvimento de nanocápsulas à base de quitosana e
gelatina para o carreamento de licopeno / Corina Estefania Berrocal
Rojas. – 2021.
76 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2021.

Orientador: Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto.

1. Antioxidante 2. Bioativo 3. Despolimerização 4. Emulsificação
5. Estabilidade Estérica 6. Nanoemulsão I. Pinto, Luiz Antonio de
Almeida II. Título.

CDU 338.45

Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

III. FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Corina Estefania Berrocal Rojas, com orientação do Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto, aprovada em 18 de agosto de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto – FURG



Prof. Dr. Tito Roberto Sant'Anna Cadaval Jr. – FURG



Profa. Dra. Gabriela Silveira da Rosa – UNIPAMPA

Dedico este trabalho a meus pais Jorge e Norma, a meus irmãos Germain e Antonella, que me impulsionaram a seguir em frente e sempre foram e serão meu porto seguro. Também a meu tio Pedro Berrocal e a meu professor Fernando Quevedo, sempre estarão no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Deus

Fonte da esperança, da força e da energia. Pelo dom da vida, pela saúde, coragem e proteção.
Por todas as bênçãos alcançadas e por Vossa presença em minha vida.

Aos meus pais, Jorge e Norma.

Pelo amor incondicional, os ensinamentos e por ter me criado corajosa. Amo vocês infinitamente. Todas as minhas vitórias são de vocês e para vocês. Muito obrigada por tanto apoio e amor.

A meus irmãos Anto e Geri

Pelo carinho e por sempre confiar em mim, as vezes incluso mais do que eu confio. Sou afortunada em ter vocês do meu lado sempre. Amor incondicional.

A minha família no Perú

Por sempre ter me apoiado em todos meus sonhos. Eternamente agradecida com cada um de vocês.

Ao meu Professor Orientador Luiz Antônio de Almeida Pinto

Muito obrigada por me guiar nesta aventura acadêmica muito louca (com pandemia). Sou muito grata pela sua dedicação e sua incansável vontade de nós ajudar. O senhor é das pessoas que sempre deixarão uma lembrança boa nos nossos corações. Sinto muito orgulho de ser orientada pelo senhor que tem a maior qualidade acadêmica, humana e ética que eu já vi.

A Tia Beth Gonçalves e Luana Gonçalves

Por ter me permitido morar com ela e me tratar como se fosse a sua filha. Muito obrigada por todas as risadas, os jogos de baralhos, as comidas, as taças de vinho e pelo amor.

A Bruna Farias

Por toda a ajuda que sempre me deu. Por esse coração maravilhoso e bondoso que ela tem. Obrigada pela parceria e por sempre me dar uma voz de ânimo quando estava desesperada ou triste.

A meu querido José Stênio

Sem você não teria feito muita coisa. Obrigada por estar do meu lado me animando a seguir pela frente e continuar lutando dia a dia. Obrigada mesmo por estar comigo nos meus momentos mais tristes e complicados. Você é a mão amiga e parceira, um presente de Deus.

A Nelson Botelho

Pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis da minha vida. Meu pai Brasileiro.

A Eliza Acosta e família

Pela amizade, por me receber sempre com muito carinho na sua casa. Pelas longas conversas de madrugada e pelo carinho, desejo que perdure sempre.

Aos irmãos que o Brasil me deu

As pessoas que tive o grande prazer de conhecer aqui. Obrigada pelos gratos momentos, tantas culturas, tantas lembranças, tanto carinho.

Os levarei sempre comigo.

A Luan, Pedro, Gissele, Wesclen

Pela ajuda, amizade e a parceria, principalmente quando estava desesperada no final do meu trabalho. Amo vocês.

A Raif Nasre

Uma das pessoas mais maravilhosas que tenho conhecido. Sou muito grata pela tua amizade.

À família Pereira da Silva

Foi muito lindo ter conhecido vocês e mato grosso do sul. Obrigada pelo carinho, os jogos, os risos, os papos, as comidas e por ter me mostrado sua cultura.

Aos colegas de laboratório

Obrigada pelo aprendizado, a ajuda incondicional e a acolhida. Nunca me senti sozinha.

Ao LTA, LCA, LEB, LASCQ e MIBI e aos seus respectivos técnicos

Pela colaboração na realização de experimentos fundamentais para este estudo.

Aos membros da banca

Pela disponibilidade, o meu sentimento de gratidão e respeito.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação

Pelos conhecimentos passados e pela boa disponibilidade sempre.

A FURG

Pela estrutura física e por propiciar ensino e pesquisa de qualidade.

A CAPES E CNPQ

Pelo auxílio financeiro.

AO BRASIL

Por ter me acolhido como se fosse uma filha mais.

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

Marthin Luther King

RESUMO

Os alimentos funcionais possuem propriedades benéficas à saúde além de seus benefícios nutricionais. Dentre eles, o licopeno age como composto bioativo importante. O licopeno é um carotenoide com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais e anti-inflamatórias relacionado com a prevenção de doenças cardiovasculares e tumores. No entanto, esses compostos são instáveis e degradados facilmente quando expostos à luz, aquecimento/resfriamento, oxigênio e enzimas. Nesse sentido, é importante encontrar novos sistemas carreadores que preservem as propriedades dos compostos bioativos. A nanoencapsulação utilizando quitosana como material de parede é promissora, devido às suas propriedades biodegradáveis, biocompatíveis, atóxicas, antimicrobianas e mucoadesivas. Além disso, a redução da massa molar da quitosana gera a redução da viscosidade e alteração na sua solubilidade, tornando-se interessante para o desenvolvimento de nanocápsulas. A gelatina tipo B é uma proteína, a qual resulta da hidrólise incompleta do colágeno, possui ponto isoelétrico entre pH 4,8 - 5,2 e apresenta caráter aniônico. Esta última característica é interessante para a interação química com um biopolímero policationico, como a quitosana. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de nanoemulsão para nanoencapsular licopeno, utilizando como materiais de parede a quitosana despolimerizada oxidativamente e a gelatina tipo B, e caracterizar as nanocápsulas. As pastas de tomate italiano *in natura* foram utilizadas para a extração de licopeno. A quitosana foi obtida a partir dos resíduos de camarão; após, foi submetida à despolimerização pela via oxidativa. As nanocápsulas foram desenvolvidas com o método de emulsificação. Foram avaliadas diferentes massas molares de quitosana (50, 100, 150 e 200 kDa) e, os outros fatores foram fixados, concentração de quitosana e gelatina (0,55 % m/v), taxa de agitação (10.000 rpm) e concentração de bioativo (2 % v/v). O efeito da massa molar de quitosana foi avaliado nas características das nanocápsulas. As nanocápsulas foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulação, estabilidade físico-química (tamanho da cápsula, potencial Zeta) estabilidade da atividade antioxidante (método ABTS). Os resultados demonstraram que todas as nanoemulsões apresentaram alta eficiência de encapsulação ($\geq 96,73\%$) e permaneceram estáveis por 30 dias sem separação de fases. A quitosana de baixa massa molar (50 kDa) apresentou a melhor estabilidade estérica ao longo de 30 dias (338 a 390 nm). Além disso, todas as nanoemulsões preservaram a atividade antioxidante do licopeno ($\sim 59-76\%$).

Palavras-chave: Antioxidante. Bioativo. Despolimerização. Emulsificação. Estabilidade estérica. Nanoemulsão.

ABSTRACT

CHITOSAN AND GELATIN NANOCAPSULES FOR LOADING LYCOPENE

Functional foods have beneficial health properties, in addition to their nutritional benefits. Among them, lycopene acts as an important bioactive compound. Lycopene is a carotenoid with antioxidant, antimicrobial, antitumor and anti-inflammatory properties related to the prevention of cardiovascular diseases and tumors. However, these compounds are unstable and easily degrade when exposed to light, heating/cooling, oxygen and enzymes. In this sense, it is important to find new carrier systems that preserve the properties of bioactive compounds. Nanoencapsulation using chitosan as a wall material is promising due to its biodegradable, biocompatible, non-toxic, antimicrobial and mucoadhesive properties. Furthermore, the reduction in the molar mass of chitosan generates a reduction in viscosity and changes in its solubility, making it interesting for the development of nanocapsules. Type B gelatin is a protein, which results from incomplete collagen hydrolysis and has an isoelectric point between pH 4.8 - 5.2 and has an anionic character, the latter characteristic is interesting for a chemical interaction with a polycationic biopolymer such as chitosan. For this reason, the aim of this work was to develop a nanoemulsion system to nanoencapsulate lycopene, using oxidatively depolymerized chitosan and type B gelatin as wall materials, and finally to characterize the nanocapsules. Fresh Italian tomato pastes were used for lycopene extraction. Chitosan was obtained from shrimp waste; after, it was subjected to depolymerization via the oxidative pathway. Nanocapsules were developed using the emulsification method. Different chitosan molecular weights were evaluated (50, 100, 150 and 200 kDa), the other factors were fixed, concentration of chitosan and gelatin (0.55% w/v), agitation rate (10,000 rpm) and concentration of bioactive (2 % v/v). The effect of chitosan molecular weight was evaluated on the nanocapsules characteristics. The nanocapsules were evaluated for encapsulation efficiency, physicochemical stability (particle size, Zeta potential) and the stability of the nanocapsules antioxidant activity (ABTS method). The results pointed out that all nanoemulsions showed high encapsulation efficiency ($\geq 96.73\%$) and remained stable for 30 days without phase separation. The low molecular weight chitosan (50 kDa) showed the best steric stability over 30 days (338 to 390 nm). Furthermore, all nanoemulsions preserved the antioxidant activity of lycopene ($\sim 59\text{-}76\%$).

Keywords: Antioxidant. Bioactive. Depolymerization. Emulsification. Nanoemulsion. Steric stability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da viscosidade específica e viscosidade reduzida das amostras de quitosana 52

Tabela 2 - Parâmetros de viscosidade intrínseca e a massa molar média viscosimétrica das amostras de quitosana..... 53

Tabela 3 – Eficiência de encapsulação (%EE) das nanocápsulas para as diferentes massas molares pela via oxidativa..... 54

Tabela 4 – Atividade antioxidante do licopeno e das nanocápsulas com diferentes massas molares 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da produção de tomate, valor (mil reais).....	26
Figura 2 - Estrutura química do licopeno	27
Figura 3 – Representação gráfica da produção de camarão no brasil no ano 2020	27
Figura 4 – Representação estrutural do processo de desacetilação da quitina.....	28
Figura 5 – Estrutura química da gelatina bovina tipo B.	30
Figura 6 – Resumo gráfico dos sistemas de nanoemulsões para nanoencapsular licopeno.....	39
Figura 7 – Extração de licopeno a partir do tomate italiano. (a) Tomate italiano. (b) Pupa de tomate. (c) Separação do licopeno sendo a fase superior a mistura de licopeno e hexano. (d) Solução de licopeno	40
Figura 8 - Fluxograma do processo de obtenção da quitina a partir dos resíduos do camarão.	41
Figura 9 – Fluxograma do processo de obtenção da quitosana a partir da quitina seca	42
Figura 10 – Método de emulsificação: (a) agitação a 2000 rpm; (b) agitação a 10000 rpm; (c) obtenção das nanocápsulas	46
Figura 11 – Quitosanas de 50 kDa obtidas por despolimerização química: (a) por via ácida e (b) via oxidativa.	49
Figura 12 – Quitosanas de 125 kDa obtidas por despolimerização química: (a) por via ácida e (b) via oxidativa.	51
Figura 13 - Tamanho das nanocápsulas produzidas com quitosanas de massas molares diferente obtidas por via oxidativa.....	55
Figura 14 - Potencial zeta de nanocápsulas produzidas com quitosana de diferentes massas molares obtidas por via oxidativa..	55
Figura 15 – (a) Quitosanas despolimerizadas (0,55 %) com diferentes massas molares em solução de ácido acético 1 %. (b) Solução de gelatina ao 0.55 %	56
Figura 16 – (a) Sistemas de nanoemulsões depois de 1 dia; (b) Sistemas de nanoemulsões depois de 16 dias.....	57
Figura 17 - Estabilidade antioxidante de nanocápsulas produzidas com quitosanas de diferentes massas molares.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1	COMPOSTOS BIOATIVOS.....	25
3.1.1	LICOPENO.....	26
3.2	RESÍDUOS DE CAMARÃO.....	27
3.3	QUITOSANA.....	28
3.4	GELATINA.....	29
3.5	NANOTECNOLOGIA.....	31
3.6	NANOTECNOLOGIA EM ALIMENTOS.....	31
3.7	TÉCNICAS DE NANOENCAPSULAÇÃO.....	34
3.8	NANOELMULSÕES – PROPRIEDADES.....	35
3.9	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES.....	36
3.9.1	EFICIÊNCIA DE NANOENCAPSULAÇÃO.....	36
3.9.2	TAMANHO DAS CÁPSULAS.....	36
3.9.3	POTENCIAL ZETA.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	MATERIAL.....	39
4.1.1	MATÉRIAS PRIMAS.....	39
4.2	MÉTODOS.....	40
4.2.1	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO LICOPENO.....	40
4.2.2	OBTENÇÃO DA QUITOSANA.....	41
4.2.3	REDUÇÃO DA MASSA MOLAR DA QUITOSANA.....	43
4.2.4	CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	44
4.2.5	DESENVOLVIMENTO DAS NANOCÁPSULAS.....	45
4.2.6	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%EE).....	46
4.2.7	ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA.....	47
4.2.8	ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%AA).....	47
4.2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	CONCENTRAÇÃO DE LICOPENO EM TOMATES ITALIANOS.....	49
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	49

5.2.1 DESPOLIMERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	49
5.2.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DA QUITOSANA.....	52
5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%EE).....	53
5.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA.....	54
5.5 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%AA).....	58
 6 CONCLUSÃO.....	 63
 7 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO.....	 65
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 67

1 INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos oriundos de recursos naturais possuem propriedades fisiológicas benéficas para a saúde humana (BIESALSKI et al., 2009; FERNANDES; COELHO; SALAS-MELLADO, 2019; YEUNG; MOCAN; ATANASOV, 2018). Nesse sentido, há grande interesse no incremento da produção de alimentos funcionais, os quais sejam incorporados com esses compostos biologicamente ativos.

O licopeno é um carotenoide encontrado principalmente em tomates (*Solanum lycopersicum*). Este composto bioativo é um hidrocarboneto alifático de cadeia aberta com 13 ligações duplas, das quais 11 ligações duplas de carbono são conjugadas (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2013). O licopeno atua como um poderoso antioxidante relacionado à redução do risco de doenças degenerativas, como doenças cardiovasculares, além de possuir propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais e anti-inflamatórias (CHERNYSHOVA et al., 2019; NEDAMANI; NEDAMANI; SALIMI, 2019).

No entanto, os compostos bioativos são desafiadores para a indústria de alimentos, pois se degradam com facilidade, já que apresentam baixa estabilidade, sendo a solubilidade e atividade afetadas pelas condições adversas no trato gastrointestinal, as quais limitam a aplicação na indústria e dificultam a extração, determinação e padronização. Sendo assim, torna-se possível obter um melhor aproveitamento das propriedades dos compostos bioativos a partir de novos sistemas, como carreadores que protejam os mesmos (BAO et al., 2019; NOWAK et al., 2019).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico hidrofílico linear, com uma estrutura molecular que permite gerar modificações químicas e mecânicas. Entre muitas características, pode-se destacar suas propriedades de biodegradabilidade, biofuncionalidade, biocompatibilidade, antimicrobiana e atoxicidade, além de possuir características mucoadesivas, aumentando sua capacidade de adsorver e proteger compostos bioativos pela passagem ao longo do trato gastrointestinal. Essas propriedades tornam a quitosana um composto ótimo para a produção de nanocápsulas (BATISTA et al., 2019; FARIAS et al., 2019; SULLIVAN et al., 2018; YUNESSNIA et al., 2018). A redução da massa molar da quitosana gera a redução da viscosidade e alteração na sua solubilidade, tornando-se interessante para o desenvolvimento de nanocápsulas.

O encapsulamento impede e retarda os processos de degradação dos compostos bioativos, consequentemente, melhorando os efeitos terapêuticos desses compostos (YUNESSNIA et al., 2018). Além disso, tem sido demonstrado que a aplicação de biopolímeros

na nanotecnologia pode inibir a degradação dos compostos bioativos (RAJABI et al., 2019; RIVERA et al., 2015). Nesse sentido o encapsulamento é atrativo para aplicações nas áreas de alimentos e farmácia, como, por exemplos, sua aplicação na conservação de alimentos (WANG et al., 2017), carreador em alimentos (HA et al., 2013) e suplemento alimentar (CHIU et al., 2017). Sendo assim, no presente trabalho são desenvolvidos sistemas de nanoemulsões para nanoencapsular licopeno, utilizando como materiais de parede a quitosana despolimerizada e a gelatina tipo B, caracterizando as nanocápsulas formadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver sistemas de nanoemulsões para nanoencapsular o licopeno, proveniente de tomate italiano, utilizando quitosana despolimerizada e gelatina tipo B, como materiais de parede, e caracterizar as nanocápsulas formadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter quitosana de resíduos de camarão com diferentes massas molares mediante as despolimerizações por vias ácida e oxidativa, e caracterizar as amostras quanto à massa molar média viscosimétrica.
- Extrair e quantificar o licopeno das amostras de tomate italiano.
- Desenvolver nanocápsulas de licopeno à base de quitosana e gelatina tipo B, utilizando o método de emulsificação e, avaliar os efeitos da massa molar nas nanocápsulas desenvolvidas.
- Caracterizar as nanocápsulas quanto a tamanho de cápsulas, potencial Zeta, estabilidade físico-química, eficiência de encapsulação, além de avaliar a atividade antioxidante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os consumidores têm demandado por produtos que contribuam diretamente para sua saúde. Portanto, o desenvolvimento de alimentos funcionais tornou-se atrativo, pois possuem propriedades favoráveis para sua aplicação na indústria de alimentos (ÖZMATARA, 2021).

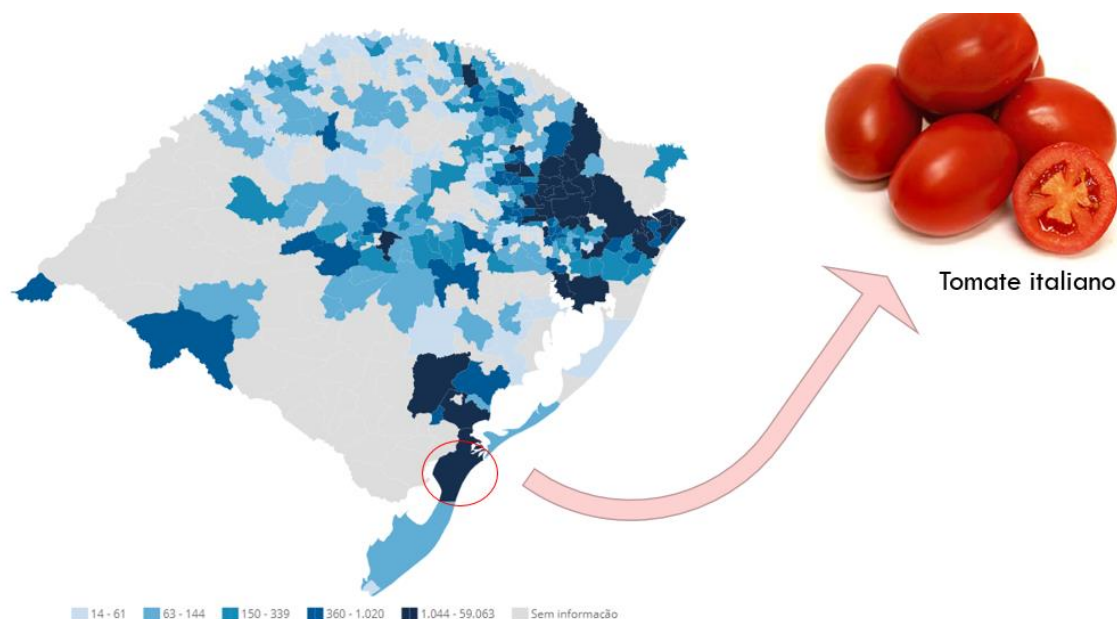
O conceito de alimento funcional foi inicialmente utilizado pelos cientistas japoneses como alimentos fortificados com constituintes especiais que apresentam efeitos fisiológicos vantajosos (SIRÓ et al., 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os alimentos funcionais como todos os alimentos ou ingredientes que além de funções nutricionais básicas, produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos, a fim de fornecer efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguros para consumo sem supervisão médica (ANVISA, 1999).

Os compostos bioativos são substâncias ativas presentes em plantas, micro-organismos e em certos alimentos (como frutas, vegetais, nozes, óleos e grãos integrais), que têm efeito benéfico na saúde humana. Os ingredientes bioativos, também conhecidos como ingredientes funcionais, são extraídos de fontes naturais de alimentos. Esses compostos mantêm suas propriedades mesmo após a extração (BIESALSKI et al., 2009). Os bioativos podem apresentar atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante; sendo que os antioxidantes constituem um dos grupos mais estudados devido à sua influência em prevenir doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (FERNANDES; COELHO; SALAS-MELLADO, 2019).

No entanto, a aplicação de compostos bioativos tem sido desafiadora para a indústria de alimentos, pois esses se degradam com facilidade, já que apresentam baixa estabilidade. Ademais, a solubilidade e a atividade biológica são afetadas pelas condições adversas no trato gastrointestinal, as quais limitam a aplicação na indústria e dificultam a extração, determinação e padronização. Sendo assim, torna-se possível obter um melhor aproveitamento das propriedades dos compostos bioativos a partir do desenvolvimento de novos sistemas, como carreadores que protejam os mesmos (YOUSEFI et al., 2021).

Segundo a Produção Agrícola Municipal (PAM) no ano 2019, a cidade do Rio Grande, teve uma produção de tomate entre 1044 – 59,063 (mil reais), conforme é mostrado na Figura 1. São duas espécies as que destacam nessa produção, sendo o tomate italiano o escolhido nesta pesquisa.

Figura 1 – Mapa da produção de tomate, valor (mil reais).



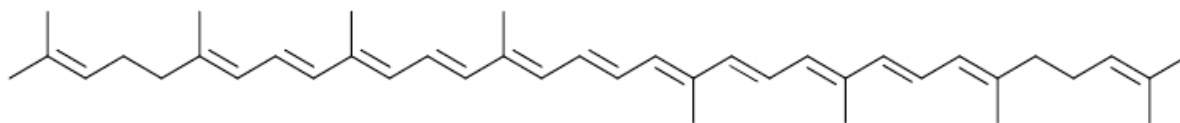
Fonte: PAM (Produção Agrícola Municipal) 2019.

3.1.1 Licopeno

Dentre os alimentos, o licopeno (Figura 2) é um composto bioativo da classe dos carotenoides encontrado em muitas frutas e hortaliças. O tomate (*Solanum lycopersicum*) apresenta a maior concentração deste composto bioativo, entre 30–140 mg/kg, sendo responsável pela sua cor vermelha (JIANG et al., 2008).

Este composto bioativo é um hidrocarboneto de polieno linear, composto por 40 átomos de carbono, possuindo uma cadeia aberta com 13 ligações duplas, das quais 11 ligações duplas são conjugadas (GHEONEA et al., 2021). Esta última característica lhe confere a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio. Este composto bioativo tem efeitos benéficos à saúde humana devido à sua atividade antioxidante, possuindo o maior potencial antioxidante entre todos os carotenoides. O licopeno é usado no tratamento de doenças como câncer, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (CHERNYSHOVA et al., 2019; GRABOWSKA et al., 2019; NEDAMANI; NEDAMANI; SALIMI, 2019; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2013).

Figura 2 - Estrutura química do licopeno.



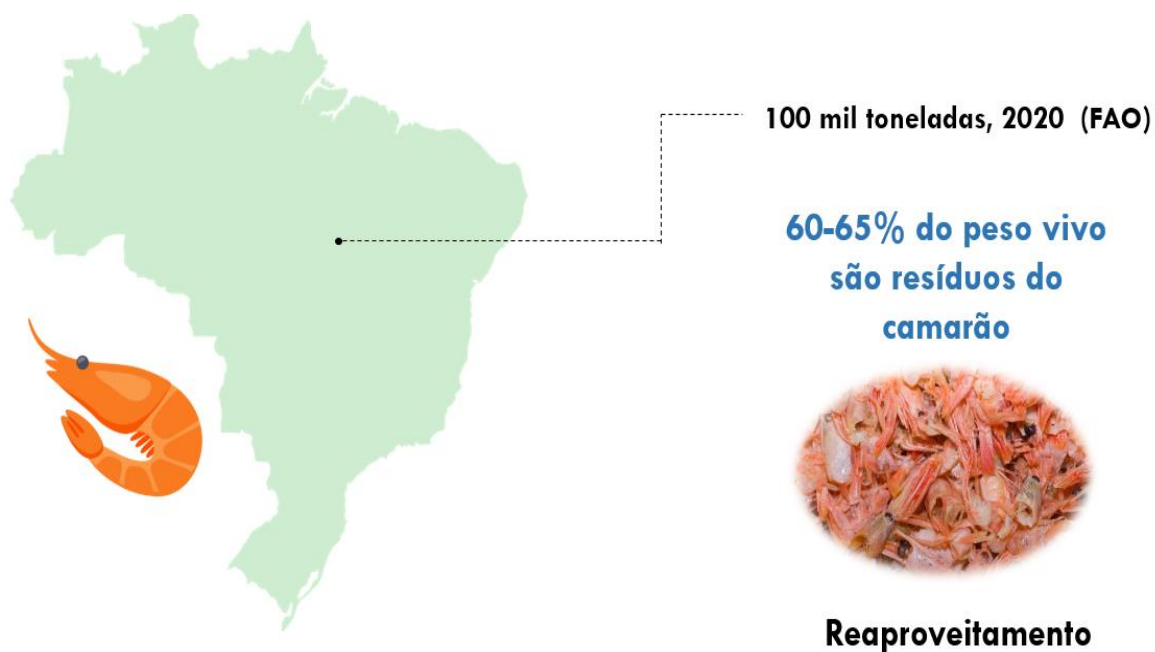
Fonte: Adaptado de Grabowska et al. (2019).

O licopeno é um antioxidante que sofre degradação oxidativa com muita facilidade devido ao seu alto grau de insaturação, o que gera muita instabilidade (SOUZA et al., 2018). Ademais, é insolúvel em água e sensível ao oxigênio, luz e calor, o que limita seu uso na indústria alimentícia (RIBEIRO; AX; SCHUBERT, 2010).

3.2 RESÍDUOS DE CAMARÃO

Segundo fontes da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção de camarão gerado no ano 2020, foi aproximadamente 100 mil toneladas, das quais entre 60 – 65% são resíduos do camarão (Figura 3). Esses resíduos são usados para a produção de quitina e finalmente obter quitosana.

Figura 3 – Representação gráfica da produção de camarão no brasil no ano 2020.

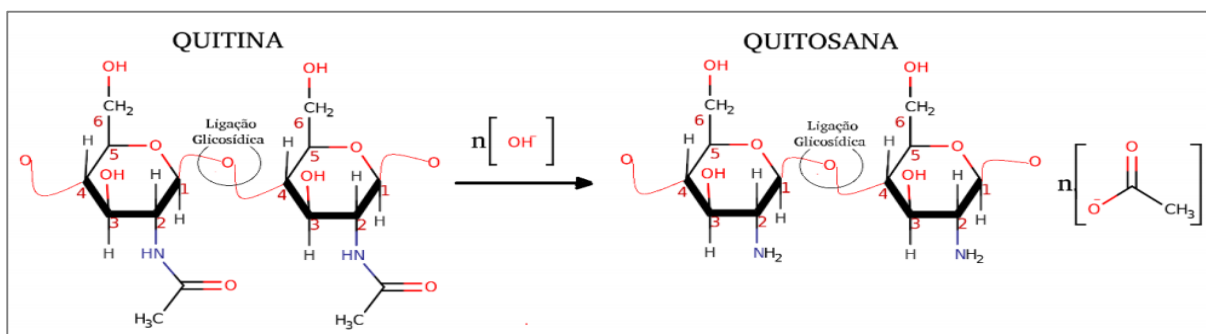


Fonte: FAO (2020)

3.3 QUITOSANA

A quitina é um polímero biodegradável e é o segundo polímero mais abundante na natureza. As principais fontes são os exoesqueletos de crustáceos e da parede celular de fungos. A quitosana é um polímero policatiônico composto de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glicopirranose e resíduos de 2-amino-2-desoxi- β -D-glicopirranose, e é produzida industrialmente partindo da desacetilação da quitina, possuindo propriedades físico-químicas interessantes para a área da pesquisa e para da indústria (Figura 4). Sua estrutura molecular permite gerar modificações químicas e mecânicas. Entre muitas propriedades, pode-se destacar seu caráter biodegradável, funcional, adesivo, solubilidade, policatiônico, atoxicidade, além de possuir características antimicrobianas, consequentemente estendendo seu uso a diversas áreas, como a alimentícia (DOTTO; CAMPANA - FILHO; PINTO, 2017; HOSSAIN; IQBAL, 2014; SULLIVAN et al., 2018).

Figura 4 – Representação estrutural do processo de desacetilação da quitina.



Fonte: Silveira (2018).

Uma das propriedades mais importantes da quitosana é seu caráter policatiônico ($pK_a \sim 6,3$). Sendo assim, a quitosana é protonada em soluções de pH ácido, onde os grupos aminas (NH_2) presentes na cadeia do polímero transformam-se em $(-NH_3)^+$. A quitosana possui propriedades mucoadesivas, devido às forças moleculares de atração, baseadas em interação eletrostática entre os seus grupos aminas carregados positivamente e as superfícies da mucosa carregadas negativamente (DHAWAN SANJU; SINGLA ANIL; SINHA VIVEK, 2004; HARISH PRASHANTH; THARANATHAN, 2007). A propriedade mucoadesiva da quitosana apresenta uma influência positiva na adsorção dos compostos bioativos ao longo do trato gastrointestinal. Portanto, a quitosana torna-se atrativa para o desenvolvimento de sistemas

carreadores alimentícios e farmacêuticos (DARBASIZADEH et al., 2018; ESQUERDO et al., 2018; RINAUDO, 2006).

A massa molar (MM) é uma propriedade importante para a caracterização dos polímeros, e está relacionada com a quantidade de unidades monoméricas presentes em cada polímero. A MM pode influenciar parâmetros como solubilidade e viscosidade. Ao aumentar a massa molar, incrementa a viscosidade da quitosana (KOFUJI et al., 2005; LIZARDI-MENDOZA; ARGÜELLES MONAL; GOYCOOLEA VALENCIA, 2016).

O grau de desacetilação (GD) tem relação direta com o nível de porção monomérica 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose. O incremento do GD influencia na presença de maior quantidade de grupos amino na cadeia do polímero, em consequência as propriedades de solubilidade e o carácter policatiônico são potencializados (KUMAR, 2000). Muitos fatores durante a produção podem influenciar a massa molar da quitosana, como alta temperatura, concentração de álcalis, tempo de reação, tratamento prévio da quitina, tamanho de cápsula e concentração de quitina (HOSSAIN; IQBAL, 2014). Além disso, é possível modificar a MM da quitosana a partir de massas molares maiores. Vários métodos de despolimerização da quitosana foram descritos, os quais são classificados como físicos, químicos e enzimáticos (ALVES et al., 2018; DOTTO; CAMPANA-FILHO; PINTO, 2017).

Os métodos físicos incluem técnicas térmicas, mecânicas e termomecânicas (ALVES et al., 2018). Os métodos enzimáticos são realizados com enzimas específicas, como quitinase e quitosanase, ou com enzimas não específicas, como papaína, pepsina, pronase, proteinase, bromelina, amilase, celulase, hemicelulase, lipase (KAPADNIS et al., 2019). Os métodos químicos são mais usados por serem econômicos, simples e podem ser usados em grande escala. A despolimerização por métodos químicos é dividida em duas rotas, usando a via ácida (HCl, CH₃COOH, H₃PO₄, HNO₃), na qual o HCl é mais utilizado (FARIAS et al., 2019; KASAAI; ARUL; CHARLET, 2013); e a via oxidativa (H₂O₂, NaNO₂, O₃), sendo o H₂O₂ o mais utilizado (FARIAS et al., 2019; MAO et al., 2004).

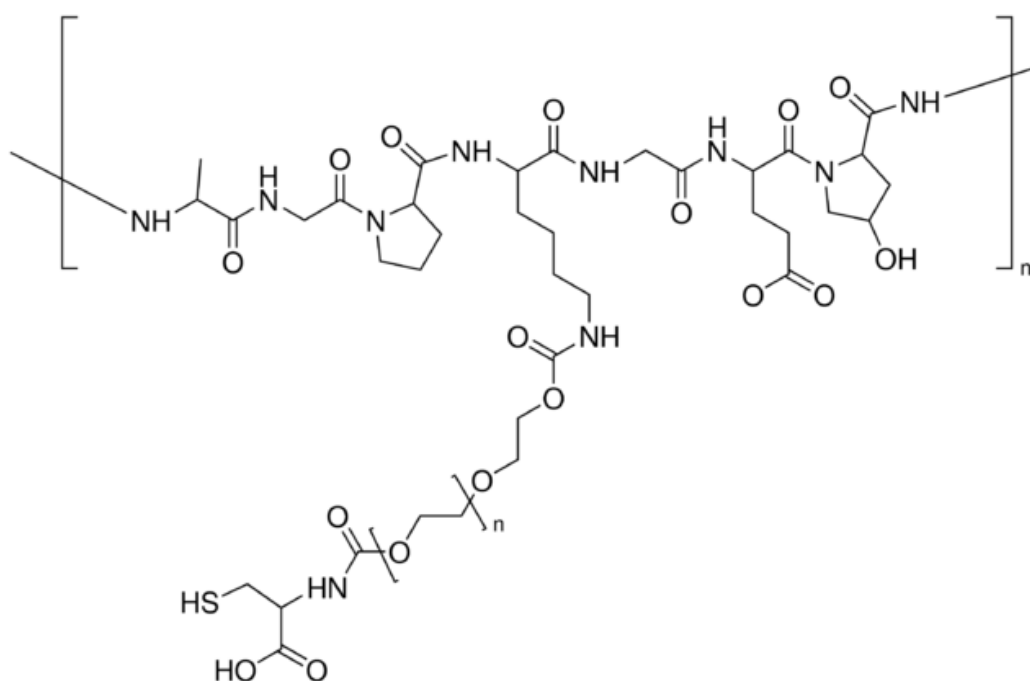
3.4 GELATINA

A gelatina é uma proteína obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno, que geralmente é extraído de fontes animais, como ossos e pele de bovinos e suínos (SILVA et al., 2011), sendo um tipo de proteína abundante em tecidos conjuntivos. A gelatina é uma proteína composta por todos os aminoácidos essenciais, com exceção do triptofano (BERTAN, 2003). Seu preço varia de acordo com sua qualidade, que é determinada principalmente pela sua força

em gel, viscosidade, transparência, sabor e dissolução (SILVA et al., 2011; TAVAKOLIPOUR, 2011). Seu valor comercial também é influenciado pelo ponto isoelétrico, pois esses interferem no ponto de fusão, solubilidade, constantes dielétricas das cargas iônicas (ANDREUCCETTI, 2010). O valor do seu ponto isoelétrico varia de acordo com a forma de obtenção da gelatina, que por sua vez também indicará qual tipo de gelatina será obtida.

A gelatina é categorizada em tipo A e tipo B, sendo que a principal diferença entre elas é o meio ao qual são obtidas, sendo a “tipo A” por tratamentos ácidos (com pH de 4,6 até 5,2) e a “tipo B” por tratamentos básicos (com pH de 7,0 até 9,0). Para obter-se a gelatina são necessárias diversas etapas, porém elas podem ser sintetizadas em 3 passos básicos, que são: tratamento da matéria prima, extração e purificação (SILVA et al., 2011). A Figura 5 apresenta a estrutura química da gelatina bovina comercial do tipo B.

Figura 5 – Estrutura química da gelatina bovina tipo B.



Fuente: Sigma-Aldich ®

Entre as propriedades mais importantes da gelatina está a sua capacidade gelificante e as propriedades de cargas. Essa segunda propriedade confere as mesmas porções hidrofílicas e hidrofóbicas, as quais são requisitos muito importantes para a obtenção de encapsulados. Essas características conferem a gelatina funções, como estabilizante, emulsificante, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Logo, a gelatina é um potencial ingrediente na formação de novos biomateriais (GOOMEZ-GUILLEN et al., 2011).

3.5 NANOTECNOLOGIA

As nanoestruturas foram definidas pela primeira vez por Richard Feynman em 1959 para conceituar a prática da manipulação de cápsulas que são submicrométricas (EZHILARASI et al., 2013). O prefixo nano (*nanos*) significa anão que veio do grego e metricamente significa a bilionésima parte de um metro ou nanômetro (nm). Na escala nano existem as organelas de células, algumas algas, bactérias e proteínas (SCOTT, 2007). A nanotecnologia foi a tecnologia que permitiu ao homem manipular certas estruturas, como por exemplo o licopeno, gelatina e a quitosana, em dimensões nanométricas (1 até 100 nm), isso infere que tais estruturas são manipuladas ao nível molecular (SCOTT, 2007).

A nanotecnologia é uma tecnologia interdisciplinar, ou seja, aborda o desenvolvimento, pesquisa e atividade industrial de áreas entre a física, química, biologia, engenharia e entre várias outras (CHAUDHRY et al., 2008). O mercado para nanoencapsulados geraram US \$ 178 bilhões em 2015, enquanto a estimativa para 2020 era de US \$ 231 bilhões, em termos de produtos vendidos, com uma taxa de crescimento anual de 4,9%. No entanto, essa estimativa foi subestimada, já que o mercado gerado em 2020 foi de cerca de US \$ 231 bilhões de grande porte, com uma estimativa de US \$ 310 bilhões até 2025 (TRUCILLO, P., 2021).

3.6 NANOTECNOLOGIA EM ALIMENTOS

A nanotecnologia é considerada uma tecnologia que trouxe benefícios para a indústria de alimentos, além de que pode influenciar positivamente a produção deles (SCOOT; CHEN, 2002). Devido à alta relação entre a área superficial e o volume, esta tecnologia faz com que os materiais na escala nanométrica possuam propriedades únicas, influenciando diretamente na solubilidade, resistência e difusividade destes materiais. Os nanocarreadores estão sendo usados como sistemas carreadores para transportar aditivos alimentares em produtos alimentares sem alterar sua morfologia (ASSADPOUR; MAHDI JAFARI, 2018; HAMAD et al., 2018; SINGH et al., 2017).

Na escala monométrica os compostos químicos sofrem distorções devido sua grande capacidade reativa causada pela grande superfície de contato (ETC Group, 2005). Atualmente, as nanocápsulas são usadas em diversos produtos comerciais, como os alimentos, fármacos e catalisadores químicos (WANYI; LU; ZEHAN; XINAN, 2019). Na utilização da nanotecnologia nos alimentos, também pode-se citar os nanocompósitos, nanofibras, filmes biodegradáveis e diversos outros, os quais podem controlar o tempo de vida útil de alimentos

funcionais (MATTOSO, 2005). Além disso, grande parte das matérias-primas utilizadas na indústria de alimentos, que são submetidos as técnicas de nanotecnologia, podem ser encontradas em resíduos agroindustriais, assim como o licopeno extraído do bagaço de tomate e a quitosana extraída dos resíduos de camarão (GUO, 2019).

Para as indústrias de alimentos e farmacêuticas, esta técnica consiste em proteger compostos de interesse encapsulando-os em escalas nanométricas com uma parede protegendo-os do ambiente externo (BAKOWSKABARCZAK; KOLODZIEJCZYK, 2011). Nesse sentido, pode-se encapsular líquidos em superfícies sólidas tornando o composto resultante em um pó. Essa tecnologia ganhou destaque e está crescendo rapidamente nos anos recentes. A indústria procura com essa tecnologia aumentar o valor nutricional, alterar algumas propriedades dos alimentos assim como aumentar seu tempo de vida útil. Sendo que muitos testes são feitos para diminuir a quantidade de sais, gorduras e conservantes químicos, alterar sabores, estabilidade, textura, aceitação e segurança do consumidor (SEKHON, 2010).

A nanotecnologia tem ganhado bastante destaque em países desenvolvidos por causa de suas propostas ambientais diante ao reaproveitamento de resíduos, assim como sua grande competição tecnológica e versatilidade de aplicações industriais (MDIC, 2011). A nanotecnologia em alimentos acarreta em oportunidades para inovações industriais com grande velocidade. Essas inovações refletem na estrutura, textura, sabor, cor, processabilidade e estabilização, solubilidade, biodisponibilidade dos alimentos (EZHILARASI et al., 2013). Os efeitos benéficos e suas possíveis aplicações são bem descritas, entretanto, poucas pesquisas são realizadas para investigar seus potenciais toxicológicos (GARCIA et al., 2010). Dentre os compostos químicos mais utilizados na indústria de alimentos, pode-se citar o dióxido de titânio, utilizado como nanocápsula com potencial antimicrobiano e proteção UV (WANG et al., 2007), a prata e o zinco como agentes antimicrobianos (BRUNNER et al., 2006; HUSSAIN et al., 2005;) e o dióxido de silicone utilizado em embalagens de alimentos (CHEN; VON MICKECZ, 2005).

Existem diversas técnicas e processos utilizados para preservar os compostos bioativos. Uma delas é a nanoencapsulação, uma técnica promissora que gerou grande interesse no campo científico devido à sua aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. A nanoencapsulação é um processo no qual o composto bioativo é coberto com material transportador, formando cápsulas em escala nanométrica (REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019). Essa técnica permite preservar e melhorar a funcionalidade dos compostos bioativos, reduzir a perda de volatilidade, melhorar a reatividade, bem como melhorar as estabilidades física e biológica, e a vida útil dos compostos bioativos. A nanoencapsulação permite a formação de

barreiras de proteção contra luz, oxigênio, pH, umidade, calor, cisalhamento ou outras condições extremas (BAO et al., 2019; SHISHIR et al., 2018). Além disso, as nanocápsulas possuem vantagens como alta penetração na mucosa, maior adsorção celular e propriedades de liberação controlada em relação aos sistemas de administração tradicionais (SANTOS et al., 2018). Sendo assim, a nanoencapsulação utilizando quitosana como material de parede é promissora, devido à sua capacidade de formar interações iônicas dependentes do pH com a mucina e por sua capacidade de melhorar a penetração de grandes moléculas na superfície da mucosa. A MM da quitosana é uma das suas principais características, que pode afetar sua processabilidade e desempenho como veículo carreador (ARYA et al., 2009).

Esquerdo et al. (2018) obtiveram nanoemulsões contendo ácidos graxos insaturados a partir de óleo de carpa utilizando quitosana e gelatina como fase aquosa. As nanoemulsões com índices acima de 70% (m/m) de quitosana e abaixo de 30% de gelatina (m/m), permaneceram estáveis por mais de 7 dias, com adequados valores de índice de polidispersão ($<0,3$) e potencial Zeta (31,5 mV). A nanoemulsão quitosana: gelatina na proporção de 90:10 foi a mais estável, resultando em menor oxidação para os concentrados de ácidos graxos insaturados.

Rajabi et al. (2019) realizaram a nanoencapsulação de extrato de açafrão utilizando quitosana e goma arábica por meio de gelificação iônica. Foram formados nanocomplexos para reter os compostos bioativos do açafrão, já que esses compostos degradam facilmente. O tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta das nanocápsulas produzidas foi na faixa de 183–295 nm; 0,272–0,612 e 20,5–50,5 mV, respectivamente.

Dentre as técnicas conhecidas para o desenvolvimento das nanocápsulas estão a emulsificação, complexação de inclusão, nanoprecipitação e coacervação (BAZANA et al., 2015; EZHILARASI et al., 2013; WALIA et al., 2019).

A velocidade de agitação, por exemplo, é um dos parâmetros operacionais que intervém diretamente no tamanho, morfologia e sistema de liberação da nanocápsula. De forma genérica, os estudos da mecânica de fluidos estão diretamente relacionados com o tamanho médio das gotas que constituem um sistema de dispersão líquida. Nesse sentido, a tensão de cisalhamento atuando sobre a dispersão deve ser maior que a tensão interfacial e a viscosidade do fluido, para que o regime turbulento possa ser atingido, o qual gera a redução do tamanho da cápsula na escala nanométrica (GEANKOPLIS, 1998; LEMOS; MARIANO MARFIL; NICOLETTI, 2017).

3.7 TÉCNICAS DE NANOENCAPSULAÇÃO

Muitas variáveis podem influenciar nas propriedades finais da formação dos nanoencapsulados, entre elas estão as técnicas de encapsulação e os compostos usados, assim como sua concentração, massa molar, flexibilidade, cargas, interações, forças iônicas e as variáveis ambientais como o pH, temperatura, agitação, tempo de desenvolvimento do sistema. De acordo com as propriedades dos nanoencapsulados formados pode-se caracterizá-los de acordo com a quantidade de polímeros utilizados e com a técnica utilizada. (DE KRUIF et al., 2004; TOLSTOGUZOV, 2003; TURGEON et al., 2007).

Existem várias técnicas de nanoencapsulação, assim como: emulsificação, complexo de inclusão, nanoprecipitação, coacervação e outras. Todas essas técnicas são capazes de produzir cápsulas carreadoras com escala nanométrica, isso é, 10 até 1000 nm.

A nanoprecipitação também é conhecida como deslocamento de solvente ou deposição do polímero pré-formado (GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004). Esse método ocasiona uma emulsificação espontânea em que a fase interna orgânica que contém o composto de interesse dissolvido em solvente orgânico, como o hexano por exemplo, é aplicado na fase aquosa externa. As moléculas lipofílicas e hidrofílicas da mistura obtida irão se rearranjar e isso fará que a substância aplicada que é hidrofílica se desloque para o interior das cápsulas (GALINDO-RODRIGUEZ ET AL., 2004), e dessa forma é obtido nanocápsulas sem a utilização de óleos.

O complexo de inclusão trata-se do uso de um substrato (agente encapsulante) junto a substância que deverá ser encapsulada. A encapsulação acontece com o auxílio de interações fracas, como a força de Van der Waals e com as interações hidrofóbicas. Geralmente essa técnica proporciona melhor estabilidade e eficiência de encapsulamento. O método de complexo de inclusão é usado majoritariamente para encapsulamento de compostos voláteis ou muito instáveis, como as vitaminas por exemplo, sendo capaz de tornar a mistura inodora, porém preservando o sabor (EZHILARASI et al., 2013).

A coacervação faz com que as moléculas interajam com suas cargas opostas formando complexos moleculares que por repulsão acabam fazendo que a mistura se separe em duas fases. (STRAUSS; GIBSON, 2004) A fase precipitada, com maior massa molar, é composta por um grande número de polímeros, enquanto a fase sobrenadante é pobre em polímeros onde fica a maior parte do solvente. Os nanoencapsulados são formados pelas forças eletrostáticas devido às cargas opostas dos compostos misturados, pelas interações hidrofóbicas, e pontos de hidrogênio (EZHILARASI et al., 2013). Sendo assim, essa é uma

técnica que simplifica a obtenção de nanoencapsulados com altas concentrações, separando a fase sobrenadante da mistura bifásica, já que a mesma se compõe basicamente do soluto.

A emulsificação geralmente é utilizada para nanoencapsular substâncias em meio aquoso através de nanoemulsões. As nanoemulsões são dispersões coloidais onde imerge um líquido dentro do outro, assim formando gotículas de diferentes tamanhos imersas uma na outra (SANGUASRI et al., 2006). A maior parte dos estudos são óleos imergidos em água, porém há uma grande quantidade de estudos em água imergidas em óleos (CHIESA et al., 2008). As nanoemulsões são feitas com altas agitações e/ou grau de homogeneização. A alta turbulência sobre a mistura de fases oleosas, aquosas, surfactantes e aditivos ocasiona a redução de suas cápsulas e posteriormente a precipitação por cavitação. Para ser possível a redução das cápsulas pela turbulência em escalas manométricas é necessário agitação entre 10.000 e 20.000 rpm (MASON et al., 2006).

3.8 NANOELMULSÕES – PROPRIEDADES

As nanoemulsões são emulsificações entre uma fase aquosa e uma oleosa, resultando em uma única fase. As gotículas de óleo são imergidas na fase aquosa em escalas manométricas, ou seja, menores que 100 nm. As cápsulas nessa escala apresentam diversas vantagens sobre os microencapsulados (MASON ET AL., 2006), entre elas podemos destacar:

- Alta área superficial. Essa característica melhora a percepção da palatabilidade de substâncias pouco solúveis em meios aquosos.
- Translucidez. Sendo possível a aplicação em bebidas sem que altere suas propriedades colorimétricas. As microencapsulações alteram essas propriedades já que elas tendem a ser leitosas e não translúcidas.
- Baixa viscosidade.
- Menor quantidade de surfactantes.

As nanoemulsões são pequenas estruturas em escala nanométrica que são translúcidas (SHAH et al., 2010). São cápsulas que apresentam baixa tensão interfacial, sendo essa menor que 6-10 N/m, que proporciona a substância capacidade de dissolver uma grande variedade de substâncias (SCHWUGER; SCHOMÄCKER, 1995). Sendo assim, eles podem ser usados para compartimentar fármacos com diferentes dimensões, propriedades físico-químicas em diferentes meios dispersantes podendo aumentando o potencial de adsorção do mesmo (CRUZ; UCKUN, 2001). Elas se comportam como fluidos newtonianos, apresentam viscosidade semelhante à da água, mesmo em elevadas concentrações devido a coalescência

reversível delas (SILVA, 2010). Esses compostos conseguem ser mais solúveis que soluções micelares e, por esse motivo, são tão usados na indústria farmacêutica (FORMARIZ, 2004).

Diferentemente das microemulsões, as nanoemulsões não são termodinamicamente estáveis, mas metaestáveis, ou seja, estáveis até certo período ou condição. A estabilidade da cápsula está diretamente relacionada as condições de preparo, levando em consideração a estabilização estérica, quais tensoativos não-iônicos ou poliméricos foram usados e o tamanho das cápsulas (FERNANDEZ et al., 2004; TAROS et al., 2004).

3.9 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

3.9.1 Eficiência de nanoencapsulação

Para que seja possível determinar a quantidade do composto que foi eficientemente encapsulado é necessário fazer uma análise chamada de “eficiência de encapsulação”. Essa análise consiste em primeiramente quebrar as nanocápsulas, que pode ser feito através de um tratamento com ultrassom disperso em solvente orgânico e um tampão. O teor do componente encapsulado então é quantificado por espectrofotometria específica do composto a ser analisado, como por exemplo, o licopeno é quantificado com um comprimento de onda ($\lambda_{\max}$) de 515 nm, após séries de diluições para encontrar um branco adequado. A eficiência de aprisionamento e carregamento pode ser calculada a partir de uma equação específica. Além da análise de eficiência de encapsulamento feito por espectrofotometria, também é possível fazer através cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa (SINGEH EL AL, 2008).

3.9.2 Tamanho das cápsulas

O tamanho das cápsulas é uma análise que é realizada a partir de *photon correlation spectroscopy* (PCS) ou espalhamento de luz dinâmico (DLS), que monitora a variação de luz de acordo com as interferências que a amostra causa a partir do movimento Browniano. Essa análise é capaz de identificar os tamanhos das cápsulas partindo do pressuposto que cápsulas menores se locomovem mais rápido, assim como cápsulas maiores são mais lentas. Isso é computado através da captação de luz difratada pelas cápsulas dispersas na solução analisada (BABOOTA et al., 2007).

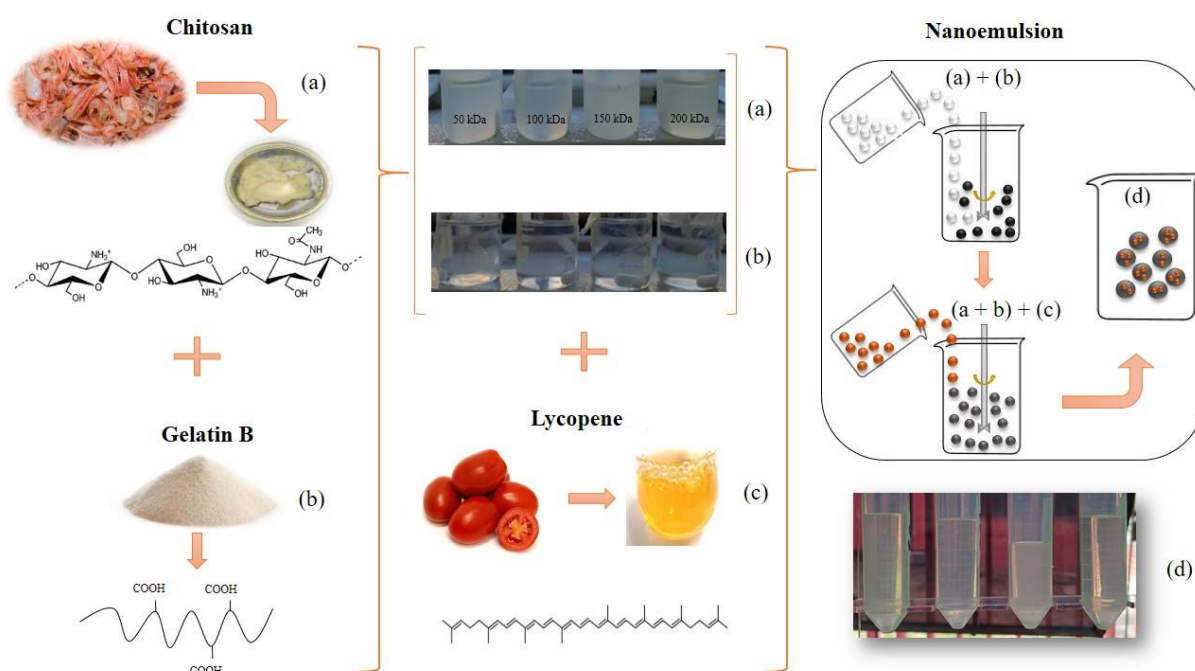
3.9.3 Potencial Zeta

Amplamente conhecido, o potencial Zeta é um método para determinar a carga superficial das nanocápsulas quando elas são colocadas em líquido. O valor do potencial Zeta é usado para fazer um análises da estabilidade da dispersão. Neste sentido, o valor vai depender das propriedades físico-químicas do composto ativo, os polímeros; da presença de eletrólitos e o poder de absorção de cada um deles. Usualmente, para esta análise é usada o espalhamento de luz eletroforético. Segundo os estudos prévios, acredita-se que o potencial zeta de ± 30 mV é suficiente para garantir a estabilidade física das nanocápsulas, no âmbito da estabilidade por repulsão eletrostática (MARIANO; OLIVEIRA; ASSIS, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram desenvolvidos sistemas de nanoemulsões para nanoencapsular licopeno extraído de tomates, utilizando como materiais de parede a quitosana despolimerizada (por via ácida e por via oxidativa) e a gelatina bovina (tipo B), e caracterizar as nanocápsulas formadas, conforme está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 – Resumo gráfico dos sistemas de nanoemulsões para nanoencapsular licopeno.



4.1 MATERIAL

4.1.1 Matérias primas

O tomate italiano (*Solanum lycopersicum*) foi obtida do comércio local da cidade de Rio Grande-RS. A gelatina de pele bovina tipo B foi obtida da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). A quitina foi obtida dos resíduos do camarão (*Penaeus brasiliensis*) mediante as etapas de desmineralização, desproteinização, desodorização e secagem. Posteriormente, a quitosana foi obtida por desacetilação alcalina da quitina de acordo com a metodologia de Moura et al. (2015).

4.2 MÉTODOS

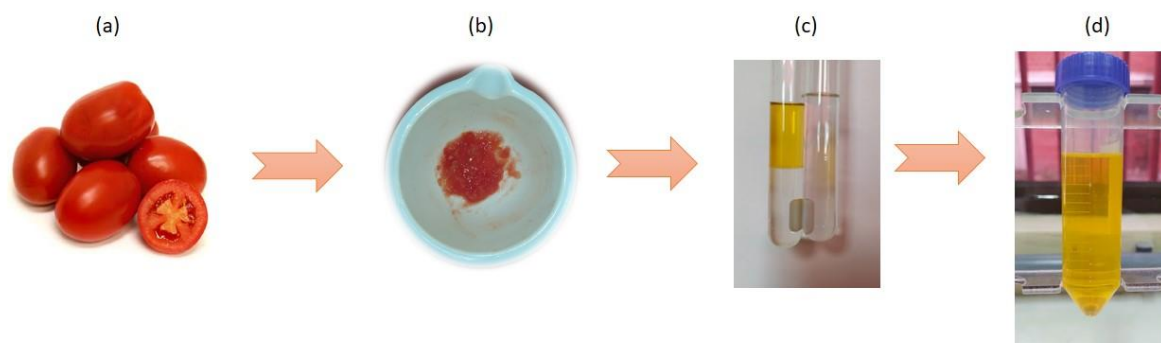
4.2.1 Extração e quantificação do licopeno

Para a extração do licopeno da polpa do tomate italiano foi utilizada a metodologia de Anthon, Barrett (2007). Primeiro, a polpa da casca e as sementes foram separadas. Pesou-se 0,1 g de polpa de tomate. Num frasco com tampa de rosca âmbar foram adicionados a polpa pesada e 8 mL de uma solução de hexano, acetona e etanol (2: 1: 1). As amostras foram deixadas no escuro e analisadas em triplicata. Para o branco, foram adicionados 100 µL de água destilada e 8 mL da solução de hexano, acetona e etanol. Em seguida, foi realizada agitação por 10 min (mínimo) à temperatura ambiente (25 ± 1 °C), com agitação constante a 300 rpm (Fisatom, 752, Brasil). Foram adicionados 1 mL de água e deixou-se descansar por 10 min. Finalmente, com o espectrofotômetro UV-VIS (Kasuki, IL-593, Brasil) em 503 nm foi lida a absorbância, para depois determinar a concentração de licopeno de acordo com a Equação 1. A Figura 7 apresenta um esquema da extração do licopeno de tomates italianos.

$$\text{Licopeno (mg.kg}_{\text{fresco}}^{-1}) = \frac{(\text{ABS}_{503} \times 537 \times 8 \times 0,55)}{(m \times 172)} \quad (1)$$

sendo 537 (em g.mol) é a massa molar do licopeno, 8 (em mL) é o volume do solvente misto, 0,55 (em mL) é a proporção do volume da camada superior para os solventes misturados, m é a massa do tomate adicionado (0,10 g) e 172 (em mM) é o coeficiente de extinção do licopeno em hexano.

Figura 7 – Extração de licopeno a partir do tomate italiano. (a) Tomate italiano. (b) Polpa de tomate. (c) Separação do licopeno sendo a fase superior a mistura de licopeno e hexano. (d) Solução de licopeno.



4.2.2 Obtenção da quitosana

A quitina foi extraída dos resíduos do camarão (*Penaeus brasiliensis*) mediante as etapas de desmineralização, desproteinização, desodorização e secagem (Figura 8). A obtenção da quitosana de 200 kDa foi realizada por meio da desacetilação alcalina da quitina (diâmetro de 1 mm), com solução de NaOH 45% (m/v), temperatura de 135 ± 1 °C por 90 min e razão mássica de NaOH:quitina de 20:1 (MOURA et al., 2015). Posteriormente, a quitosana foi purificada em solução de ácido acético 1% e então centrifugada a $7000 \times g$ por 30 min. A precipitação total da quitosana ocorreu levando até pH 12,5 e depois até pH 7,0. Finalmente, foi realizada a secagem em leito de jorro a 95°C e vazão de alimentação de suspensão de 0,18 kg_{pasta}/kg_{inerte}h até a umidade comercial (< 10%) (DOTTO et al., 2011), como está mostrado na Figura 9.

Figura 8 - Fluxograma do processo de obtenção da quitina a partir dos resíduos do camarão.

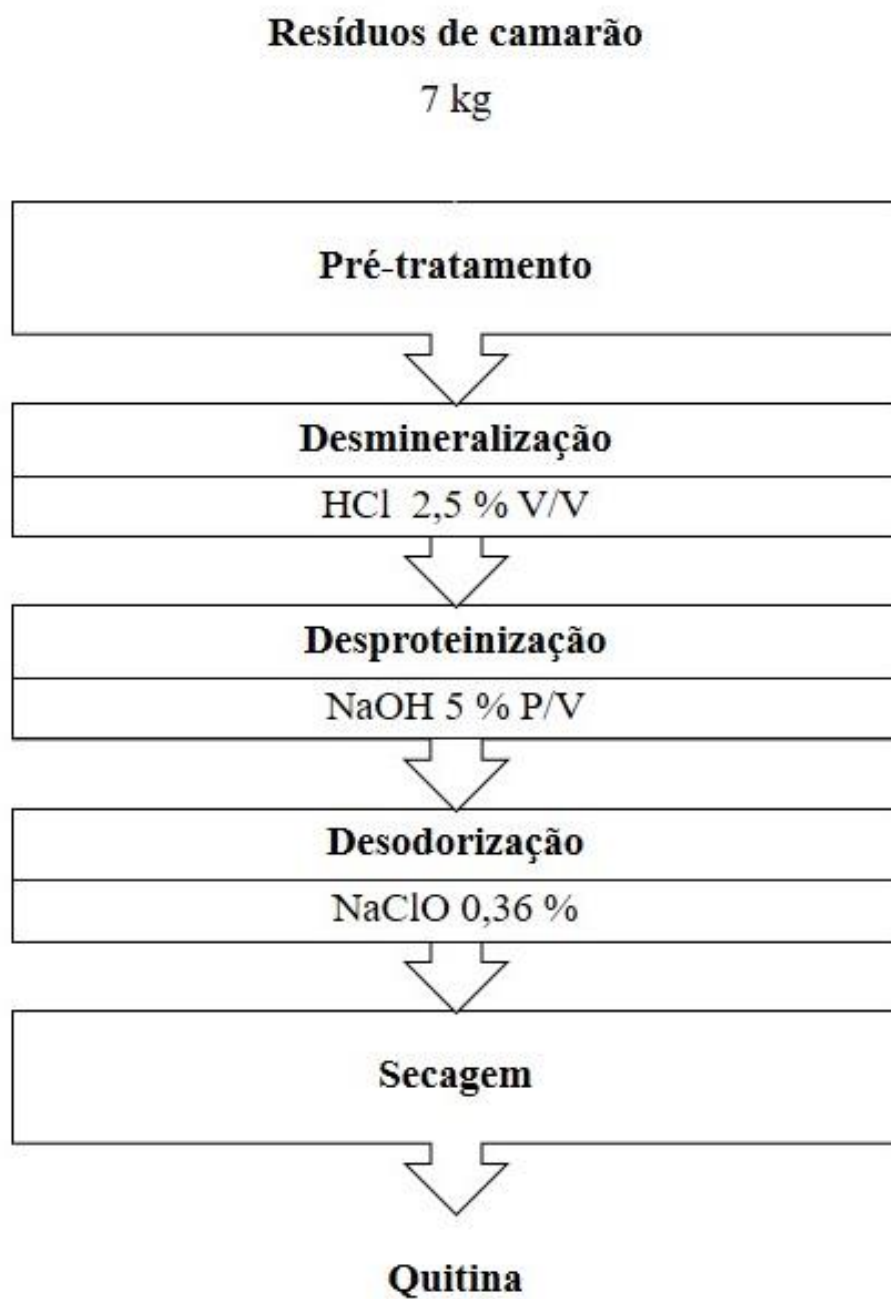
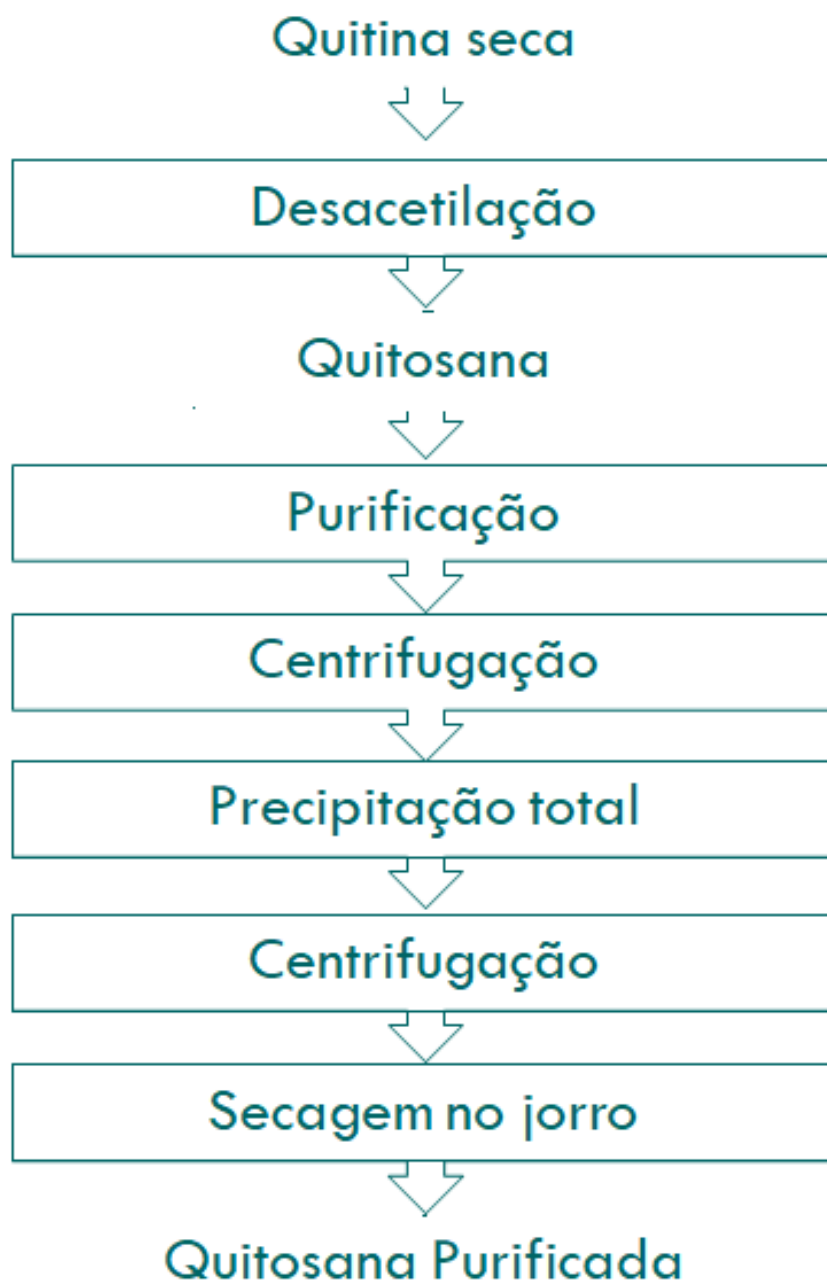


Figura 9 – Fluxograma do processo de obtenção da quitosana a partir da quitina seca.



4.2.3 Redução da massa molar da quitosana

A redução da massa molar foi realizada mediante despolimerização química por via oxidativa. Para a despolimerização oxidativa, a quitosana (1 g) foi dissolvida em 50 mL de HCl ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) a $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 h, com agitação constante de 300 rpm (Fisatom, modelo 752, Brasil). Posteriormente, a reação de despolimerização iniciou com a adição de 5 mL de H_2O_2 ($0,2 \text{ mol/L}$) sob agitação a 300 rpm (Fisatom, modelo 752, Brasil) a $65 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (FARIAS et al., 2019). Para a via ácida, a quitosana purificada e seca (1 g) foi dissolvida em 20 mL de HCl ($0,05 \text{ mol/L}$), durante 12 h, à temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$), com agitação constante

de 300 rpm (Fisatom, 752, Brasil). Subsequentemente, foi realizada a reação de despolimerização a qual se iniciou partindo da adição de 100 mL de HCl (6,20 mol/L), a temperatura controlada (65 ± 1 °C) e com agitação constante de 300 rpm (Fisatom, 752, Brasil) para atingir a concentração final de ácido de 5,15 mol/L.

As massas molares de 125 e 50 kDa foram obtidas a partir de diferentes tempos de despolimerização. Para a via ácida, os tempos foram de 30 e 175 min, e para a via oxidativa os tempos foram de 7 e 100 min, respectivamente (FARIAS et al., 2019).

Ao final de cada procedimento, as soluções foram resfriadas rapidamente para interromper a reação e, em seguida, uma solução de NaOH (10% m/v) foi adicionada, até alcançar um pH de 12,5. Após, o pH foi ajustado para pH 7,0 com uma solução de HCl (10% v/v). A quitosana despolimerizada passou por centrifugação (Sigma, 6-16, Osterode am Harz, Baixa Saxônia, Alemanha), a $7000 \times g$ durante 30 min, eliminando assim produtos secundários que permaneceram no sobrenadante.

4.2.4 Caracterização da quitosana

Para determinar a massa molar média viscosimétrica das amostras de quitosana foi utilizado o método viscosimétrico, e se determinou o valor da viscosidade cinemática utilizando um viscosímetro capilar tipo Cannon–Fensk (Schott Geraete, GMBH – D65719, Alemanha) (ROBERTS; DOMSZY, 1982).

A viscosidade específica foi calculada utilizando a Equação 2. No que diz respeito à viscosidade intrínseca $[\eta]$, foi calculada pelo ajuste da equação de Huggins (Equação 3) nos resultados obtidos.

$$\eta_{SP} = \frac{t-t_0}{t_0} k \quad (2)$$

$$\frac{\eta_{SP}}{c} = [\eta] + k[\eta]^2 c \quad (3)$$

sendo η_{SP} a relação entre as viscosidades do polímero em solução e do solvente, t e t_0 referem-se aos tempos de escoamento da amostra e do solvente (s), respectivamente, η_{SP}/c é a viscosidade reduzida (mL/g), “ c ” é a concentração da solução (g/mL), $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (mL/g) e k é uma constante válida para cada polímero (adimensional) (ALSARRA et al., 2002).

A massa molar média viscosimétrica da quitosana foi calculada a partir do valor da viscosidade intrínseca usando a equação de Mark–Houwink–Sakurada (Equação 4), citada por Roberts e Domszy. (1982).

$$[\eta] = k[MM]^a \quad (4)$$

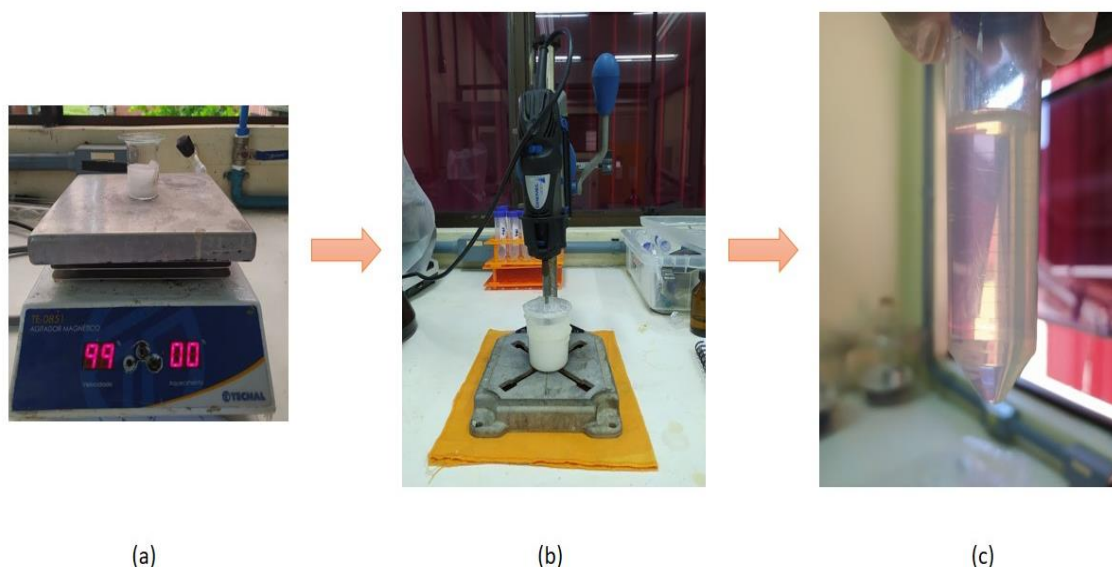
sendo $k=1,81 \times 10^{-3}$ mL/g e $a=0,93$, as quais são constantes que dependem do sistema solvente–polímero (CERVERA et al., 2004; GALED et al., 2005; KUMAR, 2000).

Depois de verificados as diferentes massas moleculares das amostras de quitosana, foram escolhidas as amostras de massas molares a serem trabalhados na nanoemulsão.

4.2.5 Desenvolvimento das nanocápsulas

O método utilizado para desenvolver as nanocápsulas foi a emulsificação (Figura 10). Assim, a preparação foi obtida utilizando uma alíquota de quitosana (0,55% m/v) obtida por despolimerização oxidativa. A quitosana foi adicionada à uma solução de ácido acético (1% m/v). A solução foi submetida a agitação constante de 300 rpm (Fisatom, 752, Brasil) e temperatura ambiente controlada (25 ± 1 °C) por 12 h. Paralelamente, gelatina tipo B (0,55% m/v) foi previamente diluída em água com agitação constante de 300 rpm (Fisatom, 752, Brasil) e temperatura controlada (60 ± 1 °C) por 2 h. Posteriormente, as soluções de gelatina foram incorporadas, separadamente, gota a gota a uma taxa constante (1 mL/min) nas soluções de quitosana sob agitação constante com agitador mecânico de 2.000 rpm. Em seguida, uma solução de NaOH (0,1 mol/L) foi adicionada aos sistemas, mantendo o pH < 5,5, e uma solução de NaCl foi adicionado em uma concentração total de 200 mM, sempre com agitação constante. Posteriormente, o extrato de licopeno numa proporção de 2 % v/v (em relação ao volume total) e o surfactante (Tween® 80), 5% em relação à massa de quitosana, foram adicionados no sistema quitina:gelatina, e o mesmo foi deixado em agitação mecânica por 10.000 rpm por 30 min (Kinematica, PT 2500E, EUA) (Figura 10). Por fim, as amostras foram congeladas a -10 °C por 30 min e, em seguida, armazenadas em refrigeração no escuro.

Figura 10 – Método de emulsificação: (a) agitação a 2000 rpm; (b) agitação a 10000 rpm; (c) obtenção das nanocápsulas.



4.2.6 Eficiência de encapsulação (%EE)

A eficiência foi avaliada de acordo com o método descrito por Zardini et al. (2017), com pequenas modificações. A metodologia envolve a quantificação do licopeno presente na superfície externa das nanocápsulas e a quantidade de licopeno adicionada ao sistema. Um volume de amostra de 500 uL foram adicionados a 8 mL de solução de hexano, acetona e etanol (2: 1: 1), seguido de sonicação em banho (Eco - Sonics, Q3.0, Brasil) por 30 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Sigma, 6-16, Osterode am Harz, Baixa Saxônia, Alemanha) a $3500 \times g$ por 30 min. A determinação do licopeno foi realizada por espectroscopia (Kasuki, IL-593, Brasil) com detector UV/VIS a 503 nm. Todas as medições para %EE foram feitas pelo menos em triplicata. A eficiência de encapsulamento (% EE) foi calculada usando a Equação 5.

$$\%EE = \frac{W_{Total} - W_{Free}}{W_{Total}} \times 100 \quad (5)$$

sendo, W_{total} é a massa do licopeno aplicado na formulação da dispersão (g) e W_{Free} é a quantidade de licopeno livre medida no sobrenadante (g).

4.2.7 Estabilidade físico-química

A estabilidade físico-química das nanoemulsões foi realizada a 7°C durante 30 dias. O tamanho das nanocápsulas presentes nas nanoemulsões (com diluição de 500 vezes) foi mensurado em triplicata usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) (LitesizerTM 500, Anton Paar, Áustria), com luz laser de 658 nm a 25°C e ângulo de medição automático. O potencial Zeta das nanoemulsões foi determinado em triplicatas usando espalhamento de luz eletroforético (ELS) (LitesizerTM 500, Anton Paar, Áustria) a 25°C e ajuste automático de tensão.

4.2.8 Estabilidade da atividade antioxidante (%AA)

A estabilidade da atividade antioxidante dos bioativos contidos nas nanocápsulas foi avaliada com o método de captura do radical 220-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) desenvolvido por Cano et al. (1998). Este método baseia-se na descoloração do radical livre ABTS•⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico sal diamônio 98% pureza). Este radical foi obtido a partir da mistura de 5 mL da solução estoque de ABTS 7 mM e 88 µL de solução de persulfato de potássio a 140 mM. A mistura permaneceu no escuro entre 12 a 16 horas para a estabilização do radical formado. Uma alíquota de 1,5 mL do radical foi diluída em etanol 95% em um frasco protegido de luz até a estabilização da absorbância do radical a $0,700 \pm 0,02$ em comprimento de onda de 734 nm. Para a determinação da capacidade antioxidante das amostras, foram adicionados 1 mL da amostra e 3,0 mL da solução diluída de ABTS•⁺, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A redução da absorbância foi observada após 30 minutos de reação e para cada reação também foi realizada uma reação controle, com um tubo de ensaio contendo apenas 1 mL de etanol 95%.

4.2.9 Análise estatística

A análise de ANOVA de uma via e duas vias foi usado para analisar os dados. Os experimentos foram realizados em triplicata de forma independente. A diferença significativa entre as médias dos triplicados foi determinada teste de Tukey usando o software estatístico SPSS.2 SPSS v.18.0 (IBM Corp., Armonk, New York, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONCENTRAÇÃO DE LICOPENO EM TOMATES ITALIANOS

O licopeno extraído da polpa do tomate foi de 89,69 mg/kg, este valor foi superior ao relatado por diversos autores na literatura. Periago et al. (2004) realizaram uma extração de tomates crus com uma mistura de hexano, acetona e etanol na proporção (2: 0,5: 0,5 v/v) onde obtiveram uma concentração de 30,78 mg/kg. De Souza (2017) obteve uma concentração de licopeno na polpa do tomate de 41,17 mg/kg, e Fattore et al. (2016) relataram valores na faixa de 78,6 mg/kg. A maior quantidade de licopeno determinada pode estar relacionada ao alto estado de maturação dos tomates italianos selecionados para as análises, o que está de acordo com o que foi relatado por Kozukue e Friedman (2003).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

5.2.1 Despolimerização da quitosana

A quitosana obtida foi submetida à reação de despolimerização química por meio de duas vias distintas, a via ácida e a via oxidativa, para obter quitosana com massa molar reduzida (50 kDa e 125 kDa).

A Figura 11 apresenta as amostras de quitosana de 50 kDa. A primeira imagem (Figura 11 (a)) é a quitosana obtida por reação de despolimerização por via ácida, a qual foi obtida em 175 min de reação. A segunda imagem (Figura 11 (b)) é a quitosana obtida por reação de despolimerização por via oxidativa, a qual foi obtida em 100 min de reação. A via ácida gerou uma pasta de quitosana de cor mais escura em comparação com a pasta de quitosana obtida por via oxidativa. Outra diferença visível foi a textura das pastas, sendo a pasta da via ácida mais seca, compacta, lisa e densa em comparação com a pasta da via oxidativa, a qual tem uma textura levemente granular, maior quantidade de água, menos densa e menos compacta.

Figura 11 – Quitosanas de 50 kDa obtidas por despolimerização química: (a) por via ácida e (b) via oxidativa.



(a)



(b)

A Figura 12 mostra as quitosanas de 125 kDa. A primeira imagem (Figura 12 (a)) apresenta a quitosana despolimerizada por via ácida, a qual foi obtida em 30 min de reação. A segunda imagem (Figura 12 (b)) apresenta a quitosana despolimerizada por via oxidativa, a qual foi obtida em 7 min de reação. Pode-se visualizar que a pasta obtida por via ácida é mais escura em comparação com a pasta da via oxidativa. Isto mostra um comportamento similar ao apresentado nas quitosanas de 50 kDa. A primeira imagem, a pasta (Figura 12 (a)) apresenta uma textura cremosa, pouco compacta em comparação com a segunda imagem, a pasta (Figura 12 (b)), a qual apresenta textura granular, mais compacta e mais seca.

Figura 12 – Quitosanas de 125 kDa obtidas por despolimerização química: (a) por via ácida e (b) via oxidativa.



(a)



(b)

Ao comparar as duas vias de despolimerização, temos que ressaltar que a via oxidativa foi consideravelmente mais rápida em comparação com a via ácida. Além disso, o rendimento da via oxidativa também foi maior. Sendo assim, esta via foi escolhida para o desenvolvimento das nanocápsulas.

5.2.2 Determinação da massa molar da quitosana

Foi determinada a massa molar da quitosana obtida através da reação de desacetilação. A Tabela 1 apresenta os parâmetros de viscosidade específica e viscosidade reduzida.

Tabela 1 – Parâmetros da viscosidade específica e viscosidade reduzida das amostras de quitosana.

Reação de desacetilação	Parâmetros					
	200 kDa		125 kDa		50 kDa	
Concentrações (g/mL)	η_{SP} (adimensional)	$\frac{\eta_{SP}}{c}$ (mL/g)	η_{SP} (adimensional)	$\frac{\eta_{SP}}{c}$ (mL/g)	η_{SP} (adimensional)	$\frac{\eta_{SP}}{c}$ (mL/g)
0,001	0,27±0,01	267,80±9,27	0,14±0,00	19,07±0,57	0,10±0,00	9,97±0,00
0,003	0,93±0,01	311,09±2,63	0,16±0,00	17,00±0,45	0,14±0,00	9,60±0,00
0,006	2,44±0,02	406,86±3,03	0,19±0,00	17,27±0,38	0,19±0,00	10,73±0,24
0,009	5,75±0,02	639,01±2,72	0,32±0,01	19,02±0,51	0,22±0,00	11,77±0,22
0,012	9,64±0,06	803,69±4,70	0,38±0,00	18,44±0,21	0,22±0,00	10,40±0,00

*Valor médio ± desvio padrão (n=3).

η_{SP} : viscosidade específica

$\frac{\eta_{SP}}{c}$: viscosidade reduzida

Tabela 2 - Parâmetros de viscosidade intrínseca e a massa molar média viscosimétrica das amostras de quitosana.

Reação de desacetilação	Parâmetros	
	[η] (mL/g)	MM (kDa)
	172,44 $\pm$ 0,19	225,8
	14,19 $\pm$ 0,02	154,0
	3,23 $\pm$ 0,15	31,37

*Valor médio $\pm$ desvio padrão (n=3).

[η]: viscosidade intrínseca

(MM): massa molar média viscosimétrica da quitosana

Através da análise das Tabelas 1 e 2, pôde-se verificar que os resultados foram similares aos reportados por Moura et al. (2015) e Farias et al. (2019).

Depois de ter verificado que os tempos de despolimerização foram similares aos reportados pela literatura, foram escolhidas três quitosanas (triplicatas) com as massas molares para desenvolver as nanoemulsões. Como também, a via para serem obtidas as quitosanas com estas massas molares foi a via oxidativa, devido à facilidade de operação e alto rendimento.

5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%EE)

A eficiência de encapsulação variou ligeiramente entre as formulações com diferentes massas molares de quitosana, que corresponderam à 98,53%; 97,83%; 97,75% e 96,73% para os sistemas de 50 kDa, 100 kDa, 150 kDa e 200 kDa, respectivamente. A alta eficiência das nanocápsulas apontou que a metodologia utilizada foi eficiente, que compreende uma boa relação entre os materiais da parede (quitosana-gelatina), o núcleo (licopeno) e o surfactante. Este último e a gelatina desempenham papéis importantes na interação e boa retenção de moléculas lipofílicas no núcleo (MARTÍNEZ - HERNÁNDEZ, CASTILLEJO & ARTÉS - HERNÁNDEZ, 2019; VASCONCELOS ET AL., 2020). Os resultados são superiores aos descritos na literatura (SINGH; NEUPANE; PANDA; KOHLI, 2017), que foi de 84,50%. A eficiência de encapsulação do licopeno depende significativamente dos materiais de parede e da concentração do licopeno, pois é muito provável que a medida que a concentração do licopeno aumenta, os pontos de ligação no material de parede podem se tornar saturados e assim

a eficiência ser cada vez menor. Na Tabela 3 também podemos observar os tempos de reação de despolimerização por via oxidativa, que foram escolhidos para obter as massas molares de 50, 100, 150 e 200 kDa.

Tabela 3 - Eficiência de encapsulação (%EE) das nanocápsulas para as diferentes massas molares pela via oxidativa

Sistemas com diferentes massas molares de quitosana (kDa)	Tempo de reação (min)	% EE
50	85	98,53
100	15	97,83
150	9	97,75
225	0	96,73

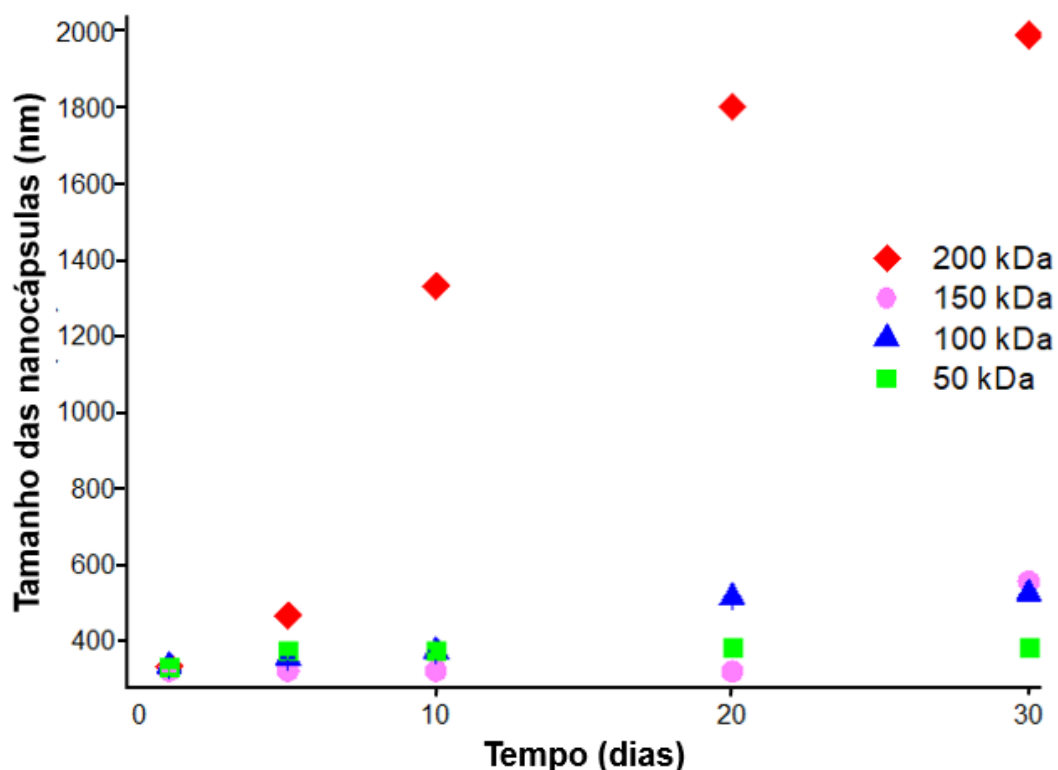
*Valor médio $\pm$ desvio padrão (n=3).

5.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

A estabilidade físico-química de todas as emulsões produzidas foi estudada considerando as mudanças nos valores do tamanho das nanocápsulas (Figura 13) e do potencial zeta (Figura 14).

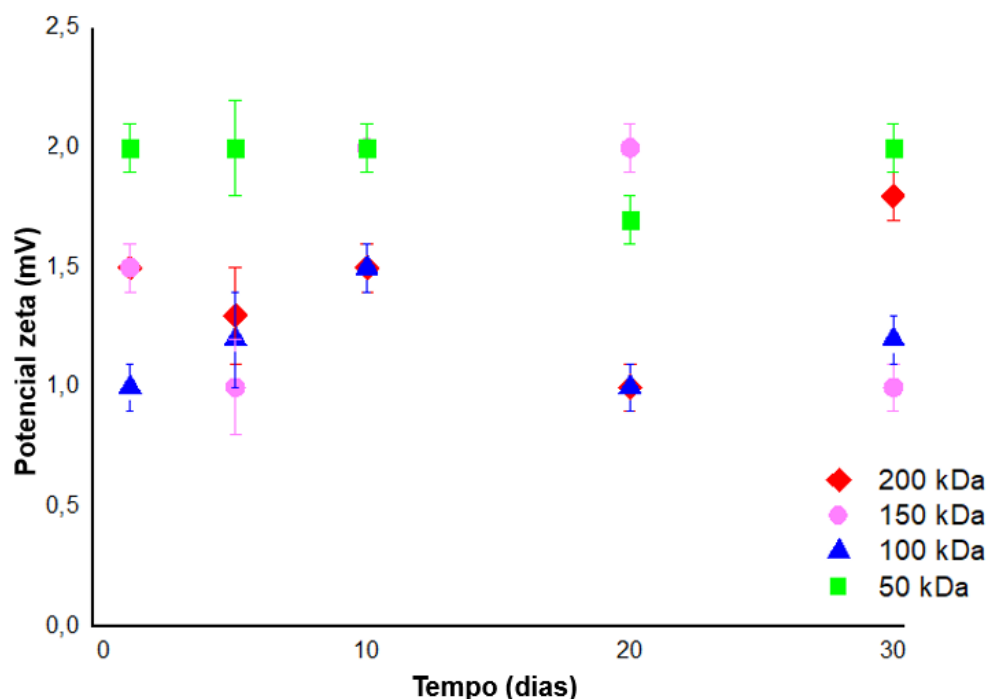
No dia 0 de análise, todos os experimentos mostraram tamanho de cápsula em torno de 340 nm (Figura 13). Portanto, as cápsulas produzidas por meio da emulsificação podem ser classificadas como nanocápsulas. Porém, em 5 dias, o aumento na faixa de massa molar da quitosana de 50-150 a 200 kDa resultou no aumento em relação ao tamanho de cápsula de aproximadamente 35%. Este efeito foi ainda mais pronunciado após 30 dias, aumentando aproximadamente 590% em relação ao dia 1. Além disso, quitosana com massas molares de 150 e 100 kDa apresentaram aumento no tamanho de cápsula em torno de 150%, respectivamente, somente após 30 dias e 20 dias. Ademais, o tamanho de cápsula da quitosana com massa molar de 50 kDa permaneceu praticamente inalterado durante todo o tempo (de 338 a 390 nm).

Figura 13 - Tamanho das nanocápsulas produzidas com quitosanas de diferentes massas molares obtidas por via oxidativa.



Os resultados podem sugerir que a redução da massa molar da quitosana pode ter favorecido a estabilidade estérica, que é alcançada pela adsorção adequada da quitosana-gelatina-surfactante-licopeno. A quitosana com massa molar mais baixa poderia ter sido adsorvida mais facilmente e compactada quando comparada à de massa molar mais alta. A estrutura mais estendida da massa molar maior pode ter ocasionado floculação de depleção devido à presença de superfície livre. Esta superfície livre pode ter causado interação atrativa entre nanocápsulas, que superou a interação repulsiva entre elas, resultando em floculação (MCCLEMENTS, 2016; LI; XIA, 2011).

Figura 14 - Potencial zeta das nanocápsulas produzidas com quitosana de diferentes massas molares obtidas por via oxidativa.



A magnitude do potencial zeta é geralmente referida como indicativo de estabilidade físico-química por repulsão eletrostática (CHIRAYIL et al., 2017). No entanto, o deslocamento no plano de cisalhamento está associado a áreas livres ao longo das nanocápsulas. Neste sentido, todas as nanoemulsões apresentaram valores semelhantes em relação ao potencial zeta ($\sim 1\text{-}2$ mV) ao longo de todo o armazenamento (Figura 14). Os baixos valores podem ser atribuídos à interações entre os grupos carboxílicos carregados negativamente ($pI \sim 5,0$) da gelatina e os grupos amina carregados positivamente ($pKa \sim 6,3$) da quitosana (DE FARIAS et al., 2019; QIAO ET AL., 2017). Portanto, os baixos valores de potencial zeta foram apenas um aspecto negativo quando associados à nanoemulsões que apresentaram falta de estabilidade estérica (100-200 kDa).

Porém, vale ressaltar que não foi verificada nenhuma separação de fases para qualquer das nanoemulsões durante todo o tempo de armazenamento, conforme mostrado nas Figuras 15 e 16.

Figura 15 – (a) Quitosanas despolimerizadas (0,55 %) com diferentes massas molares em solução de ácido acético 1 %; (b) Solução de gelatina (0.55 %).



(a)

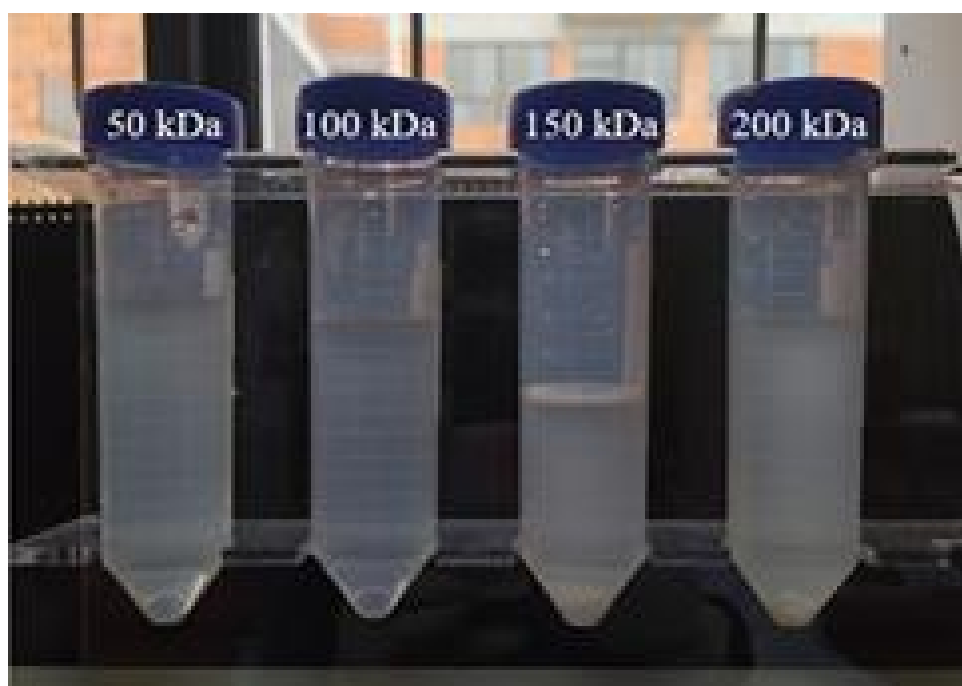


(b)

Figura 16 – (a) Sistemas de nanoemulsões depois de 1 dia. (b) Sistemas de nanoemulsões depois de 16 dias.



(a)



(b)

5.5 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%AA)

A atividade antioxidante foi calculada pelo método ABTS (Figura 17), o licopeno sem encapsulamento e os quatro sistemas de nanoemulsões foram avaliados do dia 1 ao dia 11.

O licopeno não encapsulado resultou no dia 0 em torno de 58% de atividade antioxidante (AA), sendo que as nanocápsulas apresentaram valores de %AA na faixa de 88% a 97% no dia 0, para os respectivos valores de massas molares. Após 11 dias de análise, as nanoemulsões apresentaram pequena variação, sendo, respectivamente, de 59% a 75% de AA. Já o licopeno sem encapsulação apresentou redução acentuada, que foi de 22,83% de AA, conforme os valores de %AA apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antioxidante do licopeno e das nanocápsulas com diferentes massas molares.

Licopeno	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 11
Não encapsulado (%m/m)	57,01 ± 0,75 ^{fg}	42,86 ± 0,61 ^{gh}	51,41 ± 1,33 ^h	23,26 ± 1,18 ⁱ
50 kDa (%m/m)	87,91 ± 0,22 ^{abc}	87,37 ± 1,73 ^{abc}	69,68 ± 6,89 ^{def}	71,36 ± 1,08 ^{de}
100 kDa (%m/m)	92,13 ± 0,24 ^{ab}	73,38 ± 5,54 ^d	78,81 ± 6,30 ^{cd}	75,36 ± 7,98 ^{cd}
150 kDa (%m/m)	94,93 ± 3,97 ^a	80,73 ± 0,98 ^{bcd}	74,24 ± 0,52 ^d	72,98 ± 0,47 ^d
200 kDa (%m/m)	97,32 ± 1,03 ^a	74,19 ± 0,21 ^d	77,67 ± 10,76 ^{cd}	59,75 ± 3,67 ^{efg}

* Médias precedidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna dentro de cada forma de quitosana no mesmo projeto experimental não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$).

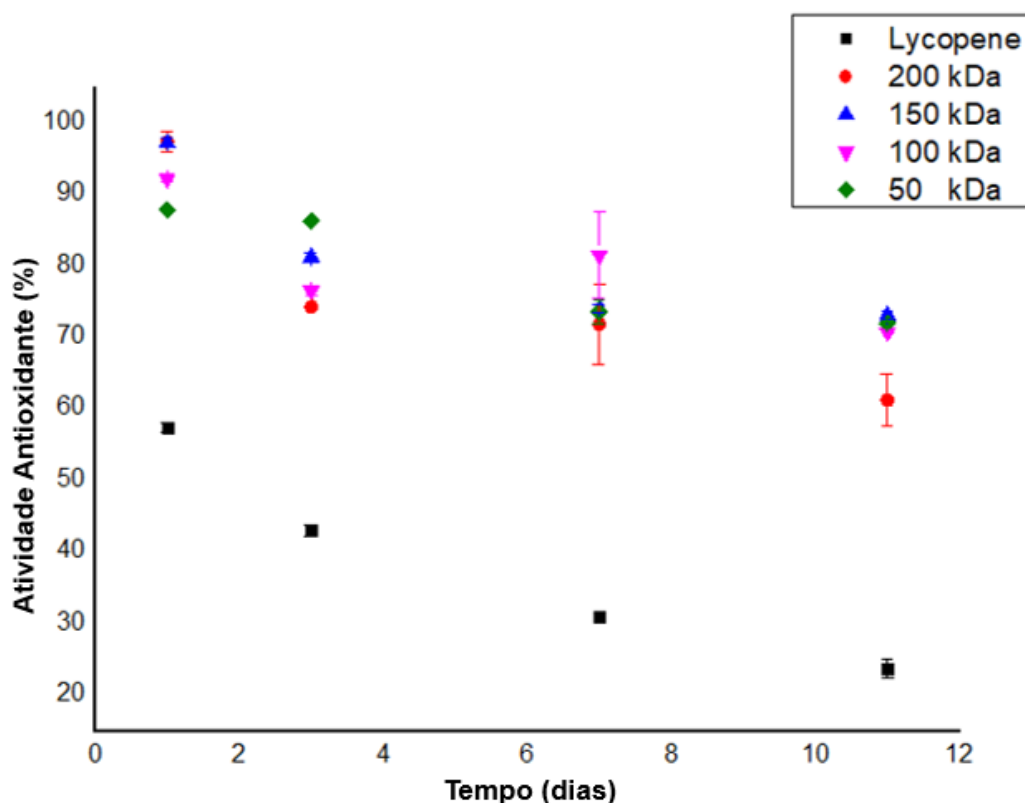
O tratamento estatístico indicou que as amostras tiveram diferença significativa tanto ao longo dos dias, assim como, entre os tratamentos com as diferentes massas molares ($p < 0,05$), conforme mostrado na Tabela 4. Porém, todas as nanocápsulas foram capazes de preservar a atividade antioxidante após 11 dias (~59% – 76%AA), mesmo apresentando diferença significativa, foi possível verificar essa porcentagem de preservação, diferindo claramente com o licopeno não encapsulado que teve uma perda de 33,75%AA.

A nanoemulsão que mais preservou as propriedades antioxidante foi o sistema desenvolvido com quitosana de 50 kDa, a qual apresentou uma redução de apenas 16,55 % na atividade oxidante. Yen, Yang e Mau (2008) avaliaram o efeito antioxidante de diferentes massas molares de quitosana, extraída a partir de resíduos de caranguejo, e concluíram que todas apresentaram boas propriedades antioxidantes. Porém, as propriedades antioxidantes mais eficazes foram exibidas pelas quitosanas com menores massas molares.

A atividade antioxidante da quitosana deve-se à forte capacidade de doação de hidrogênio da quitosana. Uma baixa massa molar e uma concentração mais alta têm uma influência positiva na atividade antioxidante da quitosana, tal e como foi estudado por Youn et al. (2001), que avaliaram quitosana com 30, 90 e 120 kDa, sendo que o aumento na

concentração de quitosana 30 kDa resultou no aumento dos grupos amina totais responsáveis por sequestrar mais radicais. Tomida et al. (2009) também mostraram que as quitosanas de baixas massas molares (2,8, 17,0 e 33,5 kDa) inibem a oxidação da albumina sérica, resultando na redução do estresse oxidativo na uremia em comparação com as quitosanas de massas molares mais altas (62,6-931 kDa).

Figura 17 - Estabilidade antioxidante de nanocápsulas produzidas com quitosana de diferentes massas molares.



O aumento da atividade de eliminação do radical ABTS e da capacidade de redução nas amostras pode ser devido ao colapso da região cristalina pela diminuição da massa molar, resultando no aumento da solubilidade e da reatividade em solução. Foi relatado que a despolimerização está associada à diminuição no índice de cristalização com a diminuição da interação intermolecular (Van der Waals) e ligações de hidrogênio. Em quitosana de baixa massa molar, o par solitário de elétrons ou compostos de hidrogênio de C–O e N–H pode ser mais acessível. De acordo com Chen et al. (2003), a quitosana com baixa massa molar apresenta maior atividade antioxidante, os grupos hidroxila ou amino podem ser destruídos por despolimerização adicional de amostras de inferior massa molar. Portanto, a atividade

antioxidante das nanocápsulas foi globalmente aumentada à medida que a massa molar da quitosana diminuiu, e este comportamento pode ser observado na Figura 17.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho estudou o efeito da quitosana de massa molar no desenvolvimento de nanocápsulas compostas de licopeno, utilizando o método de emulsificação. Foi possível desenvolver um sistema de nanoemulsões para nanoencapsular o licopeno, utilizando quitosana despolimerizada e gelatina como materiais de parede, assim como sua caracterização.

Este trabalho estudou o efeito da quitosana de massa molar reduzida no desenvolvimento de nanocápsulas compostas de licopeno, utilizando o método de emulsificação.

Todas as nanocápsulas mostraram alta eficiência de encapsulação ($\geq 96,73\%$).

Em relação à estabilidade físico-química, o tamanho de partícula das nanocápsulas com massa molar da quitosana de 50 kDa não apresentou grande alteração (338 a 390 nm) ao longo do tempo de armazenamento de 30 dias, o que revelou a melhor estabilidade estérica.

Todas as nanocápsulas foram eficientes enquanto a estabilidade do potencial Zeta (1 – 2 mV) nos 30 dias de armazenamento.

A atividade antioxidante do licopeno reduziu em 21% para as nanocápsulas com quitosana de 50 kDa, e reduziu em 60% para o licopeno sem encapsulamento nos 11 dias observados. Portanto, as nanocápsulas produzidas com quitosana de baixa massa molar (50 kDa) foram as mais adequadas para serem posteriormente aplicadas na indústria de alimentos.

7 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Foram gerados 8 L de resíduos de solução de NaOH, os quais foram armazenados em um galão de descarte de 20 L de polietileno de alta densidade (PEAD), corretamente rotulados com o nome do resíduo e a data. Posteriormente, esses resíduos são encaminhados para a unidade de gerenciamento de resíduos da FURG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUAJAH, C. I.; OGBONNA, A. C.; OSUJI, C. M. Functional components and medicinal properties of food: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2522–2529, 2015.
- ALOYS, H.; KORMA, S. A.; ALICE, T. M.; CHANTAL, N.; ALI, A. H.; ABED, S. M.; ILDEPHONSE, H. Microencapsulation by complex coacervation: methods, techniques, benefits, and applications. **American Journal of Food Science and Nutrition Research**, v. 3, n. 6, p. 188–192, 2016.
- ALSARRA, I. A.; BETIGERI, S. S.; ZHANG, H.; EVANS, B. A.; NEAU, S. H. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, v. 23, n. 17, p. 3637–3644, 2002.
- ALVES, H. J.; VIECELI, M.; ALVES, C. MUÑIZ, G. I. B.; DE OLIVEIRA, C. L. P.; FEROLDI, M.; ARANTES, M. K. Chitosan polymerization and nanochitosan production using a single physical procedure. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 9, p. 3913–3923, 2018.
- ANDREUCCETTI, C. Desenvolvimento e Caracterização de filmes biodegradáveis a base de gelatina, plastificantes hidrofóbicos e surfactantes naturais. 2010. 271 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria n° 398, de 30 de abril de 1999, que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, 1999.
- ARYA, N.; CHAKRABORTY, S.; DUBE, N.; KATTI, D. S. Electrospraying: a facile technique for synthesis of chitosan-based micro/nanospheres for drug delivery applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 88, n. 1, p. 17–31, 2009.
- ASSADPOUR, E.; MAHDI JAFARI, S. A systematic review on nanoencapsulation of food bioactive ingredients and nutraceuticals by various nanocarriers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, p. 1–23, 2018.
- BAKOWSKA-BARCZAK, A. M.; KOŁODZIEJCZYK, P.P., 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p.1301–1309, 2011.
- BAO, C.; JIANG, P.; CHAI, J.; JIANG, Y.; DAN, L.; BAO, W.; LIU, B.; LIU, B.; NORDE, W.; YUAN, L. The delivery of sensitive food bioactive ingredients: absorption mechanisms, influencing factors, encapsulation techniques and evaluation models. **Food Research International**, v. 120, p. 130–140, 2019.
- BATISTA, P.; CASTRO, P.; MADUREIRA, A. R.; SARMENTO, B.; PINTADO, M. Development and characterization of chitosan microparticles-in-films for buccal delivery of bioactive peptides. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2019.

BAZANA, M. T. **Desenvolvimento de géis-creme a partir do produto liofilizado contendo nanocápsulas de óleo de borragem e dipropionato de betametasona.** Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. p. 23 – 87, 2015.

BERTAN, L.C. **Desenvolvimento de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco.** 2003. 149 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BIESALSKI, H. K.; DRAGSTED, L. O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MÜLLER, M.; SCHRENK, D.; WALTER, P.; WEBER, D. Bioactive compounds: definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, n. 11–12, p. 1202–1205, 2009.

BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2. ed. Porto Alegre: Artmed. cap.23, p. 353-356. 2005.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, H. W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; VOORDE, S. E. C. G.; WIJNHOFEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.53, P. 52-62, 2008.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.

BRUNNER, T.; PIUSMANSER, P.; SPOHN, P.; GRASS, R.; LIMBACH, L.; BRUININK, A.; STARK W. In Vitro Citotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. **Environ Sci Technol**, v. 40, p. 4374-4381, 2006.

CANO, A.; HERNÁNDEZ-RUÍZ, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; ACOSTA, M.; ARNAO, M. B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 4, p. 196–202, 1998.

CERVERA, M. F.; HEINÄMÄKI, J.; RÄSÄNEN, M.; MAUNU, S. L.; KARJALAINEN, M.; COSTA, O. M. N.; COLARTE, A. I.; YLIRUUSI, J. Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 4, p. 401–408, 2004.

CHAN, J. Y. Y.; YUEN, A. C. Y.; CHAN, R. Y. K.; CHAN, S. W. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 5, p. 637–646, 2013.

CHAUDHRY, Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A.; CASTLE, L.; AITKEN, R.; WATKINS, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 25, n. 3, p. 241 – 258, 2008.

CHERNYSHOVA, M. P.; PRISTENSKIY, D. V.; LOZBIAKOVA, M. V.; CHALYK, N. E.; BANDALETOVA, T. Y.; PETYAEV, I. M. Systemic and skin-targeting beneficial effects of lycopene-enriched ice cream: a pilot study. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 14–25, 2019.

CHIESA, M.; GARG, J.; KAN, Y.T.; CHEN, G. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, Oxford. v. 1, n. 2, p. 67-72, 2008.

CHIU, C. Y.; FENG, S. A.; LIU, S. H.; CHIANG, M. T. Functional comparison for lipid metabolism and intestinal and fecal microflora enzyme activities between low molecular weight chitosan and chitosan oligosaccharide in high-fat-diet-fed rats. **Marine Drugs**, v. 15, n. 7, 2017.

CHU, Y-L.; HO, C-T.; CHUNG, J-G.; RAJASEKARAN, R.; LO, Y-C.; SHEEN, L-Y. Allicin induces anti-human liver cancer cells through the p53 gene modulating apoptosis and autophagy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 41, p. 9839–9848, 2013.

CRUZ, D. J. O.; UCKUM, M.F. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v.64, p.113-123, 2001.

CUNHA JÚNIOR, A. S. C.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p.385-391, 2003.

DARBASIZADEH, B.; MOTASADIZADEH, H.; FOROUGHI-NIA, B.; FARHADNEJAD, H. Tripolyphosphate-crosslinked chitosan/poly (ethylene oxide) electrospun nanofibrous mats as a floating gastro-retentive delivery system for ranitidine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 153, p. 63–75, 2018.

DE KRUIF CG, WEINBRECK F, Dd VRIES R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* v. 9, n. 5, p. 340–349, 2007.

DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. 122-128, 2004.

DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food and Function**, v. 6, n. 4, p. 1035–1052, 2015.

DOTTO, G. L.; CAMPANA-FILHO, S. P.; PINTO, L. A. A. **Frontiers in biomaterials: chitosan based materials and its applications**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2017.

DOTTO, G. L.; SOUZA, V. C.; MOURA, J. M.; MOURA, C. M.; PINTO, L. A. A. Influence of drying techniques on the characteristics of chitosan and the quality of biopolymer films. **Drying Technology**, v. 29, n. 15, p. 1784–1791, 2011.

EGYDIO, J. A.; MORAES, Â. M.; ROSA, P. T. V. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato juice and characterization of its antioxidation activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 2, p. 159–164, 2010.

ESQUERDO, V. M.; SILVA, P. P.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Nanoemulsions from unsaturated fatty acids concentrates of carp oil using chitosan, gelatin, and their blends as wall materials. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, n. 2, p. 17000240,

2018.

ETC GROUP. A Invasão Invisível do Campo: O Impacto das Nanotecnologias na Alimentação e na Agricultura. Tradução José F. Pedroso. 2004. Disponível em: <http://www.etcgroup.org/upload/publication/531/02/ivasaoformateada.pdf>.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628–647, 2013.

FARIAS, B. S.; GRUNDMANN, D. D. R.; RIZZI, F. Z.; MARTINS, N. S. S.; JUNIOR, T. R. S. C.; PINTO, L. A. A. Production of low molecular weight chitosan by acid and oxidative pathways: effect on physicochemical properties. **Food Research International**, v. 123, p. 88–94, 2019.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHMLE, A. Nanoemulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53–58, 2004.

FERNANDES, S. S.; COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods. In: **Bioactive Compounds**, 2019. cap. 7.

FORMARIZ, T. P. Incorporação da doxorubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa in vitro através de culturas de células. Dissertação (Mestrado) - **Departamento de Ciências Farmacêuticas**, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2004.

FU, Y.; KAO, W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429–444, 2010.

FUJISAWA, H.; SUMA, K.; ORIGUCHI, K.; KUMAGAI, H.; SEKI, T.; ARIGA, T. Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 4229–4235, 2008.

GALED, G.; MIRALLES, B.; PAÑOS, I.; SANTIAGO, A.; HERAS, A. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: influence of the source of chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 4, p. 316–320, 2005.

GALINDO-RODRIGUEZ S.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 8, p. 1428–1439. 2004.

GALLEGO, R.; BUENO, M.; HERRERO, M. Sub- and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae – an update. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 198–213, 2019.

GARCÍA, M.; FORBE, T.; GONZALES, E. Potenciais aplicações da nanotecnologia no setor agroalimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, n. 3, p. 573-581. 2010.

GEANKOPLIS, C. J. **Procesos de transporte y operaciones unitarias**. Ciudad Del México: Compañía Editorial Continental, 1998.

GHEONEA (DIMA), I.; APRODU, I.; CÎRCIUMARU, A.; RÂPEANU, G.; BAHRIM, G. E.; STANCIUC, N. Microencapsulation of lycopene from tomatoes peels by complex coacervation and freeze-drying: Evidences on phytochemical profile, stability and food applications. **Journal of Food Engineering**, v. 288, 2021.

GÓMEZ-GUILLÉN M.C.; GIMÉNEZ B.; LÓPEZ-CABALLERO M.E.; MONTEIRO P.M. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827. 2011.

GRABOWSKA, M.; WAWRZYNIAK, D.; ROLLE, K.; CHOMCZYNSKI, P.; OZIEWICZ, S.; JURGA, S.; BARCISZEWSKI, J. Let food be your medicine: nutraceutical properties of lycopene. **Food and Function**, v. 10, n. 6, p. 3090–3102, 2019.

GUO, N., SUN, J., ZHANG, Z., & MAO, X. Recovery of Chitin and Protein from Shrimp Head Waste by Endogenous Enzyme Autolysis and Fermentation. **Journal of Ocean University of China**, v. 18, n. 3, p. 719–726. 2019.

HA, H. K.; KIM, J. W.; LEE, M. R.; LEE, W. J. Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/ β -lactoglobulin nanoparticle. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 82–90, 2013.

HA, T. V. A.; KIM, S.; CHOI, Y.; KWAK, H. S.; LEE, S. J.; WEN, J.; OEY, I.; KO, S. Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. **Food Chemistry**, v. 178, p. 115–121, 2015.

HAMAD, A. F.; HAN, J. H.; KIM, B. C.; RATHER, I. A. The inter twine of nanotechnology with the food industry. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 27–30, 2018.

HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 117–131, 2007.

HATAMI, T.; MEIRELES, M. A. A.; CIFTCI, O. N. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene from tomato processing by-products: mathematical modeling and optimization. **Journal of Food Engineering**, v. 241, p. 18–25, 2019.

HOSSAIN, M. S.; IQBAL, A. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. **Journal of Bangladesh Agricultural University**, v. 12, n. 1, p. 153–160, 2014.

HUSSAIN, S.; HESS, K.; GEARHART, J.; GEISS, K.; SCHLAGER, J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicol in Vitro**, v. 19, p. 975–983, 2005.

JAIN, A.; SHARMA, G.; GHOSHAL, G.; KESHARWANI, P.; SINGH, B.; SHIVHARE, U. S.; KATARE, O. P. Lycopene loaded whey protein isolate nanoparticles: an innovative endeavor for enhanced bioavailability of lycopene and anti-cancer activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 546, n. 1–2, p. 97–105, 2018.

JIANG, Y.; WANG, X.; DONG, S.; LI, Y., YU C. Application and study of lycopene. **Chinese Journal of Disease and Control Prevention**, v. 12, n. 1, p. 66-69, 2008.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 457–463, 2003.

KAPADNIS, G.; DEY, A.; DANDEKAR, P.; JAIN, R. Effect of degree of deacetylation on solubility of low-molecular-weight chitosan produced via enzymatic breakdown of chitosan. **Polymer International**, v. 68, n. 6, p. 1054–1063, 2019.

KASAAI, M. R.; ARUL, J.; CHARLET, G. Fragmentation of chitosan by acids. **The Scientific World Journal**, v. 2013.

KOFUGI, K.; QIAN, C. J.; NISHIMURA, M.; SUGIYAMA, I.; MURATA, Y.; KAWASHIMA, S. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 2784–2791, 2005.

KÖSE, M. D.; BAYRAKTAR, O.; HEINZ, Ö. K. **Application of complex coacervates in controlled delivery**. Design and Development of New Nanocarriers. 2018. Cap. 13.

KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

LEMOS, Y. P.; MARIANO MARFIL, P. H.; NICOLETTI, V. R. Particle size characteristics of buriti oil microcapsules produced by gelatin-sodium alginate complex coacervation: effect of stirring speed. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 1438–1447, 2017.

LILIA, M. L.; JUAN, R. R.; DAVID, R. V.; ANABEL, L. O. Changes in physical properties and relations with allicin degradation during convective drying of garlic. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 3, p. 1227–1232, 2017.

LIZARDI-MENDOZA, J.; ARGÜELLES MONAL, W. M.; GOYCOOLEA VALENCIA, F. M. **Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan**. Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities. 2016. Cap 1

MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; SIMON, M.; BI, D.; KISSEL, T. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 281, n. 1–2, p. 45–54, 2004.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B., CASTILLEJO, N., & ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. (2019). Effect of fresh-cut apples fortification with lycopene microspheres, revalorized from tomato by-products, during shelf life. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, 2019.

MASON, T.G., WILKING, J.N., MELESON, K., CHANG, C.B., GRAVES, S.M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **J. Phys. Condens. Matter**, v. 18, p. 635-666. 2006.

MOURA, J. M.; FARIAS, B. S.; RODRIGUES, D. A. S.; MOURA, C. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of chitosan with different characteristics and its application for

biofilms production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, n. 4, p. 470–477, 2015.

NEDAMANI, R. A.; NEDAMANI, R. E.; SALIMI, A. The role of lycopene in human health as a natural colorant. **Nutrition and Food Science**, v. 49, n. 2, p. 284–298, 2019.

NOWAK, E.; LIVNEY, Y. D.; NIU, Z.; SINDH, H. Delivery of bioactives in food for optimal efficacy: what inspirations and insights can be gained from pharmaceuticals? **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 557–573, 2019.

ÖZMATARA, M. B. The Effect of Extraction Methods on Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities and Phytochemical Components of *Galium aparine* L. **Trakya University Journal of Natural Sciences**. v. 22, n. 1, p. 17-22, 2021.

QANDIL, A. M.; MARJI, T. J.; AL-TAANI, B. M.; KHALED, A. H.; BADWAN, A. A. Depolymerization of HMW into a predicted LMW chitosan and determination of the degree of deacetylation to guarantee its quality for research use. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 9, n. 2, p. 51–63, 2018.

RAJABI, H.; JAFARI, S. M.; RAJABZADEH, G.; SARFARAZI, M.; SEDAGHATI, S. Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron bioactive components. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 578, p. 123-144, 2019.

REZAEI, A.; FATHI, M.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 146–162, 2019.

RIBEIRO, H. S.; AX, K.; SCHUBERT, H. Stability of Lycopene Emulsions in Food Systems. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2730 –2734, 2010.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RIVERA, M. C.; PINHEIRO, A. C.; BOURBON, A. I.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. C. Hollow chitosan/alginate nanocapsules for bioactive compound delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 95–102, 2015.

ROBERTS, G. A. F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscometric constants for chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 4, n. 6, p. 374–377, 1982.

ROCO, M.C., BAINBRIDGE, W. Societal implications of nanoscience and nanotechnology: Maximizing human benefit. **Journal of Nanoparticle Research**, v7, p.1–13. 2015.

RYBAK, M. E.; CALVEY, E. M.; HARNLY, J. M. Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 682–687, 2004.

SALEHI, B.; ZUCCA, P.; ORHAN, I. E.; AZZINI, E.; ADETUNJI, C. O.; MOHAMMED, S. A.; BANERJEE, S. K.; SHAROPOV, F.; RIGANO, D.; SHARIFI-RAD, J.; ARMSTRONG,

L.; MARTORELL, M.; SUREDA, A.; MARTINS, N.; SELAMOGLU, Z.; AHMAD, Z. Allicin and health: a comprehensive review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 502–516, 2019.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, MA. Nanoscale materials development a food industry perspective. **Trends Food Sci. Tech**, v.17, n. 10, p. 547–556. 2006.

SANTERAMO, F. G.; CARLUCCI, L.; DE DEVITIIS, B.; SECCIA, A.; STASI, A.; VISCECCHIA, R.; NARDONE, G. Emerging trends in European food, diets and food industry. **Food Research International**, v. 104, October 2017, p. 39–47, 2018.

SANTOS, P. P.; ANDRADE, L. A.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. O. Nanoencapsulation of carotenoids: a focus on different delivery systems and evaluation parameters. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 10, p. 3851–3860, 2018.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; YOGA LATHA, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2011.

SCHWUGER, M.J.; SCHOMÄCKER, R. Microemulsions in Technical Processes. **Chemical Review**, v. 95, n. 4, p.849-864, 1995.

SCOTT, N.; CHEN, H. A National Planning Workshop: Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. **National Planning Workshop**, November 18-19, Washington, DC Washington. P. 29. 2002.

SCOTT, N. R. Nanoscience in Veterinary Medicine. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 31, n. 1, p. 139-144, 2007.

SERRA, L.; DOMÉNECH, J.; PEPPAS, N. A. Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. **Biomaterials**, v. 27, n. 31, p. 5440–5451, 2006.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, p. 24- 32, 2010

SHARIFI, F.; HADIZADEH, F.; SADEGHI, F.; MOSAVIAN, H. M. T.; ZAREI, C. Process optimization, physical properties and environmental stability of an α -tocopherol nanocapsule preparation using complex coacervation method and full factorial design. **Chemical Engineering Communications**, v. 203, n. 1, p. 64–74, 2014.

SHISHIR, M. R. I.; XIE, L.; SUN, C.; ZHENG, X.; CHEN, W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 34–60, 2018.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R., DAMASCENO, B.P.G.L., MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p.125-131, 2010.

SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

SILVA, R.S.G.; BANDEIRA, S.F.; PETRY, F.C.; PINTO, L.A.A. Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. **Ciência Rural**, vol. 41, n. 5, p. 904-909, mai. 2011.

SINGH, T.; SHUKLA, S.; KUMAR, P.; WAHLA, V.; BAJPAI, V. K.; RATHER, I. A. Application of nanotechnology in food science: perception and overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–7, 2017.

SINGH, K.; VINGKAR, S. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 347, p. 136-143, 2008.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456–467, 2008.

SOUZA, A. L. R.; HIDALGO-CHÁVEZ, D. W.; PONTES, S. M.; GOMES, F. S.; CABRAL, L. M. C.; TONON, R. V. Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 286–292, 2018.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 41–53, 2013.

SULLIVAN, D. J.; CRUZ-ROMERO, M.; COLLINS, T.; CUMMINS, E.; KERRY, J. P.; MORRIS, M. A. Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 355–364, 2018.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TAVAKOLIPOUR, H. Extraction and evaluation of gelatin from silver carp waste. **World Journal of Fish and Marine Sciences**. Sabzevar, v. 3, n. 1, p. 10-15, 2011.

TOLSTOGUZOV V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids** v.17, n. 1, p. 1–23. 2003.

TRUCILLO. P. Drug Carriers: Classification, Administration, Release Profiles, and Industrial Approach. **Processes**. v. 9, p. 470. 2021.

TURGEON, SL.; SCHMITT, C.; SANCHEZ C. Protein – polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion Colloid & Interface Science** v.12, n. 4, p. 166–178. 2007.

WALIA, N.; DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; RAMALINGAM, C.; GANDHI, M. Methods for nanoemulsion and nanoencapsulation of food bioactives. **Environmental Chemistry**

Letters, n. 0123456789, p. 1-13, 2019.

WANG J, ZHOU G, CHEN C, YU H, WANG T, MA Y, JIA G, GAI Y, LI B, SUN J, LI Y, JIAO F, ZHANO Y, CHAI Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicology Letters**, v. 2. 2007.

WANG, Y.; LI, B.; ZHANG, X.; PENG, N.; MEI, Y.; LIANG, Y. Low molecular weight chitosan is an effective antifungal agent against *Botryosphaeria* sp. and preservative agent for pear (*Pyrus*) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1135–1143, 2017.

YEN, M.-T; YANG, J.-H; MAU, J.-L. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2. P, 840 – 844, (2008).

YEUNG, A. W. K.; MOCAN, A.; ATANASOV, A. G. Let food be thy medicine and medicine be thy food: A bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. **Food Chemistry**, v. 269, p. 455–465, 2018.

YOO, M.; LEE, S.; LEE, S.; SEOG, H.; SHIN, D. Validation of high performance liquid chromatography methods for determination of bioactive sulfur compounds in garlic bulbs. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 1619–1626, 2010.

YOUN, S. K; KIM, Y. J; AHN, D. H. Studies on Substitution Effect of Chitosan against Sodium Nitrite in Pork Sausage. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 5, p. 551 – 559, (2001)

YOUSEFI, M.; SHADNOUSH, M.; SOHRABVANDI, S.; KHORSHIDIAN, N.; MONTAZAVIAN, A. M. Encapsulation Systems for Delivery of Flavonoids: A Review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. v. 11, n. 6, p. 13934-13951, 2021.

YUNESSNIA, L. A.; SHAGHOLANI, H.; GHORBANI, M.; NIKPAY, A.; SOLEIMANI, L. M.; SOLTANI, M. Chitosan nanocapsule-mounted cellulose nanofibrils as nanoships for smart drug delivery systems and treatment of avian trichomoniasis. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 95, p. 290–299, 2018.