



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Aproveitamento de subproduto obtido após processamento de cenouras:  
extração de compostos fitoquímicos, encapsulação e aplicação em filmes  
biodegradáveis**

Bruno Stefani Esposto

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2021



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Aproveitamento de subproduto obtido após processamento de cenouras:  
extração de compostos fitoquímicos, encapsulação e aplicação em filmes  
biodegradáveis**

**Versão Corrigida**

Bruno Stefani Esposto

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**  
**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Milena Martelli Tosi

RIBEIRÃO PRETO - SP

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Esposto, Bruno Stefani

Aproveitamento de subproduto obtido após processamento de cenouras: extração de compostos fitoquímicos, encapsulação e aplicação em filmes biodegradáveis. Ribeirão Preto, 2021.

117 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Tosi, Milena Martelli.

1. Carotenoides. 2. Lipossoma. 3. Quitosana. 4. Gelificação iônica

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: ESPOSTO, Bruno Stefani

Título: Aproveitamento de subproduto obtido após processamento de cenouras: extração de compostos fitoquímicos, encapsulação e aplicação em filmes biodegradáveis

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Para Paulo e Sandra, minhas maiores inspirações*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo e Sandra, e ao meu irmão Danilo, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos. Obrigado por me apoiarem sempre e por acreditarem em mim. Amo vocês!

À minha orientadora, Milena Martelli Tosi, por todos os conhecimentos compartilhados e pela parceria de tantos anos. Obrigado por acreditar no meu potencial e por me fazer acreditar mais em mim mesmo.

À Prof<sup>a</sup> Delia Rita Tapia Blácido, pela coorientação, por ceder espaço em seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho e por contribuir no meu crescimento como pesquisador.

Aos meus colegas e técnicos dos laboratórios de Ribeirão Preto e de Pirassununga. Obrigado a todos que tive o prazer de conhecer pela ajuda, pela paciência e pela troca de conhecimentos, em especial ao Marcelo Thomazini e Larissa Tessaro pelas análises realizadas.

À Prof<sup>a</sup> Paula Jauregi, por ter me aceitado como aluno visitante na Universidade de Reading e por ter me auxiliado durante o intercâmbio na Inglaterra.

Ao Isaac Queiroz, por ser a pessoa que sempre me ajuda a manter a sanidade em momentos de desespero. Obrigado por me mostrar que a vida pode ser muito mais leve e por dividir a sua comigo.

À Natália Silva, por ter se tornado uma irmã. Obrigado pela amizade de vários anos e por me receber na sua casa. Obrigado por estar sempre disponível quando eu preciso e por ter me ajudado de tantas formas no desenvolvimento deste trabalho.

À Emelin Rodrigues, Gabriela Grassi e Jessica Barbieri pela amizade e momentos de descontração. Vou sentir faltas das nossas segundas-feiras.

À Letícia Moraes e Fernanda Morila pela companhia de tantos anos.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Química pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas (Processos 2019/05511-0 e 2019/22502-4).

## RESUMO

ESPOSTO, B. S. **Aproveitamento de subproduto obtido após processamento de cenouras: extração de compostos fitoquímicos, encapsulação e aplicação em filmes biodegradáveis.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O objetivo geral deste trabalho foi a encapsulação de compostos fitoquímicos extraídos do subproduto de cenoura para aplicação em filmes biodegradáveis de quitosana. Os compostos foram extraídos utilizando-se uma técnica assistida por ultrassom de ponteira em que etanol foi utilizado como solvente para a extração simultânea de compostos fenólicos totais (CFT) e carotenoides. A otimização do processo de extração foi realizada utilizando um planejamento experimental através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizando concentração de subproduto e tempo de ultrassom como variáveis independentes. O extrato obtido (E) na condição ótima foi utilizado para a co-encapsulação de CFT e carotenoides em lipossomas (L), em lipossomas recobertos com quitosana (LQ) ou em lipossomas recobertos com quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio (LQT). A co-encapsulação apresentou eficiências de encapsulação superiores a 75% para todos compostos estudados ( $\alpha$ -caroteno: 76%,  $\beta$ -caroteno: 79% e CFT: 86%) com distribuição polidispersa de tamanho de partículas e valores de potencial zeta positivos para LQ e LQT, indicando que os lipossomas foram recobertos pela quitosana. A estabilidade dos compostos encapsulados em relação à degradação foi estudada durante períodos de armazenagem ou em condições de altas temperaturas (40 e 70 °C). De modo geral, as partículas LQT foram mais eficientes na conservação de carotenoides e CFT. A adição de L e LQ em filmes de quitosana resultou em filmes com separação de fases bastante evidente, indicando que a aplicação destas partículas não foi bem sucedida possivelmente como consequência da aglomeração das partículas na matriz filmogênica. LQT foram adicionadas em três concentrações (50, 60 e 70%) e sua incorporação da matriz filmogênica de quitosana afetou significativamente as propriedades dos filmes quando comparados com o controle. Os filmes com ativos apresentaram propriedades interessantes como atividade antioxidante (AA) e propriedade de barreira à luz ultravioleta e visível, como consequência da presença de compostos fitoquímicos. Entretanto, foram menos brilhosos, menos resistentes, menos rígidos e mais alongáveis. Além disso, os filmes ativos também apresentaram teores mais altos de umidade, o que resultou em um aumento da solubilidade em água e na permeação ao vapor de água. Partículas LQT constituem um sistema eficaz na



encapsulação de extratos contendo compostos ativos polares e apolares e podem ser aplicadas como aditivo em matrizes de quitosana para obtenção de filmes ativos.

**Palavras-chave:** Carotenoides. Lipossoma. Quitosana. Gelificação iônica.

## ABSTRACT

ESPOSTO, B. S. **By-product recovery from carrot juice processing: extraction of phytochemical compounds, encapsulation and application in biodegradable films.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The main objective of this dissertation was the encapsulation of phytochemical compounds extracted from carrot by-product for the application in chitosan biodegradable films. The phytochemicals were extracted using an ultrasound-assisted technique in which ethanol was utilized as solvent for the simultaneous extraction of total phenolic compounds (CFT) and carotenoids. The optimization of the extraction process was performed using an experimental design with by-product concentration and ultrasound time as independent variables. The extract (E) obtained in the optimal condition was used for the co-encapsulation of CFT and carotenoids in liposomes (L), in liposomes coated with chitosan (LQ), or in liposomes coated with cross-linked chitosan (LQT). The co-encapsulation resulted in encapsulation efficiencies above 75% for all the compounds studied ( $\alpha$ -carotene: 76%,  $\beta$ -carotene: 79% and CFT: 86%) with a polydisperse distribution of particle size and positive zeta potential values for LQ and LQT, indicating that the liposomes were coated with chitosan. The stability of the encapsulated compounds was studied according to storage time or high temperatures condition (40 and 70 °C). In general, LQT particles were more efficient in preventing carotenoids and CFT from degradation. The addition of L and LQ in chitosan films resulted in films with evident phase separations, indicating that the application of these particles was not successful due to the particle agglomeration in the film matrix. LQT were added in three different concentrations (50, 60 and 70%) and their incorporation in the chitosan film matrix significantly affected the properties of the film when compared to the control. The active films had some interesting properties such as antioxidant activity and UV/vis light barrier as a result of the presence of phytochemicals. However, they were less resistant, less rigid and more stretchable. Besides, active films also showed higher values of moisture, which implied in an increase in the values of solubility in water and in water vapor permeability. LQT particles are an effective system for the encapsulation of extracts containing polar and non-polar compounds and they can be applied as additives in chitosan matrixes for the production of active films.

**Keywords:** Carotenoids. Liposome. Chitosan. Iontropic gelation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – Representação de (A) micela, (B) bicama lipídica e (C) lipossoma .....	35
<b>Figura 1.2</b> – Esquema de (A) quitossoma e (B) interação eletrostática entre grupos fosfato e grupos amino .....	37
<b>Figura 1.3</b> – Esquema proposto para a formação de TPP-quitossomas .....	40
<b>Figura 2.1</b> – Processamento de cenouras para obtenção de subproduto (SC).....	53
<b>Figura 2.2</b> – Diagrama de Pareto para extração de CFT .....	63
<b>Figura 2.3</b> – Diagramas de Pareto para extração de (A) CFT e (B) $\beta$ -caroteno.....	67
<b>Figura 2.4</b> – Superfície de resposta da concentração de $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$ SC) obtida através da extração assistida por ultrassom (2 a 30 min) em diferentes concentrações de SC (2 a 30%), com nível de significância de 5% .....	69
<b>Figura 3.1</b> – Fluxograma para produção de partículas para co-encapsulação de compostos fitoquímicos.....	78
<b>Figura 3.2</b> – Aspecto visual de (A) extrato e (B) suspensão de partículas durante a produção de TPP-quitossomas (LQT) para encapsulação do extrato.....	81
<b>Figura 3.3</b> – Imagens da microestrutura das partículas de (A) lipossomas, (B) quitossomas e (C) TPP-quitossomas .....	84
<b>Figura 3.4</b> – Espectros no infravermelho de controle (extrato + PBS) e partículas de lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) .....	85
<b>Figura 3.5</b> – Gráfico de distribuição de tamanhos de partículas de TPP-quitossomas (LQT) após 18 dias de armazenamento a 8° C, com três principais populações (D1, D2 e D3) .....	86
<b>Figura 3.6</b> – Variação de concentração de (A) $\alpha$ -caroteno e (B) $\beta$ -caroteno encapsulados em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) durante 14 dias....	89
<b>Figura 3.7</b> – Degradação de $\alpha$ -caroteno e $\beta$ -caroteno presentes no extrato etanólico (E) ou encapsulados em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) em temperaturas de 40°C ou 70°C durante 90 minutos .....	90
<b>Figura 3.8</b> – Degradação de CFT presentes no extrato etanólico (E) ou encapsulados em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) em temperaturas de 40°C ou 70°C durante 90 minutos.....	91

<b>Figura 4.1</b> – Filmes obtidos através da adição de (A) extrato não encapsulado (F-E 50), (B) extrato encapsulado em L (F-L 50), (C) extrato encapsulado em LQ (F-LQ 50) ou (D) extrato encapsulado em LQT (F-LQT 50).....	102
<b>Figura 4.2</b> – Aspecto visual dos filmes de quitosana produzidos sem a adição de partículas (F-Q) ou com adição de partículas encapsulando compostos ativos nas concentrações de 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica).....	103
<b>Figura 4.3</b> – Micrografias (MEV) representativas da microestrutura dos filmes (superfície e seção transversal) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica) .....	104
<b>Figura 4.4</b> – Imagens (AFM) representativas da microestrutura dos filmes (topografia em 3D e 2D) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica) .....	106
<b>Figura 4.5</b> – Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos filmes de quitosana sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica) .....	107
<b>Figura 4.6</b> – Espectroscopia UV/visível de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica).....	112
<b>Figura 4.7</b> – Atividade antioxidante (AA), em mg equivalente de Trolox (TE)/g de filme seco produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica).....	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> – Composição nutricional de cenouras cruas em base úmida .....	27
<b>Tabela 1.2</b> – Classificação de compostos fenólicos .....	29
<b>Tabela 1.3</b> – Principais carotenoides e suas estruturas .....	31
<b>Tabela 1.4</b> – Estudos recentes de extração assistida por ultrassom de resíduos agroindustriais .....	33
<b>Tabela 1.5</b> – Encapsulação de compostos fitoquímicos em lipossomas e quitossomas .....	39
<b>Tabela 1.6</b> – Aplicação de sistemas de encapsulação em matrizes poliméricas para obtenção de filmes ativos .....	43
<b>Tabela 2.1</b> – Matriz do planejamento experimental para extração de Compostos Fenólicos Totais (CFT) .....	57
<b>Tabela 2.2</b> – Matriz do planejamento experimental para extração de carotenoides .....	58
<b>Tabela 2.3</b> – Composição de subproduto (SC) e folhas (FC) das cenouras utilizadas, em base úmida (g/100g) .....	60
<b>Tabela 2.4</b> – Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFT) a partir da extração exaustiva utilizado três solventes: água, metanol e etanol, realizada a partir do resíduo seco e úmido. Os valores foram expressos em $\mu\text{g/g}$ SC, em base seca.....	61
<b>Tabela 2.5</b> – Condições experimentais e teores de Compostos Fenólicos Totais (CFT) extraídos do subproduto de cenoura (SC), em base úmida, utilizando-se etanol (EtOH) como solvente .....	62
<b>Tabela 2.6</b> – Coeficiente de regressão e análise de variância (ANOVA) para CFT.....	64
<b>Tabela 2.7</b> – Teores de CFT e $\beta$ -caroteno extraídos do subproduto de cenoura (SC), em base úmida, através de planejamento experimental variando-se concentração de SC e tempo de ultrassom em minutos .....	65
<b>Tabela 2.8</b> – Coeficiente de regressão e análise de variância (ANOVA) para CFT.....	68
<b>Tabela 2.9</b> – Valores experimentais e preditos para otimização de extração de $\beta$ -caroteno em $\mu\text{g/g}$ SC, em base úmida.....	70
<b>Tabela 2.10</b> – Extração e quantificação de CFT e carotenoides em função do tempo de ultrassom (2 a 16 min) por grama de SC em base úmida .....	71
<b>Tabela 3.1</b> – Valores de eficiência de encapsulação (EE) de compostos fitoquímicos (carotenoides e compostos fenólicos) em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) .....	83

<b>Tabela 3.2</b> – Valores de tamanho de partícula e potencial zeta de lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) durante período de 25 dias .....	87
<b>Tabela 4.1</b> – Rugosidade média ( $R_a$ , em nm) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica).....	105
<b>Tabela 4.2</b> – Valores de brilho a 60° de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica).....	108
<b>Tabela 4.3</b> – Valores de espessura, tensão, alongação e módulo de Young (MY) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica).....	109
<b>Tabela 4.4</b> – Valores de umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica) .....	111

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- AA – Atividade antioxidante
- ABTS – 2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina)-6-ácido sulfônico
- AFM – Microscopia de força atômica
- AH – cido hidroxicinâmico
- ANOVA – Análise de variância simples
- AOAC – *Association of Official Analytical Chemistry*
- ASTM – *American Society for Testing and Materials*
- CFT – Compostos fenólicos totais
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional
- DLS – Espalhamento de luz dinâmico
- DR – Desvio relativo
- E – Extrato etanólico de subproduto de cenoura
- EE – Eficiência de encapsulação
- EtOH – Etanol
- FC – Folhas de cenoura
- F-LQT – Filme de quitosana com partículas LQT encapsulando compostos fitoquímicos
- F-Q – Filme de quitosana
- FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- GAE – Equivalente cido gálico
- GRAS – Geralmente reconhecido como seguro
- GT – Glutaciona
- L – Lipossomas
- LQ – Lipossomas recobertos com quitosana
- LQT – Lipossomas recobertos com quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio
- MEV – Microscopia eletrnica da varredura
- MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
- MY – Módulo de Young
- P90G – Fosfolipídios PHOSPHOLIPON® 90 G
- PBS – Solução tampão fosfato
- PVA – Permeabilidade ao vapor de gua
- PVOH – lcool polivinílico

PZ – Potencial zeta

SC – Subproduto de cenoura

t – tempo

TE – Equivalente Trolox

TPP – Tripolifosfato de sódio

UATR – *Universal Attenuator Total Reflectance*

USP – Universidade de São Paulo

UV – Ultravioleta

VB – Vitamina B9

VC – Vitamina C



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
REFERÊNCIAS .....	23
<b>CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
1.1 Cenoura ( <i>Daucus carota L.</i> ) .....	26
1.2 Compostos fitoquímicos.....	28
1.2.1 Compostos fenólicos .....	28
1.2.2 Carotenoides .....	30
1.2.3 Extração de fitoquímicos a partir de resíduos agroindustriais.....	31
1.2.3.1 Extração assistida por ultrassom .....	32
1.3 Encapsulação .....	34
1.3.1 Lipossomas .....	34
1.3.2 Quitossomas e TPP-quitossomas .....	37
1.4 Filmes biodegradáveis.....	41
REFERÊNCIAS .....	44
<b>CAPÍTULO 2. OBTENÇÃO DE SUBPRODUTO DE CENOURA E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS</b> .....	<b>50</b>
2.1 Introdução.....	51
2.2 Material e métodos.....	52
2.2.1 Material .....	52
2.2.2 Processamento de cenouras e obtenção de subproduto.....	52
2.2.3 Caracterização dos resíduos de cenoura.....	53
2.1.3.1 Umidade.....	53
2.1.3.2 Cinzas .....	54
2.1.3.3 Proteína bruta.....	54
2.1.3.4 Fibra bruta.....	54
2.1.3.5 Lipídeos .....	54
2.1.3.6 Carboidratos.....	55
2.2.4 Extração e quantificação de compostos fitoquímicos .....	55
2.1.4.1 Compostos fenólicos .....	56
2.1.4.2 Carotenoides .....	57
2.2.5 Análises estatísticas.....	59
2.3 Resultados e discussão .....	59
2.3.1 Processamento de cenoura e caracterização de resíduos.....	59

2.3.2 Extração e quantificação de compostos fitoquímicos .....	60
2.3.2.1 Planejamento experimental.....	62
2.3.2.2 Otimização da extração de $\beta$ -caroteno .....	70
2.3.2.3 Cinética de extração .....	71
2.3 Conclusão .....	72
REFERÊNCIAS .....	73

**CAPÍTULO 3. ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS DE SUBPRODUTO DE CENOURA EM LIPOSSOMAS, QUITOSSOMAS E TPP-QUITOSSOMAS..... 75**

3.1 Introdução.....	76
3.2 Material e métodos.....	77
3.2.1 Material .....	77
3.2.2 Encapsulação do extrato.....	77
3.2.2.1 Eficiência de encapsulação .....	79
3.2.3 Caracterização das partículas.....	79
3.2.3.1 Morfologia .....	79
3.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	80
3.2.3.3 Tamanho de partículas e potencial zeta.....	80
3.2.3.4 Estabilidade dos compostos ativos.....	80
3.2.4 Análises estatísticas.....	81
3.3 Resultados e discussão .....	81
3.3.1 Encapsulação do extrato.....	81
3.3.1.1 Eficiência de encapsulação .....	81
3.3.2 Caracterização das partículas.....	83
3.3.2.1 Morfologia .....	83
3.3.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier .....	84
3.3.2.3 Tamanho de partículas e potencial zeta.....	86
3.3.2.4 Estabilidade dos compostos ativos.....	88
3.4 Conclusão .....	91
REFERÊNCIAS .....	93

**CAPÍTULO 4. ELABORAÇÃO DE FILMES ATIVOS DE QUITOSANA CONTENDO COMPOSTOS FITOQUÍMICOS ENCAPSULADOS EM TPP-QUITOSSOMAS ..... 95**

4.1 Introdução.....	96
4.2 Material e métodos.....	97
4.2.1 Material .....	97

4.2.2	Elaboração dos filmes a base de quitosana contendo compostos fitoquímicos encapsulados .....	97
4.2.3	Caracterização dos filmes ativos.....	98
4.2.3.1	Morfologia .....	98
4.2.3.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) ...	98
4.2.3.3	Brilho.....	99
4.2.3.4	Espessura .....	99
4.2.3.5	Propriedades mecânicas.....	99
4.2.3.6	Umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água.....	99
4.2.3.7	Propriedades de barreira à luz UV/visível.....	100
4.2.3.8	Atividade antioxidante.....	101
4.2.4	Análises estatísticas.....	101
4.3	Resultados e discussão .....	101
4.3.1	Elaboração dos filmes biodegradáveis .....	101
4.3.2	Caracterização dos filmes.....	103
4.3.2.1	Morfologia .....	103
4.3.2.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .	107
4.3.2.3	Brilho.....	108
4.3.2.4	Propriedades mecânicas.....	108
4.3.2.5	Umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água.....	110
4.3.2.6	Propriedades de barreira à luz UV/Visível .....	111
4.3.2.7	Atividade antioxidante.....	113
4.4	Conclusão .....	114
	REFERÊNCIAS .....	115
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>117</b>

## INTRODUÇÃO

Os desperdícios provenientes da indústria de processamento de alimentos é estimado em cerca de 1/3 das partes comestíveis de alimentos produzidos para consumo humano, o que corresponde a cerca de 1,3 bilhões de toneladas por ano (FAO, 2011). Assim, o desenvolvimento e o estabelecimento de práticas de gerenciamento de subprodutos são fundamentais para contornar estes desperdícios. Sabe-se que frutas, hortaliças e seus subprodutos contêm uma variedade de compostos valiosos, incluindo hidratos de carbono (por exemplo: fibra alimentar, oligossacáridos) e compostos aromáticos e fitoquímicos (por exemplo: polifenóis, glucosinolatos e carotenoides).

A produção mundial de cenouras e nabos foi estimada em quase 44,8 milhões de toneladas em 2019 (FAO, 2021), sendo a cenoura uma das hortaliças mais consumidas no mundo, composta basicamente de 86-89% de água, 0,9% de proteínas, 0,2% de lipídeos, 10,6% de carboidratos, 1,2% de fibras e 1,1 % de cinzas, além de minerais, carotenoides (5,33 mg/100 g), tiamina (0,04 mg/100 g), riboflavina (0,02 mg/100 g), niacina (0,2 mg/100 g) e vitamina C (4 mg/100 g) (SHARMA et al., 2012). As cascas de cenoura representam 11% da quantidade do peso fresco do vegetal e contêm 54,1% da quantidade de fenólicos totais, enquanto o tecido floema 39,5% e o tecido do xilema fornecem apenas 6,4% (SHARMA et al., 2012). Devido ao seu alto teor nutricional, os sucos à base de cenoura têm sido explorados pela indústria de alimentos, sendo comercializados principalmente em misturas com sucos de frutas (SHARMA; NAVNEET, 2018). Após o processamento dos sucos de cenoura, um subproduto é retido nas peneiras e podem ainda conter compostos ativos essenciais para a saúde, como carotenoides e compostos fenólicos. Estes compostos podem ser extraídos e usados como aditivos naturais na indústria farmacêutica ou de alimentos, exercendo propriedades antioxidantes, antimutagênicas e com potencial anticancerígeno (SHARMA et al., 2012).

A extração de compostos ativos a partir de vegetais é normalmente realizada com o auxílio de solventes orgânicos convencionais, tais como hexano, metanol, etanol (DAI; MUMPER, 2010), óleos vegetais (GOULA et al., 2017) ou ainda por extração supercrítica com CO<sub>2</sub> (DE ANDRADE LIMA; CHARALAMPOPOULOS; CHATZIFRAGKOU, 2018). O interesse pelo uso do etanol tem aumentado consideravelmente, principalmente por ser Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) e apresentar facilidade de uso, custo e eficiência (DAI; MUMPER, 2010). Entretanto, os processos convencionais são lentos e o uso de ultrassom na suspensão tende a melhorar a difusão dos componentes para o solvente

(GOULA et al., 2017; MERCADO-MERCADO et al., 2018), sendo este um dos processos utilizados neste trabalho.

O uso dos compostos ativos naturais na indústria de alimentos ou farmacêutica é limitado devido ao alto potencial de degradação destes compostos em função dos parâmetros de processos utilizados, como temperatura, luz, oxigênio, dentre outros. Uma alternativa que vem sendo muito explorada para proteger compostos ativos contra fatores externos é a micro/nanoencapsulação (MCCLEMENTS, 2015). A micro/nanoencapsulação é um conjunto de tecnologias e processos que envolve a aplicação de revestimentos em pequenas partículas sólidas, gotas de líquidos puros, soluções ou dispersões. Este procedimento é amplamente utilizado em diversos setores industriais como o farmacêutico, alimentício, químico e agrônomico. O componente ativo pode estar dissolvido, encapsulado ou adsorvido na matriz polimérica (BRAGA; OLIVEIRA, 2007).

A encapsulação de ingredientes funcionais permitiria sua incorporação em matrizes alimentícias ou farmacêuticas, resultando em novos produtos com benefícios para a saúde. Desta forma, com o intuito de evitar a degradação dos compostos ativos, bem como aumentar sua solubilidade em água e absorção pelo organismo, têm sido desenvolvidas técnicas de veiculação e micro/nanoencapsulação de compostos por meio de biopolímeros, tais como a quitosana (DE SOUZA SIMÕES et al., 2017).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, altamente organizado, composto por unidades de glucosamina ( $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose) e obtido por meio da desacetilação da quitina em meio alcalino. Este biopolímero tem como principais características a insolubilidade em meio alcalino e solventes orgânicos (fator limitante para sua utilização), as propriedades antibacterianas, a biodegradabilidade e a baixa toxicidade (DEVI; DUTTA, 2017).

As nanopartículas de quitosana podem ser obtidas por meio de gelificação iônica com tripolifosfato (TPP) de sódio, onde o TPP promove a coagulação da solução, pois os grupos amino (cátions) da quitosana ligam-se aos fosfatos (ânions) do TPP (JANES; ALONSO, 2003). As nanopartículas de quitosana têm sido estudadas e aplicadas em diversas áreas da medicina e dos alimentos. Chanphai e Tajmir-Riahi (2017) concluíram que as nanopartículas são eficazes no carreamento e encapsulamento de testosterona *in vitro*. Hao et al. (2017) observaram a maior estabilidade e capacidade antioxidante da quercetina nanoencapsulada e Dube et al. (2010) demonstraram a menor degradação de catequinas em meio alcalino também encapsuladas em nanopartículas de quitosana. Para realizar a encapsulação com a quitosana, além do processo de gelificação iônica, outros métodos podem ser utilizados, tais como: *spray drying*, a separação

por emulsão de fase, a coacervação simples e complexa e o recobrimento com solução (PENICHE et al., 2003).

Os lipossomas, por sua vez, são vesículas esféricas formadas por pelo menos uma bicamada concêntrica de fosfolipídios que se organizam espontaneamente ou por processos mecânicos em meio aquoso, como por exemplo por extrusão por membranas, por remoção de tensoativo ou injeção de etanol. Lipossomas multilamelares podem ser formados, bem como a co-encapsulação de dois ou mais componentes hidrofóbicos, como demonstrado por Chaves et al. (2018). Atualmente, os materiais nanohíbridos orgânicos e inorgânicos têm ganhado destaque nas áreas de pesquisa pois possuem propriedades multifuncionais como estabilidade, resistência, dureza, biodegradabilidade, condutividade elétrica, distribuição uniforme das partículas e baixa tendência a aglomeração, além de apresentarem baixo custo e grande potencial de reutilização (ALMASI; JAFARZADEH; MEHRYAR, 2018). A quitosana tem sido amplamente utilizada como biopolímero de cobertura de lipossomas para melhorar sua estabilidade, como revisado por Alavi et al. (2017), enquanto a associação de sistemas híbridos a base de lipossomas e quitosana reticulada produzida por gelificação iônica com adição de TPP (TPP-quitossomas) ainda é pouco estudada (CADDEO et al., 2016). Assim, um dos principais objetivos deste estudo foi produzir TPP-quitossomas e avaliar sua potencial aplicação na encapsulação de extratos de subprodutos de processamento de cenoura.

As partículas de TPP-quitossomas contendo compostos ativos podem ser aplicadas com diversos propósitos. Pode-se destacar a produção de filmes ativos, que são definidos como matrizes contendo compostos ativos que possuem características como atividades antioxidante ou antimicrobiana (OLIVEIRA FILHO et al., 2021). Na indústria de alimentos, por exemplo, os filmes ativos podem ser utilizados para manter a qualidade do produto durante sua vida de prateleira, enquanto que na indústria farmacêutica eles podem ser utilizados para a liberação controlada de fármacos.

Nos últimos anos, alternativas ambientalmente viáveis têm sido pesquisadas para a substituição de materiais plásticos derivados do petróleo, o que inclui a produção de plástico a partir de polímeros biodegradáveis como amidos e proteínas (SALGADO et al., 2015). Na indústrias de alimentos, a adição de compostos ativos às matrizes poliméricas é geralmente utilizada para tornar embalagens biodegradáveis de alimentos mais competitivas, já que apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana e são capazes de aumentar a vida de prateleira dos produtos, melhorando ainda seu aspecto nutricional se forem utilizadas como coberturas de alimentos (FABRA et al., 2018; GANIARI; CHOULITOU DI; OREOPOULOU, 2017; STOLL et al., 2019).

Dessa forma, ativos encapsulados em TPP-quitossomas pode ser adicionados em matrizes de quitosana para a obtenção de filmes ativos com melhores propriedades antioxidantes. A camada externa de quitosana que recobre os lipossomas pode contribuir para uma incorporação mais homogênea na matriz polimérica de filmes de quitosana, evitando problemas de compatibilidade e a formação de aglomerados, influenciando também nas propriedades mecânicas e de barreira dos compósitos.

## **OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho de Mestrado foi a encapsulação de compostos fitoquímicos extraídos do subproduto de processamento de cenoura em TPP-quitossomas para aplicação em filmes biodegradáveis. Os objetivos específicos estão discriminados a seguir:

- Otimizar a extração dos principais fitoquímicos dos subprodutos de cenoura, como carotenoides e compostos fenólicos, utilizando etanol como solvente com auxílio de ultrassom de ponteira;
- Encapsular compostos fitoquímicos extraídos do subproduto em lipossomas, quitossomas e TPP-quitossomas para fins de comparação;
- Quantificar e avaliar a estabilidade dos fitoquímicos encapsulados;
- Elaborar e caracterizar filmes biodegradáveis de quitosana com adição de compostos ativos encapsulados.

Considerando tais objetivos, este trabalho está dividido em quatro capítulos descritos a seguir:

**Capítulo 1:** apresenta uma revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados na pesquisa, incluindo a cenoura, os compostos fitoquímicos, a extração de compostos assistida por ultrassom, a encapsulação de ativos em lipossomas recobertos com quitosana e suas aplicações em filmes biodegradáveis.

**Capítulo 2:** aborda a obtenção do subproduto de cenoura através de seu processamento e o estudo da otimização de extração dos compostos fitoquímicos assistida por ultrassom utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

**Capítulo 3:** apresenta o estudo sobre a encapsulação do extrato de cenoura contendo compostos fitoquímicos (polifenóis e carotenoides) em lipossomas, quitossomas e TPP-quitossomas e suas devidas caracterizações.

**Capítulo 4:** descreve a aplicação das partículas contendo extrato encapsulado (em sua melhor condição) em matrizes poliméricas de quitosana para obtenção de filmes ativos.

## REFERÊNCIAS

- ALAVI, S.; HAERI, A.; DADASHZADEH, S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 991–1012, 2017.
- ALMASI, H.; JAFARZADEH, P.; MEHRYAR, L. Fabrication of novel nanohybrids by impregnation of CuO nanoparticles into bacterial cellulose and chitosan nanofibers: Characterization, antimicrobial and release properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 273–281, 15 abr. 2018.
- BRAGA, G. K.; OLIVEIRA, W. P. Manufacturing drug loaded chitosan microspheres by spray drying: Development, characterization, and potential use in dentistry. **Drying Technology**, v. 25, n. 2, p. 303–310, fev. 2007.
- CADDEO, C. et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 69–78, 2016.
- CHANPHAI, P.; TAJMIR-RIahi, H. A. Encapsulation of testosterone by chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 535–541, 1 maio 2017.
- CHAVES, M. A. et al. Structural characterization of multilamellar liposomes coencapsulating curcumin and vitamin D3. **Colloids and Surfaces A**, v. 549, p. 112–121, 2018.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.
- DE ANDRADE LIMA, M.; CHARALAMPOPOULOS, D.; CHATZIFRAGKOU, A. Optimisation and modelling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction process of carotenoids from carrot peels. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 94–102, 1 mar. 2018.
- DE SOUZA SIMÕES, L. et al. Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 23–45, 2017.
- DEVI, N.; DUTTA, J. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1897–1904, 1 nov. 2017.
- DUBE, A.; NICOLAZZO, J. A.; LARSON, I. Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 219–225, 9 out. 2010.
- FABRA, M. J. et al. Antiviral and antioxidant properties of active alginate edible films containing phenolic extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 96–103, 1 ago. 2018.
- FAO. **Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention**. Rome: [s.n.].
- FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: 24 mar. 2021.
- GANIARI, S.; CHOULITOUdi, E.; OREOPOULOU, V. Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 68, p. 70–82, 1 out. 2017.
- GOULA, A. M. et al. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 821–830, 2017.



- HAO, J. et al. Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 37–44, 1 nov. 2017.
- JANES, K. A.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 12, p. 2769–2776, 20 jun. 2003.
- KING, A. H. Encapsulation of Food Ingredients. In: SARA J. RISCH; GARY A. REINECCIUS (Eds.). . **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. [s.l: s.n.]. p. 26–39.
- MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle- and Microparticle-Based Delivery Systems**. Boca Raton, FL: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2015.
- MERCADO-MERCADO, G. et al. Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from mango (*Mangifera indica* L. ‘Ataulfo’) by-products on in vitro bioaccessibility. **Food Bioscience**, v. 21, p. 125–131, 2018.
- OLIVEIRA FILHO, J. G. DE et al. The potential of anthocyanins in smart, active, and bioactive eco-friendly polymer-based films: A review. **Food Research International**, v. 142, p. 110202, 1 abr. 2021.
- PENICHE, C. et al. **Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation**. Macromolecular Bioscience. **Anais...**John Wiley & Sons, Ltd, 15 out. 2003Disponível em: <[www.mbs-journal.de](http://www.mbs-journal.de)>. Acesso em: 7 jun. 2021
- SALGADO, P. R. et al. **Edible films and coatings containing bioactives****Current Opinion in Food Science**Elsevier Ltd, , 1 out. 2015.
- SHARMA, H. K.; NAVNEET, K. Utilization of Carrot Pomace. In: ANAL, A. K. (Ed.). . **By-Products and their Utilization**. [s.l: s.n.]. p. 17.
- SHARMA, K. D. et al. Chemical composition, functional properties and processing of carrot- A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 22–32, 2012.
- STOLL, L. et al. Poly(acid lactic) films with carotenoids extracts: Release study and effect on sunflower oil preservation. **Food Chemistry**, v. 281, p. 213–221, 30 maio 2019.

**CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1.1 Cenoura (*Daucus carota L.*)

A cenoura é um dos vegetais mais conhecidos no mundo, que teve uma produção mundial juntamente com nabos de aproximadamente 44,8 milhões de toneladas em 2019 (FAO, 2021). O cultivo de cenouras iniciou-se antes do século X na Europa, onde eram utilizadas para propósitos medicinais (NAGRAJ et al., 2020). Cenouras podem apresentar formatos cônicos, esféricos ou cilíndricos, a depender das condições de genótipo ou das condições climáticas durante o crescimento da raiz (ROSENFELD et al., 1997). Geralmente as raízes apresentam cores laranja, vermelha, roxa, branca ou amarela, sendo influenciadas por sua composição química (SHARMA; NAVNEET, 2018). Cenouras laranjas apresentam grandes quantidades de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, enquanto que cenouras amarelas e vermelhas são ricas em luteína e licopeno, respectivamente. Por sua vez, as antocianinas são as responsáveis pela coloração roxa das cenouras (AKHTAR et al., 2017). Além deste compostos, as cenouras também podem apresentar grandes quantidades de outros componentes bioativos e funcionais como fibras, vitaminas e minerais. Por esse motivo, são fontes de compostos benéficos à saúde e seu consumo têm aumentado nos últimos anos (SHARMA; NAVNEET, 2018).

Cenouras podem ser consumidas cruas ou ainda transformadas em produtos processados como concentrados, conservas e papinhas para bebês, ou comercializada em sua forma desidratada. Outro meio de comercialização comum das cenouras é sua conversão em suco que, por conter quantidades consideráveis de carotenoides, pode ser utilizado como corante natural em uma grande variedade de alimentos (MA et al., 2013; SHARMA et al., 2012).

Dados de composição química de cenouras cruas podem ser encontrados na Tabela 1.1 de acordo com dados relatados na literatura.

**Tabela 1.1** – Composição nutricional de cenouras cruas em base úmida

<b>Componentes</b>	<b>Unidade por 100 g</b>	<b>Quantidade</b>
Água	g	86 a 89
Carboidratos	g	6 a 10,6
Açúcares	g	4,74 a 5,6
Fibras	g	1,2 a 2,8
Proteínas	g	0,7 a 0,93
Lipídeos	g	0,24 a 0,5
Potássio	mg	240 a 320
Cálcio	mg	34 a 80
Sódio	mg	40 a 69
Fósforo	mg	25 a 53
Magnésio	mg	9 a 12
Ferro	mg	0,3 a 2,2
Zinco	mg	0,2 a 0,24
Carotenos	mg	5,33
Tiamina (Vitamina B1)	mg	0,04 a 0,066
Riboflavina (Vitamina B2)	mg	0,02 a 0,058
Niacina (Vitamina B3)	mg	0,2 a 0,983
Ácido ascórbico (Vitamina C)	mg	4 a 5,9

Fonte: Sharma e Navnett (2018); Sharma et al. (2012).

O processamento de cenouras para a extração do suco normalmente resulta em rendimentos relativamente baixos, o que gera uma grande quantidade de resíduos, incluindo subprodutos que ainda não possuem importância comercial economicamente competitiva. Os resíduos podem ser definidos como aquilo que não é aproveitado antes do processamento, como as folhas, enquanto que o subproduto consiste em um produto secundário obtido no durante a produção do produto principal (KUMAR, 2020). O subproduto de cenouras é normalmente produzido durante a extração do suco, que inclui as cascas e o restante das raízes que ficam no estado sólido (SHARMA; NAVNEET, 2018). Subprodutos de cenoura já foram utilizados para a produção de bolos, pães e biscoitos a fim melhorar seus valores nutricionais e funcionais, mas a aceitação de tais produtos pelos consumidores precisa ser muito bem avaliada, principalmente porque a qualidade sensorial pode ser afetada (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001). O subproduto de cenoura ainda pode conter compostos fitoquímicos como vitaminas, compostos

fenólicos e principalmente carotenoides, e diferentes meios de extração destes componentes surgem como uma alternativa interessante para a valorização de subprodutos agroindustriais provenientes da cenoura.

## **1.2 Compostos fitoquímicos**

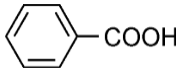
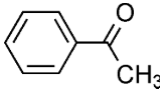
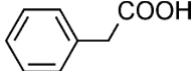
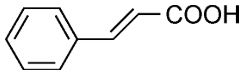
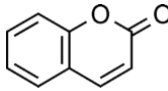
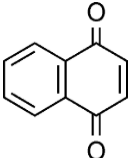
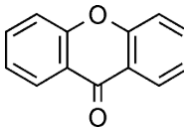
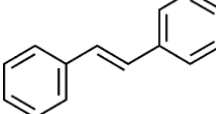
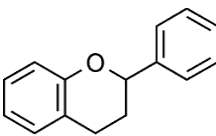
Compostos fitoquímicos, também conhecidos como fitonutrientes, são metabólitos secundários derivados de plantas com uma grande variedade de estruturas químicas que incluem compostos fenólicos, carotenoides, fitoestrogênios e terpenoides (AHMAD et al., 2021; KHAN et al., 2015). Os fitoquímicos apresentam características interessantes relacionadas à saúde humana, uma vez que são benéficos no controle de doenças cardíacas e cânceres, por exemplo (SHARMA et al., 2012). Tais efeitos positivos e benéficos são decorrentes de alguns mecanismos desencadeados por estes compostos que envolvem principalmente a eliminação direta de radicais livres sendo, portanto, considerados como agentes antioxidantes (AHMAD et al., 2021).

### **1.2.1 Compostos fenólicos**

Compostos fenólicos ou polifenóis são caracterizados por possuírem uma estrutura química que contém pelo menos um anel benzênico ao qual estão ligados um ou mais grupos hidroxila. Cerca de mais de 8 mil compostos pertencentes a esta classe existem na natureza, podendo ser classificados como flavonoides ou não flavonoides, incluindo ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; LUND, 2021). A classificação de compostos fenólicos pode ser feita através de seu número de átomos de carbono e da forma como eles são organizados, como pode ser observado na Tabela 1.2.

A grande maioria dos compostos fenólicos podem ser encontrados em plantas, incluindo frutas e vegetais (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Por esse motivo, alimentos e bebidas que passam por pouco processamento contêm altos teores de polifenóis. No entanto, alimentos processados são submetidos a diversas condições industriais (temperatura e pH, por exemplo) que podem causar a modificação da estrutura dos compostos fenólicos presentes através de reações que resultam na perda desses componentes (LUND, 2021).

**Tabela 1.2** – Classificação de compostos fenólicos

Esqueleto	Classificação	Estrutura básica
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ácido fenilacético	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinâmicos	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas	
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides	

Fonte: Crozier et al. (2009).

Compostos fenólicos também são amplamente estudados principalmente por apresentarem efeitos positivos no tratamento ou prevenção de doenças relacionadas à saúde humana, uma vez que possuem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticarcinogênicas (OLIVEIRA et al., 2021; RANI et al., 2021). Estudos recentes envolvendo estas propriedades incluem sua aplicação como ativos em doenças vasculares (OLIVEIRA et al., 2021), na síndrome do ovário policístico (MIHANFAR et al., 2021), osteoporose (BELLAVIA et al., 2021) e doenças degenerativas (MUKHERJEE; CHAKRABORTY, 2021). Além disso, compostos fenólicos também têm sido incorporados em alimentos e bebidas a fim de se obter produtos funcionais (KAN et al., 2020).

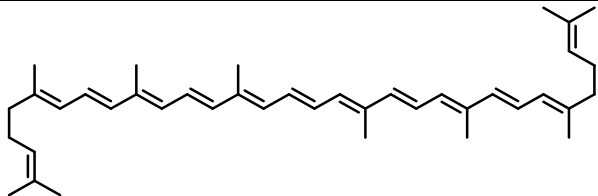
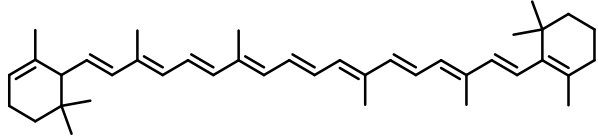
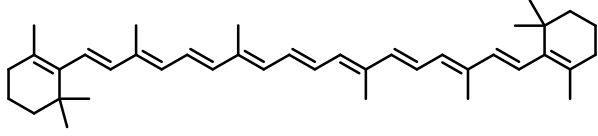
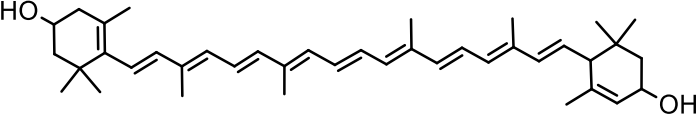
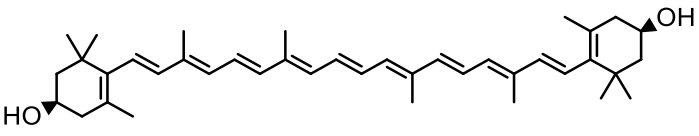
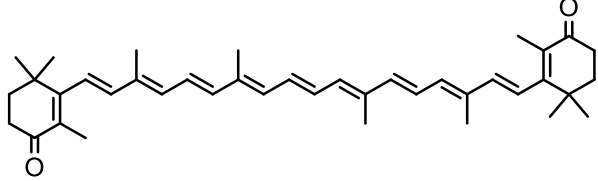
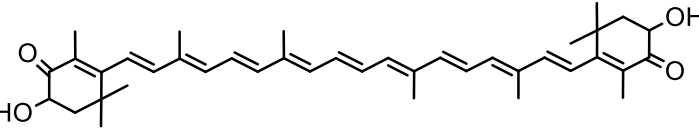
Os principais compostos fenólicos presentes nas cenouras são os ácidos clorogênicos, que podem ser encontrados nas cenouras laranjas, roxas, amarelas e brancas (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Além disso, outros 42 polifenóis conjugados foram identificados em cenouras recentemente, incluindo os ácidos cafeico, gálico, cítrico e málico (DONG et al., 2021).

### 1.2.2 Carotenoides

Os carotenoides são compostos apolares que constituem a principal classe de pigmentos naturais existentes devido à sua vasta distribuição, diversidade de estruturas e numerosas funções. Eles podem ser encontrados principalmente em plantas como frutas e hortaliças, mas microrganismos também podem ser considerados como fontes de carotenoides (OLIVER; PALOU, 2000; RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012). A estrutura dos carotenoides pode ser classificada em duas: (1) carotenos, onde só há a presença de átomos de carbono e hidrogênio, e (2) xantofilas, onde grupos substituintes que contêm átomos de oxigênio estão presentes. Além disso, os carotenoides também apresentam um sistema de duplas conjugadas em sua estrutura, o que confere características espectrofotométricas a estes compostos (OLIVER; PALOU, 2000). Carotenoides geralmente apresentam cores amarelas, laranjas ou vermelhas, mas podem adquirir cores verdes, roxas ou azuis quando são ligados a algumas proteínas (BRITTON et al., 1997). Exemplos de estruturas de carotenoides estão disponíveis na Tabela 1.3.

Carotenoides apresentam algumas propriedades interessantes, como a antioxidante e a fotoprotetora (GAO; LIGIA FOCSAN; KISPERS, 2020). Alguns carotenos, como o  $\beta$ -caroteno, são ainda provitamina A, o que significa que são convertidos a retinol (vitamina A) no organismo humano e são fundamentais para a saúde ocular. Outros efeitos protetivos de carotenoides também são amplamente estudados, incluindo sua capacidade contra doenças como câncer, doenças cardíacas, degeneração macular e várias doenças crônicas (BRITTON, 2020; OLIVER; PALOU, 2000). No entanto, seres humanos não são capazes de sintetizar carotenoides, e sua obtenção precisa ser feita através do consumo de alimentos naturais que contêm estes compostos (BRITTON, 2020). A cenoura, por exemplo, é um dos vegetais mais conhecidos como fontes de carotenoides, contendo principalmente  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e luteína (NICOLLE et al., 2004).

**Tabela 1.3 – Principais carotenoides e suas estruturas**

Classe	Composto	Estrutura
<b>Carotenos</b>	Licopeno	
	$\alpha$ -caroteno	
	$\beta$ -caroteno	
<b>Xantofilas</b>	Luteína	
	Zeaxantina	
	Cantaxantina	
	Astaxantina	

Fonte: autoria própria.

### 1.2.3 Extração de fitoquímicos a partir de resíduos agroindustriais

Frutas e hortaliças são altamente perecíveis e o processamento desses alimentos é amplamente utilizado para aumentar a vida de prateleira com o cuidado para manter suas qualidades nutricionais e sensoriais (FELLOWS, 2017). Apesar destes processos estarem cada vez mais eficientes, uma grande quantidade de resíduos ainda é gerada (TONINI; ALBIZZATI; ASTRUP, 2018). Assim, há também um grande interesse pelo aproveitamento e valorização de resíduos e subprodutos gerados pela agroindústria. Diversos estudos destacam que resíduos de



origem de alimentos naturais, como frutas e hortaliças, possuem uma quantidade considerável de compostos fitoquímicos que podem ser extraídos. Estudos mais recentes envolvem a extração de compostos fenólicos e carotenoides a partir de resíduos de café (MANASA; PADMANABHAN; ANU APPAIAH, 2021), tomate (NINČEVIĆ GRASSINO et al., 2020), romã (GOULA et al., 2017; SELVAKUMAR et al., 2021), acerola (SILVA et al., 2021), citrus (GÓMEZ-MEJÍA et al., 2019), entre outros. Depois de extraídos, estes compostos podem ainda ser utilizados na indústria farmacêutica ou de alimentos, como por exemplo na produção de alimentos funcionais (COMUNIAN; SILVA; SOUZA, 2021).

Os métodos de extração destes compostos variam, e os mais convencionais incluem a necessidade de processos como maceração e extrações líquido-líquido, o que implica na utilização de solventes orgânicos como metanol e acetona. Por este motivo, técnicas inovadoras para extração de compostos bioativos têm sido exploradas a fim de possibilitar alternativas verdes, em que solventes ambientalmente amigáveis (como óleos vegetais) podem ser usados (GOULA et al., 2017). Dentre as novas técnicas verdes de extração, destacam-se a extração supercrítica, extração com líquido pressurizado, extração assistida por micro-ondas, extração assistida por enzima e a extração assistida por ultrassom, que podem ser usadas individualmente ou combinadas (MARIĆ et al., 2018; PICOT-ALLAIN et al., 2021).

### **1.2.3.1 Extração assistida por ultrassom**

A extração assistida por ultrassom tem como fundamento o princípio de cavitação. Em uma alta intensidade, as ondas de ultrassom são capazes de formar bolhas de cavitação que, ao colapsarem, formam jatos de alta velocidade. Tais jatos são então os responsáveis por causar rupturas das estruturas celulares do resíduo de origem vegetal e facilitar a penetração do solvente, possibilitando a extração de compostos fitoquímicos (PICOT-ALLAIN et al., 2021). Além disso, as bolhas formadas também liberam energia na forma de calor ao se romperem, o que aumenta a transferência de massa. No geral, a extração assistida por ultrassom baseia-se nos fenômenos térmicos e mecânicos que são responsáveis por reduzir os tamanhos das partículas, degradar a matriz vegetal e causar a ruptura da parede celular sem alterar a estrutura e função dos extratos obtidos (WEN et al., 2018). Apesar disso, um cuidado especial deve ser tomado ao extrair compostos fitoquímicos, uma vez que pode ocorrer o superaquecimento do meio e conseqüentemente causar a degradação do extrato.

Dentre as vantagens do uso da extração assistida por ultrassom em comparação com os métodos tradicionais estão a possibilidade da utilização de solventes menos agressivos ao meio

ambiente, como óleos vegetais ou o etanol, que é considerado seguro para a saúde humana (CHUTIA; MAHANTA, 2021; GOULA et al., 2017). Outras vantagens incluem o baixo consumo de energia e de solvente, altos rendimentos de recuperação de compostos ativos e tempos de extração reduzidos (PICOT-ALLAIN et al., 2021). A Tabela 1.4 apresenta um resumo de estudos recentes que utilizam ultrassom na extração de compostos fitoquímicos a partir de resíduos agroindustriais.

**Tabela 1.4** – Estudos recentes de extração assistida por ultrassom de resíduos agroindustriais

<b>Resíduo</b>	<b>Composto extraído</b>	<b>Referência</b>
Acerola	Polifenóis e vitamina C	Silva et al. (2021)
Camarão	Astaxantina	Chandra Roy et al. (2021)
Citrus	Limoneno	Khandare et al. (2021)
Maracujá	Carotenoides	Chutia e Mahanta (2021)
Romã	Polifenóis	Selvakumar et al. (2021)
	Carotenoides	Goula et al (2017)
Noz	Pectina	Asgari et al. (2020)
Pêssego	Polifenóis	Plazzotta et al. (2020)
Tomate	Polifenóis	Ninčević Grassino et al. (2020)
	Pectina	Sengar et al. (2020)
	Licopeno	Rahimi e Mikani (2019)
Melão	Carotenoides	Benmeziane et al. (2018)
Banana	Pectina	Maran et al. (2017)

Fonte: autoria própria.

Apesar de apresentarem características interessantes para os seres humanos, compostos fitoquímicos como polifenóis e carotenoides são facilmente degradados quando são submetidos a condições extremas, incluindo o contato com a luz, altas temperaturas ou oxigênio, principalmente por causa da presença de duplas conjugadas em suas estruturas (COMUNIAN; SILVA; SOUZA, 2021). A incorporação de compostos fitoquímicos como ingredientes bioativos em matrizes alimentícias visando a produção de alimentos funcionais também encontra alguns obstáculos, principalmente relacionados à solubilidade destes compostos. Por exemplo, ingredientes hidrofílicos como polifenóis não podem ser facilmente dispersados em alimentos gordurosos como manteigas e margarinas, enquanto que ingredientes hidrofóbicos como carotenoides apresentam pouca afinidade com produtos aquosos como refrigerantes e

iogurtes (MCCLEMENTS, 2015). Além disso, estes bioativos podem ainda ser degradados no trato gastrointestinal quando ingeridos por seres humanos, o que impede que sejam absorvidos no intestino (DE SOUZA SIMÕES et al., 2017). Dessa forma, seu uso ou aplicação nas indústrias farmacêuticas e alimentícias torna-se limitado.

### **1.3 Encapsulação**

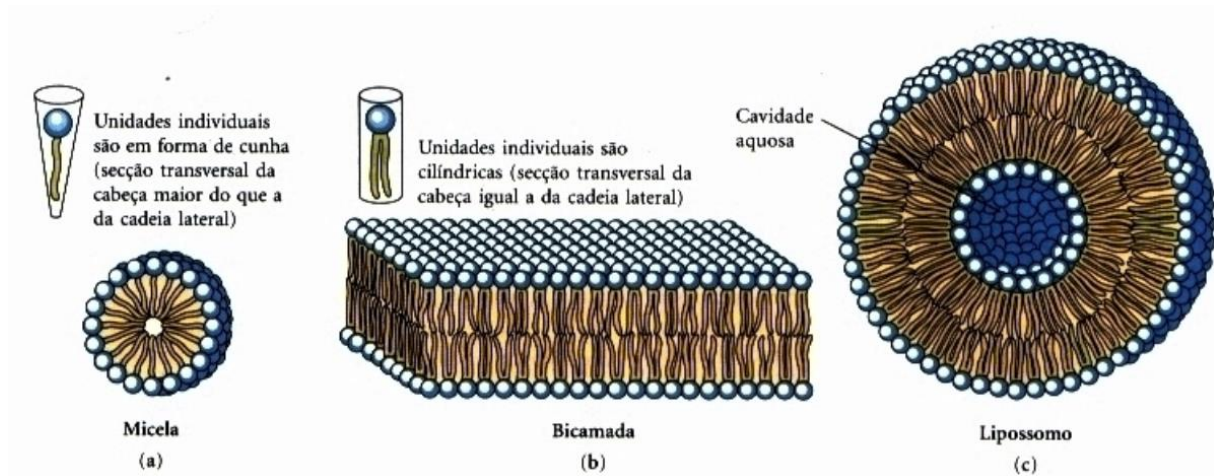
O processo de encapsulação pode ser definido como a incorporação de um componente em particular (ingrediente ativo) em algum tipo de partícula (encapsulante) com o objetivo de proteger estes compostos da degradação, aumentar sua afinidade com matrizes alimentícias ou ainda permitir sua liberação controlada (MCCLEMENTS, 2015). Atualmente há uma grande variedade de partículas ou matérias-primas que podem ser usadas para encapsulação que constituem os processos de encapsulação disponíveis, como micelas, lipossomas, emulsões, hidrogéis e biopolímeros como proteínas e polissacarídeos (MCCLEMENTS, 2015).

Dentre as matérias-primas utilizadas para a encapsulação de compostos bioativos, os lipossomas são particularmente interessantes por possuírem uma característica anfifílica e por serem biocompatíveis e biodegradáveis (SUBRAMANI; GANAPATHYSWAMY, 2020). Os lipossomas foram utilizados como objeto deste estudo e apenas este tipo de sistema é abordado com profundidade nesta revisão.

#### **1.3.1 Lipossomas**

Lipossomas são estruturas esféricas compostas por blocos de surfactantes que têm a habilidade de formar bicamadas concêntricas de fosfolipídios espontaneamente ou com o auxílio de vários processos em meio aquoso. Três tipos de agregados podem ser formados de acordo com a natureza dos fosfolipídios e das condições empregadas (NELSON; COX, 2019), como pode ser observado na Figura 1.1.

**Figura 1.1** – Representação de (A) micela, (B) bicama lipídica e (C) lipossoma



Fonte: Nelson e Cox (2019).

As micelas são estruturas esféricas contendo entre dúzias e alguns milhares de moléculas arranjadas com suas regiões hidrofóbicas agregadas no interior, excluindo a água, comum nos lisofosfolipídios (fosfolipídios sem ácido graxo) (Figura 1A). A bicamada, por sua vez, é formada por monocamadas de lipídios na presença de água no formato de uma lâmina bidimensional, bastante comum nos glicerofosfolipídios e esfingolipídios (Figura 2B). Neste caso, como as regiões hidrofóbicas em suas margens estão em contato com a água, a lâmina de bicamada é relativamente instável e há a formação espontânea de um terceiro tipo de agregado, o lipossoma (Figura 2C). Essas vesículas de bicamadas envolvem a água, criando um compartimento aquoso. Durante sua formação, os lipossomas podem adquirir características estruturais com tamanhos variados, o que inclui vesículas unilamelares ou multilamelares em micro ou nano escala, variando em tamanhos entre 10 e 10.000 nm. Tais características dependem diretamente da forma como os lipossomas são preparados, como o tipo de fosfolipídio utilizado e o método de produção escolhido (MCCLEMENTS, 2015). Sendo assim, estes parâmetros podem ser utilizados para a obtenção de vesículas com características específicas.

Dentre os métodos de preparo de lipossomas, pode-se citar a hidratação de filme lipídico. Esta técnica baseia-se na dissolução de fosfolipídios em uma fase orgânica seguida da remoção do solvente para a formação de um fino filme lipídico, que é então hidratado para possibilitar a formação das vesículas (MAHERANI et al., 2011).

Por apresentarem a característica anfifílica, os lipossomas podem ser utilizados para a encapsulação de compostos polares ou apolares de forma individual ou simultânea, destacando uma versatilidade que é considerada como vantagem em relação a outros sistemas de

encapsulação (ESPOSTO et al., 2021). No entanto, a encapsulação de compostos lipofílicos em lipossomas é geralmente mais eficiente porque os ingredientes são incorporados na bicamada lipídica, enquanto que os compostos hidrofílicos necessitam de um espaço interno aquoso mais volumoso (MCCLEMENTS, 2015).

A encapsulação de ingredientes ativos em lipossomas pode ser feita de forma passiva ou ativa. A forma passiva é realizada através da mistura dos compostos com os lipossomas antes ou depois da formação das vesículas. Por sua vez, a forma ativa envolve o uso de mecanismos físico-químicos específicos, como a incorporação de ácidos e bases fracas através do método de transferência de massa, onde há a alteração da carga do composto para permitir sua permeação na bicamada lipídica (MCCLEMENTS, 2015). É importante destacar que a interação entre lipossoma e o composto ativo a ser encapsulado irão influenciar diretamente a eficiência de encapsulação (EE), cujo termo indica a quantidade de composto que foi realmente encapsulado na partícula. Por exemplo, ingredientes que são igualmente solúveis em fases aquosas e orgânicas irão atravessar facilmente a bicama lipídica para o núcleo aquoso dos lipossomas, passando novamente pela bicama lipídica para o exterior da vesícula e apresentando uma baixa taxa de retenção (LIU et al., 2013).

Apesar de sua versatilidade, os lipossomas são físico-quimicamente instáveis. Isso se dá ao fato de que os lipídeos presentes na estrutura dos lipossomas podem sofrer degradação natural através de oxidação ou hidrólise, ou ainda porque as partículas podem formar aglomerados (LIU et al., 2013; TAYLOR et al., 2005). Os lipossomas possuem originalmente uma força repulsiva entre suas partículas que fornece uma certa estabilidade física, mas fatores externos como altas temperaturas ou mudanças de pH podem afetar sua estrutura e alterar a permeabilidade da bicamada, provocando a liberação do composto encapsulado ou a formação de aglomerados (MCCLEMENTS, 2015).

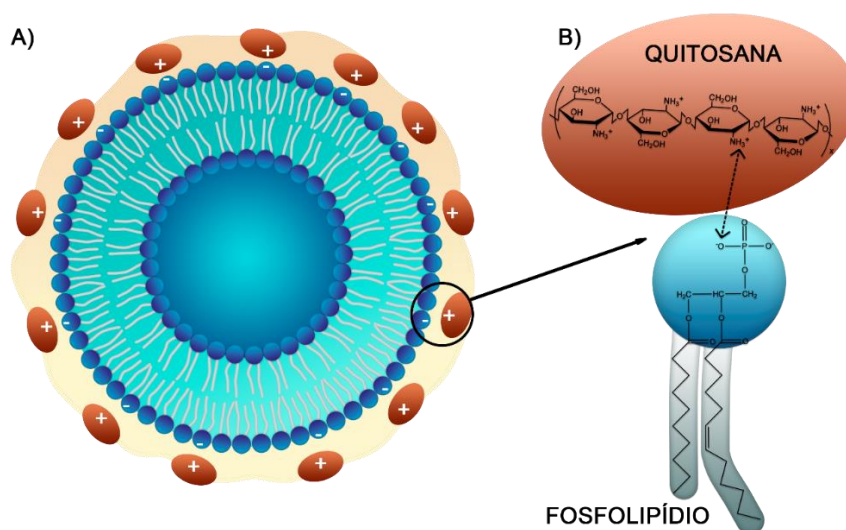
Sistemas de encapsulação estáveis são frequentemente desejados para possibilitar a aplicação das partículas em processos industriais, assim como permitir que os ingredientes ativos passem pelo trato gastrointestinal sem serem degradados para a posterior absorção no intestino (ESPOSTO et al., 2021). No entanto, estudos mostram que a estrutura de lipossomas podem ser alteradas durante o processamento de alimentos funcionais, além de serem degradados por ácido gástrico, sais biliares e lipases pancreáticas durante a digestão (ALAVI; HAERI; DADASHZADEH, 2017; GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016; HE et al., 2019). Dessa forma, alternativas como o recobrimento de lipossomas com biopolímeros podem aumentar a estabilidade física destas partículas através de fatores estéricos e eletrostáticos, criando assim um sistema híbrido. A adsorção de moléculas poliméricas à superfícies dos lipossomas resulta

em uma estabilização estérica porque impede que partículas próximas umas das outras se atraiam, evitando a formação de aglomerados. Por outro lado, biopolímeros carregados positiva ou negativamente também podem melhorar a estabilidade de lipossomas através da estabilização eletrostática baseada na repulsão de cargas (MADKOUR; BUMAJDAD; AL-SAGHEER, 2019). Dentre os biopolímeros utilizados para o recobrimento de lipossomas, pode-se citar amidos, gelatina, proteínas, celulose, pectina e quitosana (CADDEO et al., 2016; NAHAR et al., 2014; NUNES et al., 2016; TAN; WANG; SUN, 2021).

### 1.3.2 Quitossomas e TPP-quitossomas

Quitossomas são sistemas híbridos formados por lipossomas recobertos por uma camada de quitosana, um biopolímero que apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesão (DEVI; DUTTA, 2017). A quitosana é um polissacarídeo catiônico com uma estrutura linear de glucosamina ( $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose) que é obtido por meio da desacetilação da quitina em meio alcalino (ARKOUN et al., 2018). Em soluções aquosas e em valores de pH abaixo de 6,5, os grupos amino da quitosana são protonados ( $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$ ) e o comportamento policatiónico de suas moléculas permite sua aplicação como cobertura de lipossomas através da interação eletrostática entre os grupos amino da quitosana e os grupos negativamente carregados da superfície dos lipossomas (DING et al., 2019), como pode ser observado na Figura 1.2.

**Figura 1.2** – Esquema de (A) quitossoma e (B) interação eletrostática entre grupos fosfato e grupos amino



Fonte: Esposito et al. (2021)

A produção de quitossomas baseia-se em um processo simples, onde a suspensão de quitosana é adicionada à suspensão contendo os lipossomas sob agitação magnética a fim de promover a deposição eletrostática do biopolímero. No entanto, algumas condições devem ser controladas para que ocorra a produção de partículas que sejam mais estáveis, como a proporção quitosana:lipossoma, o tamanho das vesículas, a carga superficial e o fluxo de adição de quitosana (LAYE; MCCLEMENTS; WEISS, 2008). A adição de quitosana em uma concentração baixa pode não ser suficiente para recobrir os lipossomas, enquanto que um excesso de biopolímero adicionado pode ocasionar em uma força atrativa que supera as forças repulsivas intermoleculares e causar a formação de aglomerados (LAYE; MCCLEMENTS; WEISS, 2008; ZHUANG et al., 2010). Compostos ativos como polifenóis, vitaminas e extratos diversos foram encapsulados em quitossomas com o objetivo de melhorar sua estabilidade, aumentar a solubilidade em água ou ainda controlar sua liberação, como revisado por alguns autores (Tabela 1.5) (ESPOSTO et al., 2021; KUMAR et al., 2020; TAN; WANG; SUN, 2021).

Apesar da adição de uma camada de quitosana mostrar resultados positivos na estabilização de lipossomas, os quitossomas ainda possuem uma capacidade limitada relacionada à liberação controlada dos compostos encapsulados, uma vez que são altamente solúveis em meio ácido (CADDEO et al., 2017; NIAZ et al., 2018). Por esse motivo, alguns estudos recentes propõem que a deposição eletrostática de biopolímero seja realizada com quitosana reticulada através da formação de complexos polieletrólitos anteriormente à sua aplicação como material de cobertura. O processo de complexação da quitosana é geralmente conhecido como gelificação iônica, onde uma rede tridimensional é criada baseada na interação eletrostática entre os grupos amino da quitosana e grupos aniônicos de um agente reticulante. Estas interações podem ser reversíveis e proporcionar propriedades interessantes para a liberação controlada de ingredientes bioativos (BUGNICOURT; LADAVIÈRE, 2016; CADDEO et al., 2016; ESPOSTO et al., 2021). Os agentes reticulantes utilizados para o processo de gelificação iônica podem ser moléculas ou macromoléculas como citratos, alginatos, sulfatos ou polifosfatos. Dentre eles, o mais utilizado e discutido na literatura é o tripolifosfato de sódio (TPP), que produz a complexação da quitosana com características interessantes como mucoadesividade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, segundo uma revisão feita por Bugnicourt e Ladavière (2016).

**Tabela 1.5** – Encapsulação de compostos fitoquímicos em lipossomas e quitossomas

<b>Composto(s)</b>	<b>Partícula</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>EE (%)</b>	<b>Objetivo do estudo</b>	<b>Referência</b>
Curcumina	Lipossoma	93,2 ± 8,2	41,42 ± 3,03	Aumentar solubilidade em água e controlar a taxa de liberação de curcumina	Y. Liu et al. (2015)
	Quitossoma	332,7 ± 53,8	52,80 ± 3,23		
Extrato de cenoura preta	Lipossoma	51,5 ± 0,58	82,2 ± 9,7	Aumentar estabilidade de antocianinas depois do processo de <i>spray dryer</i>	Guldiken et al. (2019)
	Quitossoma	70,9 ± 3,49	Não reportado		
Extrato de semente de uva	Lipossoma	86,5	88,2 ± 4,7	Investigação in vitro da liberação de polifenóis e avaliar influência do recobrimento com quitosana	Gibis et al. (2016)
	Quitossoma	160,3	99,5 ± 2,3		
Glutaciona e ácido hidroxicinâmico	Lipossoma	247,63 ± 0,97	GT: 54,64 ± 0,44 AH: 65,72 ± 0,09	Avaliar a co-encapsulação dos compostos para proteção de atividade antioxidante.	Ran et al. (2020)
	Quitossoma	460,37 ± 6,00	GT: 61,32 ± 1,32 AH: 68,92 ± 1,27		
Vitamina C e Vitamina B9	Lipossoma	138,58 ± 0,96	VC: 34,63 ± 1,80 VB: 64,25 ± 0,80	Aumentar a estabilidade dos compostos co-encapsulados	Jiao et al. (2018)
	Quitossoma	249,13 ± 0,98	VC: 80,96 ± 1,23 VB: 87,41 ± 1,09		
Quercetina	Lipossoma	138 ± 6,3	55 ± 7,0	Aumentar a biodisponibilidade da quercetina e otimizar sua liberação no intestino	Caddeo et al. (2016)
	Quitossoma	174 ± 5,1	70 ± 10,0		
	TPP-quitossoma	182 ± 7,0	91 ± 1,0		
Vitamina D3	Lipossoma	44 ± 16,6	5 ± 1	Encapsular e conservar vitamina D3	Iida et al. (2019)
	TPP-quitossoma	91,3 e 459, polidisperso	97 ± 1		

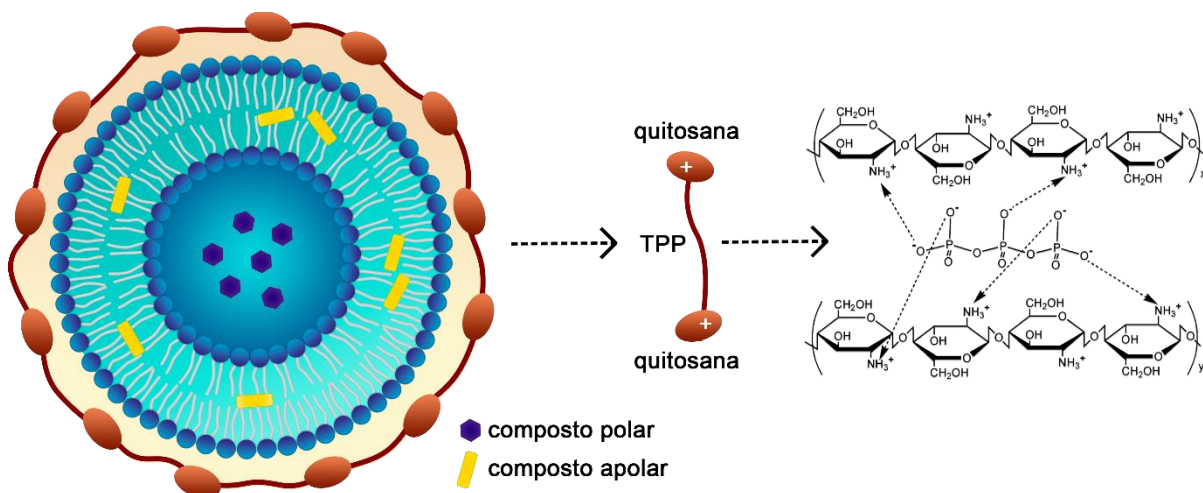
EE: eficiência de encapsulação, GT: Glutaciona, AH: ácido hidroxicinâmico, VC: vitamina C, VB: vitamina B9.

Fonte: Esposto et al. (2021), adaptada.



O uso de quitosana reticulada através de gelificação iônica com TPP para o recobrimento de lipossomas dá origem a um sistema híbrido chamado de TPP-quitossomas (Figura 1.3).

**Figura 1.3** – Esquema proposto para a formação de TPP-quitossomas



Fonte: Esposito et al. (2021), adaptada.

Apesar deste tipo de partícula ser ainda pouco estudado, alguns estudos destacaram resultados positivos na encapsulação de quercetina e vitamina D em TPP-quitossomas. Além de aumentar a estabilidade das partículas, a adição de quitosana reticulada na encapsulação de quercetina aumentou significativamente a EE do composto ativo de 55% para 91%, indicando que a complexação de quitosana com TPP pode oferecer novos sítios para a encapsulação de ativos (CADDEO et al., 2016). Um comportamento semelhante também foi observado na encapsulação de vitamina D, onde a EE aumentou de 5% para 97% quando inserida em TPP-quitossomas (IIDA et al., 2019).

Estas partículas podem ser utilizadas para diversas aplicações, o que inclui sua adição em matrizes biodegradáveis para a produção de filmes ativos que podem ser empregados nas indústrias alimentícias ou farmacêuticas. Na indústria alimentícia, os filmes podem ser aplicados como embalagens comestíveis de alimentos como frutas, hortaliças e carnes, enquanto que na indústria farmacêutica eles podem ser usados como carreadores de pequenas moléculas ativas visando sua liberação controlada para tratamentos mais eficientes (ZHANG et al., 2021).

#### 1.4 Filmes biodegradáveis

Filmes biodegradáveis podem ser definidos como uma fina camada de material que cobre a superfície de um alimento e que é degradado por ação enzimática de organismos vivos (PAVLATH; ORTS, 2009). Nos últimos anos, um aumento no interesse pelo desenvolvimento de filmes biodegradáveis é observado como consequência da utilização cada vez maior de produtos plásticos derivados de petróleo. Nesse sentido, pesquisas envolvendo o uso de polímeros biodegradáveis para a elaboração de embalagens de alimentos têm ganhado destaque, principalmente quando o biopolímero utilizado é extraído de resíduos agroindustriais, como amidos e proteínas (DO VAL SIQUEIRA et al., 2021; PARVEEN et al., 2019). O uso de quitosana para a formação de filmes biodegradáveis também tem sido bastante pesquisado ultimamente (HAGHIGHI et al., 2020).

A formação dos filmes é feita basicamente através da dispersão das macromoléculas em um solvente, seguida da adição de alguns compostos que são capazes de melhorar suas propriedades, como nanopartículas ou plastificantes (MARTELLI-TOSI et al., 2020). O método de elaboração mais utilizado para pesquisa de filmes biodegradáveis é o *casting*, onde a solução filmogênica é depositada em moldes ou placas não adesivas para secagem. Depois de secos, os filmes são destacados dos moldes e utilizados para análises de caracterização (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992).

Apesar de serem biodegradáveis, os filmes produzidos a partir de biopolímeros ainda não são muito competitivos em relação aos plásticos derivados de petróleo, uma vez que apresentam propriedades mecânicas e funcionais limitadas (HAGHIGHI et al., 2020). Por esse motivo, a utilização de aditivos tem sido pesquisada a fim de produzir filmes com características mais competitivas. Dentre os aditivos disponíveis, destacam-se os compostos fitoquímicos, geralmente na forma de extratos, que podem contribuir com as atividades antioxidantes e antimicrobianas dos filmes e aumentar de vida de prateleira dos alimentos (MIR et al., 2018). Filmes contendo aditivos com propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas, como compostos fitoquímicos, são normalmente conhecidos como “filmes ativos”. A aplicação de fitoquímicos em matrizes poliméricas pode ser feita através da adição direta do composto ou extrato na solução filmogênica, mas problemas como baixa afinidade entre fitoquímico/biopolímero ou baixa estabilidade do bioativo podem ocorrer, ocasionando na separação de fases ou ainda impossibilitando a formação de uma matriz polimérica contínua (CUI et al., 2020; CUI; YUAN; LIN, 2017).

A aplicação de compostos fitoquímicos encapsulados em filmes biodegradáveis podem permitir uma maior estabilidade da atividade antioxidante dos compostos ou ainda uma liberação controlada de ativos (CUI et al., 2020). A Tabela 1.6 apresenta alguns estudos envolvendo a aplicação de compostos encapsulados para a obtenção de filmes ativos. Filmes de gelatina e/ou quitosana foram preparados com a adição de extrato de folha de pitangueira encapsulados em uma emulsão dupla e apresentaram uma alta atividade antioxidante, além de exibirem uma propriedade de barreira à luz ultravioleta (UV) e visível (TESSARO et al., 2021). Emulsões encapsulando carvacrol ou óleos essenciais de sálvia e canela também foram incorporadas em matrizes de amido de milho, quitosana e pululano, respectivamente, para a obtenção de filmes ativos (CHU et al., 2020; DINI et al., 2020; KONG et al., 2020). Filmes de zeína contendo polifenóis extraídos da casca de romã encapsulados em nanopartículas de quitosana também apresentaram atividade antioxidante, além de possibilitar a liberação controlada dos ativos e apresentarem atividade contra o crescimento de *Listeria monocytogenes* (CUI et al., 2020). O adição de lipossomas em filmes de quitosana, gelatina ou caseína também foi estudada. Boelter e Brandelli (2016) usaram lipossomas encapsulando nisina para a produção de filmes ativos de gelatina ou caseína, obtendo um material com potencial para ser utilizado como embalagem de alimentos capaz de reduzir o crescimento de patógenos. A aplicação de lipossomas encapsulando fago em filmes de quitosana também resultou em um material com propriedades antibacterianas que possui potencial na preservação de carnes, uma vez que apresentou atividade contra *Escherichia coli* (CUI; YUAN; LIN, 2017).

A aplicação de compostos em sua forma encapsulada em filmes biodegradáveis ainda é pouco estudada, portanto a adição de TPP-quitossomas encapsulando compostos extraídos do subproduto da cenoura é um estudo inédito até o momento.

**Tabela 1.6** – Aplicação de sistemas de encapsulação em matrizes poliméricas para obtenção de filmes ativos

<b>Composto ativo</b>	<b>Sistema de encapsulação</b>	<b>Matriz polimérica</b>	<b>Referência</b>
OE de sálvia	Emulsão	Quitosana	Dini et al. (2020)
Carvacrol	Emulsão	Amido de milho/PVOH (blenda)	Kong et al. (2020)
OE de canela	Emulsão	Pululano	Chu et al. (2020)
Extrato de folha de pitangueira	Emulsão dupla	Gelatina e/ou quitosana	Tessaro et al. (2021)
Polifenóis	Nanopartícula de quitosana	Zeína	Cui et al. (2020)
Fago	Lipossoma	Quitosana	Cui et al. (2017)
Nisina	Lipossoma	Gelatina e caseína	Boelter e Brandelli (2016)

OE: óleo essencial, PVOH: álcool polivinílico

Fonte: autoria própria.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, R. et al. Phytochemical delivery through nanocarriers: a review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, p. 111389, 1 jan. 2021.
- AKHTAR, S. et al. Black carrot (*Daucus carota* L.), dietary and health promoting perspectives of its polyphenols: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 66, p. 36–47, 1 ago. 2017.
- ALAVI, S.; HAERI, A.; DADASHZADEH, S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 991–1012, 2017.
- ARKOUN, M. et al. Chitosan-based structures/coatings with antibacterial properties. In: TIWARI, A. (Ed.). **Handbook of Antimicrobial Coatings**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 357–389.
- ASGARI, K. et al. High-methylated pectin from walnut processing wastes as a potential resource: Ultrasound assisted extraction and physicochemical, structural and functional analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 1274–1282, 1 jun. 2020.
- BELLAVIA, D. et al. Non-flavonoid Polyphenols in Osteoporosis: Preclinical Evidence. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 21 abr. 2021.
- BENMEZIANE, A. et al. Extraction of carotenoids from cantaloupe waste and determination of its mineral composition. **Food Research International**, v. 111, p. 391–398, 1 set. 2018.
- BOELTER, J. F.; BRANDELLI, A. Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 740–747, 1 set. 2016.
- BRITTON, G. et al. Carotenoid blues: Structural studies on carotenoproteins. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 2075–2084, 1997.
- BRITTON, G. Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 11, p. 158699, 1 nov. 2020.
- BUGNICOURT, L.; LADAVIÈRE, C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 1–17, 2016.
- CADDEO, C. et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 69–78, 2016.
- CADDEO, C. et al. Physico-chemical characterization of succinyl chitosan-stabilized liposomes for the oral co-delivery of quercetin and resveratrol. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1853–1861, 2017.
- CHANDRA ROY, V. et al. Extraction of astaxanthin using ultrasound-assisted natural deep eutectic solvents from shrimp wastes and its application in bioactive films. **Journal of Cleaner Production**, v. 284, p. 125417, 15 fev. 2021.
- CHU, Y. et al. Fabrication, structure and properties of pullulan-based active films incorporated with ultrasound-assisted cinnamon essential oil nanoemulsions. **Food Packaging and**

- Shelf Life**, v. 25, p. 100547, 1 set. 2020.
- CHUTIA, H.; MAHANTA, C. L. Green ultrasound and microwave extraction of carotenoids from passion fruit peel using vegetable oils as a solvent: Optimization, comparison, kinetics, and thermodynamic studies. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 67, p. 102547, 1 jan. 2021.
- COMUNIAN, T. A.; SILVA, M. P.; SOUZA, C. J. F. The use of food by-products as a novel for functional foods: Their use as ingredients and for the encapsulation process. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, p. 269–280, 1 fev. 2021.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.
- CUI, H. et al. Biodegradable zein active film containing chitosan nanoparticle encapsulated with pomegranate peel extract for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100511, 1 jun. 2020.
- CUI, H.; YUAN, L.; LIN, L. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 156–164, 1 dez. 2017.
- DE SOUZA SIMÕES, L. et al. Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 23–45, 2017.
- DEVI, N.; DUTTA, J. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1897–1904, 1 nov. 2017.
- DING, L. et al. Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 133–141, 2019.
- DINI, H. et al. Effect of edible composite film based on chitosan and cumin essential oil-loaded nanoemulsion combined with low-dose gamma irradiation on microbiological safety and quality of beef loins during refrigerated storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1501–1509, 1 dez. 2020.
- DO VAL SIQUEIRA, L. et al. Starch-based biodegradable plastics: methods of production, challenges and future perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 122–130, 1 abr. 2021.
- DONG, R. et al. Composition of bound polyphenols from carrot dietary fiber and its in vivo and in vitro antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 339, p. 127879, 1 mar. 2021.
- ESPOSTO, B. S. et al. Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, p. 40–48, 1 fev. 2021.
- FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: 24 mar. 2021.
- FELLOWS, P. J. **Food Processing Technology-Principles and Practice**. 4. ed. [s.l.] Woodhead Publishing, 2017.
- GAO, Y.; LIGIA FOCSAN, A.; KISPERS, L. D. The effect of polarity of environment on the antioxidant activity of carotenoids. **Chemical Physics Letters**, v. 761, p. 138098, 16 dez. 2020.
- GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated

- from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, v. 88, p. 105–113, 1 out. 2016.
- GÓMEZ-MEJÍA, E. et al. Citrus peels waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 295, p. 289–299, 15 out. 2019.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. -L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190–195, 1 jan. 1992.
- GOULA, A. M. et al. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 821–830, 2017.
- GULDIKEN, B. et al. Formation and characterization of spray dried coated and uncoated liposomes with encapsulated black carrot extract. **Journal of Food Engineering**, v. 246, p. 42–50, 2019.
- HAGHIGHI, H. et al. Recent advances on chitosan-based films for sustainable food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, p. 100551, 1 dez. 2020.
- HE, H. et al. Adapting liposomes for oral drug delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n. 1, p. 36–48, 2019.
- IIDA, A. S. L. et al. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. **Polímeros**, v. 29, n. 4, p. 1–8, 2019.
- JIAO, Z. et al. Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 3, p. 272–280, 2018.
- KAN, L. et al. Interaction of bread and berry polyphenols affects starch digestibility and polyphenols bio-accessibility. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103924, 1 maio 2020.
- KHAN, M. K. et al. Phytochemical composition and bioactivities of lupin: A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 9, p. 2004–2012, 1 set. 2015.
- KHANDARE, R. D.; TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. Kinetic modeling and process intensification of ultrasound-assisted extraction of d-limonene using citrus industry waste. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 159, p. 108181, 1 fev. 2021.
- KONG, R. et al. Development and characterization of corn starch/PVA active films incorporated with carvacrol nanoemulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1631–1639, 1 dez. 2020.
- KUMAR, K. Nutraceutical potential and utilization aspects of food industry by-products and wastes. In: **Food Industry Wastes**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 89–111.
- KUMAR, S. et al. A systematic study on chitosan-liposome based systems for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 470–481, 1 out. 2020.
- LAYE, C.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. 7–15, 2008.
- LIU, W. et al. **Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems**. [s.l.] Elsevier Masson SAS., 2013. v. 24

- LIU, Y. et al. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. **Food Research International**, v. 74, p. 97–105, 2015.
- LUND, M. N. Reactions of plant polyphenols in foods: Impact of molecular structure. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 241–251, 1 jun. 2021.
- MA, T. et al. Influence of technical processing units on polyphenols and antioxidant capacity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1637–1644, 1 dez. 2013.
- MADKOUR, M.; BUMAJDAD, A.; AL-SAGHEER, F. To what extent do polymeric stabilizers affect nanoparticles characteristics? **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 270, p. 38–53, 2019.
- MAHERANI, B. et al. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. **Current Nanoscience**, v. 7, p. 436–452, 2011.
- MANASA, V.; PADMANABHAN, A.; ANU APPAIAH, K. A. Utilization of coffee pulp waste for rapid recovery of pectin and polyphenols for sustainable material recycle. **Waste Management**, v. 120, p. 762–771, 1 fev. 2021.
- MARAN, J. P. et al. Ultrasound assisted citric acid mediated pectin extraction from industrial waste of *Musa balbisiana*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 204–209, 1 mar. 2017.
- MARIĆ, M. et al. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. **Trends in Food Science and Technology**, v. 76, p. 28–37, 1 jun. 2018.
- MARTELLI-TOSI, M. et al. Reinforced nanocomposites for food packaging. In: JAFARI, S. M. (Ed.). . **Handbook of Food Nanotechnology**. 1. ed. [s.l.: s.n.]. p. 533–574.
- MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle- and Microparticle-Based Delivery Systems**. Boca Raton, FL: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2015.
- MIHANFAR, A. et al. Polyphenols: Natural compounds with promising potential in treating polycystic ovary syndrome. **Reproductive Biology**, v. 21, n. 2, p. 100500, 1 jun. 2021.
- MIR, S. A. et al. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends in Food Science and Technology**, v. 80, p. 141–154, 1 out. 2018.
- MUKHERJEE, C.; CHAKRABORTY, S. Study of dietary Polyphenols from natural herbal sources for providing protection against Human Degenerative Disorders. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, p. 101956, 1 maio 2021.
- NAGRAJ, G. S. et al. Carrot. In: JAISWAL, A. K. (Ed.). . **Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 323–337.
- NAHAR, K. et al. Starch-coated magnetic liposomes as an inhalable carrier for accumulation of fasudil in the pulmonary vasculature. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 464, n. 1–2, p. 185–195, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7 ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.
- NIAZ, T. et al. Polyelectrolyte multicomponent colloidosomes loaded with nisin Z for enhanced antimicrobial activity against foodborne resistant pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–19, 2018.



- NICOLLE, C. et al. Genetic Variability Influences Carotenoid, Vitamin, Phenolic, and Mineral Content in White, Yellow, Purple, Orange, and Dark-orange Carrot Cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, n. 4, p. 523–529, 2004.
- NINČEVIĆ GRASSINO, A. et al. Application of high hydrostatic pressure and ultrasound-assisted extractions as a novel approach for pectin and polyphenols recovery from tomato peel waste. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 64, p. 102424, 1 ago. 2020.
- NUNES, P. S. et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 473–482, 2016.
- OLIVEIRA, G. et al. Food-derived polyphenol compounds and cardiovascular health: A nanotechnological perspective. **Food Bioscience**, v. 41, p. 101033, 1 jun. 2021.
- OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1–2, p. 543–555, 2000.
- PARVEEN, S. et al. Biodegradable protein films from gallic acid and the cataractous eye protein isolate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 12–20, 15 out. 2019.
- PAVLATH, A. E.; ORTS, W. Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In: **Edible Films and Coatings for Food Applications**. [s.l.] Springer New York, 2009. p. 1–23.
- PICOT-ALLAIN, C. et al. Conventional versus green extraction techniques - A comparative perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 40, p. 144–156, 1 ago. 2021.
- PLAZZOTTA, S. et al. Optimizing the antioxidant biocompound recovery from peach waste extraction assisted by ultrasounds or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 63, p. 104954, 1 maio 2020.
- RAHIMI, S.; MIKANI, M. Lycopene green ultrasound-assisted extraction using edible oil accompany with response surface methodology (RSM) optimization performance: Application in tomato processing wastes. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 1033–1042, 1 maio 2019.
- RAN, L. et al. Synergistic antioxidant effect of glutathione and edible phenolic acids and improvement of the activity protection by coencapsulation into chitosan-coated liposomes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 127, n. 24, p. 109409, 2020.
- RANI, P. et al. Material, antibacterial and anticancer properties of natural polyphenols incorporated soy protein isolate: A review. **European Polymer Journal**, v. 152, p. 110494, 5 jun. 2021.
- RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1224, p. 1–10, 2012.
- ROSENFELD, H. J. et al. Sensory profiling of carrots from northern latitudes. **Food Research International**, v. 30, n. 8, p. 593–601, 1 out. 1997.
- SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - Recent developments. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, n. 11, p. 401–413, 1 nov. 2001.
- SELVAKUMAR, P. et al. Enhancement of ultrasound assisted aqueous extraction of polyphenols from waste fruit peel using dimethyl sulfoxide as surfactant: Assessment of kinetic models. **Chemosphere**, v. 263, p. 128071, 1 jan. 2021.

- SENGAR, A. S. et al. Comparison of different ultrasound assisted extraction techniques for pectin from tomato processing waste. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 61, p. 104812, 1 mar. 2020.
- SHARMA, H. K.; NAVNEET, K. Utilization of Carrot Pomace. In: ANAL, A. K. (Ed.). **By-Products and their Utilization**. [s.l: s.n.]. p. 17.
- SHARMA, K. D. et al. Chemical composition, functional properties and processing of carrot- A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 22–32, 2012.
- SILVA, N. C. DA et al. Extraction of phenolic compounds from acerola by-products using chitosan solution, encapsulation and application in extending the shelf-life of guava. **Food Chemistry**, v. 354, p. 129553, 30 ago. 2021.
- SUBRAMANI, T.; GANAPATHYSWAMY, H. An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical. **Journal of Food Science and Technology**, 2020.
- TAN, C.; WANG, J.; SUN, B. Biopolymer-liposome hybrid systems for controlled delivery of bioactive compounds: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 48, n. December 2020, p. 107727, 1 maio 2021.
- TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 7–8, p. 587–605, 2005.
- TESSARO, L. et al. Gelatin and/or chitosan-based films activated with “Pitanga” (*Eugenia uniflora* L.) leaf hydroethanolic extract encapsulated in double emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106523, 1 abr. 2021.
- TONINI, D.; ALBIZZATI, P. F.; ASTRUP, T. F. Environmental impacts of food waste: Learnings and challenges from a case study on UK. **Waste Management**, v. 76, p. 744–766, 2018.
- WEN, C. et al. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 538–549, 1 nov. 2018.
- ZHANG, L. et al. A comprehensive review on natural bioactive films with controlled release characteristics and their applications in foods and pharmaceuticals. **Trends in Food Science and Technology**, v. 112, n. December 2020, p. 690–707, 2021.
- ZHUANG, J. et al. Effects of chitosan coating on physical properties and pharmacokinetic behavior of mitoxantrone liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 407–416, 2010.

**CAPÍTULO 2. OBTENÇÃO DE SUBPRODUTO DE CENOURA  
E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS**

## 2.1 Introdução

O aproveitamento de subprodutos gerados pelo processamento de alimentos é um tópico de estudo bastante explorado atualmente considerando a grande quantidade de material que é descartado pelas agroindústrias. No entanto, por serem de origem vegetal, os subprodutos contêm compostos fitoquímicos cuja extração pode ser feita aplicando-se vários métodos (KHANDARE; TOMKE; RATHOD, 2021). Os métodos tradicionais normalmente envolvem altas temperaturas, tempos de extração longos e o uso de grandes quantidades de solventes, resultando em um alto consumo de energia e em um impacto ambiental negativo devido ao descarte de reagentes utilizados. Além disso, traços de solventes orgânicos utilizados na extração podem se tornar um problema de toxicidade se estiverem presentes no produto final em que os fitoquímicos serão aplicados (BAITE; MANDAL; PURKAIT, 2021).

Técnicas alternativas de extração, como a assistida por ultrassom, têm sido aplicadas para uma grande variedade de compostos presentes em diversas matrizes, tais como: casca de manga, de romã, de araçá vermelho e de limão doce (PICOT-ALLAIN et al., 2021). A extração assistida por ultrassom baseia-se no princípio da cavitação, onde a propagação das ondas em um meio líquido é capaz de romper as paredes celulares das plantas e liberar os compostos ativos de interesse (KHANDARE; TOMKE; RATHOD, 2021). Assim, trata-se de uma técnica ambientalmente correta que não requer uma grande quantidade de energia, a depender do tempo e potência utilizados, e que não gera grandes quantidades de resíduos químicos. A aplicação de ultrassom para a extração de compostos ativos também é considerada como uma técnica de fácil operação e segura, tornando-se competitiva com as técnicas de extração convencionais e bastante atrativa para aplicações industriais (BAITE; MANDAL; PURKAIT, 2021; KHANDARE; TOMKE; RATHOD, 2021). Dentre os compostos extraídos das matrizes vegetais, os principais são os compostos fenólicos, as antocianinas e pigmentos naturais como carotenoides. Os solventes normalmente utilizados são etanol, água ou óleos vegetais, em condições variadas de concentração. Além disso, a variação de do tempo de ultrassom também é bastante estudada, com os intervalos mais comuns entre 1 e 30 minutos (PICOT-ALLAIN et al., 2021).

Este capítulo teve como objetivos: (i) a obtenção de subproduto de cenoura através do seu processamento para a obtenção de suco, a fim de simular um processo industrial e (ii) a otimização dos parâmetros de extração dos compostos fitoquímicos. O subproduto obtidos foi caracterizado de acordo com sua composição química de umidade, cinzas, proteínas, fibras, lipídeos e carboidratos. Para a extração, uma técnica verde emergente envolvendo o uso de

ultrassom foi aplicada com o intuito de reduzir gastos e processos. Através de um planejamento experimental, variáveis como concentração de solvente, concentração de subproduto e tempo de extração foram avaliadas para a determinação da melhor condição de extração de compostos fitoquímicos.

## **2.2 Material e métodos**

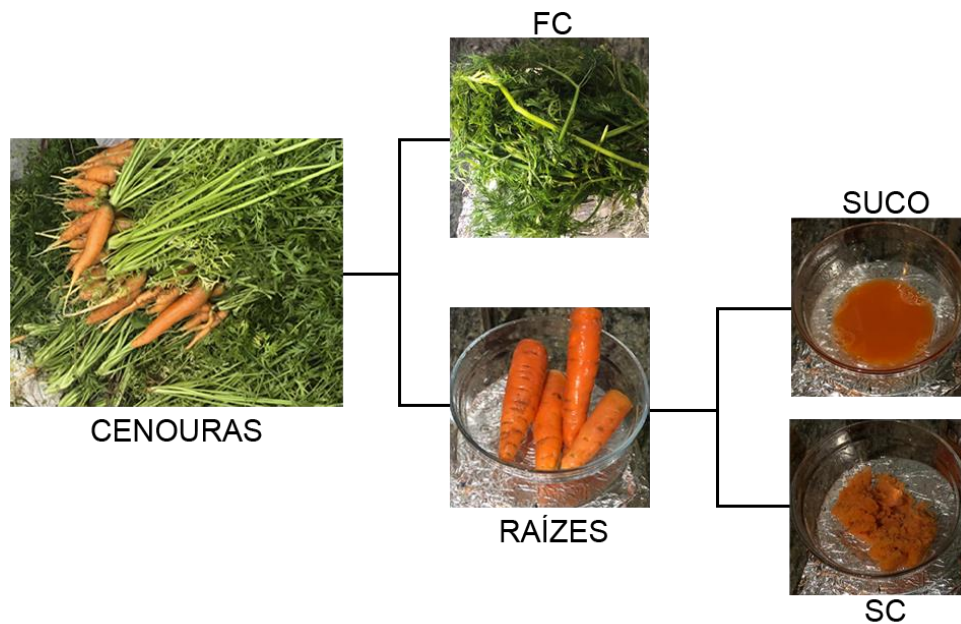
### **2.2.1 Material**

As cenouras (*Daucus carota L.*) utilizadas foram adquiridas em uma horta local (Pirassununga, São Paulo, Brasil) em sua integridade, contendo raízes e folhas. Os solventes metanol e etanol P.A. 99,8% foram adquiridos da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil). O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, São Paulo, Brasil) e os reagentes carbonato de sódio, éter metil-terc-butílico e os padrões ácido gálico,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

### **2.2.2 Processamento de cenouras e obtenção de subproduto**

Para a obtenção do subproduto, primeiramente as folhas foram separadas das raízes, e as cenouras foram então processadas em um multiprocessador caseiro (Juicer XL Philips Walita), obtendo-se o suco e o resíduo composto pelo subproduto (SC) e as folhas (FC). SC e FC foram armazenados em freezer em alíquotas de aproximadamente 200 g para evitar que uma grande quantidade de amostra fosse descongelada a cada teste realizado de caracterização ou de extração de compostos fitoquímicos. Um esquema do processamento de cenouras pode ser observado na Figura 2.1.

**Figura 2.1** – Processamento de cenouras para obtenção de subproduto (SC)



Fonte: autoria própria.

### 2.2.3 Caracterização dos resíduos de cenoura

Os resíduos provenientes do processamento de cenoura foram caracterizados de acordo com sua composição química. As análises de umidade e cinzas foram realizadas em triplicata, enquanto que as demais foram realizadas em duplicata.

#### 2.1.3.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com a metodologia da AOAC 925.45 (2005). As amostras foram secas em estufa por 24 h a 105 °C e o teor de umidade foi calculado de acordo com a Equação 2.1.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (2.1)$$

Sendo  $m_i$  a massa inicial antes da secagem e  $m_f$  a massa após a secagem.

### 2.1.3.2 Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC 923.03 (2005). Aproximadamente 1,0 g de amostra foi pesado e incinerado em mufla (Q318M, Quimis, Brasil) a 600 °C por 4 h. O teor de cinzas foi calculado de acordo com a Equação 2.2.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (2.2)$$

Sendo  $m_i$  a massa inicial antes da incineração e  $m_f$  a massa após a incineração.

### 2.1.3.3 Proteína bruta

A determinação de proteína bruta foi realizada de acordo com a metodologia Kjeldahl, técnica nº 926.86 da AOAC (2005). A determinação de proteína consiste na digestão da amostra usando uma mistura catalítica para a formação de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , que, em seguida, reage com NaOH para promover a neutralização. Posteriormente, uma destilação é realizada para recolher o gás de amônia que é formado seguido de titulação com HCl para a quantificação de amônia presente e determinação do teor de proteína.

### 2.1.3.4 Fibra bruta

A determinação de fibra bruta consistiu na secagem e digestões ácidas e básicas das amostras por 30 min usando ácido sulfúrico 1,25% e hidróxido de sódio 1,25%, respectivamente. O teor de fibra bruta foi obtido através da diferença de massa antes e após a incineração em mufla a 500 °C.

### 2.1.3.5 Lipídeos

A determinação de lipídeos foi realizada de acordo com metodologia proposta por Bligh & Dyer (1959), onde a extração dos lipídeos é feita utilizando-se solventes como clorofórmio, metanol e água para a formação de duas fases: aquosa e orgânica. Os lipídeos presentes na fase orgânica foram determinados de acordo com a Equação 2.3.

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{p \times 4 \times 100}{m} \quad (2.3)$$

Sendo p a massa de lipídeos extraídos e m a massa inicial da amostra.

### 2.1.3.6 Carboidratos

O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, cinzas, proteína bruta, fibra bruta e lipídeos descritos anteriormente.

### 2.2.4 Extração e quantificação de compostos fitoquímicos

Os ensaios preliminares de extração de compostos fitoquímicos foram realizados utilizando-se o resíduo úmido e o resíduo seco. Para a obtenção do resíduo seco, SC foi submetido à secagem em estufa a 35 °C por 48 h. Após os testes preliminares, decidiu-se trabalhar apenas com o resíduo úmido.

Inicialmente, para a extração dos compostos fitoquímicos, foram propostos dois planejamentos experimentais, sendo um para Compostos Fenólicos Totais (CFT) e outro para carotenoides. CFT seriam extraídos variando a concentração de solução hidroetanólica (% EtOH) e tempo de ultrassom (em minutos) como variáveis independentes, e o resíduo sólido resultante da primeira extração seria reutilizado para a extração de carotenoides em um segundo planejamento experimental, utilizando-se óleo de soja como solvente. No entanto, uma análise de espectroscopia por varredura do extrato com maior teor de etanol usado para extração de CFT no primeiro planejamento (Tabela 2.1, ensaio 6) mostrou banda de absorção próxima de 450 nm, comprimento de onda de absorção de carotenoides (HIRANVARACHAT; DEVAHASTIN, 2014). Dessa forma, percebeu-se que o uso de uma solução concentrada de etanol seria capaz de extrair CFT ao mesmo passo que extrairia também carotenoides, e a utilização de óleo como solvente para carotenoides foi substituída por etanol 99,8% para redução de processos e solventes. Assim, dois planejamentos de extração são apresentados neste trabalho: um apenas para CFT e outro para a extração simultânea de CFT e carotenoides utilizando-se etanol 99,8% como solvente.



#### 2.1.4.1 Compostos fenólicos

O teor total de CFT presente em SC foi inicialmente determinado segundo um método exaustivo. Segundo a metodologia descrita por Guandalini et al. (2019) com modificações, 2 g de amostra úmida ou 0,2 g de amostra seca foram misturadas com 20 mL de solvente (metanol, etanol ou água) sob agitação magnética por 15 min, seguido de centrifugação. Extrações sucessivas foram realizadas até que não fosse quantificado mais compostos fenólicos nos sobrenadantes. Cada sobrenadante foi então analisado segundo o método de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia proposta por Hillis & Swain (1959) com modificações, onde 0,5 mL de sobrenadante foi adicionado a 0,5 mL da solução aquosa 1:3 do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de carbonato de sódio 0,5 M. Os tubos de ensaio foram mantidos sob abrigo da luz durante 30 minutos, seguido por leitura de absorbância em espectrofotômetro em 725 nm. O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado de acordo com uma curva padrão de ácido gálico (0 a 50 mgL<sup>-1</sup>):

$$y = 0,0237x + 0,0033 \quad (R^2 = 0,989) \quad (2.4)$$

Onde y é a absorbância e x é a concentração de CFT, em µg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mL.

A extração de compostos fenólicos utilizando uma técnica verde foi realizada através da aplicação de etanol como solvente geralmente reconhecido como seguro (GRAS) e ultrassom de ponteira com o intuito de facilitar a difusão dos componentes para o solvente (GOULA et al., 2017; MERCADO-MERCADO et al., 2018). Para isso, um planejamento experimental utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> (4 experimentos + 3 pontos axiais + 3 pontos centrais) foi proposto utilizando-se concentração de solução hidroetanólica (% EtOH) e tempo de ultrassom (em minutos) como variáveis independentes. A matriz do planejamento experimental pode ser observada na Tabela 2.1, onde os intervalos escolhidos de concentração de solvente e de tempo de extração foram determinadas de acordo com a literatura.

**Tabela 2.1** – Matriz do planejamento experimental para extração de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

Ensaio	EtOH (%) (X <sub>1</sub> )*	Tempo (min) (X <sub>2</sub> )*
1	18,91 (-1)	6 (-1)
2	86,09 (+1)	6 (-1)
3	18,91 (-1)	26 (+1)
4	86,09 (+1)	26 (+1)
5	5 (-1,414)	16 (0)
6	100 (+1,414)	16 (0)
7	52,50 (0)	2 (-1,414)
8	52,50 (0)	30 (+1,414)
9	52,50 (0)	16 (0)
10	52,50 (0)	16 (0)
11	52,50 (0)	16 (0)

\*X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>: valores codificados

Fonte: autoria própria.

Para cada ensaio, 15 g de amostra úmida de SC foram pesados e adicionados a 50 mL de solução hidroetanólica em um béquer, o que corresponde a aproximadamente 1,2 g de amostra seca em cada ensaio. Em seguida, cada ensaio foi submetido a ultrassom de ponteira de acordo com o tempo determinado pelo planejamento experimental a 40% de amplitude. Um banho de gelo foi utilizado para evitar superaquecimento e possível degradação dos compostos ativos, de maneira que a temperatura não ultrapassasse 40°C. Após passarem por ultrassom, as suspensões obtidas foram filtradas com papel filtro, obtendo-se então extratos límpidos, que foram armazenados sob o abrigo da luz e calor em freezer para posterior determinação de CFT.

#### 2.1.4.2 Carotenoides

Os carotenoides presentes em SC também foram extraídos utilizando-se um outro planejamento experimental através de Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup>, onde as variáveis estudadas foram (1) concentração de SC e (2) tempo de ultrassom (Tabela 2.2). As escolhas de % SC foram baseadas em testes preliminares e manteve-se a mesma variação de tempo utilizada para extração de CFT (2 a 30 min). Etanol concentrado (99,8%, 100 mL) foi utilizado como solvente.

**Tabela 2.2** – Matriz do planejamento experimental para extração de carotenoides

<b>Ensaio</b>	<b>% SC (X<sub>1</sub>)*</b>	<b>Tempo (min) (X<sub>2</sub>)*</b>
1	6 (-1)	6 (-1)
2	26 (+1)	6 (-1)
3	6 (-1)	26 (+1)
4	26 (+1)	26 (+1)
5	2 (-1,414)	16 (0)
6	30 (+1,414)	16 (0)
7	16 (0)	2 (-1,414)
8	16 (0)	30 (+1,414)
9	16 (0)	16 (0)
10	16 (0)	16 (0)
11	16 (0)	16 (0)

\*X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>: valores codificados

Fonte: autoria própria.

Os carotenoides foram analisados e quantificados em relação ao teor de  $\beta$ -caroteno com auxílio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu, Prominence) com detector por arranjos de diodos e coluna analítica em fase reversa C30 (YCM Carotenoid, 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5  $\mu$ m). A fase móvel composta de metanol (95%): éter metil-terc-butílico (5%) foi mantida por 65 minutos com fluxo de 0,9 mL/min. O forno da coluna foi mantido a 35°C com injeção de 20  $\mu$ L da amostra. Os cromatogramas foram adquiridos em 450 nm e os dados coletados no software LC Solution, versão 1.21. Todos os cromatogramas obtidos apresentaram três picos de separação, com o tempo de retenção próximo de 56 minutos referente ao  $\beta$ -caroteno. A curva padrão obtida para este composto foi feita com concentrações entre 1 e 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>:

$$y = 189072x - 315105 \quad (R^2 = 0,9387) \quad (2.5)$$

Onde y é a área do pico e x, a concentração de  $\beta$ -caroteno, em  $\mu$ g por mL de extrato.

### 2.2.5 Análises estatísticas

Análises de variância (ANOVA) e testes de Tukey de comparações múltiplas com um nível de significância de 5% foram realizados usando o software Statistica 7.0 para comparação dos resultados obtidos para a composição química de SC e para a quantificação de compostos fitoquímicos extraídos.

A análise dos efeitos das variáveis estudadas sobre a quantidade de carotenoides e compostos fenólicos de acordo com o planejamento experimental também foi avaliada utilizando o software Statistica 7.0. Os dados foram ajustados ao modelo polinomial de segunda ordem (Equação 2.5) segundo a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a significância do modelo obtido para cada variável de resposta a 95% de intervalo de confiança.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (2.6)$$

Sendo  $Y_i$ : função resposta;  $X_1, X_2$ : valor das variáveis independentes;  $\beta_0$ : coeficiente relativo à interpretação do plano com o eixo resposta;  $\beta_1, \beta_2$ : coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;  $\beta_{11}, \beta_{22}$ : coeficiente das variáveis quadráticas;  $\beta_{12}$ : coeficiente de interação entre as variáveis independentes.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Processamento de cenoura e caracterização de resíduos

O processamento de cenouras resultou em um rendimento de suco de 19,3% (m/m), enquanto que o restante corresponde a 38,7% (m/m) de SC e 42,0% (m/m) de FC. Estes valores são indicativos de que maior parte do material utilizando durante o processamento é normalmente descartado pela indústria e não é utilizado posteriormente. Dessa forma, destaca-se mais uma vez que o seu aproveitamento pode ser realizado através da extração de compostos fitoquímicos.

Os dados de composição dos resíduos produzidos podem ser observados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** – Composição de subproduto (SC) e folhas (FC) das cenouras utilizadas, em base úmida (g/100g)

	SC	FC
<b>Umidade</b>	92,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	87 ± 1 <sup>b</sup>
<b>Cinzas</b>	1,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,59 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>Proteína bruta</b>	0,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,53 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>Fibra bruta</b>	1,32 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,2 <sup>b</sup>
<b>Lipídeos</b>	0,10 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>Carboidratos</b>	4,98	5,48

a,b: letras minúsculas diferentes entre si na mesma linha indicam diferença significativa entre a composição de SC e FC de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: autoria própria.

Uma revisão feita por Sharma et al. (2012) mostra que os valores obtidos para SC se assemelham àqueles reportados na literatura para cenouras, apesar de diferentes cultivos poderem apresentar composições diferentes entre si. Para a umidade, por exemplo, são encontrados teores entre 86 e 88%, enquanto que o teor de cinzas representa apenas 1,1% da composição (SHARMA et al., 2012). Os teores de proteína bruta (0,9%) e fibra bruta (1,2%) estão próximos dos relatados, enquanto que lipídeos (0,2%) e carboidratos (10,6%) foram encontrados em menores quantidades em SC do que aquelas publicadas na literatura. Estas diferenças de composição podem estar relacionadas a diversas variáveis, como a forma em que as raízes foram cultivadas.

FC apresentou teores mais altos de composição do que SC em todas as análises feitas, exceto para umidade. No entanto, observa-se que a água também é um dos principais constituintes da parte aérea das cenouras. Apesar de não ser utilizado neste trabalho, FC também apresenta possibilidades de reaproveitamento, como a produção de nanofibras a partir de resíduos lignocelulósicos (MARTELLI-TOSI et al., 2018).

### 2.3.2 Extração e quantificação de compostos fitoquímicos

A extração exaustiva de CFT foi realizada utilizando-se metanol, etanol e água como solventes, uma vez que compostos fenólicos podem ter interações diferentes com cada solvente de acordo com sua polaridade. Considerando que SC possui um alto teor de umidade e que a

presença de água pode afetar a extração dos compostos, testes também foram realizados utilizando-se SC em sua forma seca. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4** – Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFT) a partir da extração exaustiva utilizado três solventes: água, metanol e etanol, realizada a partir do resíduo seco e úmido. Os valores foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  SC, em base seca

SC	Solvente	CFT ( $\mu\text{g/g}$ SC, base seca)
<b>Seco</b>	Água	2132
	Metanol	1381
	Etanol	707
<b>Úmido</b>	Água	1818
	Metanol	2532
	Etanol	1126

Fonte: autoria própria.

Nota-se que o processo secagem de SC prejudica a extração de CFT quando metanol ou etanol são utilizados, uma vez que há uma diminuição dos valores obtidos. Este resultado pode ser devido à degradação dos compostos durante o aquecimento para secagem ou ainda por CFT presentes em SC possivelmente apresentarem uma maior afinidade por água. Sendo assim, determinou-se que os ensaios posteriores seriam realizados com o subproduto úmido, reduzindo a quantidade de processos necessários para o aproveitamento de SC.

Em relação ao tipo de solvente utilizado, o etanol foi selecionado para dar prosseguimento aos próximos experimentos. Apesar de água e metanol terem apresentado uma maior eficiência para extração de CFT, é necessário destacar que SC também apresenta compostos apolares, como carotenoides, e que sua extração não é possível de ser feita com água. O metanol, por sua vez, também não é viável neste trabalho por não ser considerado um solvente reconhecido como seguro (GRAS).

### 2.3.2.1 Planejamento experimental

Os resultados obtidos para a extração de CFT variando-se concentração de solvente (% EtOH) e tempo de ultrassom podem ser observados na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5** – Condições experimentais e teores de Compostos Fenólicos Totais (CFT) extraídos do subproduto de cenoura (SC), em base úmida, utilizando-se etanol (EtOH) como solvente

Ensaio	EtOH (%) (X <sub>1</sub> )*	t (min) (X <sub>2</sub> )*	CFT (µg EAG/g SC)
1	18,91 (-1)	6 (-1)	78 ± 1
2	86,09 (+1)	6 (-1)	78 ± 2
3	18,91 (-1)	26 (+1)	81 ± 2
4	86,09 (+1)	26 (+1)	72 ± 3
5	5 (-1,414)	16 (0)	78 ± 2
6	100 (+1,414)	16 (0)	101 ± 3
7	52,50 (0)	2 (-1,414)	79 ± 1
8	52,50 (0)	30 (+1,414)	72 ± 1
9	52,50 (0)	16 (0)	67,4 ± 0,9
10	52,50 (0)	16 (0)	65 ± 2
11	52,50 (0)	16 (0)	65 ± 1

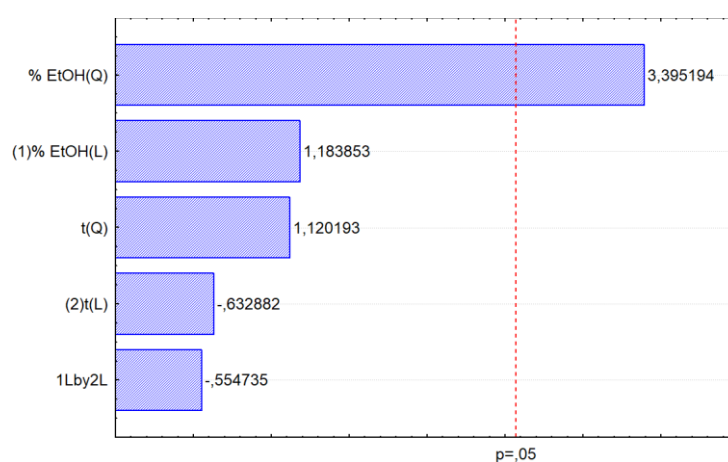
EtOH: etanol, t: tempo de ultrassom, X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub>: valores codificados.

Fonte: autoria própria.

O maior teor de CFT para as condições empregadas foi obtido no ensaio 6, usando a maior concentração de etanol proposta pelo planejamento experimental: 101 ± 3 µg EAG/g SC (base úmida), o que corresponde a aproximadamente 1262 µg EAG/g SC (em base seca). Esse valor foi similar ao encontrado por extração exaustiva em etanol (Tabela 2.4). Por outro lado, os valores mais baixos de CFT foram encontrados nos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11), chegando a um mínimo de 65,2 µg EAG/g SC (ou 815 µg EAG/g SC, em base seca). Quando comparado ao teor total de CFT através da extração exaustiva (Tabela 2.4), observa-se uma diminuição significativa na recuperação destes compostos. No entanto, é necessário destacar que a extração assistida por ultrassom trata-se de um método que utiliza uma técnica verde e que a extração exaustiva apresenta uma grande desvantagem em relação ao tempo necessário para que ocorra a extração máxima dos compostos.

A análise estatística dos resultados para avaliar os efeitos das variáveis estudadas sobre os teores de CFT extraídos podem ser observados no diagrama de Pareto da Figura 2.2. O diagrama de Pareto está associado aos efeitos de cada variável individualmente e suas interações. Neste diagrama, os efeitos padronizados fornecem as alturas das barras que, por sua vez, são dispostas de modo decrescente. O efeito de cada variável é tão significativo quanto mais à direita da linha vermelha ele estiver no nível de significância de 95% de confiança ( $p=0,05$ ) (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

**Figura 2.2** – Diagrama de Pareto para extração de CFT



Fonte: autoria própria.

A análise da Figura 2.2 mostra que apenas o parâmetro quadrático da variável % EtOH foi significativo ( $p < 0,05$ ). Além disso, o efeito positivo para esta variável indica que um aumento na concentração de etanol resulta em maiores teores de CFT extraídos. Normalmente as extrações de CFT incluem também a presença de água na mistura, como relatado por Mendes et al. (2019). No entanto, é necessário destacar que 92% de SC é composto por água (Tabela 2.3) e que a condição experimental utilizando etanol 99,8% (ensaio 6) também trata-se de uma solução etanólica não concentrada. Comportamentos semelhantes em relação à concentração de solvente na extração de CFT foi observado por Alara et al. (2017) ao trabalharem com folhas de *Vernonia amygdalina* e por Durling et al. (2007) para sálvia comum. Em geral, solventes mais polares são utilizados para extração de compostos fenólicos. Logo, os compostos e a quantidade deles extraída irá depender das características moleculares dos fenólicos, incluindo número de hidroxilas e a dimerização das estruturas (MENDES et al., 2019).

A variável tempo não apresentou efeito significativo a 95% de confiança quando comparado com o efeito do solvente, que apresentou efeito muito mais pronunciado (Figura 2).



Portanto, as condições de tempo avaliadas neste planejamento não influenciaram diretamente a extração de CFT, como relatado na literatura para outras matérias-primas (SETYANINGSIH et al., 2019).

Os valores de CFT foram então ajustados ao modelo quadrático polinomial segundo o DCCR 2<sup>2</sup> empregado. Os coeficientes de regressão e a análise de variância (ANOVA) estão apresentados na Tabela 2.6.

**Tabela 2.6** – Coeficiente de regressão e análise de variância (ANOVA) para CFT

<b>Coeficientes</b>	<b>CFT (Y<sub>1</sub>)</b>
$\beta_0$	65,97
<b>Linear</b>	
$\beta_1$	3,09
$\beta_2$	-1,65
<b>Quadrático</b>	
$\beta_{11}$	10,56*
$B_{22}$	3,48
<b>Interação</b>	
$\beta_{12}$	-2,05
<b>R<sup>2</sup></b>	0,73
<b>F<sub>calculado</sub></b>	11,07
<b>F<sub>tabelado1</sub></b>	5,12
<b>F<sub>falta de ajuste</sub></b>	42,00
<b>F<sub>tabelado2</sub></b>	4,74

\*indica significância a 95% de intervalo de confiança.

1: concentração EtOH, 2: tempo de ultrassom.

Fonte: autoria própria.

Segundo o teste F, os modelos significativos são aqueles em que  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado1}}$ , e os modelos preditivos são aqueles em que  $F_{\text{falta de ajuste}} < F_{\text{tabelado2}}$ . Portanto, observa-se que o modelo é significativo, mas não preditivo. Assim, os resultados não permitiram a obtenção de um modelo matemático para extração de CFT em função de % EtOH e tempo de ultrassom no intervalo de valores das variáveis estudados a 95% de intervalo de confiança. Dessa forma, superfícies de resposta não foram obtidas e a otimização do processo de extração não foi

possível. Apesar disto, destaca-se que a técnica empregada foi capaz de extrair teores consideráveis de CFT a partir de SC.

Além disso, uma análise de espectroscopia por varredura do extrato com maior teor de etanol usado para extração de CFT (Tabela 2.5, ensaio 6) mostrou banda de absorção próxima de 450 nm, comprimento de onda de absorção de carotenoides (HIRANVARACHAT; DEVAHASTIN, 2014). Dessa forma, percebeu-se que o uso de uma solução concentrada de etanol seria capaz de extrair CFT ao mesmo passo que extrairia também carotenoides. Um novo planejamento experimental foi sugerido, de modo que a concentração de solvente se mantivesse fixa e que as novas variáveis estudadas fossem (1) concentração de SC e (2) tempo de ultrassom. Os dados obtidos para a extração simultânea de CFT e  $\beta$ -caroteno utilizando um DCCR estão na Tabela 2.7

**Tabela 2.7** – Teores de CFT e  $\beta$ -caroteno extraídos do subproduto de cenoura (SC), em base úmida, através de planejamento experimental variando-se concentração de SC e tempo de ultrassom em minutos

Ensaio	SC (%)	t (min)	CFT ( $\mu\text{g EAG/g SC}$ )	$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g SC}$ )
1	6 (-1)	6 (-1)	244 $\pm$ 2	59,63
2	26 (+1)	6 (-1)	128,8 $\pm$ 0,2	10,87
3	6 (-1)	26 (+1)	272 $\pm$ 1	60,21
4	26 (+1)	26 (+1)	132,4 $\pm$ 0,8	9,5
5	2 (-1,414)	16 (0)	264,2 $\pm$ 0,3	113,36
6	30 (+1,414)	16 (0)	117 $\pm$ 2	7,86
7	16 (0)	2 (-1,414)	134,9 $\pm$ 0,8	28,65
8	16 (0)	30 (+1,414)	123 $\pm$ 1	19,32
9	16 (0)	16 (0)	109,3 $\pm$ 0,5	26,41
10	16 (0)	16 (0)	111,1 $\pm$ 0,4	27,54
11	16 (0)	16 (0)	117,0 $\pm$ 0,2	31,16

t: tempo de ultrassom

Fonte: autoria própria.

Os resultados obtidos permitem a observação de que a condição de extração máxima de CFT foi obtida no ensaio 5, onde uma maior extração de  $\beta$ -caroteno também foi observada. Quando comparados à primeira extração realizada (Tabela 2.5), os teores de CFT obtidos neste

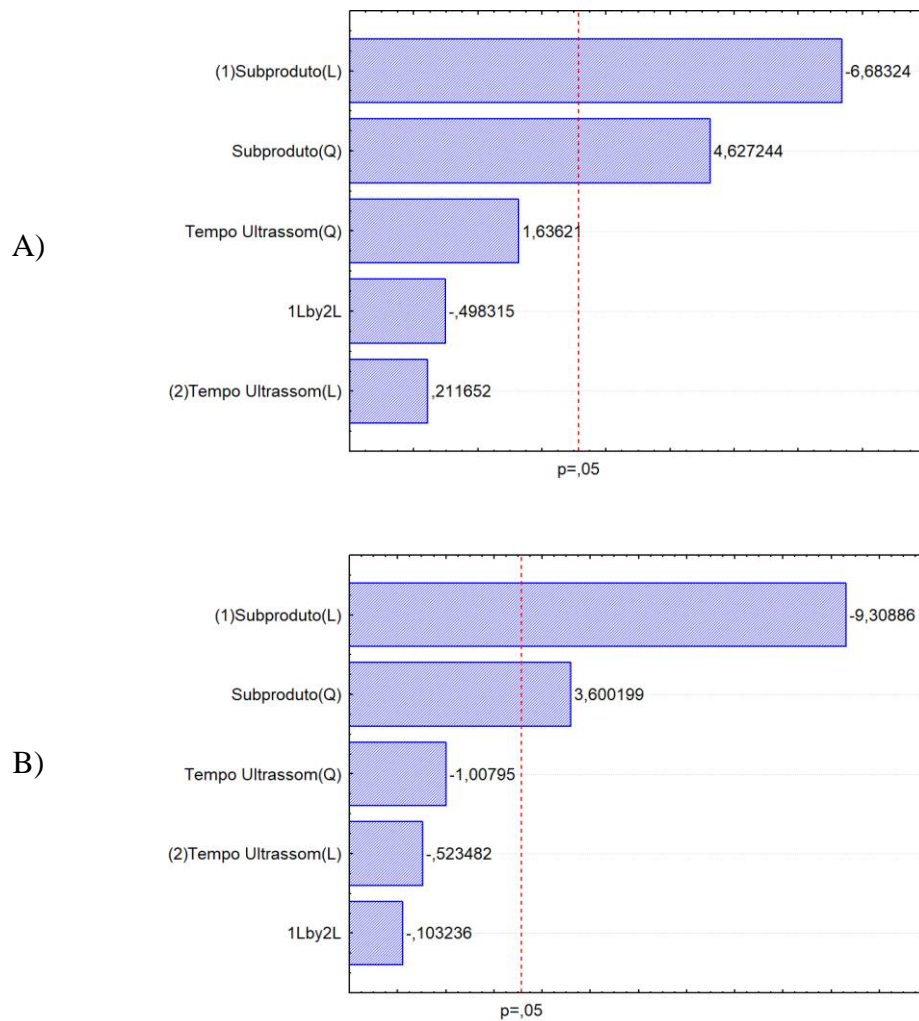
planejamento experimental foram todos superiores, aumentando em até 164% a quantidade de composto fenólicos extraídos e atingindo-se um rendimento maior em relação ao teor total de CFT determinado pela extração exaustiva (1126  $\mu\text{g}$  EAG/g SC).

Por sua vez, a extração máxima de  $\beta$ -caroteno corresponde a 113,36  $\mu\text{g/g}$  SC. Um estudo de extração supercrítica com  $\text{CO}_2$  realizado para casca de cenoura demonstrou um teor de  $\beta$ -caroteno igual a 127,8  $\mu\text{g/g}$  (DE ANDRADE LIMA; CHARALAMPOPOULOS; CHATZIFRAGKOU, 2018), estando próximo do valor encontrado para SC.

Para um mesmo tempo de ultrassom aplicado (conjuntos de ensaios 1 e 2 ou 3 e 4), os teores de CFT aumentam cerca de 5 vezes ao diminuir a concentração de SC de 26 para 6%. O mesmo comportamento é observado para os teores de  $\beta$ -caroteno, em que a quantidade extraída pode ser até 6 vezes maior quando a quantidade de material utilizado para a extração é diminuído. Percebe-se, portanto, que uma menor quantidade de subproduto utilizada favorece a extração de ambos os compostos fitoquímicos.

A análise estatística foi feita e os efeitos das variáveis foram avaliados em relação a cada uma das respostas, no nível de significância de 95% de confiança. Os diagramas de Pareto podem ser observados na Figura 2.3. A Figura 2.3A demonstra que o parâmetro linear para concentração de SC possui efeito significativo ( $p < 0,05$ ) e negativo sobre os teores de CFT obtidos, indicando que concentrações mais altas de SC resultam em extrações menos eficientes, como observado e discutido anteriormente. A Figura 2.3B apresenta um comportamento semelhante para a segunda variável resposta estudada, em que o efeito significativo da concentração de SC também é inversamente proporcional à extração de  $\beta$ -caroteno.

**Figura 2.3** – Diagramas de Pareto para extração de (A) CFT e (B)  $\beta$ -caroteno



Fonte: autoria própria.

O efeito da razão sólido:solvente (ou da concentração de SC utilizada) é um fator importante na eficiência da extração. A fim de se extrair os compostos da matriz utilizada, uma quantidade suficiente de solvente deve ser fornecida de forma que a solução não seja saturada pela quantidade de sólido (SC) adicionado (CIVAN; KUMCUOGLU, 2019; GOULA et al., 2017). As extrações menos eficientes observadas para concentrações mais altas de SC podem ser resultado da saturação das soluções utilizadas. Neste caso, uma redução da habilidade de dissolução do solvente é observada, apesar da aplicação de ultrassom, que esperava-se facilitar este processo (GOULA et al., 2017; MERCADO-MERCADO et al., 2018). De fato, os diagramas de Pareto mostram que a variável tempo de ultrassom estudada não apresentou efeito significativo para nenhuma das respostas.

Os valores de CFT e  $\beta$ -caroteno ajustados ao modelo quadrático polinomial segundo o DCCR 2<sup>2</sup>, os coeficientes de regressão e a análise de variância (ANOVA) estão apresentados na Tabela 2.8.

**Tabela 2.8** – Coeficiente de regressão e análise de variância (ANOVA) para CFT

<b>Coeficientes</b>	<b>CFT (Y<sub>1</sub>)</b>	<b><math>\beta</math>-caroteno (Y<sub>2</sub>)</b>
$\beta_0$	112,46	28,37
<b>Linear</b>		
$\beta_1$	-57,90*	-31,09*
$\beta_2$	1,83	-1,75
<b>Quadrático</b>		
$\beta_{11}$	47,72*	14,31*
$B_{22}$	16,87	-4,01
<b>Interação</b>		
$\beta_{12}$	-6,11	-0,49
<b>R<sup>2</sup></b>	0,93	0,95
<b>F<sub>calculado</sub></b>	31,86	65,56
<b>F<sub>tabelado1</sub></b>	4,46	4,46
<b>F<sub>falta de ajuste</sub></b>	47,95	14,88
<b>F<sub>tabelado2</sub></b>	19,3	19,3

\*indica significância a 95% de intervalo de confiança.

1: concentração de SC, 2: tempo de ultrassom.

Fonte: autoria própria.

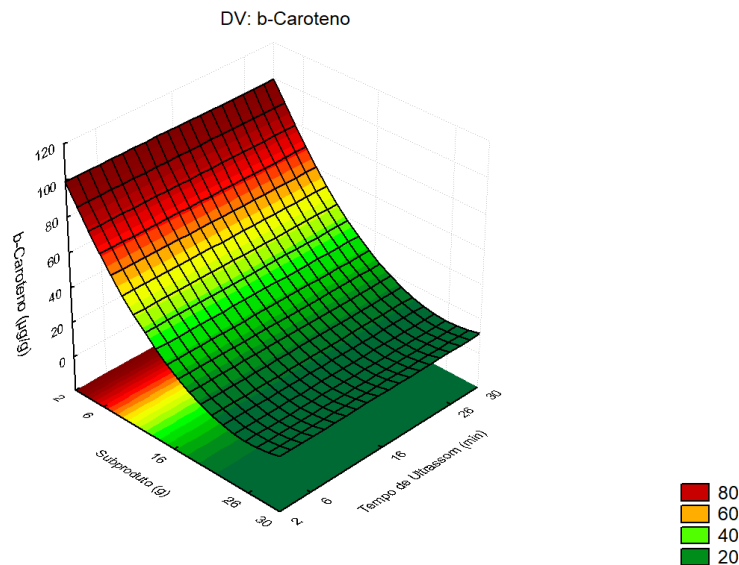
De acordo com o teste F, o modelo matemático para CFT é significativo porque  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado1}}$ . No entanto, o modelo não é preditivo ( $F_{\text{falta de ajuste}} > F_{\text{tabelado2}}$ ) e a otimização para extração de compostos fenólicos não foi possível. No entanto, para a extração de  $\beta$ -caroteno, o teste foi significativo ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado1}}$ ) e também preditivo ( $F_{\text{falta de ajuste}} < F_{\text{tabelado2}}$ ). Assim, foi possível a obtenção de um modelo matemático codificado para o teor de  $\beta$ -caroteno, considerando apenas os parâmetros que foram significativos. O modelo pode ser observado na Equação 2.7.

$$\beta\text{-caroteno} = 28,37 - 31,09 X_1 + 14,31 X_1^2 \quad (2.7)$$

Onde  $X_1$  é o valor codificado para % SC.

Com base neste modelo, foi construído o gráfico de superfície de resposta para teor de  $\beta$ -caroteno (Figura 2.4).

**Figura 2.4** – Superfície de resposta da concentração de  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$  SC) obtida através da extração assistida por ultrassom (2 a 30 min) em diferentes concentrações de SC (2 a 30%), com nível de significância de 5%



Fonte: autoria própria.

Os teores mais altos de  $\beta$ -caroteno são obtidos nas regiões em vermelho, enquanto que as regiões verdes representam uma diminuição na eficiência da extração para este composto. A análise da superfície de resposta reforça a tendência observada anteriormente e indica que, para qualquer tempo utilizado entre o intervalo estudado (2 a 30 min), a extração de  $\beta$ -caroteno depende unicamente da concentração de SC utilizada, e um aumento no teor de  $\beta$ -caroteno extraído é observado quando o tempo de ultrassom é mantido constante e a concentração de SC é diminuída.

Por se tratar de um modelo preditivo, prosseguiu-se então com a otimização do processo de extração para determinação dos valores das variáveis em que o teor de  $\beta$ -caroteno obtido é máximo dentro dos limites propostos no planejamento experimental.

### 2.3.2.2 Otimização da extração de $\beta$ -caroteno

A otimização do processo de extração de  $\beta$ -caroteno foi realizada utilizando-se o software *Statistica 7* através da transformação da função resposta em uma função denominada de “desejabilidade”, onde os valores ótimos codificados determinados foram iguais a -1,414 para % SC (2%) e -1,414 para tempo de ultrassom (2 min). Estes valores podem ser aplicados no modelo obtido e substituídos na Equação 2.6 para a obtenção de um valor predito para a variável resposta ( $\beta$ -caroteno).

Extratos com as condições de 2% de SC em solução etanólica e 2 min de ultrassom foram produzidos. Os teores de  $\beta$ -caroteno determinados foram utilizados para validação do modelo, onde o desvio relativo (DR) é calculado. A quantificação de CFT no extrato obtido também foi realizada, apesar do modelo obtido para esta variável não ter sido preditivo. Os resultados contendo a comparação entre o valor experimental e o predito estão dispostos na Tabela 2.9.

**Tabela 2.9** – Valores experimentais e preditos para otimização de extração de  $\beta$ -caroteno em  $\mu\text{g/g}$  SC, em base úmida

Variável dependente	Valor experimental	Valor predito	DR (%)
CFT ( $\mu\text{g}$ EAG/g SC)	$29 \pm 2$	-	-
$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$ SC)	$113 \pm 5$	99,42	+12

DR (%): [(valor experimental – valor predito)/valor experimental]  $\times$  100

Fonte: autoria própria.

É possível notar que o processo de otimização de  $\beta$ -caroteno resultou em resultados melhores do que aquele predito pelo modelo, com um desvio relativo de +12%. Por outro lado, observa-se que a quantidade de CFT para o extrato otimizado decaiu significativamente em relação aos teores obtidos anteriormente, sendo o mínimo valor obtido até então durante todos os ensaios feitos de extração.

Embora a condição ótima foi a de 2g de SC/100 mL de suspensão, a proporção de compostos fitoquímicos na suspensão obtida apresentou teores muito baixos de CFT: 5,29 mg EAG/mL de suspensão e  $\beta$ -caroteno: 2,27  $\mu\text{g/mL}$  de suspensão. Como o objetivo deste trabalho também foi a encapsulação dos compostos da suspensão, optou-se por aumentar a concentração de SC na suspensão para 6%, visto que esses resultados também apresentaram altos rendimentos (Tabela 2.7).

### 2.3.2.3 Cinética de extração

Apesar da otimização da extração de  $\beta$ -caroteno ter apresentado resultados positivos para carotenoides, a quantidade de CFT obtida nas condições ótimas foi baixa. O ultrassom é considerado como um facilitador na extração de compostos fitoquímicos, mas também pode causar a degradação dos compostos que estão sendo extraídos se aplicado por muito tempo, uma vez que pode ocorrer o aquecimento da solução. Nos planejamentos experimentais estudados, a variável tempo não apresentou efeito significativo a 95% de confiança, e um estudo cinético foi então proposto para avaliar até qual ponto o aumento do tempo de ultrassom auxilia na extração simultânea de CFT e carotenoides usando 6 g de SC. Os dados obtidos podem ser observados na Tabela 2.10.

**Tabela 2.10** – Extração e quantificação de CFT e carotenoides em função do tempo de ultrassom (2 a 16 min) por grama de SC em base úmida

Tempo (min)	$\alpha$ -caroteno ( $\mu\text{g/g SC}$ )	$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g SC}$ )	CFT ( $\mu\text{g EAG/g SC}$ )
2	12,67 $\pm$ 2,52 <sup>a</sup>	20,69 $\pm$ 3,17 <sup>a</sup>	53 $\pm$ 5 <sup>a</sup>
6	14,03 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	23,93 $\pm$ 2,46 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>
11	13,58 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	22,92 $\pm$ 1,91 <sup>a</sup>	81 $\pm$ 6 <sup>c</sup>
16	12,66 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	20,89 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup>	67 $\pm$ 6 <sup>abc</sup>

a-c: letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna indicam diferença significativa entre ensaios de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: autoria própria.

Para extração de carotenoides não há diferença significativa entre o intervalo de tempo estudado, onde os teores máximos extraídos de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno foram de 14,03 e 23,93  $\mu\text{g/g SC}$ , respectivamente. Por outro lado, observa-se que a extração de CFT só é favorecida até 11 minutos, uma vez que a partir de 16 minutos ocorre uma diminuição significativa na quantidade extraída em relação ao tempo anterior. É possível observar também que há uma diminuição no teor total de carotenoides extraídos em relação ao ponto ótimo obtido através da otimização da extração (seção 2.2.2.2). No entanto, ressalta-se mais uma vez que o objetivo deste trabalho foi a extração simultânea de duas classes de compostos com características físico-químicas opostas, como a polaridade, o que indica que as condições aplicadas eventualmente irão desfavorecer a extração de um ou outro composto. Apesar disso, a Tabela 2.10 indica que a extração de carotenoides e CFT utilizando 11 minutos de extração é capaz de recuperar teores



satisfatórios destes compostos e esta condição foi selecionada para dar prosseguimento à encapsulação.

### **2.3 Conclusão**

O processamento de cenouras indicou que uma grande quantidade de subproduto é obtida durante a fabricação de suco. SC apresenta composição química similar à cenoura, sendo constituído principalmente por água, além de apresentar compostos fitoquímicos como compostos fenólicos e carotenoides. O aproveitamento de SC foi possível através da extração deste compostos, que foi realizada utilizando-se uma técnica verde (em relação ao uso de solvente) assistida por ultrassom. Dentre as vantagens deste processo de extração, destaca-se a utilização de um solvente barato e seguro para consumo (etanol) e também a diminuição de tempo necessário quando comparado a métodos tradicionais, que envolvem gastos de energia e uso de solventes como metanol. Além disso, também foi possível a extração simultânea e em quantidades relevantes de compostos com polaridades diferentes, diminuindo a necessidade de processos separados de extração.

## REFERÊNCIAS

- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; OLALERE, O. A. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 7–16, 2017.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Washington: AOAC, 2005.
- BAITE, T. N.; MANDAL, B.; PURKAIT, M. K. Ultrasound assisted extraction of gallic acid from *Ficus auriculata* leaves using green solvent. **Food and Bioproducts Processing**, v. 128, p. 1–11, 1 jul. 2021.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- CIVAN, M.; KUMCUOGLU, S. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoid and capsaicinoid from the pulp of hot pepper paste based on the bio-refinery concept. **Lwt**, v. 113, n. November 2018, p. 108320, 2019.
- DE ANDRADE LIMA, M.; CHARALAMPOPOULOS, D.; CHATZIFRAGKOU, A. Optimisation and modelling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction process of carotenoids from carrot peels. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 94–102, 1 mar. 2018.
- DURLING, N. E. et al. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1417–1424, 1 jan. 2007.
- GOULA, A. M. et al. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 821–830, 2017.
- GUANDALINI, B. B. V.; RODRIGUES, N. P.; MARCZAK, L. D. F. Sequential extraction of phenolics and pectin from mango peel assisted by ultrasound. **Food Research International**, v. 119, p. 455–461, 2019.
- HIRANVARACHAT, B.; DEVAHASTIN, S. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 17–26, 1 abr. 2014.
- KHANDARE, R. D.; TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. Kinetic modeling and process intensification of ultrasound-assisted extraction of d-limonene using citrus industry waste. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 159, p. 108181, 1 fev. 2021.
- MARTELLI-TOSI, M. et al. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 61–68, 15 out. 2018.
- MENDES, M. K. DE A. et al. Application of multivariate optimization for the selective extraction of phenolic compounds in cashew nuts (*Anacardium occidentale* L.). **Talanta**, v. 205, n. May, p. 120100, 2019.
- MERCADO-MERCADO, G. et al. Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from mango (*Mangifera indica* L. ‘Ataulfo’) by-products on in vitro bioaccessibility. **Food Bioscience**, v. 21, p. 125–131, 2018.
- PICOT-ALLAIN, C. et al. Conventional versus green extraction techniques - A comparative perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 40, p. 144–156, 1 ago. 2021.

- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas, Brasil: Casa do Pão, 2014.
- SETYANINGSIH, W. et al. Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains. **Food Chemistry**, v. 288, p. 221–227, 2019.
- SHARMA, K. D. et al. Chemical composition, functional properties and processing of carrot—A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 22–32, 2012.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63–68, 1959.

**CAPÍTULO 3. ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS  
FITOQUÍMICOS DE SUBPRODUTO DE CENOURA EM  
LIPOSSOMAS, QUITOSSOMAS E TPP-QUITOSSOMAS**

### 3.1 Introdução

A aplicação de compostos fitoquímicos nas indústrias alimentícias ou farmacêuticas pode ser limitada devido à alta taxa de degradação destes compostos em condições industriais ou à baixa solubilidade nas matrizes de interesse. Dessa forma, a encapsulação destes compostos é uma alternativa bastante pesquisada para resolver tais problemas ou ainda para permitir a liberação controlada dos ativos (MCCLEMENTS, 2015).

Os lipossomas são partículas interessantes para a encapsulação de compostos fitoquímicos porque possuem a característica anfifílica e são capazes de reter compostos polares no seu interior e apolares nas bicamadas lipídicas. No entanto, os lipossomas podem sofrer degradação através da oxidação e hidrólise dos lipídeos presentes em sua estrutura e ocasionar a liberação dos compostos encapsulados (TAYLOR et al., 2005). O uso de biopolímeros como material de recobrimento de lipossomas tem sido bastante utilizado com o objetivo de aumentar a estabilidade das partículas. Dentre os biopolímeros utilizados, podem ser citados amido, quitosana, proteínas ou celulose (NAHAR et al., 2014; NUNES et al., 2016; TAN; WANG; SUN, 2021).

A quitosana é um dos biopolímeros mais utilizados para recobrimento, produzindo sistemas conhecidos como “quitossomas”. Além disso, a quitosana também pode ser reticulada com tripolifosfato de sódio para a formação de complexos, produzindo partículas conhecidas como “TPP-quitossomas”. Estudos recentes mostram que a aplicação de TPP-quitossomas como meio de encapsulação foram eficientes para compostos ativos como a quercetina (CADDEO et al., 2016) e a vitamina D3 (IIDA et al., 2019), mas este sistema ainda não foi utilizado para a co-encapsulação de compostos fenólicos e carotenoides até o momento.

Assim, este capítulo compreende a encapsulação de compostos fitoquímicos extraídos do subproduto de cenoura em partículas de lipossomas ou lipossomas recobertos com quitosana (reticulada com TPP ou não). A co-encapsulação de compostos fenólicos e carotenoides nestas partículas foi estudada através das caracterizações de morfologia, tamanho de partículas, potencial zeta e estudos de estabilidade.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Material

Os fosfolipídios PHOSPHOLIPON® 90 G (P90G, teor superior a 94%) da Lipoid foram adquiridos através Lipid Ingredients (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Etanol P.A. 99,8% foi adquirido da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil). Quitosana de média massa molecular, tripolifosfato de sódio (TPP) e ácido acético PA foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

### 3.2.2 Encapsulação do extrato

Inicialmente, os compostos fenólicos e carotenoides foram extraídos do subproduto da cenoura utilizando-se a condição ótima definida através dos estudos discutidos no Capítulo 2. Dessa forma, 6 g de SC foram adicionados a 100 mL de etanol 99,8% como solvente, aplicando-se 11 minutos de ultrassom para obtenção do extrato. Os compostos extraídos foram então co-encapsulados em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) como descrito por Caddeo et al. (2016) e Iida et al. (2019), com algumas modificações. O fluxograma para produção das partículas está apresentado na Figura 3.1.

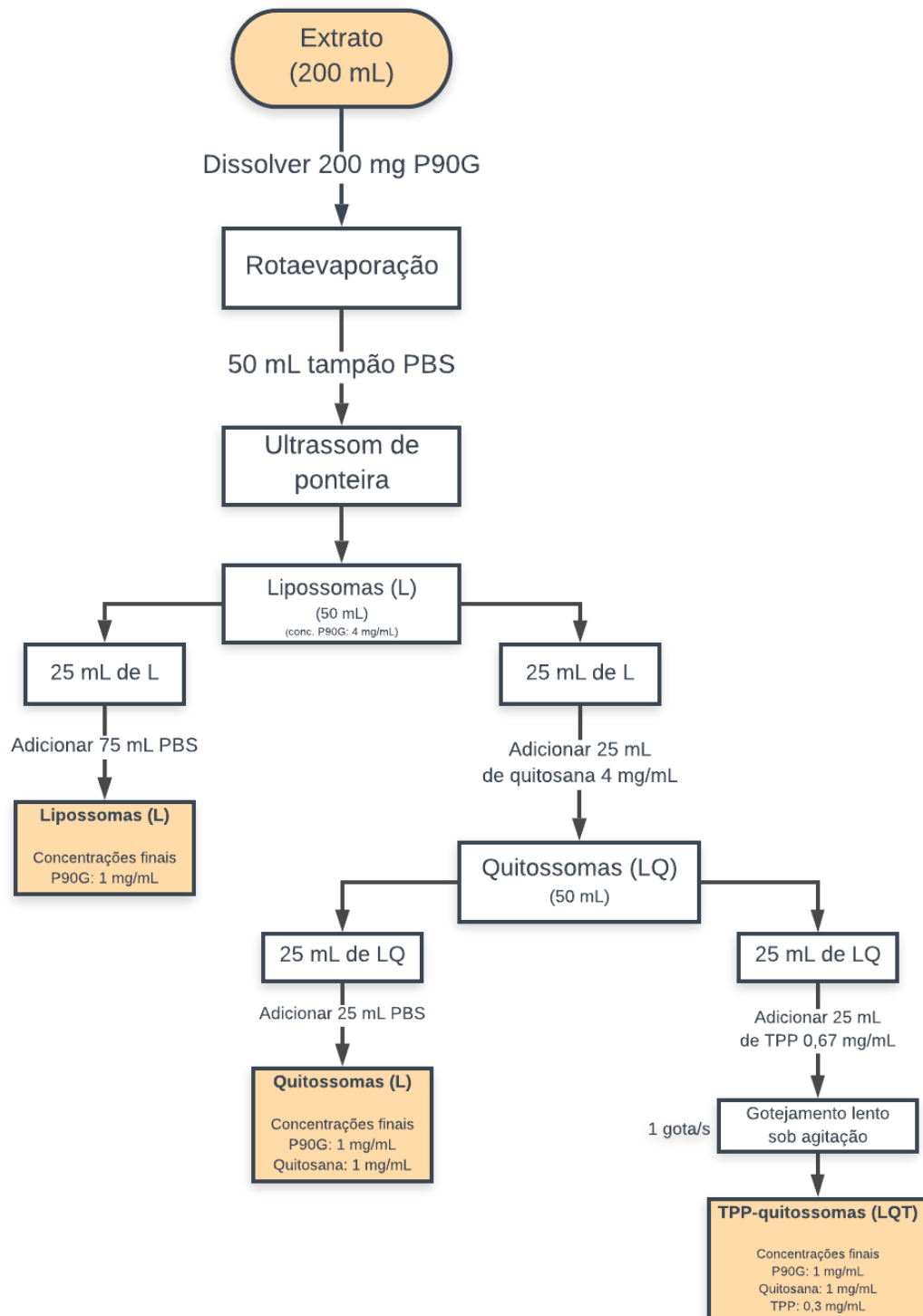
Para a produção de L, os fosfolipídios (1 mg/mL) foram dissolvidos no extrato etanólico contendo os compostos fenólicos e carotenoides. Em seguida, o solvente foi rotaevaporado a 40°C em um rotaevaporador (Marconi MA 120, Brasil) para a formação de um fino filme lipídico, que foi hidratado com solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,4. Em seguida, a dispersão foi sonicada em ultrassom de ponteira (Delta Ultrassons) em 25 ciclos, sendo que cada ciclo consistiu em 5 segundos de ultrassom ligado com intervalos de 2 segundos do equipamento desligado.

Para a produção de LQ, uma suspensão de quitosana 4 mg/mL em ácido acético 1% foi adicionada à dispersão de lipossomas na proporção de 1:1, seguido de diluição através da adição de tampão PBS para que as concentrações finais fossem: P90G 1 mg/mL e quitosana 1 mg/mL

Para a produção de LQT, uma solução aquosa de TPP 0,67 mg/mL foi adicionada à suspensão de LQ também na proporção de 1:1. A adição foi feita através de gotejamento lento com auxílio de uma bureta e agitação magnética rápida. O fluxo de adição de TPP foi de aproximadamente 1 gota/s com uma distância de 10 cm entre a base do agitador magnético e a

ponta da bureta. As concentrações finais foram: P90G 1 mg/mL, quitosana 1 mg/mL e TPP 0,3 mg/mL.

**Figura 3.1** – Fluxograma para produção de partículas para co-encapsulação de compostos fitoquímicos



Fonte: autoria própria.

### 3.2.2.1 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada de acordo com Britto et al. (2014) e Tan et al. (2016), com modificações. De acordo com esta metodologia, considera-se que as partículas que contêm compostos encapsulados possuem massa suficiente para precipitarem durante o processo de centrifugação, e que os compostos que não foram encapsulados ficam livres no sobrenadante.

Para carotenoides, uma alíquota de 2 mL de cada amostra foi centrifugada a 12.000 rpg a 4°C por 10 minutos. Os carotenoides foram então extraídos três vezes do sobrenadante com 0,5 mL de éter de petróleo. O solvente foi evaporado e as amostras foram redissolvidas em uma solução 1:1 de acetato de etila:etanol e os compostos foram quantificados por HPLC como descrito anteriormente.

Para os compostos fenólicos, uma alíquota de 2 mL de cada amostra foi centrifugada a 12.000 rpg a 4°C por 5 minutos utilizando-se um filtro Amicon como descrito por Machado et al. (2019). O sobrenadante foi então utilizado para a quantificação de CFT através do método de Folin Ciocalteu descrito anteriormente.

A EE foi calculada de acordo com a Equação 3.1.

$$EE (\%) = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde  $C_t$  é a concentração total de cada composto presente e quantificado no extrato utilizado na encapsulação e  $C_s$  é a concentração de cada composto presente no sobrenadante.

### 3.2.3 Caracterização das partículas

As partículas encapsulando compostos fitoquímicos foram caracterizadas de acordo com sua morfologia, espectroscopia, tamanho, potencial zeta e estabilidade em função de tempo e temperatura, conforme metodologias descritas a seguir.

#### 3.2.3.1 Morfologia

A morfologia das partículas foi observada através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As suspensões foram gotejadas em fita de carbono, coloridas com acetato



de uranilo 1,5% (solução aquosa) e secas a temperatura ambiente por 24 h. As amostras foram examinadas em um microscópio JEM 100CXII (Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital MegaView III utilizando o software AnalysSIS com uma voltagem de 80 kV.

### **3.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier**

As análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em um espectrofotômetro (Spectrum-One, PerkinElmer, EUA) equipado com um acessório UATR (*Universal Attenuator Total Reflectance*). FTIR foi utilizado para identificar mudanças de grupos funcionais nas amostras liofilizadas de L, LQ e LQT. Cada espectro representa uma média de 40 varreduras individuais obtidas com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  na faixa espectral de 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.2.3.3 Tamanho de partículas e potencial zeta**

O tamanho de partículas de cada amostra foi determinado através da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) usando um Zetasizer Nano ZS Instrument (Malvern Instruments, Reino Unido), sendo que cada amostra foi diluída 100 vezes antes da determinação do raio hidrodinâmico. O potencial zeta das partículas também foi determinado utilizando o mesmo equipamento por espalhamento de luz eletroforético, sem diluição das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata nos dias 4, 7, 11, 18 e 25 após o processo de encapsulação.

### **3.2.3.4 Estabilidade dos compostos ativos**

A estabilidade dos compostos fitoquímicos encapsulados em L, LQ e LQT foi avaliada para determinar a capacidade de proteção destas partículas em relação ao tempo de armazenamento e temperatura. A estabilidade em relação ao tempo foi realizada através da quantificação dos compostos presentes em amostras que foram mantidas sob refrigeração de aproximadamente 8°C por 14 dias. A estabilidade em função da temperatura foi realizada de modo semelhante, onde as partículas foram submetidas a tratamento térmico (40 ou 70°C) e a degradação dos compostos foi avaliada através de sua quantificação em intervalos de tempo durante um total de 90 minutos.

### 3.2.4 Análises estatísticas

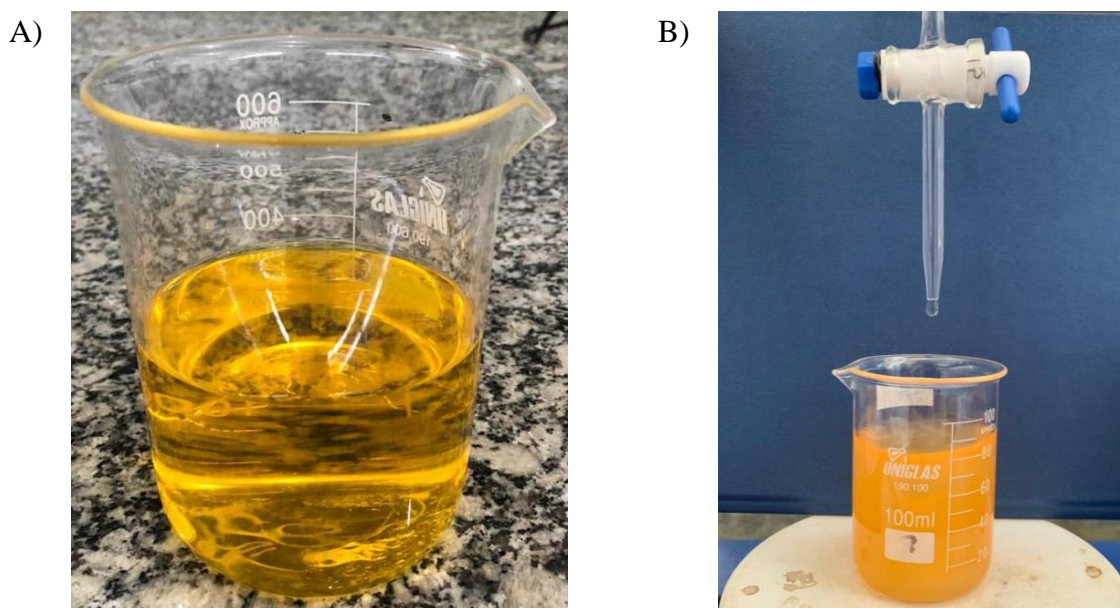
Análises de variância (ANOVA) e testes de Tukey de comparações múltiplas com um nível de significância de 5% foram realizados usando o software Statistica 7.0 para comparação dos resultados obtidos para EE.

## 3.3 Resultados e discussão

### 3.3.1 Encapsulação do extrato

A encapsulação do extrato resultou em suspensões de coloração alaranjada como decorrência da presença de carotenoides. Além disso, a presença de partículas LQT contribuiu para que as suspensões adquirissem opacidade quanto comparadas ao extrato (Figura 3.2).

**Figura 3.2** – Aspecto visual de (A) extrato e (B) suspensão de partículas durante a produção de TPP-quitossomas (LQT) para encapsulação do extrato



Fonte: autoria própria.

#### 3.3.1.1 Eficiência de encapsulação

A EE indica a habilidade das partículas de encapsular os fitoquímicos. A capacidade de encapsulação dos compostos é dependente de vários fatores como polaridade, encaixe estérico

na bicamada lipídica ou ainda a estabilidade dos fitoquímicos durante o processo de encapsulação (TAN et al., 2016). A Tabela 3.1 revela que  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno possuem uma habilidade similar em serem encapsulados independentemente da partícula utilizada (L, LQ ou LQT), atingindo um máximo de 86 e 90% em LQ, respectivamente. Assim, adição de quitosana como material de recobrimento para lipossomas (LQ) foi significativamente mais eficiente na encapsulação de  $\alpha$ -caroteno quanto comparado com L. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as amostras produzidas para a encapsulação de  $\beta$ -caroteno, indicando que a adição de quitosana reticulada não afeta negativamente os valores de EE neste caso. Os valores obtidos para encapsulação de  $\beta$ -caroteno estão de acordo com os resultados reportados por Tan et al. (2016), onde uma EE de 86% foi obtida ao encapsular o composto (padrão analítico) em quitossomas. Por terem característica apolar, os carotenoides ficam essencialmente na bicama lipídica dos lipossomas, e portanto a adição de quitosana não influencia diretamente os valores de EE.

É possível observar ainda na Tabela 3.1 que a encapsulação de CFT não apresentou diferenças significativas na EE para os três tipos de sistemas estudados, podendo chegar até um máximo de 89%. Valores semelhantes também foram encontrados por outros autores na encapsulação de compostos fenólicos em quitossomas, como os polifenóis extraídos de sementes de uva que apresentaram EE de 99,5% (GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016). Geralmente a encapsulação de compostos polares em lipossomas é mais limitada por ser necessário um espaço aquoso mais volumoso dentro da vesícula para acomodação das moléculas (MCCLEMENTS, 2015). Por exemplo, a encapsulação de ácido hidroxicinâmico atingiu valores mais baixos de EE, sendo 65,72% e 68,92% para lipossomas e quitossomas, respectivamente (RAN et al., 2020). No entanto, uma grande quantidade de CFT presentes no extrato de cenoura foram encapsulados, possivelmente por suas estruturas e propriedades físico-químicas serem compatíveis com os lipossomas produzidos, recobertos ou não.

**Tabela 3.1** – Valores de eficiência de encapsulação (EE) de compostos fitoquímicos (carotenoides e compostos fenólicos) em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT)

Amostra	EE (%)		
	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	CFT
L	75 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	79 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	89 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
LQ	86 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	90 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	86 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
LQT	76 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	79 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	86 $\pm$ 3 <sup>a</sup>

a,b: letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna indicam diferença significativa entre valores de EE para diferentes partículas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: autoria própria.

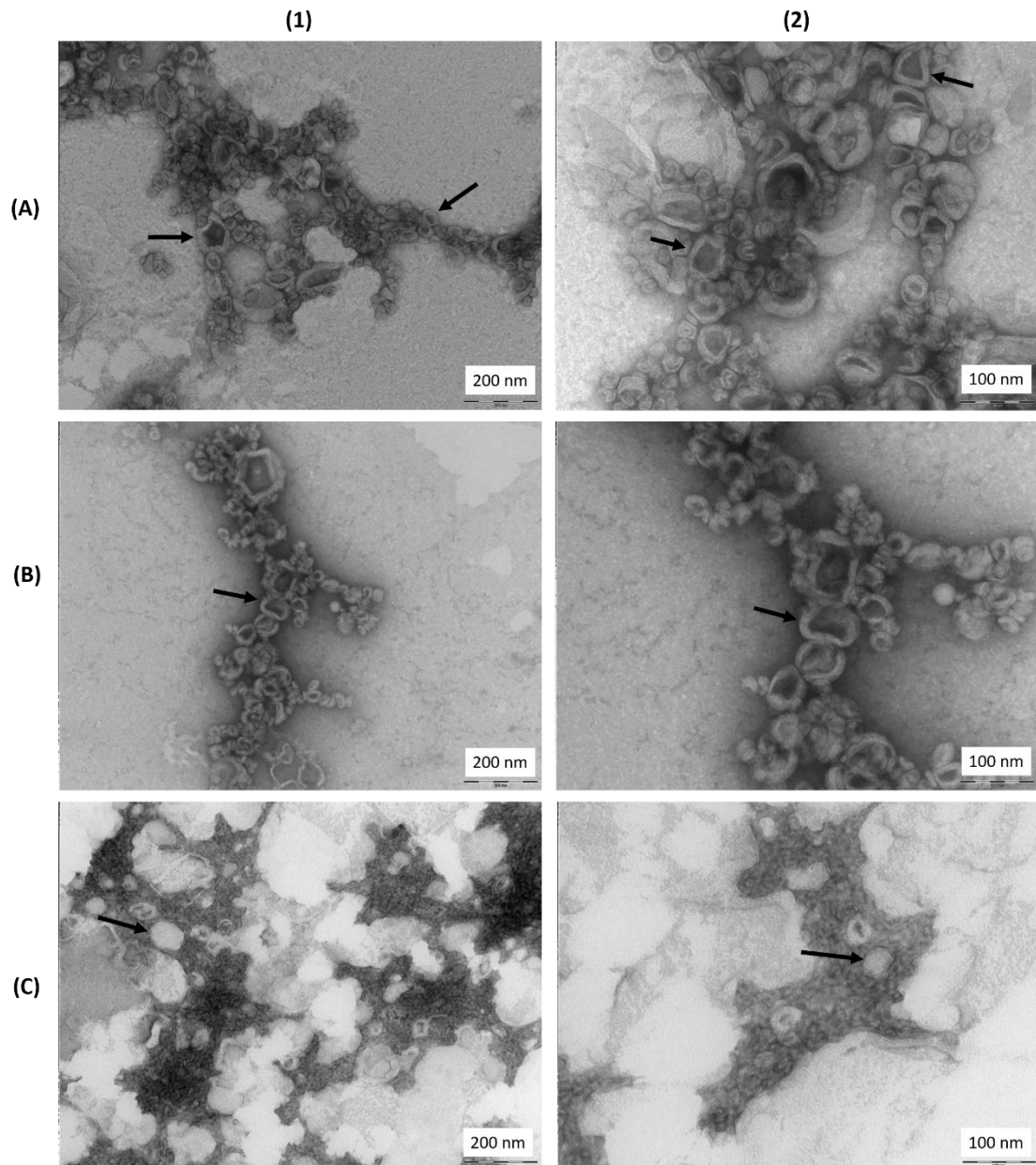
Os dados obtidos comprovam que compostos com polaridades diferentes foram encapsulados simultaneamente nas partículas produzidas, tratando-se portanto de uma co-encapsulação. A co-encapsulação de compostos em quitossomas ainda é pouco estudada, mas um estudo envolvendo a adição de vitaminas C e B9 em lipossomas e quitossomas apresentou uma melhora significativa na EE quando os lipossomas foram recobertos, passando de 34,63% para 80,96% para vitamina C e de 64,25% para 87,41% para vitamina B9 (JIAO et al., 2018). Dessa forma, o uso destas partículas se mostra viável na encapsulação de um ou mais compostos que possuem propriedades e estruturas químicas diferentes.

### 3.3.2 Caracterização das partículas

#### 3.3.2.1 Morfologia

A morfologia das partículas L, LQ e LQT encapsulando os compostos fitoquímicos é mostrada na Figura 3.3. As imagens de L e LQ (Figuras 3.3A e 3.3B) são similares entre si e apresentam partículas com formatos esféricos e diferentes tamanhos. As partículas de L e LQ apresentam-se em formas de aglomerados e próximas umas às outras. Por outro lado, as amostras de LQT (Figura 3.3C) apresentam uma estrutura que é formada pela quitosana reticulada envolvendo algumas vesículas de lipossomas. Neste caso, os lipossomas estavam mais isolados que em L e LQ como resultado da reticulação da quitosana. O mesmo comportamento também foi observado por Caddeo et al. (2016) para TPP-quitossomas.

**Figura 3.3** – Imagens da microestrutura das partículas de (A) lipossomas, (B) quitossomas e (C) TPP-quitossomas



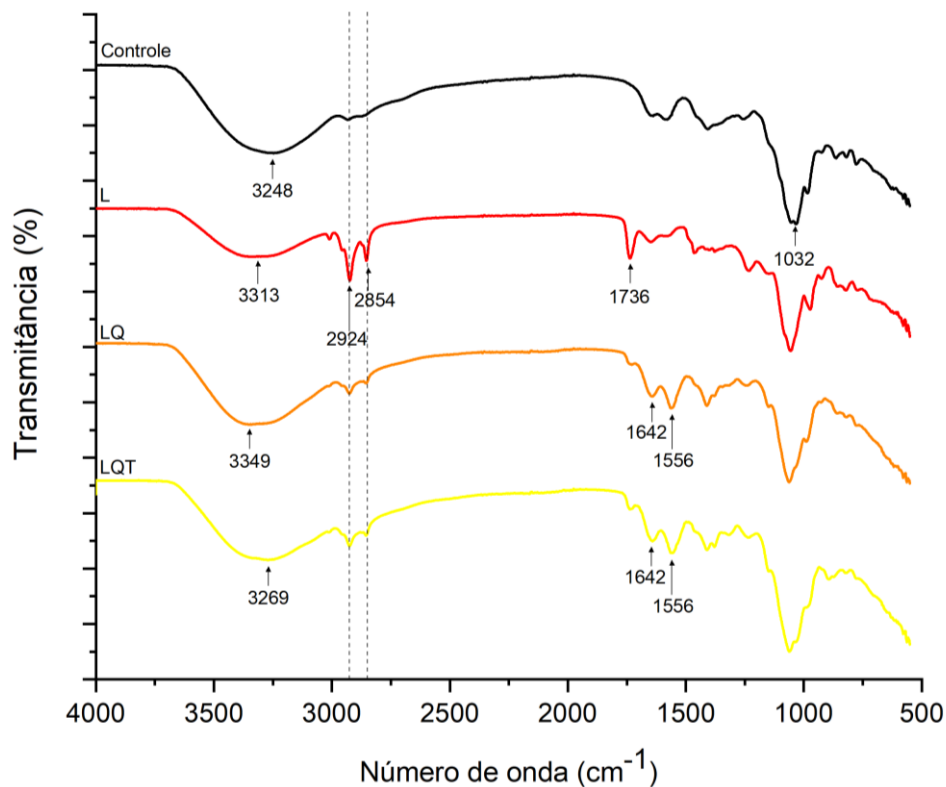
Fonte: autoria própria.

### 3.3.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A análise de espectroscopia no infravermelho é uma técnica importante para a identificação de mudanças estruturais das partículas produzidas através da identificação dos grupos funcionais presentes. Os espectros no infravermelho para L, LQ e LQT encapsulando o extrato foram obtidos, assim como para uma amostra controle contendo o extrato + PBS para fins de comparação (Figura 3.4).

As semelhanças nos perfis das bandas apresentadas entre a amostra controle e as amostras de partículas (L, LQ, LQT) podem indicar que o extrato foi encapsulado com sucesso, em conformidade com os dados obtidos para EE discutidos anteriormente. Bandas largas presentes entre 3248 e 3349  $\text{cm}^{-1}$  em todas as amostras indicam a presença de água (estiramento –OH). Sinais característicos do estiramento da ligação C–H de cadeias de ácidos graxos (2924 e 2854  $\text{cm}^{-1}$ ) podem ser observados nas amostras de L, LQ e LQT como consequência da presença de fosfolipídios. O pico em 1736  $\text{cm}^{-1}$  indica o estiramento da ligação C=O de ésteres de ácido graxo também presentes nas amostras L, LQ e LQT, sugerindo que não houve diferenças significativas na estrutura da bicamada lipídica dos lipossomas após a adição de quitosana (reticulada com TPP ou não), apesar dos picos serem menos intensos em LQ e LQT (SAOJI et al., 2016). Os espectros também podem ser usados para a confirmação do recobrimento dos lipossomas com quitosana através do aparecimento de duas bandas em 1642  $\text{cm}^{-1}$  (amida I, estiramento C=O) e 1556  $\text{cm}^{-1}$  (amida II, dobramento –NH<sub>2</sub>) para amostras de LQ e LQT (LIU et al., 2015).

**Figura 3.4** – Espectros no infravermelho de controle (extrato + PBS) e partículas de lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT)

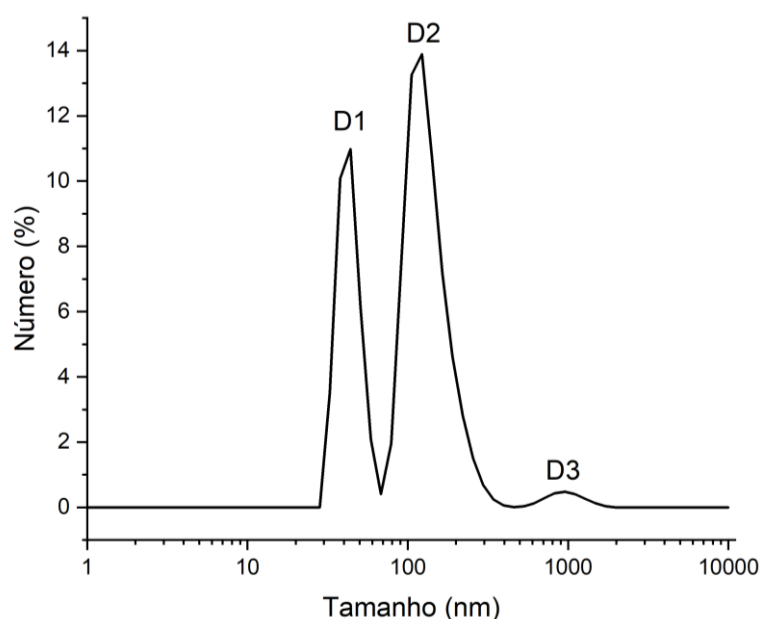


Fonte: autoria própria.

### 3.3.2.3 Tamanho de partículas e potencial zeta

A diferença de tamanho de partículas em função do tempo foi analisada para investigar a interação que ocorre entre as partículas, uma vez que pode ocorrer a alteração de estabilidade através da formação de aglomerados quando compostos fitoquímicos são encapsulados. Todas as amostras, com exceção de L no dia 18, apresentaram uma distribuição de tamanho polidispersa. Um exemplo de gráfico de distribuição de tamanho pode ser observado na Figura 3.5, onde cada população é identificada como D1, D2 e D3. A Tabela 3.2 apresenta os diâmetros médios obtidos para cada população e sua porcentagem de área baseada na área total do gráfico de distribuição de tamanho.

**Figura 3.5** – Gráfico de distribuição de tamanhos de partículas de TPP-quitossomas (LQT) após 18 dias de armazenamento a 8° C, com três principais populações (D1, D2 e D3)



Fonte: autoria própria.

Amostras L revelaram duas populações principais com diâmetros de partícula variando entre 59,97 nm (área D1: 99,9%) no dia 11 e 868,2 nm (área: 5,7%) no dia 25. Assim, observa-se uma tendência na formação de aglomerados com o aumento do tempo, principalmente após o dia 25. A adição de quitosana não reticulada ao sistema (LQ) resultou em partículas com tamanhos variados, com o aparecimento de uma nova população de escala micrométrica no dia 18 (D3). Além disso, partículas com diâmetros maiores que aqueles obtidos para L começam a aparecer em maiores quantidades a partir do dia 7 (118,3 nm, área D2: 59,8%), indicando uma

grande variabilidade de tamanhos de partículas LQ. O mesmo comportamento é observado para as amostras LQT, que começaram a apresentar partículas com tamanhos maiores em uma quantidade considerável a partir do dia 11, com o aparecimento de diâmetros de 171,2 nm (área D2: 32,0%). De modo geral, todas as amostras apresentaram uma grande variabilidade de tamanhos de partícula, abrangendo tamanhos nanométricos e micrométricos. Partículas maiores e micrométricas foram observadas com maior frequência nas amostras de LQ e LQT, o que contribui com o que foi observado nas imagens de MEV. Além disso, a variabilidade também pode indicar que a adição de quitosana como material de recobrimento causa um aumento no tamanho de partículas.

**Tabela 3.2** – Valores de tamanho de partícula e potencial zeta de lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) durante período de 25 dias

Amostra	Dia	D1 (nm)	Área D1 (%)	D2 (nm)	Área D2 (%)	D3 (nm)	Área D3 (%)	PZ (mV)
L	4	67,95	99,6	543,1	0,4	-	-	$-2 \pm 3^a$
	7	70,69	99,5	339,1	0,5	-	-	$-3 \pm 3^a$
	11	59,97	99,9	746,9	0,1	-	-	$-3 \pm 2^a$
	18	182,3	100,0	-	-	-	-	$-4 \pm 5^a$
	25	92,13	94,3	868,2	5,7	-	-	$-2,5 \pm 0,5^a$
LQ	4	77,92	98,7	415,9	1,3	-	-	$+20 \pm 1^a$
	7	53,43	40,2	118,3	59,8	-	-	$+27 \pm 2^{bc}$
	11	86,76	99,3	891,7	0,7	-	-	$+24 \pm 1^b$
	18	64,27	37,1	121,7	62,4	1104	0,5	$+29 \pm 1^c$
	25	113,7	97,0	686,1	3,0	-	-	$+25 \pm 1^b$
LQT	4	90,52	98,0	496,7	2,0	-	-	$+22 \pm 1^a$
	7	129,8	99,9	2471	0,1	-	-	$+24 \pm 6^b$
	11	88,34	40,5	171,2	32,0	632,0	0,3	$+26 \pm 5^{ab}$
	18	44,34	33,1	136,6	64,8	980,3	2,2	$+34 \pm 2^c$
	25	78,78	99,2	866,0	0,8	-	-	$+27 \pm 1^b$

a,c: letras minúsculas diferentes para uma mesma amostra (L, LQ ou LQT) indicam diferença significativa entre valores de PZ em diferentes dias de análise de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

D1, D2, D3: diâmetro 1, diâmetro 2, diâmetro 3. PZ: Potencial zeta.

Fonte: autoria própria.



Os valores de potencial zeta variaram entre -2,5 e -4 mV para as amostras de L. A observação de uma carga negativa para estas partículas deve-se à presença de grupos hidrofóbicos carregados negativamente na superfície da vesícula formada pelos fosfolípidios P90G utilizados para a produção dos lipossomas (CADDEO et al., 2016), ou ainda pela presença de contra-íons de carga negativa (BHATTACHARJEE, 2016). Este fator indica que os lipossomas possuem sítios negativos disponíveis para a interação com os grupos amino da quitosana para o processo de recobrimento. Por sua vez, a adição de quitosana resultou em uma inversão dos valores observados de negativos para positivos, e isto pode ser utilizado como evidência de que o recobrimento de lipossomas foi realizado com sucesso, como discutido por alguns autores (CADDEO et al., 2016; MAZLOOMI et al., 2020; TAN et al., 2016). A Tabela 3.2 mostra que os valores de potencial zeta têm a tendência de aumentar com o passar do tempo para as amostras LQ e LQT, indicando que as moléculas de quitosana continuam sendo adsorvidas na superfície dos lipossomas até o dia 18, enquanto que uma diminuição nesses valores começa a ocorrer a partir do dia 25.

Os valores de potencial zeta podem ser utilizados como um indicativo da estabilidade física das partículas, uma vez que as partículas com valores altos de potencial zeta (em módulo) irão repelir entre si e diminuir a tendência de formação de aglomerados (BHATTACHARJEE, 2016; NGUYEN et al., 2014). Dessa forma, as partículas de lipossomas recobertas com quitosana podem ser consideradas como mais estáveis que as amostras de lipossomas sem recobrimento, especialmente LQT, que apresentou o maior valor de potencial zeta entre todas as amostras analisadas (+35 mV, dia 18).

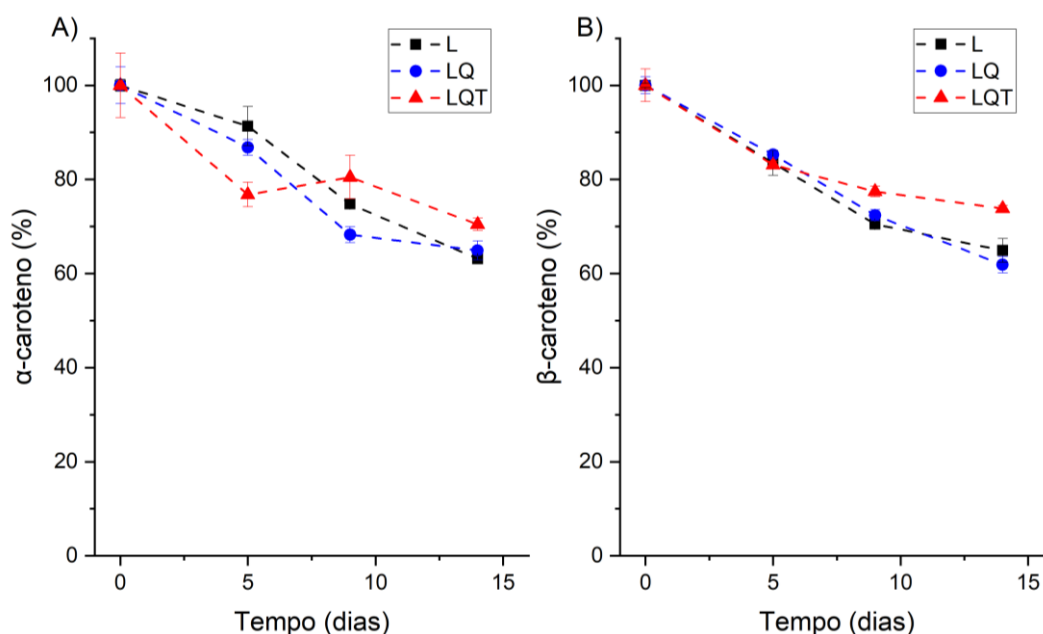
#### **3.3.2.4 Estabilidade dos compostos ativos**

A estabilidade dos compostos encapsulados foi avaliada através da diminuição de sua concentração presente nas suspensões contendo partículas em função do tempo e em temperaturas diferentes. A Figura 3.6 ilustra a capacidade das partículas de L, LQ e LQT em evitar a degradação de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno durante armazenagem a 8°C por 14 dias.

A Figura 3.6A revela que L e LQ retiveram significativamente uma maior quantidade de  $\alpha$ -caroteno nos primeiros 5 dias de armazenamento, enquanto que LQT começa a apresentar uma performance melhor a partir do dia 9. Ao final de 14 dias, uma média de 70,4% de  $\alpha$ -caroteno encapsulado em LQT não foi degradada, enquanto que os valores para L e LQ foram mais baixos e semelhantes entre si (63,1% para L e 64,9% para LQ). A estabilidade de  $\beta$ -caroteno também apresentou melhores resultados quando foi encapsulado em LQT (Figura

3.6B). As três partículas encapsulando este composto apresentaram comportamento semelhante nos primeiros 5 dias, mas ao final de 14 dias o sistema LQT conseguiu evitar a degradação de uma maior quantidade de compostos ativos (73,8%) quando comparado com L (64,9%) e LQ (61,9%) para  $\beta$ -caroteno. De modo geral, compostos encapsulados em LQT apresentaram resultados significativamente melhores, indicando uma proteção mais evidente dos carotenos quando o sistema de encapsulação utilizado inclui a formação de interação iônica ao redor dos lipossomas.

**Figura 3.6** – Variação de concentração de (A)  $\alpha$ -caroteno e (B)  $\beta$ -caroteno encapsulados em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) durante 14 dias

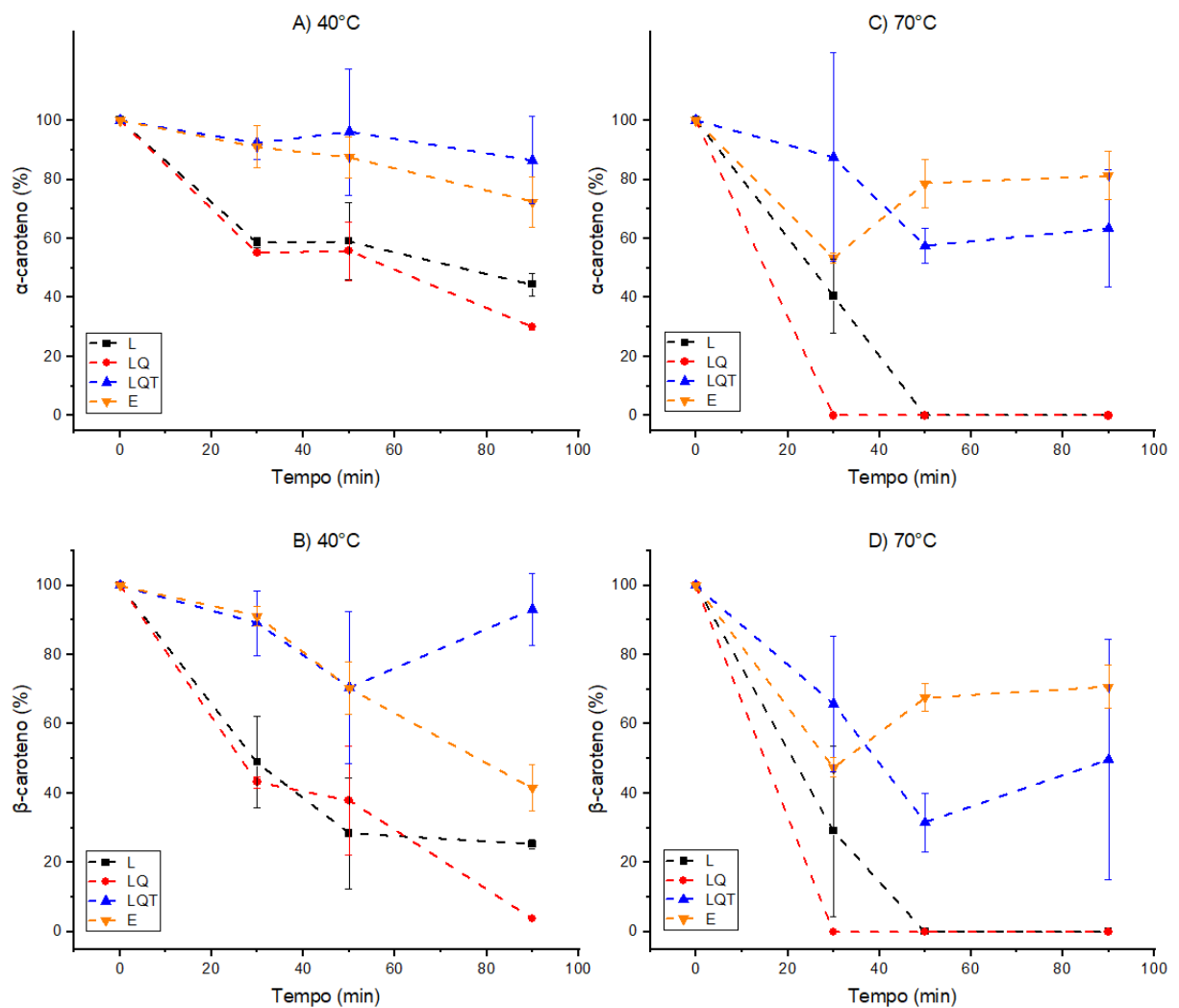


Fonte: autoria própria.

A estabilidade dos carotenoides também foi avaliada submetendo as partículas a 40°C e 70°C para avaliar seu comportamento em temperaturas mais elevadas (Figura 3.7). As amostras de L e LQ apresentaram uma menor proteção para  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno quando submetidas a 40°C quando comparadas com LQT (Figuras 3.7A e 3.7B), indicando mais uma vez que a reticulação da quitosana para recobrimento de lipossomas resulta em um sistema híbrido mais eficiente na proteção de compostos ativos contra degradação. Após 90 minutos, partículas LQT evitaram a degradação de até 86,6% de  $\alpha$ -caroteno e 93,0% de  $\beta$ -caroteno, sendo significativamente diferentes de L e LQ. Esta diferença fica ainda mais evidente quando temperaturas de 70°C são empregadas (Figuras 3.7C e 3.7D), uma vez que 100% da concentração inicial de ambos os compostos avaliados são degradados após 30 minutos quando

encapsulados em LQ e após 50 minutos quando encapsulados em L. É necessário destacar ainda que os compostos não encapsulados presentes no extrato (E) não são degradados com facilidade em 40 ou 70°C por terem uma maior afinidade pelo meio. No entanto, isso não pode ser considerado como uma vantagem em relação aos sistemas de encapsulação porque trata-se de uma solução etanólica cuja aplicação em suspensões aquosas (alimentícias ou farmacêuticas) pode gerar problemas de compatibilidade envolvendo a solubilidade destes compostos na matriz.

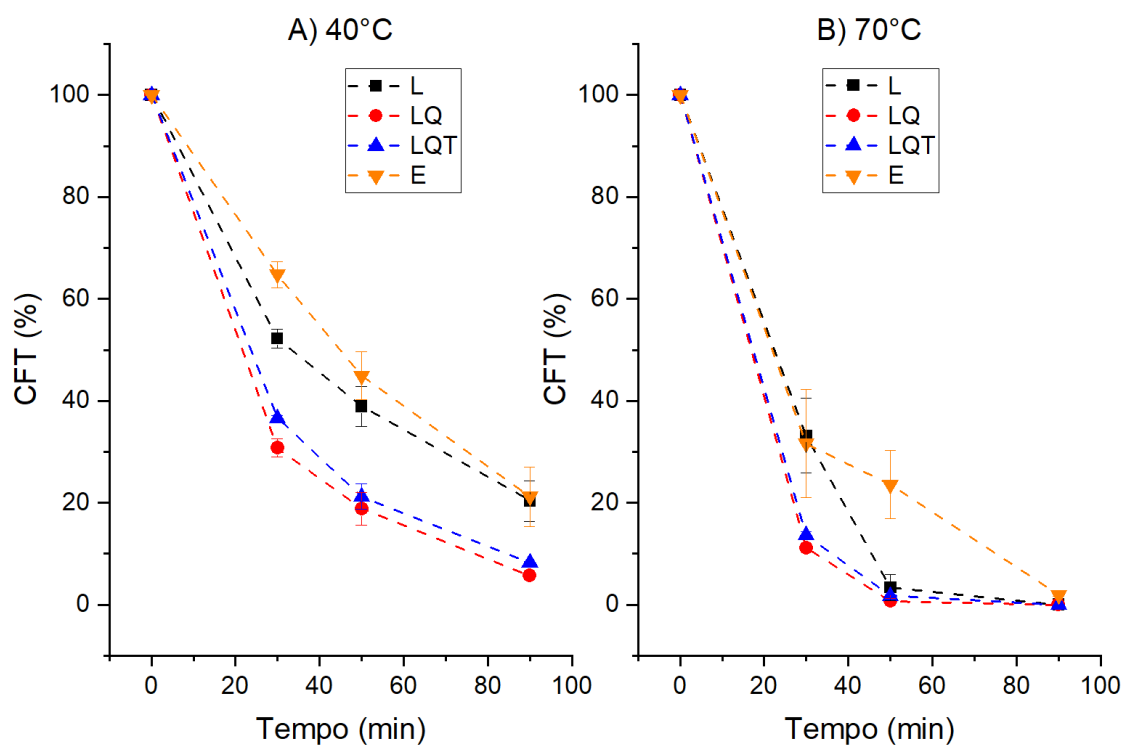
**Figura 3.7** – Degradação de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno presentes no extrato etanólico (E) ou encapsulados em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) em temperaturas de 40°C ou 70°C durante 90 minutos



Fonte: autoria própria.

A estabilidade térmica de CFT encapsulados também foi avaliada (Figura 3.8). Diferentemente dos carotenoides, os polifenóis são degradados com mais facilidade quando submetidos a temperaturas mais altas. CFT encapsulados em L foram menos degradados do que quando encapsulados em lipossomas recobertos com quitosana em ambas as temperaturas estudadas. Uma possível justificativa para o fato observado é o de que CFT também podem ter sido encapsulados nas nanopartículas de quitosana presentes na superfície dos lipossomas ou produzidas durante o preparo sem os fosfolipídios e, portanto, são mais facilmente degradados por estarem mais externos do que aqueles encapsulados dentro do núcleo aquoso das vesículas.

**Figura 3.8** – Degradação de CFT presentes no extrato etanólico (E) ou encapsulados em lipossomas (L), quitossomas (LQ) e TPP-quitossomas (LQT) em temperaturas de 40°C ou 70°C durante 90 minutos



Fonte: autoria própria.

### 3.4 Conclusão

A encapsulação dos fitoquímicos extraídos do subproduto de cenoura foi realizada com sucesso em lipossomas (recobertos ou não com quitosana), atingindo valores altos de EE. As partículas produzidas apresentaram distribuição de tamanhos variados em escala nano e micrométrica, com as partículas de L e LQ apresentando diâmetros maiores como consequência

da camada externa de quitosana adicionada. A adição de quitosana reticulada com TPP resultou em partículas com potencial zeta positivo e próximos de +30 mV, confirmando o recobrimento dos lipossomas e indicando uma suspensão estável que foi capaz de evitar a degradação dos compostos encapsulados, principalmente carotenoides. Os fitoquímicos encapsulados apresentaram resistência à degradação em altas temperaturas e longos períodos de tempo. Partículas de LQT apresentam, portanto, um futuro potencial de aplicação industrial em sistemas aquosos (alimentícios ou farmacêuticos).

## REFERÊNCIAS

- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- CADDEO, C. et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 69–78, 2016.
- DE BRITTO, D. et al. Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles. **Macromolecular Research**, v. 22, n. 12, p. 1261–1267, 2014.
- GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, v. 88, p. 105–113, 1 out. 2016.
- IIDA, A. S. L. et al. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. **Polímeros**, v. 29, n. 4, p. 1–8, 2019.
- JIAO, Z. et al. Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 3, p. 272–280, 2018.
- LIU, Y. et al. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. **Food Research International**, v. 74, p. 97–105, 2015.
- MACHADO, A. R. et al. Liposomes loaded with phenolic extracts of Spirulina LEB-18: Physicochemical characterization and behavior under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 120, n. June 2018, p. 656–667, 2019.
- MAZLOOMI, S. N. et al. Physicochemical properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with orange seed protein hydrolysate. **Journal of Food Engineering**, v. 280, p. 109976, 2020.
- MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle- and Microparticle-Based Delivery Systems**. Boca Raton, FL: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2015.
- NAHAR, K. et al. Starch-coated magnetic liposomes as an inhalable carrier for accumulation of fasudil in the pulmonary vasculature. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 464, n. 1–2, p. 185–195, 2014.
- NGUYEN, T. X. et al. Chitosan-coated nano-liposomes for the oral delivery of berberine hydrochloride. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 41, p. 7149–7159, 2014.
- NUNES, P. S. et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 473–482, 2016.
- RAN, L. et al. Synergistic antioxidant effect of glutathione and edible phenolic acids and improvement of the activity protection by coencapsulation into chitosan-coated liposomes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 127, n. 24, p. 109409, 2020.
- SAOJI, S. D. et al. Preparation and Evaluation of Phospholipid-Based Complex of Standardized Centella Extract (SCE) for the Enhanced Delivery of Phytoconstituents. **AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 102–114, 2016.
- TAN, C. et al. Biopolymer-coated liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 774–784, 2016.

TAN, C.; WANG, J.; SUN, B. Biopolymer-liposome hybrid systems for controlled delivery of bioactive compounds: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 48, n. December 2020, p. 107727, 1 maio 2021.

TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 7–8, p. 587–605, 2005.

**CAPÍTULO 4. ELABORAÇÃO DE FILMES ATIVOS DE  
QUITOSANA CONTENDO COMPOSTOS FITOQUÍMICOS  
ENCAPSULADOS EM TPP-QUITOSSOMAS**



## 4.1 Introdução

A adição de compostos ativos em matrizes poliméricas é cada vez mais estudada para a produção de materiais que possuem características funcionais interessantes para aplicações nas indústrias farmacêuticas ou de alimentos. Os filmes ativos podem ser aplicados como embalagens de alimentos para aumentar a vida de prateleira de alimentos, além prevenir danos físico-químicos durante o transporte e armazenamento por apresentarem características antioxidantes e/ou antimicrobianas (ZHANG et al., 2021). Na indústria farmacêutica, os filmes ativos são estudados como materiais responsáveis por carregar pequenas moléculas ativas que são adsorvidas na superfície das matrizes para liberação controlada de fármacos em um tecido alvo (ZHANG et al., 2021). Em ambas as indústrias, o uso de quitosana para formação de filmes ativos é bastante estudado devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade (BRÁS et al., 2020; RIAZ et al., 2018).

A incorporação de substâncias ativas em filmes biodegradáveis pode ser feita através de sua adição diretamente à suspensão filmogênica, como demonstrado por vários autores (BRÁS et al., 2020; ESPOSITO et al., 2020; HAMDI et al., 2019; NWABOR et al., 2020). No entanto, é importante ressaltar que a mistura de compostos ativos diretamente no filme irá resultar em perda de eficiência dos compostos ativos e em uma possível deterioração das propriedades físico-químicas dos filmes, além de problemas de compatibilidade entre a matriz e o composto a ser incorporado (ZHANG et al., 2021). A adição de compostos ativos encapsulados é capaz de manter suas características originais durante o processo de formação do filme e torna-se uma alternativa interessante para a produção de filmes ativos (TESSARO et al., 2021; ZHANG et al., 2021). Filmes de quitosana com compostos ativos encapsulados foram estudados por alguns autores e incluem a incorporação de emulsão encapsulando óleo essencial de sálvia (DINI et al., 2020), emulsão dupla encapsulando extrato de folha de pitangueira (TESSARO et al., 2021) e lipossomas encapsulando fago (CUI; YUAN; LIN, 2017).

Assim, de acordo com nosso conhecimento, esta é a primeira vez que filmes ativos são elaborados a partir de quitosana com a adição de compostos fitoquímicos encapsulados em TPP-quitossomas. As características dos filmes produzidos foram avaliadas de acordo com suas propriedades estruturais, mecânicas e funcionais, assim como sua atividade antioxidante.

## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1 Material

A quitosana de baixa massa molecular, o ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina)-6-ácido sulfônico), o persulfato de potássio e o Trolox foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O ácido acético para o preparo da suspensão de quitosana e o metanol foram obtidos da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil).

### 4.2.2 Elaboração dos filmes a base de quitosana contendo compostos fitoquímicos encapsulados

O extrato do subproduto de cenoura foi obtido através da extração assistida por ultrassom usando uma suspensão de 6% em etanol 99,8% durante 11 minutos de ultrassom. As partículas de L, LQ e LQT para aplicação nos filmes foram obtidas de acordo com metodologia descrita anteriormente (Capítulo 3, seção 3.2.2) utilizando extrato de subproduto de cenoura recém preparado.

Os filmes de quitosana foram produzidos utilizando o método *casting* através da dispersão de quitosana de baixa massa molecular em solução de ácido acético 1% (v/v) por 16 horas sob agitação magnética. Em seguida, o extrato de subproduto de cenoura (não encapsulado ou encapsulado em lipossomas – L, quitossomas – LQ ou TPP-quitossomas - LQT) foi adicionado nas proporções de 50, 60 ou 70 g por 100 g de suspensão filmogênica e a suspensão foi submetida à agitação magnética por 15 minutos. Eles foram denominados como F-LQT 50, F-LQT 60 e F-LQT 70. A concentração de quitosana em todos os filmes foi de 1% (1g/100g de suspensão filmogênica). Filmes de quitosana 1% sem adição de extrato também foram produzidos como controle (F-Q). As suspensões foram adicionadas em placas de acrílico e secas a aproximadamente 35°C em incubadora BOD (SL 200/364U, Solab Científica, Brasil) com circulação forçada e umidade relativa controlada (58%) durante 24 horas. Após a secagem, os filmes foram cortados nos moldes específicos para cada análise de caracterização e foram acondicionados a 58% de umidade relativa (solução saturada de NaBr) em temperatura ambiente por pelo menos 72 horas antes de cada teste.

### **4.2.3 Caracterização dos filmes ativos**

Os filmes produzidos foram caracterizados de acordo com sua microestrutura, propriedades mecânicas, funcionais e atividade antioxidante.

#### **4.2.3.1 Morfologia**

##### **4.2.3.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura**

As micrografias foram obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em posições aleatórias das amostras de filmes que foram aplicados sobre fitas de carbono e analisados sem nenhum preparo em um microscópio eletrônico de varredura (TM-3000, HITACHI, Japão) com uma voltagem de 15 kV. As amostras também foram criofraturadas após congelamento em nitrogênio líquido para observação da estrutura interna (seção transversal).

##### **4.2.3.1.2 Microscopia de Força Atômica**

Os filmes foram analisados no modo semi-contato, utilizando-se um microscópio de força atômica (NT-MDT, Rússia). As análises foram realizadas utilizando uma frequência de ressonância de 240 kHz, força de contato de 11,8 N/m e velocidade de varredura de 0,3 Hz. A rugosidade média ( $R_a$ , em nm) foi calculada utilizando o *software* do equipamento (Nova Px 3.2.5 Rev 1266).

##### **4.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

As análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em um espectrofotômetro (Spectrum-One, PerkinElmer, EUA) equipado com um acessório UATR (*Universal Attenuator Total Reflectance*). FTIR foi utilizado para identificar mudanças de grupos funcionais nas amostras dos filmes. Cada espectro representa uma média de 40 varreduras individuais obtidas com uma resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  na faixa espectral de 600 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.3.3 Brilho

O brilho dos filmes foi determinado no ângulo de 60° utilizando-se um glossímetro NGL 20/60 de acordo com a ASTM D2457. Um total de 10 medidas foram feitas em posições aleatórias dos filmes.

#### 4.2.3.4 Espessura

A espessura de cada filmes foi determinada através de 10 medições em posições aleatórias após a secagem, utilizando-se um micrômetro digital de ponta plana com resolução de 1 µm (Zaas-Precision).

#### 4.2.3.5 Propriedades mecânicas

Os ensaios mecânicos foram realizados utilizando um texturômetro Analyzer TA TX Plus (TA Instrument, Inglaterra). A tensão e alongação foram determinadas de acordo com o método ASTM D882-95, tendo uma média de cinco determinações em cada tratamento. Amostras retangulares de filmes de 0,6 cm de largura com um comprimento de pelo menos 10 cm foram submetidas à tração com velocidade de 1,0 mm/s, partindo-se de uma separação inicial de 80 mm, até a ruptura do filme. O Módulo de Young (MY) foi calculado como a inclinação da porção linear inicial da curva de tensão versus alongação utilizando o software do texturômetro V.1.22 (SMS), possibilitando a caracterização da rigidez do filme.

#### 4.2.3.6 Umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água

O teor de umidade foi determinado de acordo com a metodologia da AOAC 925.45 (2005). As amostras foram secas em estufa por 24 h a 105 °C e o teor de umidade foi calculado de acordo com a Equação 4.1.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (4.1)$$

Sendo  $m_i$  a massa inicial antes da secagem e  $m_f$  a massa após a secagem.

A solubilidade em água dos filmes foi medida pela metodologia Gontard et al. (1992). Para cada teste feito em triplicata, três discos de 2 cm de diâmetro foram cortados. Em seguida, os discos foram pesados (base seca) e posteriormente submetidos a agitação esporádica por 24 horas a  $25 \pm 2$  °C, em erlenmeyers contendo 50 mL de água. O conteúdo não solubilizado foi seco em estufa a 105 °C for 24 h e sua massa pesada. O cálculo da solubilidade em água dos filmes foi realizado de acordo com a Equação 4.2

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (4.2)$$

Sendo  $m_i$  a massa inicial dos discos e  $m_f$  a massa não solubilizada.

O teste de permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi realizado em triplicata utilizando um método padrão ASTM E96-95 modificado. As amostras de cada filme foram fixadas em suportes de alumínio circulares contendo sílica-gel no seu interior com 0% de umidade relativa (UR), com abertura de 34 mm correspondente à área da filmes que fica exposto para troca. Os suportes foram vedados hermeticamente e colocados dentro de dessecadores contendo água destilada (100% UR, pressão de vapor 3,167 kPa), com ambiente previamente equilibrado durante 48 horas a  $25 \pm 2$  °C. A massa do sistema (suporte + filme) foi pesada em intervalos de 1 hora por 7 horas no total. A taxa de PVA foi calculada segundo a Equação 4.3.

$$\text{PVA} = \frac{w}{t} \left( \frac{x}{A \Delta P} \right) \quad (4.3)$$

Onde  $w/t$  é a taxa de ganho de água,  $x$  é a espessura dos filmes (mm),  $A$  corresponde à área de permeação ( $0,00196 \text{ m}^2$ ) e  $\Delta P$  é a diferença entre a pressão parcial da atmosfera sobre a sílica-gel e sobre a água pura (3,167 kPa a 25 °C).

#### **4.2.3.7 Propriedades de barreira à luz UV/visível**

As propriedades de barreira à luz UV/visível dos filmes foram determinadas através de um espectrofotômetro UV/visível (Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer, EUA) entre 200 e 800 nm (FANG et al., 2002). As amostras foram colocadas no lugar da cubeta para que o feixe de luz atravessasse os filmes e os dados fossem obtidos. Uma medida realizada sem a presença de amostras foi utilizada como branco.

#### 4.2.3.8 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes foi medida de acordo com o método ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina)-6-ácido sulfônico). Para a extração dos compostos ativos presentes nos filmes, 0,1 g de filme cortado em pequenos pedaços foi misturado com 10 mL uma solução de metanol:ácido acético:água (50:10:40). O uso de metanol e ácido acético foi empregado para que as partículas presentes nos filmes fossem quebradas e liberassem os compostos encapsulados (DAG; GUNER; OZTOP, 2019). A mistura foi mantida em ausência de luz por 24 horas sob agitação constante. Após agitação, os sobrenadantes resultantes foram filtrados em filtros de 0,45 µm e utilizados para a análise.

O radical ABTS foi formado pela reação de solução ABTS<sup>++</sup> 7 mM com solução de persulfato de potássio 2,45 mM, preparado 16 horas antes de cada análise. Em seguida, 30 µL do sobrenadante foi misturado com 3 mL do radical ABTS. A leitura em espectrofotômetro (HP Hewlett Packard 8453, EUA) foi feita após 6 minutos de reação a 734 nm em ausência de luz. A curva padrão foi feita com reagente Trolox, nas concentrações de 10 a 2000 µM. Os resultados estão expressos em mg de Trolox equivalente (TE) por grama de filme em base seca.

#### 4.2.4 Análises estatísticas

Análises de variância (ANOVA) e testes de Tukey de comparações múltiplas com um nível de significância de 5% foram realizados usando o software Statistica 7.0 para comparação dos resultados obtidos para caracterização dos filmes.

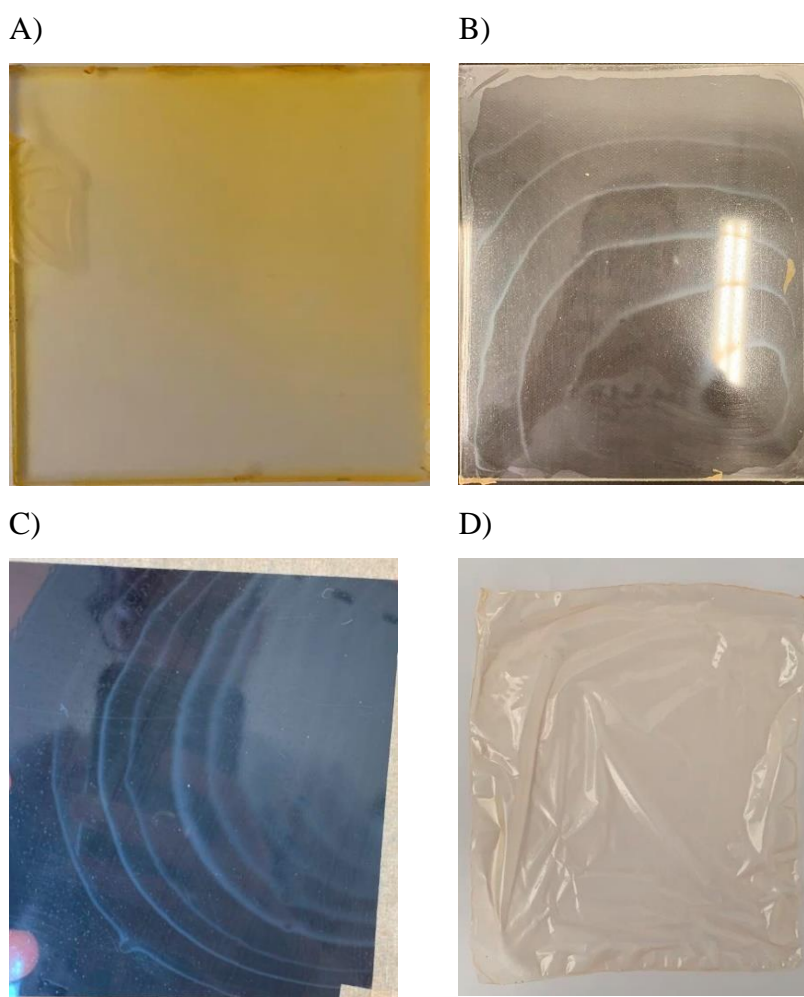
### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 Elaboração dos filmes biodegradáveis

A incorporação do extrato de subproduto de cenoura em filmes biodegradáveis de quitosana só foi possível através de sua encapsulação em LQT. Através adição de extrato etanólico não encapsulado na proporção de 50% (g extrato/100 g de suspensão filmogênica), não foi possível obter filmes, uma vez que eles não se destacaram das placas (Figura 4.1A). Quando foram utilizados extratos encapsulados em L (Figura 4.1B) ou LQ (Figura 4.1C), foi possível observar separação de fase e a heterogeneidade dos filmes. Já os filmes contendo partículas encapsuladas em LQT foram visualmente homogêneos e manipuláveis. Os

lipossomas são termodinamicamente instáveis e, como observado na caracterização das partículas, tanto L, quanto LQ foram menos estáveis do que as LQT. Dessa forma, é possível que possa ter ocorrido uma aglomeração dessas partículas na matriz filmogênica.

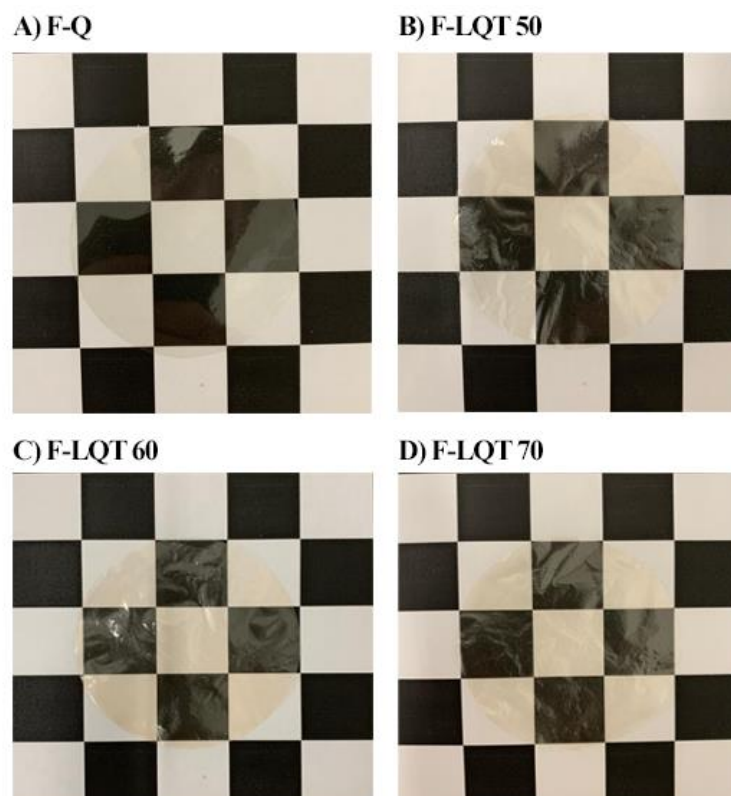
**Figura 4.1** – Filmes obtidos através da adição de (A) extrato não encapsulado (F-E 50), (B) extrato encapsulado em L (F-L 50), (C) extrato encapsulado em LQ (F-LQ 50) ou (D) extrato encapsulado em LQT (F-LQT 50)



Fonte: autoria própria.

Assim, deu-se prosseguimento para a elaboração de filmes de quitosana com adição de LQT em três concentrações diferentes (50, 60 e 70%, g de suspensão de partículas/100 g de suspensão filmogênica) a fim de avaliar o efeito de sua incorporação nas propriedades dos filmes. Eles foram denominados como F-LQT 50, F-LQT 60 e F-LQT 70. Além disso, um filme controle contendo apenas quitosana também foi produzido (F-Q). O aspecto visual dos filmes pode ser observado na Figura 4.2.

**Figura 4.2** – Aspecto visual dos filmes de quitosana produzidos sem a adição de partículas (F-Q) ou com adição de partículas encapsulando compostos ativos nas concentrações de 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)



Fonte: autoria própria.

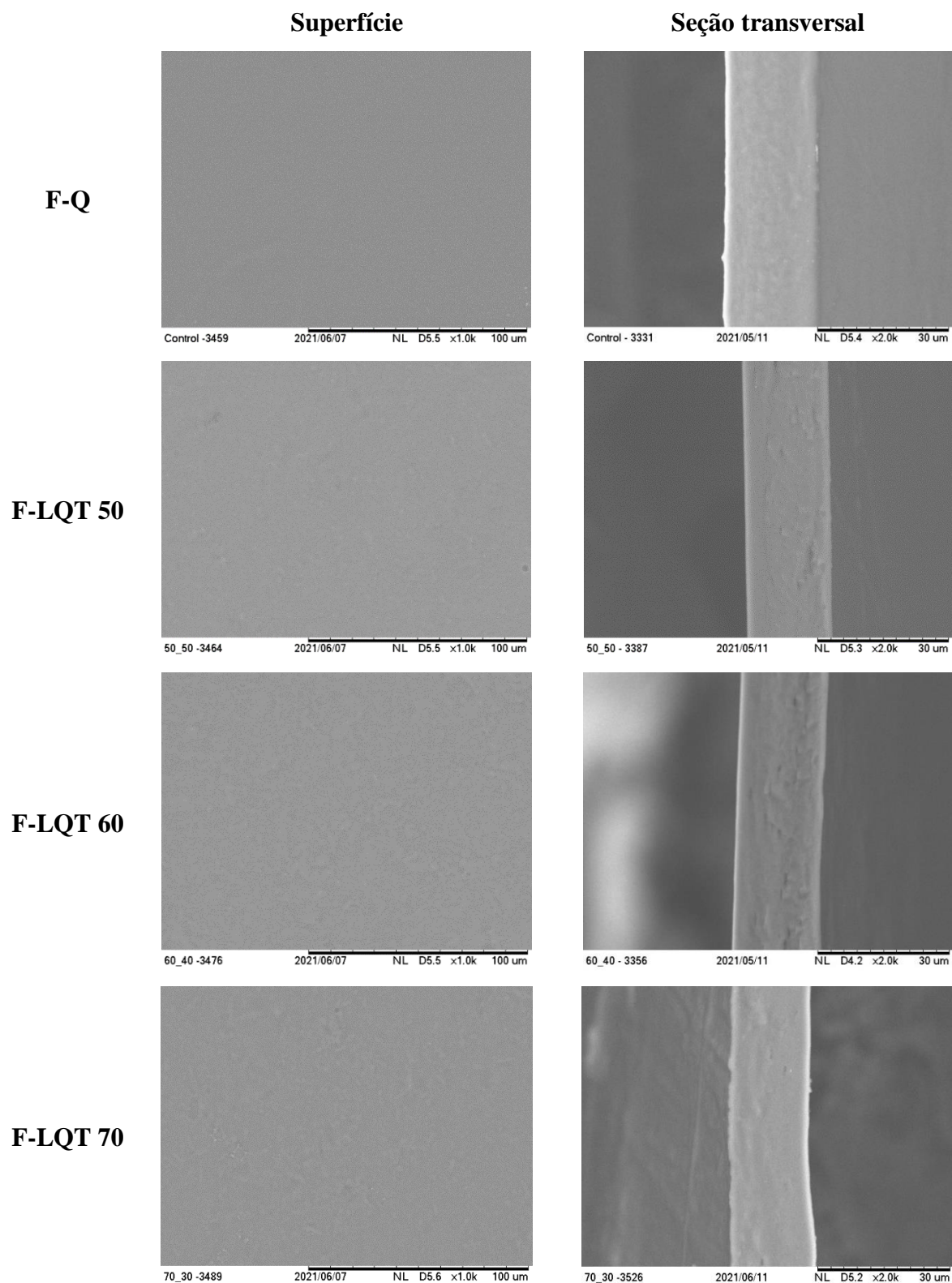
### 4.3.2 Caracterização dos filmes

#### 4.3.2.1 Morfologia

A observação da morfologia através de MEV dos filmes mostrou grande homogeneidade na microestrutura de F-Q. Por outro lado, a adição de partículas encapsulando compostos ativos resultou em filmes mais heterogêneos (F-LQT 50, F-LQT 60 e F-LQT 70). A Figura 4.3 mostra as alterações causadas pelas partículas na matriz polimérica, que são mais pronunciadas quando a concentração de partículas adicionadas é maior (F-LQT 70). As imagens indicam alterações ocasionadas pela incorporação das partículas através de superfícies e seções transversais que apresentam mais sítios irregulares quando comparadas ao F-Q. Sendo assim, a aplicação das partículas poderá influenciar diretamente nas propriedades dos filmes, uma vez que interferem nas interações intermoleculares formadas pela matriz de quitosana.



**Figura 4.3** – Micrografias (MEV) representativas da microestrutura dos filmes (superfície e seção transversal) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)



Fonte: autoria própria.

As imagens de AFM das topografias dos filmes podem ser observadas na Figura 4.4. As regiões mais claras nas topografias 3D e 2D indicam a presença de picos espessos e irregularidades na superfície dos filmes analisados. Assim, é possível observar que a adição de partículas proporciona alterações nas topografias dos filmes, resultando em regiões mais irregulares, principalmente quando a concentração de LQT adicionadas é maior (F-LQT 60 e F-LQT 70), enquanto que o filme F-Q se apresenta mais liso e uniforme.

A presença de irregularidades na superfícies dos filmes contendo compostos ativos observadas na Figura 4.4 também pode ser comprovada através dos valores de rugosidade média ( $R_a$ ) calculados (Tabela 4.1). O valor de  $R_a$  obtido para F-Q aumenta significativamente com a presença de partículas, chegando a 58,3 nm quando partículas são adicionadas na concentração de 50% (F-LQT 50). Valores de  $R_a$  não foram significativamente diferentes entre os filmes F-LQT 60 e F-LQT 70, aumentando até 96,1 nm quando a concentração de 70% de partículas é incorporada à matriz dos filmes. A adição de partículas em filmes de quitosana geralmente resulta no comportamento observado. Tessaro et al. (2021) observaram um aumento de valores de rugosidade de 14,6 até 80,9 nm quando emulsões duplas foram aplicadas, enquanto que a adição de óleo essencial de cravo em filmes de quitosana alterou  $R_a$  de 57 nm (controle) para 740 nm (BONILLA et al., 2018).

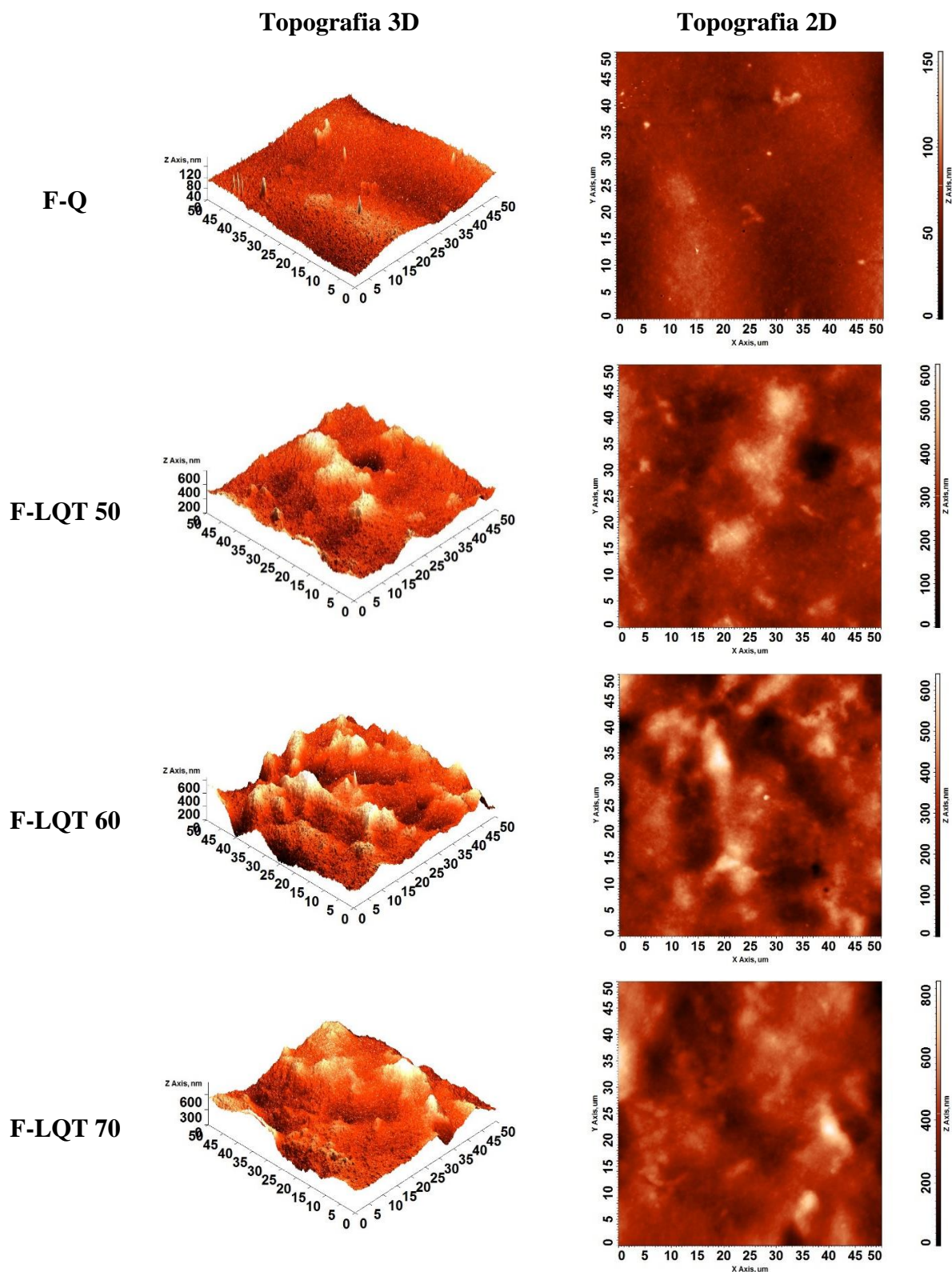
**Tabela 4.1** – Rugosidade média ( $R_a$ , em nm) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)

<b>Filme</b>	<b><math>R_a</math> (nm)</b>
<b>F-Q</b>	12,6 ± 1,8 <sup>a</sup>
<b>F-LQT 50</b>	58,3 ± 8,2 <sup>b</sup>
<b>F-LQT 60</b>	95,6 ± 5,0 <sup>c</sup>
<b>F-LQT 70</b>	96,1 ± 8,0 <sup>c</sup>

a-c: letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna indicam diferença significativa entre valores de rugosidade para os filmes produzidos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: autoria própria.

**Figura 4.4** – Imagens (AFM) representativas da microestrutura dos filmes (topografia em 3D e 2D) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)



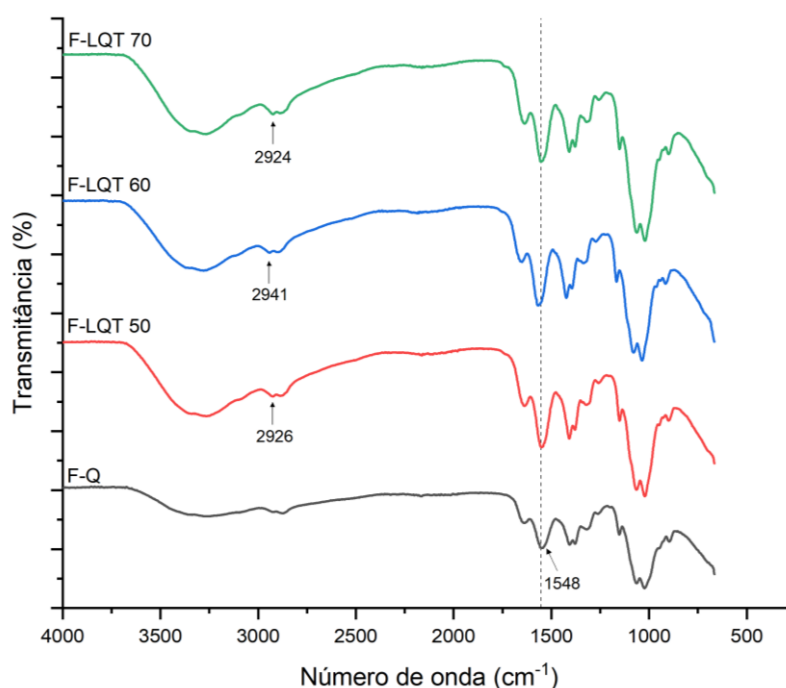
Fonte: autoria própria.

#### 4.3.2.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho obtidos para as amostras dos filmes podem ser observados na Figura 4.5. O comportamento das bandas dos filmes com partículas adicionadas são semelhantes entre si (F-LQT 50, F-LQT 60 e F-LQT 70), o que indica que a estrutura dos filmes não teve alterações muito significativas em nenhuma das três concentrações testadas.

Bandas largas presentes na região de 3250 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de água nas amostras (estiramento  $-\text{OH}$ ), sendo mais pronunciada nos filmes contendo partículas do que em F-Q (controle). A presença de ácidos graxos nas partículas adicionadas resultou no aparecimento de bandas próximas das regiões de 2924, 2941 e 2926  $\text{cm}^{-1}$  para as amostras F-LQT 50, F-LQT 60 e F-LQT 70, característica do estiramento da ligação  $\text{C}-\text{H}$  (SAOJI et al., 2016) dos lipossomas. Além disso, os espectros também confirmam a presença de quitosana em todas as amostras através do aparecimento da banda em 1548  $\text{cm}^{-1}$  (amida I, estiramento  $\text{C}=\text{O}$ ).

**Figura 4.5** – Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos filmes de quitosana sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)



Fonte: autoria própria.

### 4.3.2.3 Brilho

O brilho é considerado como uma propriedade de superfície capaz de determinar o polimento dos filmes produzidos, possuindo escala arbitrária. Os valores não possuem dimensão e o brilho obtido a 60° para os filmes produzidos estão dispostos na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** – Valores de brilho a 60° de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)

Filme	Brilho a 60°
F-Q	34,1 ± 3,9 <sup>a</sup>
F-LQT 50	14,0 ± 2,1 <sup>b</sup>
F-LQT 60	9,5 ± 1,4 <sup>c</sup>
F-LQT 70	5,6 ± 1,0 <sup>d</sup>

a-d: letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna indicam diferença significativa entre valores de brilho para os filmes produzidos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: autoria própria.

Observa-se que, em relação ao filme controle (F-Q), a adição de partículas diminui significativamente o brilho dos filmes produzidos. Um aumento na quantidade de partículas resulta em filmes com menos brilho, chegando a um valor mínimo de  $5,6 \pm 1,0$  para a maior concentração de partículas adicionadas (F-LQT 70). Um comportamento semelhante foi observado Tessaro et al. (2021) ao incorporar emulsões duplas contendo extrato de folhas de pitangueira em filmes de quitosana, cujos valores de brilho diminuíram de 89,7 para 15,4 após a adição de ativos.

### 4.3.2.4 Propriedades mecânicas

De modo geral, os valores de tensão, alongação e módulo de Young foram significativamente diferentes para os filmes contendo partículas quando comparados com F-Q (Tabela 4.3). A adição dos compostos ativos em sua forma encapsulada resultou em filmes de quitosana menos resistentes, cujos valores de tensão diminuíram de 40,4 MPa para até 15,3 MPa com o aumento da concentração de partículas adicionadas. O módulo de Young é usado para indicar a rigidez dos filmes. De forma similar, os valores desta propriedade também

diminuíram com o aumento de concentração de partículas, resultando, portanto, em filmes menos resistentes e menos rígidos. De forma contrária, as partículas aumentaram significativamente os valores de alongação, sendo diretamente proporcional à sua concentração aplicada em cada filme.

A diminuição da resistência e rigidez dos filmes pode ser observada como consequência de perturbações na estrutura molecular na matriz filmogênica de quitosana causadas pelas partículas. Ao serem incorporadas, elas interagem com as moléculas de quitosana de forma a diminuir suas forças intermoleculares, resultando em filmes mais alongáveis. Uma concentração maior de partículas implica em uma maior perturbação nas forças intermoleculares da quitosana, fazendo com que diminuições progressivas na tensão e rigidez sejam notadas, assim como um grande aumento na alongação.

As espessuras dos filmes contendo partículas foram significativamente maiores que os valores obtidos para o filme apenas de quitosana. A incorporação de LQT na matriz polimérica resulta em filmes mais grossos, o que pode ter influenciado nos valores obtidos para as demais propriedades, incluindo tensão, alongação e módulo de Young. Filmes de quitosana controle com espessura próximas àqueles contendo partículas serão produzidos e caracterizados afim de melhorar esta comparação.

**Tabela 4.3** – Valores de espessura, tensão, alongação e módulo de Young (MY) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)

Filme	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Tensão (MPa)	Elongação (%)	MY (MPa)
<b>F-Q</b>	$0,017 \pm 0,001^a$	$40,4 \pm 4,1^a$	$2,9 \pm 0,9^a$	$28,0 \pm 2,3^a$
<b>F-LQT 50</b>	$0,036 \pm 0,005^b$	$20,5 \pm 4,7^b$	$36,2 \pm 13,4^b$	$8,0 \pm 1,6^b$
<b>F-LQT 60</b>	$0,029 \pm 0,004^c$	$18,9 \pm 4,1^b$	$34,8 \pm 20,3^b$	$6,0 \pm 2,4^{bc}$
<b>F-LQT 70</b>	$0,032 \pm 0,002^c$	$15,3 \pm 5,1^b$	$47,9 \pm 4,9^b$	$3,2 \pm 1,7^c$

a-c: letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna indicam diferença significativa entre valores de espessura e propriedades mecânicas para os filmes produzidos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: autoria própria.

Alterações nas propriedades mecânicas dos filmes são esperadas quando aditivos são incorporados. A adição de lipossomas encapsulando nisina em matrizes de gelatina resultou em

diminuições nos valores de tensão (de 8,6 para 4,9 MPa) e módulo de Young (de 234,3 para 95,7 MPa) dos filmes produzidos comparados com o controle (BOELTER; BRANDELLI, 2016), comportamento similar ao observado na Tabela 4.3. Além disso, lipossomas encapsulando fagos adicionados em filmes de quitosana resultaram em filmes mais alongáveis com o aumento da proporção de partículas de 40:60 para 100:0 (lipossomas:quitosana) (CUI; YUAN; LIN, 2017), com valores variando entre aproximadamente 40 a 70%. Apesar das partículas provocarem uma diminuição na tensão e rigidez dos filmes, Boelter e Brandelli (2016) mostraram que a incorporação de nanopartículas de argila juntamente com nanolipossomas apresentaram valores semelhantes ao controle. Assim, a adição de nanomateriais de reforço pode ser uma alternativa para manter as propriedades originais da matriz do filme mesmo com a adição de compostos ativos encapsulados.

#### **4.3.2.5 Umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água**

Os dados de umidade obtidos para os filmes foram diferentes em si. Filmes de quitosana apresentaram o menor teor de umidade (12,4%), enquanto que a adição de partículas provocou um aumento gradativo do teor de umidade com o aumento de concentração de partículas adicionadas, chegando a um máximo de 21,1% (Tabela 4.4). Este comportamento já era esperado de acordo com as bandas de estiramento –OH observadas nos espectros de infravermelho (Figura 4.3). De forma similar, os valores de solubilidade em água mostram que a adição de partículas torna os filmes mais solúveis, provavelmente devido aos teores mais altos de água presente na matriz polimérica que contribui para a presença de sítios polares. A quitosana é um polímero que apresenta baixa solubilidade em água e alta higroscopicidade (DING et al., 2019), o que justifica os valores mais baixos de umidade e solubilidade em água para o filme F-Q. Um comportamento semelhante para solubilidade em água foi observado por Cui et al. (2017), cujos valores aumentaram de 26,42% para 92,47 quando a concentração de lipossomas aumentou de 0 a 100 (v/v) em filmes de quitosana.

**Tabela 4.4** – Valores de umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)

Filme	Umidade (%)	Solubilidade (%)	PVA ( $10^{-9}$ g/msPa)
<b>F-Q</b>	12,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	9,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,05 ± 0,7 <sup>a</sup>
<b>F-LQT 50</b>	18,4 ± 1,7 <sup>b</sup>	9,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	7,56 ± 0,9 <sup>b</sup>
<b>F-LQT 60</b>	18,2 ± 2,2 <sup>b</sup>	14,1 ± 1,5 <sup>b</sup>	7,55 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>F-LQT 70</b>	21,1 ± 1,1 <sup>c</sup>	14,7 ± 1,5 <sup>b</sup>	7,54 ± 0,5 <sup>b</sup>

a-c: letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna indicam diferença significativa entre valores de umidade, solubilidade em água ou PVA para os filmes produzidos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: autoria própria.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) indica a taxa de água que passou pelo filme durante o período de análise (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). Nesse sentido, a incorporação de partículas resultou em filmes mais permeáveis que o filme controle, mas a variação de concentração de partículas não teve efeito significativo nos resultados obtidos. O aumento em PVA em relação a F-Q pode ser explicado pelas alterações que as partículas causam na matriz polimérica, diminuindo as interações intermoleculares e aumentando a distância entre as moléculas de quitosana, oferecendo espaço para que as moléculas de água permeiem (CUI; YUAN; LIN, 2017). Além disso, os teores mais altos de água nos filmes F-LQT 50, F-LQT 60 e F-LQT 70 indicam a presença de grupos polares em sua estrutura capazes de permitir a interação com moléculas de água e facilitar a permeação pela matriz polimérica.

#### 4.3.2.6 Propriedades de barreira à luz UV/Visível

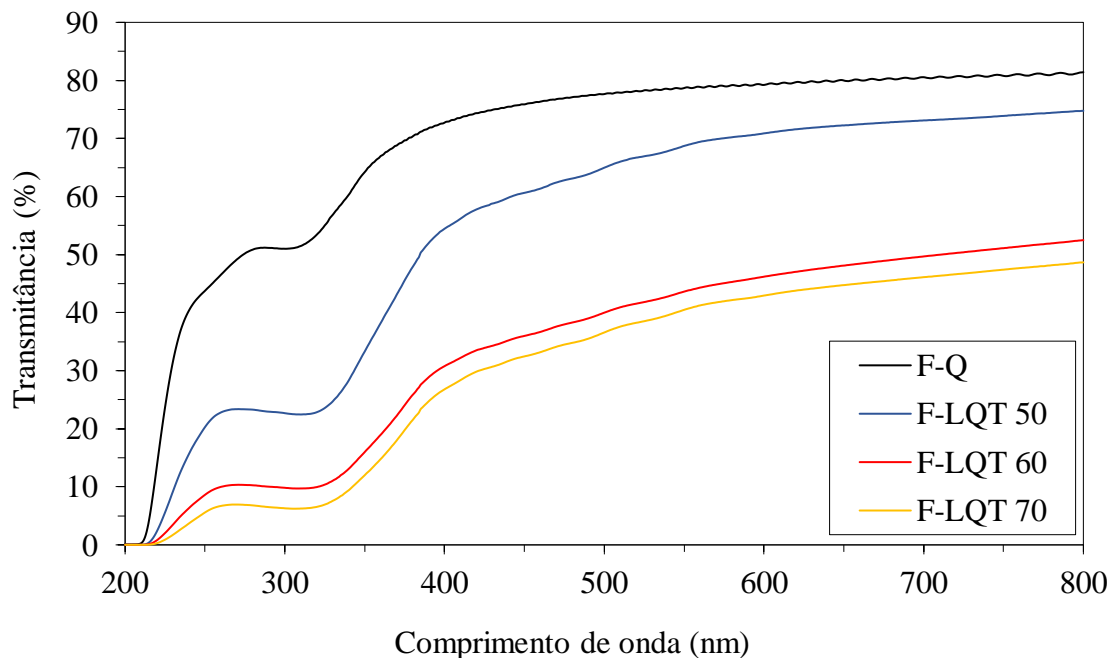
A elaboração de filmes com propriedades de barreira à luz UV/visível é muitas vezes desejada para prevenir a degradação do material que está em contato com o plástico. Por exemplo, filmes ativos com alta estabilidade UV/visível podem ser utilizados como embalagens que são capazes de proteger o alimento, uma vez que previnem a oxidação lipídica e preservam suas propriedades organolépticas (HAGHIGHI et al., 2019).

Todos os filmes contendo compostos ativos encapsulados (F-LQT 50, F-LQT 60 e F-LQT 70) apresentaram transmitância mais baixas que o filme controle (F-Q) no intervalo de



comprimento de onda de luz ultravioleta (UV) e visível, como pode ser visto na Figura 4.6. Na região UV (100 a 400 nm), a adição de partículas nas concentrações de 60 e 70% (F-LQT 60 e F-LQT 70) resultou em filmes com alta barreira à luz, apresentando resultados mais satisfatórios que F-Q e F-LQT 50, que apresentaram transmitância máxima de 81,41% e 74,76%, respectivamente. A propriedade de barreira à luz UV/visível é diretamente proporcional à concentração de partículas adicionadas, com o filme F-LQT 70 permitindo a transmitância máxima de apenas 48,66% da luz. A presença de compostos ativos encapsulados nas partículas adicionadas é a responsável por conferir a propriedade de barreira à luz em matrizes poliméricas, como observados por outros autores (HAGHIGHI et al., 2019; STOLL et al., 2019; TESSARO et al., 2021). Por exemplo, os carotenoides são compostos que apresentam uma estrutura com duplas conjugadas e que podem exercer proteção significativa contra a luz (LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2010).

**Figura 4.6** – Espectroscopia UV/visível de filmes de quitosana produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)

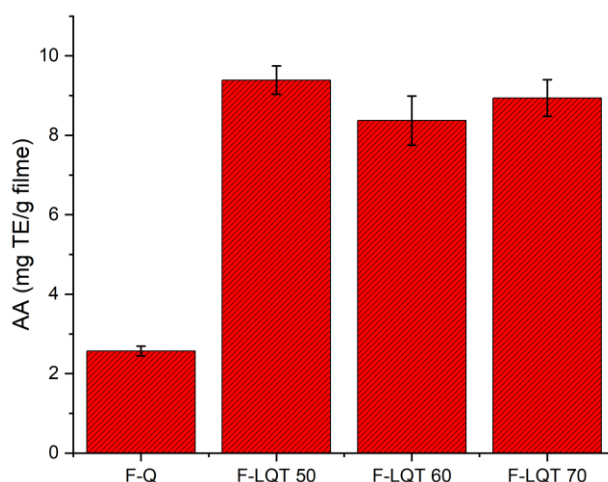


Fonte: autoria própria.

#### 4.3.2.7 Atividade antioxidante

A presença de compostos ativos encapsulados na matriz de quitosana aumentou significativamente a atividade antioxidante (AA) dos filmes produzidos (Figura 4.7). Os compostos fenólicos e carotenoides são conhecidos por apresentarem estruturas características capazes de prevenir a oxidação de moléculas (RAO, 2016), o que os classificam como antioxidantes. Filmes de quitosana (F-Q) apresentam propriedades antioxidantes intrínsecas, mas a adição de partículas resultou em filmes com um maior potencial na prevenção de oxidação. A variação de concentração de partículas adicionadas não influenciou significativamente nos valores obtidos de AA, atingindo um máximo de 9,39 mg TE/g de filme em base seca.

**Figura 4.7** – Atividade antioxidante (AA), em mg equivalente de Trolox (TE)/g de filme seco produzidos sem (F-Q) ou com a adição de partículas encapsulando compostos ativos em diferentes concentrações: 50% (F-LQT 50), 60% (F-LQT 60) e 70% (F-LQT 70) (g/100g de suspensão filmogênica)



Fonte: autoria própria.

A adição de compostos ativos para melhorar AA de filmes de quitosana também foi estudada por outros autores. Liu et al. (2021) adicionaram extratos de pimenta em filmes de quitosana e conseguiram aumentar em até 4 vezes a AA dos filmes comparados com o controle. Comportamentos semelhantes também foram encontrados na adição de extratos de cedro-do-himalaia (*Cedrus deodara*) e de folhas de pitangueira (TESSARO et al., 2021) adicionados em filmes de quitosana.

#### 4.4 Conclusão

A aplicação de partículas de TPP-quitossomas encapsulando compostos fitoquímicos em filmes de quitosana resultaram em filmes ativos com atividade antioxidante e propriedades de barreira à luz UV/visível melhores dos que os filmes de quitosana sem partículas. Entretanto, a adição de partículas nos filmes de quitosana afetou diretamente suas propriedades mecânicas, produzindo filmes ativos mais alongáveis e menos resistentes como consequência da diminuição das interações intermoleculares do filme de quitosana (F-Q). Além disso, as partículas foram responsáveis por aumentar o teor de umidade nos filmes ativos, o que contribuiu para uma maior solubilidade em água e uma maior permeabilidade de vapor de água. Os filmes ativos produzidos possuem características interessantes para aplicações nas indústrias de alimentos ou farmacêuticas.

## REFERÊNCIAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Washington: AOAC, 2005.
- BOELTER, J. F.; BRANDELLI, A. Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 740–747, 1 set. 2016.
- BONILLA, J. et al. Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films. **Food Bioscience**, v. 23, p. 107–114, 1 jun. 2018.
- BRÁS, T. et al. Development of bioactive films based on chitosan and *Cynara cardunculus* leaves extracts for wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1707–1718, 15 nov. 2020.
- CUI, H.; YUAN, L.; LIN, L. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 156–164, 1 dez. 2017.
- DAG, D.; GUNER, S.; OZTOP, M. H. Physicochemical mechanisms of different biopolymers' (lysozyme, gum arabic, whey protein, chitosan) adsorption on green tea extract loaded liposomes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 473–482, 1 out. 2019.
- DING, L. et al. Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 133–141, 2019.
- DINI, H. et al. Effect of edible composite film based on chitosan and cumin essential oil-loaded nanoemulsion combined with low-dose gamma irradiation on microbiological safety and quality of beef loins during refrigerated storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1501–1509, 1 dez. 2020.
- ESPOSITO, T. et al. Valorisation of chestnut spiny burs and roasted hazelnut skins extracts as bioactive additives for packaging films. **Industrial Crops and Products**, v. 151, p. 112491, 1 set. 2020.
- FANG, Y. et al. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 188–193, 1 jan. 2002.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. -L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190–195, 1 jan. 1992.
- HAGHIGHI, H. et al. Comprehensive characterization of active chitosan-gelatin blend films enriched with different essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 33–42, 1 out. 2019.
- HAMDI, M. et al. Bioactive composite films with chitosan and carotenoproteins extract from blue crab shells: Biological potential and structural, thermal, and mechanical characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 802–812, 1 abr. 2019.
- LIU, T. et al. Fabrication and comparison of active films from chitosan incorporating different spice extracts for shelf life extension of refrigerated pork. **LWT**, v. 135, p. 110181, 1 jan. 2021.
- LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. **Improvement of UV stability and mechanical properties of biopolyesters through the addition of  $\beta$ -carotene**. *Polymer Degradation and Stability*. **Anais...Elsevier**, 1 nov. 2010

- NWABOR, O. F. et al. Enhancement of food shelf life with polyvinyl alcohol-chitosan nanocomposite films from bioactive Eucalyptus leaf extracts. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100609, 1 ago. 2020.
- RAO, V. R. Antioxidant Agents. In: **Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 137–150.
- RIAZ, A. et al. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 547–555, 15 jul. 2018.
- SAOJI, S. D. et al. Preparation and Evaluation of Phospholipid-Based Complex of Standardized Centella Extract (SCE) for the Enhanced Delivery of Phytoconstituents. **AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 102–114, 2016.
- STOLL, L. et al. Poly(acid lactic) films with carotenoids extracts: Release study and effect on sunflower oil preservation. **Food Chemistry**, v. 281, p. 213–221, 30 maio 2019.
- TESSARO, L. et al. Gelatin and/or chitosan-based films activated with “Pitanga” (*Eugenia uniflora* L.) leaf hydroethanolic extract encapsulated in double emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106523, 1 abr. 2021.
- ZHANG, L. et al. A comprehensive review on natural bioactive films with controlled release characteristics and their applications in foods and pharmaceuticals. **Trends in Food Science and Technology**, v. 112, n. December 2020, p. 690–707, 2021.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aproveitamento do subproduto gerado no processamento de cenouras foi realizado através da extração de compostos fenólicos e carotenoides utilizando-se uma técnica verde aplicando-se 11 minutos de ultrassom em uma suspensão de 6% de subproduto utilizando etanol como solvente. A co-encapsulação de compostos de polaridades diferentes foi realizada com sucesso em lipossomas e em lipossomas recobertos com quitosana (reticulada ou não). As partículas de TPP-quitossomas foram mais eficientes na estabilização dos compostos encapsulados e foram aplicadas em matrizes de quitosana para obtenção de filmes ativos. Os filmes ativos apresentaram mudanças significativas em suas propriedades em comparação com o controle, incluindo uma diminuição na resistência e rigidez, e um aumento na alongação, umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água. Além disso, os filmes ativos apresentaram atividade antioxidante e propriedade de barreira à luz UV/visível.

Os dados apresentados nessa dissertação demonstram uma valorização de um subproduto através da extração de compostos fitoquímicos. Além disso, apresenta uma alternativa para os problemas encontrados na aplicação de extratos etanólicos nas indústrias farmacêuticas ou de alimentos através da encapsulação em um novo sistema de encapsulação denominado TPP-quitossomas. Esse sistema pode evitar a fácil degradação de compostos fitoquímicos em altas temperaturas ou a baixa compatibilidade dos compostos com matrizes alimentícias para a produção de alimentos funcionais. A aplicação desse sistema em filmes biodegradáveis de quitosana também se apresenta como uma alternativa para a produção de filmes ativos que podem ser utilizados na liberação de fármacos na indústria farmacêutica ou ainda como possível embalagem de alimentos com propriedades antioxidantes e de barreira à luz UV/visível.

Dessa forma, os seguintes trabalhos futuros são sugeridos:

- Utilização das folhas de cenoura ou do subproduto (após a extração dos compostos fitoquímicos) para produção de nanofibras;
- Estudo da variação de concentração de fosfolipídios utilizados na produção de lipossomas e sua influência nas propriedades das partículas;
- Utilização de outros biopolímeros como materiais de recobrimento de lipossomas;
- Aplicação de TPP-quitossomas em outras matrizes poliméricas, utilizando materiais de reforço, como nanoceluloses;
- Aplicação de TPP-quitossomas em coberturas de alimentos.