



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

JOSÉ AUGUSTO DE ALMEIDA NASCIMENTO

**NANOENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA C EXTRAÍDA DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL PARA PREPARAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS**

JUAZEIRO - BA

2018

JOSÉ AUGUSTO DE ALMEIDA NASCIMENTO

**NANOENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA C EXTRAÍDA DE RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL PARA PREPARAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Juazeiro, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Douglas de Britto

JUAZEIRO - BA

2018

	Nascimento, José Augusto de Almeida.
N244n	Nanoencapsulação de vitamina C extraída de resíduo agroindustrial para preparação de filmes comestíveis / José Augusto de Almeida Nascimento. -- Juazeiro, 2018. xiii, 79 f. : il. ; 29 cm.
	Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Juazeiro-BA, 2018.
	Orientador: Prof. Dr. Douglas de Brito.
	1. Nanotecnologia. 2. Acerola. I. Título. II. Brito, Douglas de. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco
	CDD 620.5

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF
Bibliotecário: Renato Marques Alves



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO

Avenida Antônio Carlos Magalhães, 510 - Santo Antônio. CEP: 48902-300 Juazeiro/BA

Tel/Fax: (74)21027645, www.univasf.edu.br/~cpgcm

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**Nanoencapsulação de vitamina C extraída de resíduo agroindustrial para
preparação de filmes comestíveis**

por

José Augusto de Almeida Nascimento

Dissertação de mestrado APROVADA em sessão pública no dia 27 de fevereiro
de dois mil e dezoito perante a banca examinadora constituída pelos seguintes
professores:

Prof. Dr. Douglas de Brito

(CPGCM-UNIVASF)

Prof. Dr. Acácio Figueirêdo Neto

(CENAMB-UNIVASF)

Prof. Dr.ª Maria Auxiliadora Coelho de Lima

(EMBRAPA Semiárido)

Dedico este trabalho à toda minha família, em especial a minha tia/mãe Maria (in memorian), tenho certeza que onde esteja, está muito feliz com mais uma etapa concluída em minha vida.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus por me conceder saúde e força durante a jornada.
- ✓ Aos meus pais, Benedito e Fátima, e toda minha família, por todo apoio, compreensão e incentivo.
- ✓ A meu orientador, professor Dr. Douglas de Britto, pela amizade, excelente orientação, paciência e confiança.
- ✓ Aos amigos/primos Felipe, Vanessa, Willas e Carlos, pelo apoio e boa convivência durante essa jornada.
- ✓ Aos Amigos/“irmãos”, Cristina, Dirliane, Laiane, Laislane, Naiane, Alexandra, Bráulio e Railson, que contribuíram diretamente na realização das análises.
- ✓ Aos meus amigos, que iniciaram essa jornada comigo e que foram muito importante durante minha formação: Edjan, Layanny, Karina, Victor Hugo, José Neto, Michael, Aoliabe, Michel, Jorge, Lucas e Silvio.
- ✓ A todos os professores e técnicos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
- ✓ A todos do laboratório de fisiologia pós-colheita da EMBRAPA Semiárido, em especial a pesquisadora Maria Auxiliadora por ceder as amostras do resíduo de acerola.
- ✓ À analista Adriana Coatrini Thomazi, da Embrapa Instrumentação, pelas medidas de DLS.
- ✓ À CAPES e à Rede AgroNano, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A atividade agroindustrial gera resíduos que ocasionam impactos ambientais, tendo, contudo, potencial de reaproveitamento para a obtenção de compostos bioativos, como o resíduo proveniente da fabricação de polpa de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) que é rico em vitamina C. Assim, objetivando aproveitar esta vitamina, este trabalho propôs sua extração via gelificação iônica (nanoencapsulação) com quitosana e tripolifosfato de sódio. As suspensões de nanopartículas (NP) foram caracterizadas e avaliadas suas estabilidades em diferentes condições de estocagem (incidência de luz, temperatura e atmosfera oxidante). Adicionalmente, filmes nanocompósitos (NC) obtidos a partir destas NP e matriz filmogênica de galactomanana foram preparados, caracterizados e avaliada sua estabilidade. Os resultados por Espalhamento de Luz Dinâmico e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) indicaram morfologia homogênea, forma esférica e tamanho de ~220 nm. Quanto à estabilidade da vitamina C nas suspensões de NP, a análise por espectrofotometria no UV-visível mostrou uma taxa de degradação bem menor para a condição encapsulada, resultando em mais de 30% de preservação em comparação com os sistemas não-encapsulados ao final do 15º dia de estocagem. Esta degradação pôde ser satisfatoriamente representada pelo modelo cinético de primeira ordem, em que os tempos de meia-vida dos sistemas encapsulados foram duas vezes maiores (~20 dias) que os controles não-encapsulados (~10 dias). O valor da Energia de Ativação para o processo de degradação sob temperatura ficou em torno 20,1 kcal/mol, sendo esta a condição que mais alterou as propriedades das nanopartículas, resultando em um aumento de tamanho para 405 nm. Em concordância, os filmes NC também resultaram em preservação da vitamina C principalmente para o teste em temperatura elevada, o qual manteve cerca de 80% da concentração inicial, enquanto que na condição não-encapsulada este valor caiu para 45%. A análise morfológica desses filmes por MEV indicou boa distribuição das nanopartículas na matriz de galactomanana. No entanto, não foi possível constatar diferença significativa no perfil de liberação da vitamina C encapsulada em comparação à não-encapsulada a partir dos filmes. Desta forma, os resultados indicam a viabilidade do uso do método de encapsulamento para estabilização da vitamina C extraída do resíduo agroindustrial de acerola. O método proposto apresenta, portanto, potencialidade de aplicação em filmes comestíveis para revestimento de frutas e preparação de embalagens ativas com propriedades nutracêuticas.

Palavras-chave: Quitosana. Acerola. Vitamina C. Estabilidade

ABSTRACT

The agroindustrial activity generates waste that causes environmental impacts, but has potentiality as source to obtain bioactive compounds. The residue from the production of acerola pulp (*Malpighia emarginata* D.C.) is rich in vitamin C. Thus, aiming to make good use of such vitamin, this work proposed its extraction through ionic gelation (nanoencapsulation) with chitosan and sodium tripolyphosphate. Nanoparticle suspensions (NP) were characterized and their stabilities were evaluated under different storage conditions (incidence of light, temperature and oxidizing atmosphere). In addition, nanocomposite films (NC) obtained from these NP and a filmogenic matrix of galactomannan were prepared, characterized and evaluated their stability. The results by Dynamic Light Scattering and Scanning Electron Microscopy (SEM) indicated homogeneous morphology, spherical shape and size of ~220 nm. Regarding the stability of vitamin C in the NP suspensions, the UV-visible spectrophotometric analysis showed a much lower degradation rate for the encapsulated condition, resulting in more than 30% of preservation compared to the non-encapsulated systems at the end of the 15th day of storage. This degradation could be satisfactorily represented by a first order kinetic model in which the half-life times of the encapsulated systems were twice as long (~20 days) as the non-encapsulated controls (~10 days). The value of activation energy for the temperature degradation process was around 20.1 kcal/mol, which was the condition that most altered the properties of the nanoparticles, resulting in an increase in size to 405 nm. In agreement, the NC films also resulted in preservation of vitamin C mainly for the test in high temperature, which maintained about 80% of the initial concentration, whereas in the non-encapsulated condition this value fell to 45%. The morphological analysis of these films by SEM indicated good distribution of the NP in the galactomannan matrix. However, no significant difference was found in the release profile of encapsulated vitamin C compared to non-encapsulated one. Thus, the results indicate the feasibility of using the encapsulation method to stabilize vitamin C extracted from the agroindustrial residue of acerola. The proposed method presents, therefore, potential of application in edible films for fruit coating and preparation of active packaging with nutraceutical properties.

Keywords: Chitosan. Acerola. Vitamin C. Stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Degradação aeróbica do ácido ascórbico.	18
Figura 2: Resíduos do processamento da acerola, coletados em três etapas do processo: triturador, despulpadeira e decanter; bem como em dois estádios de maturação.	21
Figura 3: Representação da estrutura primária da quitina e quitosana.	25
Figura 4: Interação iônica entre a quitosana e o tripolifosfato de sódio (TPP).....	26
Figura 5: Estrutura química parcial de uma galactomanana presente em edosperma de sementes.....	29
Figura 6: Energias relativas dos orbitais moleculares.....	31
Figura 7: Componentes principais de um espectrofotômetro de feixe simples.....	31
Figura 8: Desenho esquemático dos componentes básicos do microscópio eletrônico de varredura.....	34
Figura 9: Espectrofotômetro (UV-Vis) Thermo Scientific, modelo MultiSkan GO.	36
Figura 10: Soluções extratoras contendo vitamina C do resíduo do processamento de polpa de acerola.....	37
Figura 11: Amostras das suspensões de nanopartículas contendo vitamina C.	40
Figura 12: Espectro na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) para a vitamina C em meio aquoso de ácido metafosfórico a 1% (m/v) (a), ácido oxálico (m/v) (b), ácido acético (v/v) (c) e ácido clorídrico (v/v) (d).....	45
Figura 13: Curvas de calibração da vitamina C em ácido metafosfórico (a), ácido oxálico (b), ácido acético (c) e ácido clorídrico (v/v) (d).....	46
Figura 14: Concentração de vitamina C (normalizado) em função do tempo, quando expostas à luz. NP _{ex} : extrato acerola encapsulado; NP _{pr} : vitamina C pura encapsulada; AA _{ag} : ácido ascórbico em água e VC _{ox} : extrato do resíduo de acerola em ácido oxálico.	50
Figura 15: Concentração de vitamina C (normalizado) em função do tempo, quando expostas a temperatura elevada. NP _{ex} : extrato acerola encapsulado; NP _{pr} : vitamina C pura encapsulada; AA _{ag} : ácido ascórbico em água e VC _{ox} : extrato do resíduo de acerola em ácido oxálico.	51
Figura 16: Concentração de vitamina C (normalizado) em função do tempo, quando expostas à atmosfera oxidante. NP _{ex} : extrato acerola encapsulado; NP _{pr} : vitamina C pura encapsulada; AA _{ag} : ácido ascórbico em água e VC _{ox} : extrato do resíduo de acerola em ácido oxálico.	52
Figura 17: Degradação do AA a partir modelo cinético de primeira ordem na presença de (a) luz, (b) temperatura e (c) ação sob oxigênio.....	53
Figura 18: Concentração de vitamina C em função do tempo, quando expostas à 30 °C (a) e 35 °C (b). NP _{ex} : extrato acerola encapsulado; NP _{pr} : vitamina C pura encapsulada.....	55
Figura 19: Degradação isotérmica das suspensões de NP _{ex} e NP _{pr} quando armazenada a 25, 30 e 35 °C, ajustados conforme uma curva polinomial de segunda ordem (linhas contínuas). NP _{ex} : extrato acerola encapsulado; NP _{pr} : vitamina C pura encapsulada.....	56
Figura 20: Gráfico linearizado da função de Arrhenius para as NP _{ex} e NP _{pr} . NP _{ex} : extrato acerola encapsulado; NP _{pr} : vitamina C pura encapsulada.	57
Figura 21: Variação da transmitância para as amostras a) NP _{ex} b) e NP _{pr} no intervalo de 800 a 200 nm durante 2, 5, 8 e 10 dias de armazenamento sub influência da	

temperatura (35 °C). NP _{ex} : extrato acerola encapsulado; NP _{pr} : vitamina C pura encapsulada.....	60
Figura 22: Variação da transmitância para nanopartículas de vitamina C obtidas a partir de extrato de resíduo do processamento de acerola (NP _{ex}) para os comprimentos de onda em 450 e 600 nm em função do tempo de armazenamento.	61
Figura 23: Variação da transmitância para nanopartículas de vitamina C pura (NP _{pr}) para os comprimentos de onda em 450 e 600 nm em função do tempo de armazenamento.	62
Figura 24: Perfil de liberação da vitamina C em etanol/água para os filmes nanocompósitos (liofilizados) de vitamina C obtida a partir de extrato de resíduo do processamento de acerola (NC _{ex}), de vitamina C pura (NC _{pr}) e filme controle de GLM adicionado de ácido ascórbico puro (FC _{AA}).....	63
Figura 25: Concentração de vitamina C em função do tempo, quando expostos à luz. NC _{ex} : nanocompósitos contendo extrato de resíduo de acerola; NC _{pr} : nanocompósitos adicionado de vitamina C pura; FC _{AA} : filme controle de GLM adicionado de ácido ascórbico puro.....	64
Figura 26: Concentração de vitamina C em função do tempo, quando exposta em temperatura elevada. NC _{ex} : nanocompósitos contendo extrato de resíduo de acerola; NC _{pr} : nanocompósitos adicionado de vitamina C pura; FC _{AA} : filme controle de GLM adicionado de ácido ascórbico puro.	65
Figura 27: Variação da concentração de vitamina C em função do tempo, sob ação de O ₂ . NC _{ex} : nanocompósitos contendo extrato de resíduo de acerola; NC _{pr} : nanocompósitos de vitamina C pura; FC _{AA} : filme controle de GLM adicionado de ácido ascórbico puro.....	66
Figura 28: Imagens obtidas por MEV da amostra NP _{ex} depositada em lâminas de vidro para a) baixa magnitude com ampliação 1,0 k vezes e b) alta magnitude com ampliação 10,0 k vezes.	67
Figura 29: Imagens obtidas por MEV dos filmes de a) GLM pura; b) NC de vitamina C obtida a partir de extrato de resíduo do processamento de acerola (NC _{ex}) e c) NC de vitamina C pura (NC _{pr}).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A - Absorbância
- AA_{ag} - Solução de vitamina C (ácido ascórbico) pura em água
- ADHA – Ácido dehidroascórbico
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- b - Comprimento do caminho percorrido pela luz através da amostra
- C - Concentração do soluto
- D - Constante de difusão
- DLS - *Dynamic Light Scattering*
- E_a – Energia de ativação
- EE - eficiência de encapsulamento
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ε - absorvidade molar
- FC_{AA} – Filme controle à base de galactomanana e vitamina C (ácido ascórbico) pura
- GLM - Galactomanana
- GlcN - 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose
- GlcNAc - 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ln C – logaritmo neperiano da concentração no tempo t
- ln C₀ – logaritmo neperiano da concentração no tempo zero
- k - Constante de Boltzman
- k – Constante cinética (taxa de degradação)
- k₀ – fator pré-exponencial
- m/v - Massa por volume
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- min - Minutos
- mV - Milivolts
- η - Viscosidade do solvente
- NAS/USDA - *National Academy of Science/United States Department of Agriculture*
- nm – Nanômetros
- NC – nanocompósitos
- NC_{ex} – filmes nanocompósitos obtidos a partir do extrato do resíduo do processamento de polpa de acerola
- NC_{pr} – filmes nanocompósitos da vitamina C pura
- NP_s - Nanopartículas
- NP_{ex} - Nanopartículas obtidas a partir do extrato do resíduo do processamento de polpa de acerola
- NP_{pr} - Nanopartículas da vitamina C pura
- P - Intensidade da radiação que emerge da amostra

P.A. - *Pro analyse*

P_0 - Intensidade da radiação que incide sobre a amostra

PZ - Potencial zeta

R – constante dos gases

R^2 - Coeficiente de determinação

R_H - Raio hidrodinâmico

rpm - Rotações por minuto

T – Temperatura absoluta

$t_{1/2}$ – Tempo de meia-vida

TACO - TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS

TPP - Tripolifosfato de sódio

UV/VIS - Ultravioleta e Visível

μL - Microlitro

VC_{ox} – Solução de vitamina C do resíduo do processamento de polpa de acerola em ácido oxálico

v/v - Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 IMPORTÂNCIA DA VITAMINA C	17
3.2 VITAMINA C NA ÁREA ALIMENTÍCIA.....	18
3.3 CARACTERÍSTICAS DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE ACEROLA ...	20
3.4 ESTABILIZAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS POR NANOENCAPSULAÇÃO	22
3.4.1 Quitosana.....	24
3.4.2 Tripolisfosfato de sódio (TPP).....	26
3.5 NANOCOMPÓSITOS A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS	26
3.5.1 Galactomanana.....	28
3.6 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA NANOENCAPSULAÇÃO.	30
3.6.1 Espectroscopia de absorção na região do UV/Visível	30
3.6.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	32
3.6.3 Potencial zeta.....	33
3.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAL	35
4.1 MÉTODOS	35
4.1.1 Construção da curva de calibração de ácido ascórbico.....	35
4.1.2 Estudo preliminar de diferentes sistemas de extração de vitamina C	36
4.1.3 Teor de ácido ascórbico (AA).....	38
4.1.4 Estabilização da vitamina C extraída do resíduo do processamento de polpa de acerola via nanoencapsulação	38
4.1.5 Estudo da estabilidade da vitamina C nanoencapsulada em diferentes condições.....	39
4.1.6 Determinação de parâmetros cinéticos.....	40
4.1.7 Avaliação de tamanho de partícula e potencial zeta.....	41
4.1.8 Análise de turbidez.....	41
4.1.9 Extração de galactomanana (GLM) a partir de vagens de algaroba (<i>Prosopis juliflora</i>)	42
4.1.10 Preparação dos filmes nanocompósitos (NC)	42
4.1.11 Avaliação do perfil de liberação da vitamina C.....	43
4.1.12 Estabilidade da vitamina C em filmes nanocompósitos sob diferentes condições.....	43
4.1.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO	45
5.2 ESTUDO PRELIMINAR DE DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRAÇÃO DE VITAMINA C.....	47
5.3 TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO (AA).....	48
5.4 ESTABILIDADE DA VITAMINA C NANOENCAPSULADA EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	50
5.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS	53

5.6 AVALIAÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA.....	57
5.7 ANÁLISE DE TURBIDEZ	60
5.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA VITAMINA C	62
5.9 ESTABILIDADE DA VITAMINA C EM FILMES NANOCOMPÓSITOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES.....	64
5.10 MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	66
6. CONCLUSÕES	69
7. PERSPECTIVAS.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, ficando atrás apenas da China e Índia. As características naturais de clima e solo favoráveis ao cultivo de diversas espécies frutíferas são fatores que contribuem para este desempenho. Atualmente, o país registra um aumento na produção de frutas, estimando-se que, com base nos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), teria chegado a 44 milhões de toneladas, em 2017. A previsão era superior à produção de 43,8 milhões de toneladas, reportada para 2016 (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2017).

Uma das culturas de destaque é a aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.), reconhecida pela alta síntese natural de vitamina C e outros compostos bioativos em seus frutos. Dado isto, e aliado ao seu sabor agradável, a acerola tem sido explorada comercialmente, sendo matéria-prima para o desenvolvimento de diversos produtos, como sucos, geleias, iogurtes, licores, barras nutritivas, dentre outros (MENEZES et al. 2009; MERCALI et al. 2013).

Na atividade de processamento industrial de frutas, como acerola e outras, é gerada uma quantidade muito grande de resíduos, compostos principalmente de casca, semente ou caroço e bagaço que, geralmente, é subaproveitado ou simplesmente descartado. Estima-se que o total de frutas processadas para a produção de suco e polpas gere de 30 a 40% de resíduos (MARTINS e FARIAS, 2002).

O aproveitamento desses resíduos tem motivado muitos estudos e aplicações. Do ponto de vista ambiental, a correta destinação destes resíduos é desejada a fim de minimizar o impacto ambiental e acúmulo de lixo. Do ponto de vista tecnológico, esses resíduos podem ser reaproveitados para extração de moléculas e macromoléculas com propriedades bioativas, tendo potencial de exploração econômica. São moléculas, por exemplo, como polissacarídeos, lipídeos, proteínas, polifenóis, vitaminas, dentre várias outras classes (SOUSA et al. 2011).

Um tipo de resíduo muito comum no Vale do São Francisco é o oriundo do processamento da polpa da acerola. No caso da acerola, estudo anterior mostrou que, no resíduo do processamento, ainda se mantém uma quantidade significativa de vitamina C residual (COSTA, 2012). Esta vitamina pode ser reaproveitada através de processos de extração e estabilização, visto que as vitaminas, principalmente a

vitamina C, são compostos sensíveis e instáveis e que perdem as suas funções quando expostos a temperatura inadequada, atmosfera oxidante (O₂), umidade ou luz. Uma solução para isto é empregar polissacarídeos com poder quelante, como a quitosana, que tem a capacidade de se ligar a vários tipos de substâncias e possibilitar sua extração e estabilização. Adicionalmente, esses polissacarídeos podem formar também nanopartículas que preservam consideravelmente a estabilidade destas vitaminas (ALISHAHI et al. 2011; BRITTO et al. 2014; BRITTO et al. 2012).

O uso de nanopartículas (NP) é muito promissor na área alimentícia, uma vez que pode ser empregada como meio de transporte ou liberação de diversas substâncias. No caso das vitaminas, o encapsulamento pode ser ainda mais interessante, por serem sensíveis e instáveis a determinadas condições. As NP podem ser introduzidas em matrizes filmogênicas, formando filmes comestíveis nanocompósitos (NC), que podem preservar estas vitaminas por mais tempo e com aplicação como embalagem ativa para revestimento de frutas e hortaliças (BRITTO e ASSIS, 2012). Um composto com potencialidade para formação de matriz filmogênica é o polissacarídeo galactomanana presente em semente de algaroba (*Prosopis juliflora*), árvore muito comum no Nordeste.

Com base no exposto acima, este trabalho teve como objetivo principal a extração da vitamina C a partir do resíduo agroindustrial da produção de polpa de acerola e sua concomitante estabilização por nanoencapsulação via gelificação iônica a partir de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP). Posteriormente, filmes NC contendo NP de quitosana com vitamina C encapsulada foram preparados por *casting*, empregando a galactomanana como matriz filmogênica. Com este estudo, foi possível oferecer alternativas viáveis de aproveitamento de resíduos agroindustriais com potencial para formação de filmes comestíveis, podendo ser ingrediente ativo em formulações alimentícias, tanto para consumo humano como para ração animal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter nanopartículas de vitamina C encapsulada a partir de resíduo do processamento de polpa de acerola para preparação de filmes comestíveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a melhor condição para extração de vitamina C a partir de resíduos agroindustriais de polpa de acerola, empregando o processo de nanoencapsulação;
- Caracterizar as nanopartículas encapsuladas quanto ao tamanho, morfologia e estabilidade da suspensão;
- Avaliar a estabilidade dos sistemas nanoencapsulados submetidos a diferentes processos de degradação (presença de luz, temperatura elevada e atmosfera oxidante);
- Preparar filmes nanocompósitos (NC) composto de galactomanana e vitamina C nanoencapsulada;
- Caracterizar os filmes NC quanto à morfologia e perfil de liberação de vitamina C;
- Avaliar a estabilidade os filmes NC submetidos a diferentes processos de degradação (presença de luz, temperatura elevada e atmosfera oxidante)
- Avaliar as propriedades de cinética de liberação da vitamina C nanoencapsulada em nanocompósitos a base de galactomanana.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

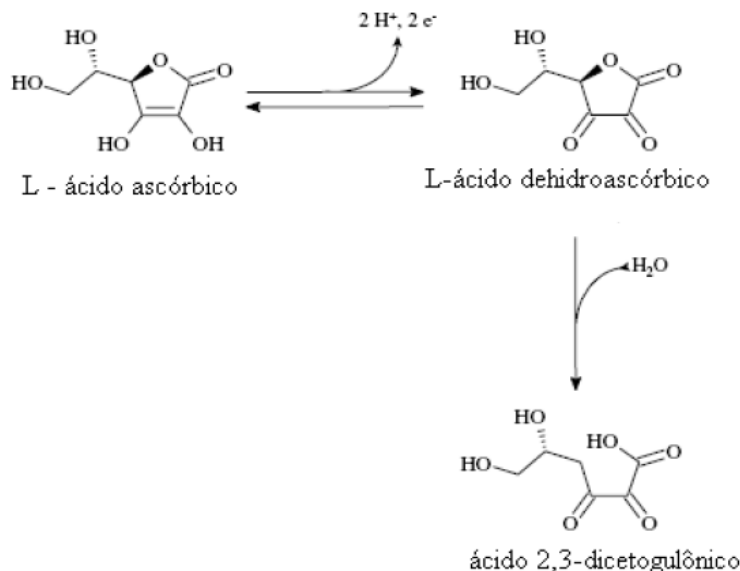
3.1 IMPORTÂNCIA DA VITAMINA C

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico ou ácido L-ascórbico, é uma cetolactona de seis carbonos ($C_6H_8O_6$), com massa molar de 176,13 g/mol. Pertence a um grupo orgânico chamado lactonas, que são ácidos carboxílicos que se transformam em ésteres cíclicos, ou seja, ésteres de cadeia fechada que perderam água espontaneamente. O ácido ascórbico é um composto hidrossolúvel, biologicamente ativo e instável, com reconhecida atividade benéfica à saúde humana. Entre suas múltiplas funções, destaca-se sua capacidade de ceder e receber elétrons, o que lhe confere um papel essencial como antioxidante (CORREIA; FARAONI e PINHEIRO-SANT'ANA, 2008; ROJAS e GERSCHENSON, 1997; VANUCCI e ROCHA, 2012).

As principais fontes de vitamina C são as frutas e hortaliças, nas quais se encontram na forma livre e, também, unida às proteínas. Por não possuírem a enzima gulonolactona oxidase, envolvida na biossíntese do ácido L-ascórbico a partir de D-glicose, os animais, dentre eles os seres humanos, não sintetizam a vitamina C. Para estes, é necessária a ingestão diária na dieta alimentar (LEHNINGER; NELSON e COX, 2002).

A degradação de vitamina C é um evento catabólico complexo que envolve diversas reações de oxidação e redução, produzindo moléculas intermediárias menores. Dependendo das condições do meio, dois mecanismos de degradação podem ocorrer: aeróbico e anaeróbico (YUAN e CHEN, 1998). Em condições aeróbicas, o ácido ascórbico, potente agente redutor, se oxida facilmente e de modo reversível a ácido dehidroascórbico (ADHA), porém ainda possui propriedades de vitamina C (Figura 1). Continuando-se as reações de oxidação, a atividade biológica da vitamina C se perde quando o ADHA se transforma irreversivelmente em ácido 2,3-dicetogulônico, produzindo, finalmente, hidroxifurfural (YUAN e CHEN, 1998; ROJAS e GERSCHENSON, 1997; VANUCCI e ROCHA, 2012).

Figura 1: Degradação aeróbica do ácido ascórbico.



Fonte: LAVARDA (2011).

A deficiência na ingestão do ácido ascórbico torna-se fortemente evidente quando ocorrer a síntese defeituosa do tecido colagenoso e o desenvolvimento do escorbuto, uma doença que se caracteriza por afrouxamento dos dentes, sangramento das gengivas, anemia, hemorragias, deficiência na cicatrização, osteoporose e, em casos extremos, a morte (ALVES, 2004; VANUCCI e ROCHA, 2012).

Os principais fatores que podem afetar a degradação da vitamina C durante o armazenamento, processamento e consumo incluem as condições de estocagem, o tipo de embalagem, a exposição ao oxigênio e à luz, a temperatura, a presença de catalisadores metálicos e enzimas e o pH (GREGORY III, 1985; LAVARDA, 2011).

3.2 VITAMINA C NA ÁREA ALIMENTÍCIA

De acordo com a literatura, o ácido ascórbico é quimicamente estável em pH ácido, mas instável quando em meio alcalino ou meio aquoso neutro. Também sofre degradação intensa quando sujeito a determinadas concentrações de oxigênio, intensidade luz e temperatura. Dependendo das condições de preparo do alimento, ele pode ser totalmente degradado (*Maximum Cook Loose* (MCL) = 100%) (GREGORY III, 1985).

Van Bree et al. (2012), analisando a cinética de degradação do ácido ascórbico em suco de fruta, relataram que, em condições de não-stress, a vitamina C degrada-se de forma irreversível de acordo com um modelo de primeira ordem. Mesmo quando conservados em condições ótimas de temperatura, a maioria dos sucos naturais perdem de 20 a 35% do seu teor inicial de vitamina C depois de um ano de armazenamento (DE RITTER, 1976).

Sapei e Hwa (2014), investigando o efeito da temperatura de armazenamento e da adição de açúcar na perda de ácido bem como a cinética de degradação e a influência de ascórbico em sucos de morango, durante 8 horas, verificaram que a reação de degradação da vitamina C seguiu os modelos cinéticos de ordem zero em todos os tipos de sucos. Nos sucos sem adição de açúcar armazenados em temperatura ambiente, a degradação de ácido ascórbico foi quase que completa. Analisando o mesmo efeito, Oliveira et al. (2013) demonstraram que houve uma redução significativa do teor de ácido ascórbico em suco integral de manga com o aumento da temperatura, utilizando um modelo cinético de primeira ordem. Quando verificado em maçãs, a degradação do ácido ascórbico seguiu uma reação de pseudo-primeira ordem e a constante da taxa de degradação aumentou quando a temperatura aumentou de 40 para 70 °C (TIMOUMI; MIHOUBI e ZAGROUBA, 2007).

Mercali et al. (2012), ao analisar o efeito do tratamento térmico por aquecimento ôhmico e convencional na degradação da vitamina C em polpa de acerola, verificaram que os gradientes de tensão induziram maior degradação do ácido ascórbico por causa de reações eletroquímicas. A fim de avaliar a influência da presença de oxigênio sobre a degradação da vitamina C em diferentes meios (purê de maçã, purê de cenoura, solução tampão e água ultrapura), verificou-se que a ausência de oxigênio nos meios testados preservaram quase que completamente a vitamina C (HERBIG; MAINGONNAT e RENARD, 2016). Del-Valle et al. (2009) demonstraram que em amostras minimamente processadas de mandarinas 'Clemenules' em atmosfera controlada com maior concentração de O₂ apresentaram aumento da perda de vitamina C comparada com aquelas com menor concentração de O₂.

Tentativas para fortificar leite com vitamina C resultou em perda de 35-40% ao longo de 7 dias de armazenamento a 4 °C na ausência de luz (ROSENTHAL; ROSEN e BERNSTEIN, 1993). Quando este foi adicionado a um alimento sólido, como pão e flocos de cereais, foram observadas altas taxas de perda: cerca de 80 e 40%, respectivamente (STEELE, 1976).

Teixeira et al. (2006), ao verificar o efeito de diferentes condições de estocagem sobre a degradação do ácido ascórbico em goiabadas industrializadas ao longo de 270 dias, concluíram que, a 30 °C, a retenção de ácido ascórbico foi menor quando havia presença de luz. Também avaliando a estabilidade e o efeito da luz sobre o ácido ascórbico, Maeda et al. (2007) observaram que, em néctares de camu-camu armazenados sob luz e refrigeração durante 120 dias, houve perda de 12 a 14% do teor de ácido ascórbico. As respostas indicam que a presença de luz também é um fator de degradação do ácido ascórbico.

Com o objetivo de verificar o efeito do processamento da acerola sobre componentes (vitamina C, antocianinas e carotenóides) do suco obtido, Maia et al., (2007) observaram que após a etapa de pasteurização houve uma diminuição da concentração de vitamina C, devido a degradação térmica do ácido ascórbico.

A preservação de vitaminas adicionadas à alimentação animal é também uma preocupação. Coelho (2002) revisou os fatores de estresse que podem influenciar a estabilidade das várias vitaminas adicionadas durante o processamento e armazenamento em premixes e rações para ruminantes, apontando para os efeitos da peletização e extrusão sobre a degradação de ingredientes. Guilherme et al. (2009), avaliaram a degradação do ácido ascórbico quando adicionados à ração de peixes contra vários fatores, como a estabilidade térmica, fotoquímica e lixiviação, evidenciando que o conteúdo de vitamina diminuiu em aproximadamente 60% depois de 30 dias de armazenagem em meio aquoso.

Levando-se em consideração o fato de que os citrinos são um dos maiores contribuintes de vitamina C para o ser humano, ter conhecimento sobre fatores pós-colheita que afetam o teor desta vitamina em frutas torna-se necessário. Mditshwa et al., (2017) elaboraram uma revisão bibliográfica em que relataram que os fatores de degradação da vitamina C em frutas cítricas são tratamentos pós-colheita, condições de armazenamento e estresse oxidativo. Tratamentos pós-colheita, tais como revestimento de superfície, tratamento térmico, irradiação e modificação de atmosfera levam a uma melhor conservação de vitamina C.

3.3 CARACTERÍSTICAS DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE ACEROLA

A acerola destaca-se em razão, especialmente, do seu elevado teor de ácido ascórbico, seu potencial para industrialização, bem como suas características nutricionais, acompanhados ao sabor e à textura aprazíveis ao paladar do consumidor

(MENEZES et al. 2009). No processamento de polpas de frutas, são gerados resíduos que, geralmente, são constituídos de casca, caroço ou sementes e bagaço. Durante a produção de suco ou polpa congelada da acerola, a prensagem desses frutos produz resíduos altamente fibrosos de coloração bastante intensa (Figura 2).

Figura 2: Resíduos do processamento da acerola, coletados em três etapas do processo: triturador, despoldadeira e decanter; bem como em dois estádios de maturação.



Fonte: COSTA (2012).

Estes resíduos, apesar de possuírem em sua composição vitaminas, minerais, fibras, compostos antioxidantes e fenólicos, são desperdiçados na maioria das fábricas. Seu aproveitamento é possível em produtos, como compotas, geleias, sucos, barras de cereais e bolos, minimizando o desperdício e gerando uma nova fonte alimentar. Estes resíduos também podem ser destinados para a alimentação animal (rações mistas) ou à produção de fertilizantes (CAETANO et al. 2009; MOREIRA, 2007).

As cascas e as sementes são frequentemente os maiores componentes de vários frutos e, em geral, não recebem a devida atenção, o que pode ser decorrente da falta de valor comercial do bagaço. Vale destacar que as cascas e as sementes de certos frutos exibem atividade antioxidante mais alta do que da polpa e que o perfil dos fitoquímicos antioxidantes é diferenciado nestas partes do vegetal (SOONG e BARLOW, 2004). A extração e o processamento dos compostos de interesse presentes no bagaço de acerola poderiam aumentar o valor comercial da matéria-prima e a rentabilidade do processamento da fruta (CAETANO et al., 2009; MOREIRA, 2007).

SOUSA et al. (2011) investigaram o valor nutricional e compostos antioxidantes presentes em resíduos de polpas de frutas tropicais. Os resultados mostraram que os resíduos são fontes potenciais de macronutrientes e compostos bioativos, destacando-se os resíduos de acerola e goiaba como os mais ricos em compostos antioxidantes, como carotenóides totais, fenólicos totais e vitamina C. Em estudo similar, Caetano et al., (2009) também analisaram a extração dos antioxidantes de resíduos agroindustriais, concluindo que os da fruta da aceroleira são fonte promissora de antioxidante natural.

Braga et al. (2011) avaliaram o caráter nutricional dos resíduos de acerola verde e madura, extraídos do processo de clarificação do suco, e concluíram que a farinha obtida apresentou maiores quantidades de nutrientes que o material fresco, destacando-se a alta concentração de vitamina C e fibras. Desta forma, evidenciou-se o bom potencial de utilização destas farinhas para o enriquecimento de produtos alimentícios.

Também foi verificada a composição nutricional de farinhas de resíduos da produção de sucos de uva e acerola por Storck et al. (2015), que apresentaram teores de proteína de 8,2% a 15,6% e de 8,3% a 12,1%, respectivamente. Portanto, uso destes resíduos na alimentação humana pode ser recomendado, melhorando o valor nutricional de preparações alimentícias, pelo fornecimento de fibras, proteína, cinzas e polifenóis.

3.4 ESTABILIZAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS POR NANOENCAPSULAÇÃO

Tendo conhecimento que ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) possuem efeitos benéficos à saúde humana e que os peixes e animais são as fontes mais ricas de AGPI na dieta humana, Ghorbanzade et al. (2017) utilizaram nanolipossomas para nanoencapsular óleo de peixe na tentativa de fortificar iogurte. No geral, a encapsulação das nanolipossomas resultou numa redução significativa da acidez, aumento da estabilidade dos AGPI presentes no óleo de peixe. Por sua vez, a adição de óleo de peixe nanoencapsulado no iogurte resultou em características mais próximas à amostra de controle em termos de características sensoriais do que o iogurte com óleo de peixe livre (não encapsulado).

Do Prado Silva et al. (2017) nanoencapsularam a luteína em matriz de polivinilpirrolidona (PVP) pelo método de dissolução em solvente comum, visando aumentar sua estabilidade e biodisponibilidade, e verificaram seu efeito na memória

de camundongos. Os resultados indicaram que as NP de PVP apresentaram morfologia esférica, tamanho uniforme e que a encapsulação foi capaz de aumentar em 43 vezes a solubilidade em água da luteína. Os testes *in vivo* mostraram que a administração de nanopartículas carregadas de luteína não alterou os parâmetros inflamatórios no plasma, fígado e cérebro de camundongos. Nesse sentido, as nanocápsulas de PVP carregadas com luteína podem ser uma alternativa vantajosa para aumentar a solubilidade em água e para melhorar a memória de camundongos sem causar danos inflamatórios.

Existem muitas maneiras de reduzir a perda de ingredientes bioativos, como as vitaminas, em produtos nutracêuticos (PÉREZ-MASIÁ et al. 2015). Entre esses, a nanoencapsulação polimérica tem sido utilizada para proteger vitaminas sensíveis contra a influência externa. A nanoencapsulação geralmente é feita pelo processo de gelificação iônica, que oferece vantagem por sua relativa simplicidade de preparação e a ausência da necessidade de se utilizar solventes orgânicos. Técnica esta que consiste no estabelecimento de ligação cruzada inter- e intramolecular entre um polieletrólito, por exemplo, quitosana, e um poliion, tal como tripolifosfato de sódio (TPP). O sistema se mantém estável a partir de força eletrostática entre os íons de cargas opostas. No entanto, as características das NP são altamente dependentes do polímero, das concentrações do agente de reticulação, do pH e da presença de uma terceira espécie (especialmente, a substância encapsulada) (BRITTO et al. 2014; BRITTO et al. 2012, SALAZAR, 2015).

Utilizando o processo de gelificação iônica, foram preparadas NP de quitosana/TPP carregadas com polpa de jujuba e extrato de sementes para aumentar sua estabilidade. Os resultados mostraram boa eficiência de encapsulamento (EE), sendo superior a 80% para todas as condições de preparação. A estabilidade da polpa de jujuba e extrato da semente também foram efetivamente aumentadas pela nanoencapsulação, tornando-se, assim, ingrediente útil na formulação alimentar (HAN et al., 2015).

A viabilidade de encapsulamento de vitaminas C, B9 e B12 em quitosana/TPP e em trimetil quitosana/TPP foi previamente confirmada em estudos anteriores, nos quais as mudanças estruturais e químicas foram relacionadas e discutidas por meio de análises espectroscópicas (^{13}C -RMN no estado sólido e infravermelho) e morfológica (Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura) (BRITTO et al. 2012). No geral, NP de quitosana e TPP têm morfologia esférica e

tamanho por volta de 200 nm, aumentando consideravelmente quando ocorre a encapsulação da vitamina. A cinética de liberação dessas vitaminas em meio aquoso mostrou ser dependente do pH e que propriedades físico-químicas como massa molar e solubilidade da vitamina influenciam grandemente o perfil de liberação (BRITTO et al. 2014).

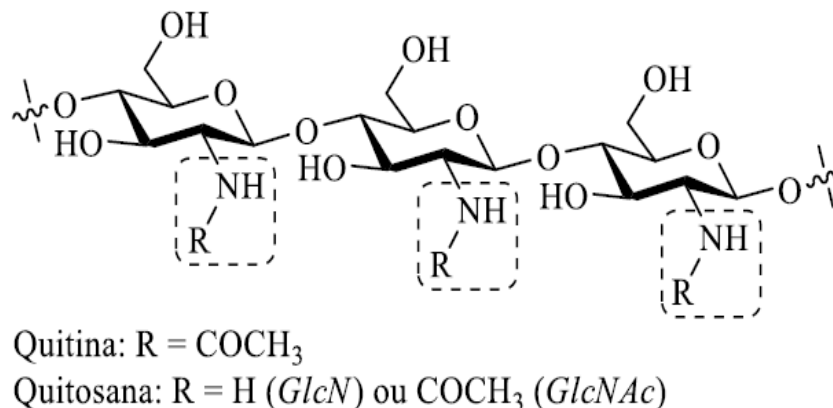
As mudanças no processamento e a crescente exigência do consumidor por alimentos mais naturais, com uma vida útil prolongada, mantendo a qualidade nutritiva, tem sido buscado rotineiramente. Um dos materiais poliméricos mais utilizados em aplicações na indústria de alimentos é a quitosana, devido as suas propriedades peculiares, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade. Seu uso, características químicas e físicas serão discutidos a seguir.

3.4.1 Quitosana

A quitosana é um polímero natural obtido a partir da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, presente também em alguns moluscos ou em parede celular de fungos e leveduras (ABREU et al. 2013; SHAHIDI; ARACHCHI e JEON, 1999). A quitina (Figura 3) é um polímero linear cuja cadeias são constituídas por unidades N-acetilglicosamina unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, enquanto a quitosana é derivada da N-desacetilação da quitina, processo que raramente é completo (DASH et al., 2011; SOARES, 2012).

Quimicamente, a quitosana (Figura 3) se apresenta na forma de um copolímero composto por unidades estruturais de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, porém com a unidade de glicosamina (GlcN) em maior proporção (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Geralmente, é difícil de se obter quitosana com elevado grau de desacetilação, pois, à medida que este aumenta, a possibilidade de degradação do polímero também aumenta. Quando o grau de acetilação é inferior a 50% a quitina passa a ser chamada de quitosana (CAMPANA-FILHO et al. 2007; SALAZAR, 2015; SILVA; DOS SANTOS e FERREIRA, 2006).

Figura 3: Representação da estrutura primária da quitina e quitosana.



Fonte: GONSALVES et al. (2011).

No processo para obtenção da quitosana via N-desacetilação da quitina, os grupos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) das unidades de N-acetilglicosamina (GI-NAc) remanescentes do precursor são convertidos em grupos amino ($-\text{NH}_2$), em taxas variadas, para originar o heteropolissacarídeo com diferentes graus médios de substituição (GONSALVES et al. 2011).

O método comumente empregado na desacetilação da quitina para obtenção da quitosana consiste em utilizar solução básica quente ($\approx 80 - 130\text{ }^\circ\text{C}$) concentrada de NaOH ($\approx 40 - 60\%$ m/v) durante várias horas. As condições empregadas nesse processo, tais como a concentração da solução alcalina e a razão quitina/solução alcalina, o tamanho das partículas de quitina, a temperatura, o tempo e a atmosfera de reação, afetam as características da quitosana obtida, como massa molar e grau de desacetilação. Este último representa a porcentagem de grupos amina livre e está fortemente vinculado com a solubilidade do polímero (KUMAR, 2000; ROBERTS, 1992).

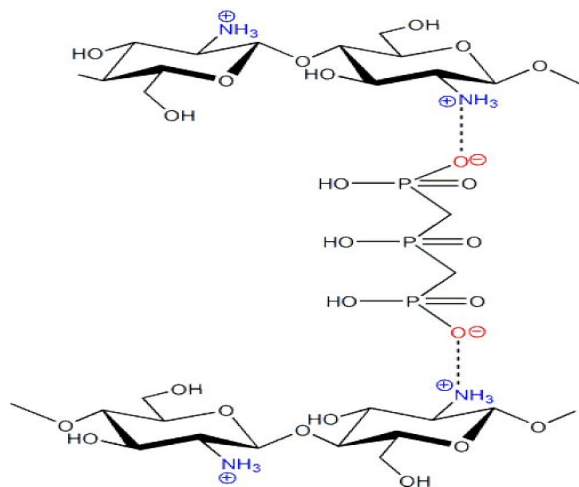
A quitosana é solúvel em ácidos diluídos ($\text{pH} < 6$), devido à protonação dos grupos amino livres ($-\text{NH}_3^+$) de suas unidades glicosamina, enquanto que em meios neutros e alcalinos ela é insolúvel, o que limita muitas de suas aplicações potenciais. Assim, nessas condições de ácido diluído, a ocorrência de cargas positivas confere à quitosana caráter de polieletrólito catiônico (ABREU et al. 2013; CAMPANA-FILHO et al. 2007; SALAZAR, 2015;). Desta forma, a quitosana torna-se um material especial de interesse científico e tecnológico, apresentando diversas propriedades como bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxidade, ação polieletrólítica,

habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelação e capacidade adsorptiva. Com estas propriedades, este material polieletrólito tem potencial de aplicação em diversas áreas como alimentos, cosméticos, agricultura, farmácia, biologia, medicina e nanotecnologia (DASH et al. 2011; SHAHIDI; ARACHCHI e JEON, 1999).

3.4.2 Tripolisfosfato de sódio (TPP)

Tripolisfosfato de sódio (TPP) ou pentassódio trifosfato é usualmente representado pela fórmula molecular $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. É um agente reticulante, não tóxico e possui a capacidade de formar géis por interação iônica com a quitosana. A preparação de nanopartículas de quitosana e TPP é muito comum porque no processo é desnecessário o uso de solventes orgânicos (PEREZ; MELCHIADES e BOSCHI, 2009; SALAZAR, 2015). Neste trabalho, o TPP foi utilizado como agente reticulante no processo de nanoencapsulação por gelificação iônica com a quitosana. A Figura 4 mostra a interação entre os íons fosfatos do TPP e os grupos amino da quitosana.

Figura 4: Interação iônica entre a quitosana e o tripolisfosfato de sódio (TPP).



Fonte: SALAZAR (2015).

3.5 NANOCOMPÓSITOS A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS

Os nanocompósitos (NC) são materiais híbridos em que pelo menos um dos componentes tem dimensões nanométricas (1-100 nm). Os componentes de um NC podem ser de natureza inorgânica/inorgânica, inorgânica/orgânica ou ainda orgânica/orgânica. NC à base de polissacarídeos têm despertado enorme interesse devido às suas diversas aplicabilidades e à sua capacidade em melhorar as propriedades mecânicas e térmicas quando comparados a polímeros sintéticos ou

compósitos fora da escala nano (ESTEVES; BARRO-TIMMONS e TRINDADE, 2004). A incorporação de cargas inorgânicas em polímeros origina materiais com maior resistência mecânica, maior estabilidade térmica ou com propriedades ópticas, magnéticas ou elétricas superiores (COELHO, 2008). As cargas, tendo dimensões nanométricas, apresentam uma área de superfície elevada, promovendo melhor dispersão na matriz polimérica e por isso uma melhoria das propriedades físicas do compósito, que dependem da homogeneidade do material (ESTEVES; BARRO-TIMMONS e TRINDADE, 2004).

Similarmente, NP têm uma área de superfície elevada. Quando dispersas em matrizes poliméricas, promovem alterações nas propriedades da matriz, relacionadas com a interação química específica entre as cargas e o polímero. Por exemplo, Dos Santos et al. (2017) desenvolveram NC de quitosana incorporado com NP de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para o potencial tratamento da infecção por herpes. No trabalho de Kanmani e Rhim (2014), NP de prata, quando adicionadas a filmes de gelatina, aumentaram as propriedades de barreira dos filmes, além de atribuir propriedades antimicrobianas a eles.

Adicionalmente, a preparação de NC de matriz polimérica permite em muitos casos encontrar um compromisso entre um baixo custo, devido à utilização de menor quantidade de carga, e um elevado nível de desempenho, que pode resultar da sinergia entre os componentes. Por exemplo, filmes bio-nanocompósitos de matriz de polissacarídeo de carboximetilcelulose e amido reforçado com nanocristais de celulose foram obtidos com o objetivo de melhorar suas propriedades para aplicações em embalagem (EL MIRI et al. 2015). Lorevice, Moura e Mattoso (2014) sintetizaram NC de polpa de mamão e NP de quitosana e observaram melhorias nas propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água, e térmicas dos filmes NC. Além desses, NC de polímero biodegradável poli(succinato de butileno) (PBS) e argila montmorilonita organofílica foram sintetizados com o objetivo de melhorar as propriedades do polímero, como, a formação de compósitos com estruturas esfoliadas, intercaladas, além dos tactóides (aglomerados) (FERREIRA et al. 2014).

Um fato relevante é que estes materiais de reforço para preparação de NC podem ser extraídos ou obtidos de rejeitos agroindustriais como fibra de coco, o bagaço da cana-de-açúcar (nanocristais de celulose), da casca do ovo (cristais de cálcio) e de resíduos agrícolas de mandioca (EL MIRI et al. 2015).

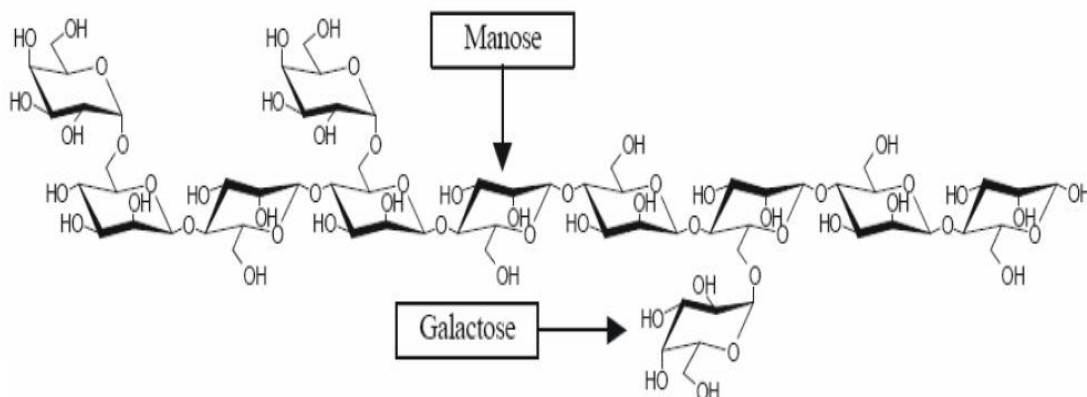
Da mesma forma, a matriz polimérica para a preparação dos filmes NC também pode ser obtida a partir de resíduos agroindustriais e fontes renováveis como os polímeros naturais. Esta é, de fato, uma das principais tendências da indústria atualmente, em que filmes comestíveis são utilizados como alternativa ao uso de recursos não-renováveis para preparação de material de embalagem, bem como aumentar a capacidade de preservação de alimentos a fatores externos (CERQUEIRA et al. 2011).

Dentro desse contexto destaca-se a *Prosopis juliflora*, comumente conhecida no Brasil como algaroba ou algarobeira, com distribuição muito comum no Nordeste. Possui, como fonte de energia para o embrião, um endosperma composto por um polissacarídeo neutro denominado galactomanana (BENTO et al. 2013). Este polissacarídeo destaca-se pela sua potencialidade de formação de matriz filmogênica a partir de soluções aquosas. Esta aplicação é uma alternativa interessante, de baixo custo e amplia a potencialidade de aproveitamento desta espécie classificada como invasora no bioma Caatinga. Nesse trabalho, este polissacarídeo foi utilizado como matriz polimérica para preparação de filmes, por meio da utilização de frações extraídas de vagens da algaroba, que, devido a sua propagação desordenada e ausência de mecanismos para aproveitamento, é pouco explorada (PEGADO et al. 2006).

3.5.1 Galactomanana

Galactomananas são polissacarídeos derivados do endosperma de sementes de plantas, especialmente leguminosas (BENTO et al. 2013; CERQUEIRA et al. 2011; CERQUEIRA et al. 2009). Sua estrutura é formada por uma longa cadeia principal de D-manose, ligadas através de ligações $\beta(1\rightarrow4)$ que conferem rigidez a sua conformação, com ramificações simples de D-galactose, substituídas de forma $\alpha(1\rightarrow6)$ (Figura 5) (POLLARD et. al. 2010).

Figura 5: Estrutura química parcial de uma galactomanana presente em edosperma de sementes.



Fonte: CASTRO (2007).

A razão entre as unidades manose/galactose varia de acordo com a sua fonte, a espécie leguminosa e o processo de extração (BENTO et al. 2013). O tamanho da cadeia principal e o número e o comprimento das ramificações estão diretamente relacionados à sua aplicação técnica. Em geral, quanto maior o teor em D-galactose, maior a sua solubilidade em água, ou seja, aquelas que possuem menos que 10% de D-galactose em sua composição irão precipitar (AZERO e ANDRADE, 1999). Na família Leguminosae, não são encontradas mananas puras (pouco ramificadas) e o grau de ramificação é de, no mínimo, uma unidade de galactose a cada quatro unidades de D-manose (BUCKERIDGE et al. 2004).

A principal aplicação da galactomanana ocorre como agente estabilizante e emulsificante, podendo ser assim utilizada na indústria de alimentos, cosméticos, têxtil, farmacêutica e biomédica (CERQUEIRA et al. 2009; AZERO e ANDRADE, 1999). Além disso, estudos recentes mostram que a galactomanana possui interessante potencial para ser utilizada na formulação de filmes para embalagens e revestimentos, aliando a sua propriedade de formar soluções viscosas a baixas concentrações com o fato de sua capacidade de se ligar à água (CERQUEIRA et al. 2011).

3.6 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA NANOENCAPSULAÇÃO

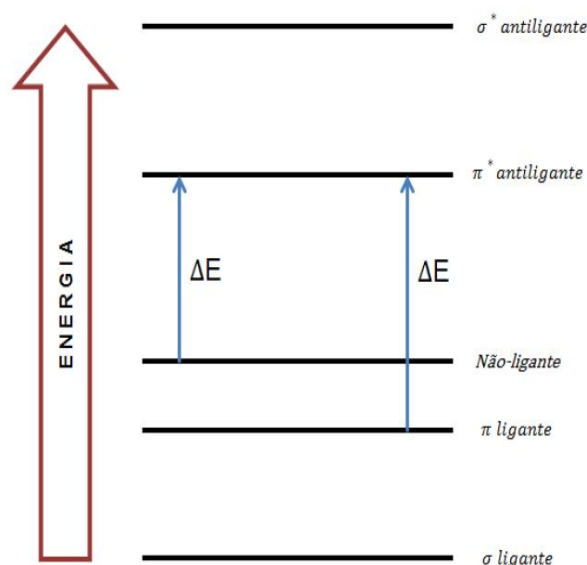
3.6.1 Espectroscopia de absorção na região do UV/Visível

A espectroscopia é o estudo da interação entre a matéria e a radiação eletromagnética. Dentre os métodos espectrométricos, o de absorção molecular na região do espectro eletromagnético referente ao ultravioleta e ao visível (UV-VIS) é uma das técnicas analíticas mais empregadas, devido ao custo ser relativamente baixo, possuir grande número de aplicações desenvolvidas e robustez. As variáveis que influenciam a região de absorção do espectro pela substância, incluem pH, temperatura, solvente empregado, concentração de eletrólitos e os componentes da amostra (BRUICE, 2006; SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002).

Segundo Bruice (2006), a espectroscopia no UV/Vis fornece informações sobre as substâncias com ligações duplas conjugadas. A luz ultravioleta é a radiação eletromagnética com comprimento de onda entre 180 e 400 nm (nanômetros), enquanto a luz visível possui comprimentos de onda entre 400 e 780 nm. A luz na região do ultravioleta e visível possui energia suficiente apenas para provocar transição eletrônica, ou seja, os elétrons estão em orbital molecular de mais baixa energia (estado fundamental), quando a molécula absorve luz num determinado comprimento de onda apropriado o elétron é promovido para um orbital molecular de mais alta energia (estado excitado).

Como observado na Figura 6, a transição eletrônica com a mais baixa energia é a promoção de um elétron não ligante (livre) para um orbital molecular π^* antiligante e a transição eletrônica de mais alta energia é a promoção de um elétron de um orbital molecular ligante para um orbital π^* antiligante. Isso significa que substâncias orgânicas com elétrons π podem produzir espectros do UV/Vis.

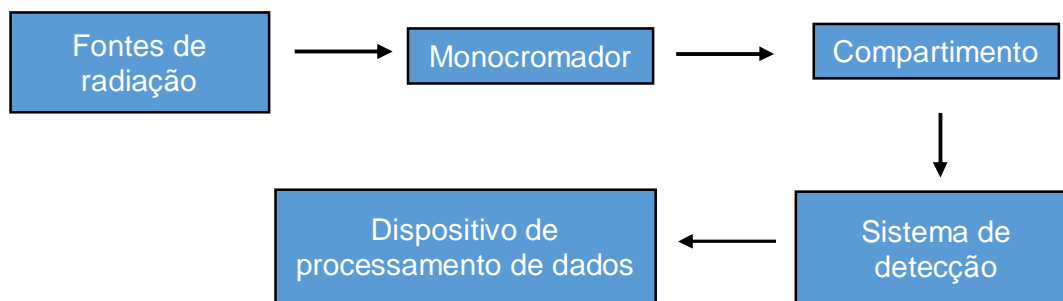
Figura 6: Energias relativas dos orbitais moleculares.



Fonte: BRUICE (2006).

Espectrofotômetros utilizados na região do ultravioleta e visível apresentam, basicamente, fonte contínua de radiação (por exemplo, uma lâmpada de tungstênio); um monocromador para seleção de uma faixa estreita de comprimentos de onda que atravessam a solução contendo o analito, um compartimento para inserção de soluções de amostras no feixe de luz monocromática (por exemplo, cubetas) e um dispositivo para detecção da medida da intensidade de radiação e uma unidade de leitura e de processamento de sinal (Figura 7).

Figura 7: Componentes principais de um espectrofotômetro de feixe simples.



A espectroscopia de absorção está baseada na medida de transmitância (T) ou absorvância (A) de soluções contidas em células transparentes à luz ultravioleta e visível, por exemplo, quartzo, através um caminho óptico determinado em

centímetros. A Equação 1 mostra a quantidade de luz absorvida (A) que está relacionada diretamente com a concentração do soluto (C) em determinada solução, por meio da lei de Lambert-Beer, ou simplesmente lei de Beer (BRUCE, 2006; SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002):

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon b C \quad (\text{Equação 1})$$

em que:

P_0 = intensidade da radiação que incide sobre a amostra;

P = intensidade da radiação que emerge da amostra;

C = concentração da amostra, em mol/L;

b = comprimento do caminho percorrido pela luz através da amostra, em cm;

ϵ = absorvidade molar (litro mol/cm).

Neste trabalho, o uso da técnica UV/Vis tornou-se relevante para quantificação de vitamina C presente nas soluções.

3.6.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS) é uma técnica não destrutiva utilizada para medir o tamanho de partículas, macromoléculas e proteínas em tamanho inferior ao micrão dispersa em um líquido. O espalhamento de luz dinâmico está relacionado ao movimento aleatório (flutuações) das partículas em solução, devido às diferenças de densidade decorrentes da aglomeração de partículas e variação de números de moléculas no volume disperso (PETTA, 2006).

Quando uma fonte de luz laser incide sobre a solução, ela pode ser espalhada ou absorvida pelas partículas do meio. O instrumento usado na técnica do DLS registra a luz espalhada, cuja partículas espalham luz com intensidades diferentes. Assim, partículas com diâmetro pequeno se movimentam rapidamente, a luz espalhada mostra flutuações rápidas. Por outro lado, partículas maiores se movimentam mais lentamente, de modo que a luz espalhada apresenta flutuações mais lentas. Portanto, a variação de intensidade da luz espalhada carrega informações importantes sobre o tamanho de partícula. Com o coeficiente de difusão e viscosidade do solvente conhecidos, o raio hidrodinâmico pode ser calculado a partir da equação de Stokes–Einstein (Equação 2):

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (\text{Equação 2})$$

onde, 'k' é a constante de Boltzmann, 'T' é a temperatura absoluta, 'η' a viscosidade do solvente e 'D' a constante de difusão.

3.6.3 Potencial zeta

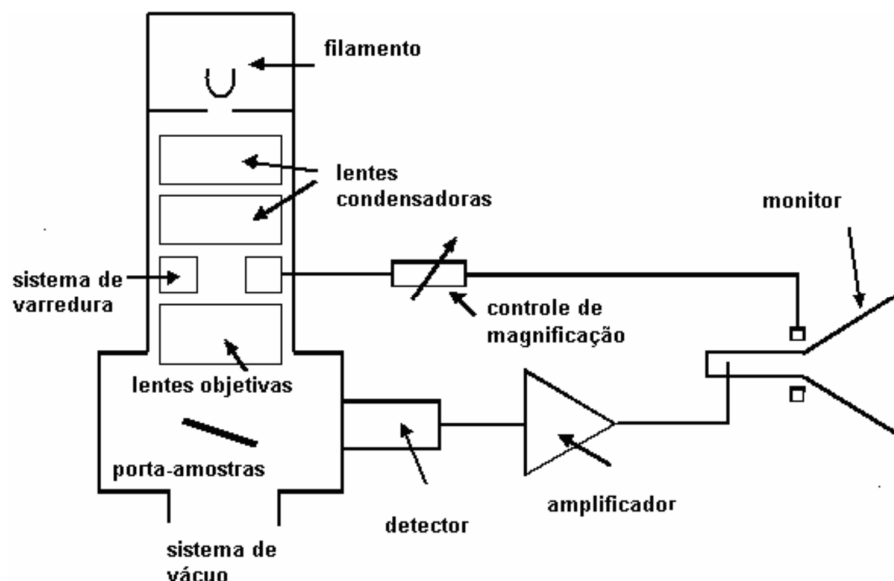
O potencial zeta é uma técnica utilizada para prever a estabilidade de uma suspensão. A medida do potencial zeta leva à determinação da carga eletrostática superficial de pequenas partículas sólidas dispersas no meio, que se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas. Altos valores de potencial zeta significa que a densidade de cargas de um mesmo sinal sobre as partículas é alta, tendo como consequência a repulsão mútua entre elas, logo a estabilidade é maior. De um modo geral, quanto maior o valor do potencial zeta, mais provável à estabilidade da suspensão, pois as partículas carregadas se repelem, e essa força supera a natural agregação das partículas. O valor ideal deve ser maior ou igual a +/- 30 mV (SCHAFFAZICK et al. 2003).

3.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma das técnicas da microscopia mais utilizadas, sendo um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a observação morfológica, atuando na análise das características microestruturais de materiais sólidos.

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons extremamente estreito para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica com varredura perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente, o feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. O resultado da interação entre o feixe de elétrons incidente e a superfície da amostra é a produção de elétrons secundários e/ou elétrons retroespalhados que são acelerados por um detector e seus sinais amplificados, gerando imagens da topografia da amostra (DEDAVID, GOMES e MACHADO; 2007). O MEV convencional apresenta uma coluna óptico-eletrônica adaptada a uma câmara com porta-amostra aterrado, sistema eletrônico, detectores e sistema de vácuo (Figura 8).

Figura 8: Desenho esquemático dos componentes básicos do microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: DEDAVID et al. (2007).

O MEV é um aparelho que pode também fornecer rapidamente informações sobre a identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia (DEDAVID, GOMES e MACHADO; 2007). A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas. Instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al. 1987). Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os resíduos do processamento de polpa de acerola utilizados neste trabalho foram cedidos pela empresa Niagro-Nichirei do Brasil Agrícola Ltda, indústria que processa a acerola para obtenção de polpa e suco concentrado, localizada no distrito industrial, lotes 14/17, em Petrolina-PE. Os resíduos utilizados foram gerados na etapa de processamento que usa o triturador, a partir das cultivares de acerolas Okinawa e Flor Branca. Solventes e reagentes como tripolifosfato de sódio (TPP, 85% Sigma – Aldrich ®); quitosana (Chi) de peso molecular médio (75 - 85% desacetilada), adquirida da Sigma - Aldrich ®, ácido acético (HAc) (Vetec ®, 99,7%); ácido metafosfórico P.A. (Vetec ®); ácido clorídrico (HCl 37%, Alphatec ®); ácido oxálico dihidratado P.A. (Vetec ®, 99,5 – 102,5%) e ácido L(+) ascórbico (vitamina C) P.A. (Vetec ®); álcool etílico absoluto P. A. (Ciavikko ®, 99,5%), foram utilizados na forma que adquiridos comercialmente, sem purificação prévia. Para a preparação dos filmes nanocompósitos foi utilizada galactomanana extraída da semente de algaroba, coletada na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE.

4.1 MÉTODOS

4.1.1 Construção da curva de calibração de ácido ascórbico

Para construir a curva de calibração por espectrofotometria no UV-Visível foram testados alguns solventes para a preparação da solução estoque. Para isso, foram dissolvidos 30 mg de ácido ascórbico em: ácido oxálico 0,5% (m/v), ácido acético 0,1% (v/v), ácido clorídrico 0,1% (v/v) e ácido metafosfórico 1,0% (m/v). Todas as soluções foram preparadas em volume de 100 mL. Alíquotas de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µL dessas soluções foram diluídas para 10 mL nos respectivos ácidos que contêm para construir a curva de calibração.

A análise foi realizada em temperatura ambiente com leitura de varredura no intervalo de 200 a 400 nm, tendo 242 nm como pico máximo para a vitamina C. O aparelho utilizado foi da marca Thermo Scientific, modelo MultiSkan GO (Figura 9). Todos os dados foram tratados utilizando o programa computacional Origin Pro 8.0.

Figura 9: Espectrofotômetro (UV-Vis) Thermo Scientific, modelo MultiSkan GO.



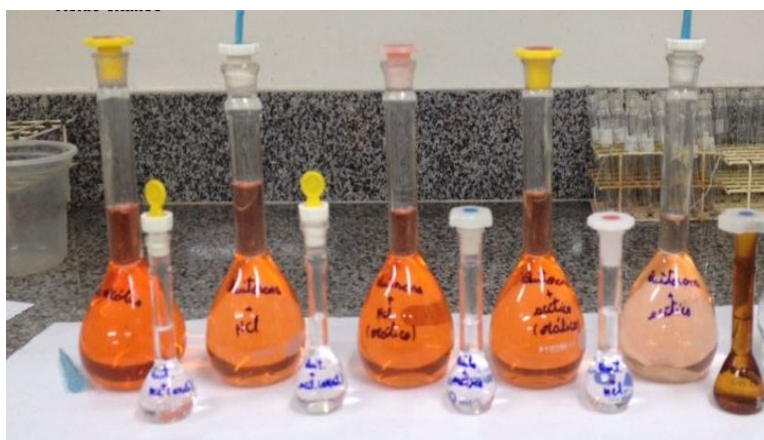
4.1.2 Estudo preliminar de diferentes sistemas de extração de vitamina C

A fim de se determinar qual o melhor sistema para a extração da vitamina C, foram estudadas cinco condições diferentes. O procedimento pode ser dividido em duas etapas, sendo a primeira a de extração do resíduo e na segunda, o volume é completado com diferentes soluções. A Tabela 1 resume as cinco extrações obtidas. A primeira etapa consistiu em pesar 5 g do resíduo úmido de polpa de acerola em tubo Falcon com 50 mL de capacidade, adicionar as diferentes soluções extratoras (Tabela 1) e agitar manualmente por cerca de 30 segundos. Em seguida, a mistura do resíduo do processamento de polpa e as soluções extratoras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min, a 8 °C, para a separação do resíduo sólido, obtendo-se, assim, o extrato sobrenadante rico em vitamina C. As soluções extratoras a partir de quitosana foram preparadas previamente, dissolvendo-a sob agitação magnética, durante aproximadamente 4 horas. Para a segunda etapa, o extrato sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico com 100 mL de capacidade (Figura 10) e completado o volume com as diferentes soluções, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes sistemas extratores empregados na obtenção da vitamina C a partir do resíduo de processamento da acerola.

Extratos	Primeira Etapa (Soluções extratoras)	Segunda Etapa (Soluções a completar o volume para 100 mL)
Extrato 1 (Condição controle)	40 mL de ácido oxálico a 0,5% (m/v)	Completo-se com ácido oxálico a 0,5% (m/v)
Extrato 2	50 mL de solução aquosa de quitosana (3 mg/mL) em ácido acético 0,1% (v/v)	Completo-se com ácido acético a 0,1% (m/v)
Extrato 3	50 mL de solução aquosa de quitosana (3 mg/mL) em ácido acético 0,1% (v/v)	Completo-se com ácido oxálico a 0,5% (m/v)
Extrato 4	50 mL de solução aquosa de quitosana (3 mg/mL) em HCl 0,1% (v/v)	Completo-se com ácido clorídrico 0,1% (v/v)
Extrato 5	50 mL de solução aquosa de quitosana (3 mg/mL) em HCl 0,1% (v/v)	Completo-se com ácido oxálico a 0,5% (m/v)

Figura 10: Soluções extratoras contendo vitamina C do resíduo do processamento de polpa de acerola.



A capacidade de preservação foi feita expondo-se os diferentes sistemas de extratos à luz fluorescente com intensidade de 5,88 lux, (dpUNION, DPU-220) durante 3 dias, ininterruptamente, a 25 °C, em câmara tipo B.O.D. localizada no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), em Petrolina-PE. Por fim, alíquotas de 200 µL dos extratos foram diluídas para 10 mL de ácido metafosfórico 1,0% (m/v) para quantificar a vitamina C por espectrofotometria no UV-visível (COSTA, 2012).

4.1.3 Teor de ácido ascórbico (AA)

Para calcular o teor de vitamina C no resíduo seco de polpa de acerola, inicialmente pesou-se 1 g de resíduo e deixou em estufa a 105 °C durante 24 horas. Após secagem, as amostras foram pesadas e, por diferença de massa, calculou-se a quantidade de massa seca. O experimento foi realizado em triplicata. O teor de AA presente no resíduo seco foi calculado de acordo com a Equação 3:

$$\text{Teor de AA} = \frac{\text{massa AA da extração (mg)}}{\text{massa seca (g)}} \quad (\text{Equação 3})$$

em que, a quantidade de massa AA da extração, foi calculada com base nas concentrações quantificadas pela espectrofotometria UV/Vis. Os resultados foram expressos em mg/100 g.

4.1.4 Estabilização da vitamina C extraída do resíduo do processamento de polpa de acerola via nanoencapsulação

A estabilização ocorreu via gelificação ionotrópica a partir de solução de quitosana, contendo a vitamina C e o TPP. O solvente escolhido para a quitosana foi o HCl 0,1% (v/v), conforme os melhores resultados apresentados no estudo preliminar descrito no item 4.1.2. Assim, o processo de extração da vitamina C para este estudo foi conforme o procedimento para obtenção dos extratos 4 e 5 (primeira etapa), consistindo de 50 mL de solução de quitosana em HCl. Após a centrifugação, o extrato sobrenadante foi submetido à gelificação iônica com solução de TPP. Para efeito de comparação, foi preparado também um sistema controle, contendo 60 mg de vitamina C pura adicionada à 50 mL de solução de quitosana em HCl. A solução assim obtida foi também submetida à gelificação iônica, nas mesmas condições.

A solução de TPP (60 mg em 50 mL de água) foi colocada em uma bureta e gotejada sobre as soluções de quitosana e extrato ou vitamina C sob agitação, em temperatura ambiente, para a formação das NP pelo mecanismo espontâneo de gelificação iônica. A taxa de adição da solução de TPP foi de 1 mL/min. As suspensões de NP foram denominadas NP_{ex} e NP_{pr} respectivamente para NP obtidas a partir do extrato do resíduo e as obtidas a partir da vitamina C pura (BRITTO et al., 2014; BRITTO et al., 2012).

4.1.5 Estudo da estabilidade da vitamina C nanoencapsulada em diferentes condições

A estabilidade da vitamina C quando nanoencapsulada foi avaliada em três condições: incidência de luz fluorescente, temperatura e saturação de oxigênio (O₂). Para avaliar a estabilidade quanto à exposição à luz fluorescente, as soluções foram colocadas em tubos de ensaio com tampas e deixadas em estufa (marca Eletrolab, modelo EL202/E) a 25 °C, durante 15 dias, no laboratório de Entomologia localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Para análise da influência da temperatura, as suspensões foram deixadas em câmara climática de temperatura constante (marca Fitotec, modelo LT 2100 UTFP) a 35 °C na ausência de luz, durante 15 dias. Para avaliar a degradação da vitamina C na presença de oxigênio (ausência de luz, 25 °C), utilizou-se um sistema contendo uma pipeta Pasteur junto a uma mangueira conectada em cilindro de oxigênio, onde o fluxo de O₂ borbulhava durante 10 minutos ininterruptamente (uma única vez para cada intervalo de tempo) para cada amostra num período de 15 dias.

Para análise de degradação da vitamina C por ação de oxigênio (O₂) tornou-se necessário fazer alguns ajustes devido à precipitação das suspensões. Assim, foram utilizados 40 mg e 50 mg de TPP em 50 mL de água no processo de nanoencapsulação para as amostras NP_{ex} e NP_{pr}, respectivamente.

Após tempos pré-determinados (duas vezes semanais, durante 15 dias), alíquotas de 1 mL da suspensão de NP (Figura 11) foram separadas e centrifugadas (13.000 rpm, 10 min, 10 °C). A vitamina C residual presente no sobrenadante foi quantificada, separando-se alíquotas de 200 µL, diluídas para 10 mL de ácido metafosfórico 1% (m/v) e analisada em espectrofotômetro (item 4.1.1). Os

experimentos foram realizados em duplicata e os dados foram tratados e normalizados através do programa OriginPro 8.

Figura 11: Amostras das suspensões de nanopartículas contendo vitamina C.



Como controle, para comparar a degradação relativa com as amostras encapsuladas (NP_{ex} e NP_{pr}), preparou-se solução de ácido ascórbico (vitamina C) em água deionizada (0,6 mg/mL), denominada AA_{ag} , e um segundo controle consistindo da extração da vitamina C do resíduo de acerola em solução de ácido oxálico a 0,5% (m/v) baseado no extrato 1 (Tabela 1), sendo denominado VC_{ox} .

4.1.6 Determinação de parâmetros cinéticos

Os resultados obtidos para a cinética de degradação do ácido ascórbico, analisando a influência da luz, temperatura e atmosfera oxidante foram ajustados ao modelo cinético de primeira ordem de acordo com a Equação 4 (MERCALI et al. 2013):

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (\text{Equação 4})$$

onde t é o tempo (dias), k é a constante cinética de primeira ordem (dias^{-1}), C e C_0 a concentração no tempo t e concentração no tempo zero, respectivamente.

Os valores de degradação do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram dados pela Equação 5 (MERCALI et al. 2013):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (\text{Equação 5})$$

Os sistemas NP_{ex} e NP_{pr} foram estudados também quanto à determinação da energia de ativação, E_a. Para isto, foram levantadas isotermas das suspensões de NP_{ex} e NP_{pr} a 25, 30 e 35 °C. As suspensões de NP foram deixadas em câmara climática de temperatura constante (marca Fitotec, modelo LT 2100 UTFP) na ausência de luz, durante 4, 9 e 12 dias para as temperaturas 25, 35 e 30 °C, respectivamente. Em determinados intervalos de tempo, alíquotas de 1 mL da suspensão de NP foram separadas e centrifugadas (13.000 rpm, 10 min, 10 °C). A vitamina C residual presente no sobrenadante foi quantificada, separando-se alíquotas de 200 µL, diluídas para 10 mL de ácido metafosfórico 1% (m/v) e analisada em espectrofotômetro (item 4.1.1).

A dependência da temperatura da degradação da vitamina C pode ser expressa em termos da energia de ativação (E_a) e descrita adequadamente pela cinética de Arrhenius, conforme a Equação 6 (TIMOUMI, MIHOUBI e ZAGROUBA; 2007):

$$k_1 = k_0 \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (\text{Equação 6})$$

onde k₁ é a constante (taxa de degradação), k₀ é um fator pré-exponencial, E_a a energia de ativação (kcal/mol), R a constante dos gases (1,987 kcal/mol.K) e T é a temperatura absoluta em K.

4.1.7 Avaliação de tamanho de partícula e potencial zeta

A variação do tamanho e o potencial zeta das nanopartículas (NP_{ex} e NP_{pr}) em função do tempo foi avaliada com base na técnica de DLS (*Dynamic Light Scattering*), em equipamento Zetasizer Nano ZS Zen 3600 da Malvern Instruments Ltd., Inglaterra, localizado no Laboratório de Nanotecnologia para o Agronegócio – LNNA, da Embrapa Instrumentação em São Carlos, SP. Todas as análises foram realizadas em triplicata, a 25 °C.

4.1.8 Análise de turbidez

Para avaliar a estabilidade das suspensões e a formação de aglomerados nas NP foram feitas medidas de turbidez em três suspensões diferentes para cada amostra (NP_{ex} e NP_{pr}). A preparação das suspensões por nanoencapsulamento consistiu no mesmo procedimento descrito no item 4.1.4, alterando apenas a

quantidade de TPP, em que para a NP_{ex} utilizou-se 40, 45 e 50 mg de TPP em 50 mL de água, enquanto que para a NP_{pr} (vitamina C pura = 30 mg) utilizou-se 45, 50 e 55 mg de TPP em 50 mL de água. A turbidez da suspensão de NP foi avaliada deixando as amostras em câmara climática de temperatura constante (marca Fitotec, modelo LT 2100 UTFP) a 35 °C por 10 dias na ausência de luz. Em determinados intervalos de tempo (duas vezes semanais) foram retiradas alíquotas de 3 mL e analisada em espectrofotômetro UV-Visível, sendo posteriormente estas alíquotas foram descartadas (MONTEIRO, 2009). Os resultados obtidos foram discutidos relacionando a transmitância (%) com o comprimento de onda (200 – 800 nm).

4.1.9 Extração de galactomanana (GLM) a partir de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*)

As vagens coletadas na área de Caatinga da Embrapa Semiárido, Petrolina PE, foram inicialmente separadas e secas em estufa a 110 °C durante 24 horas. Após secagem, as sementes foram separadas através de um moinho de bolas (TECNAL, TE-350, velocidades de 617 golpes/min.). As sementes isoladas foram moídas em moinho de facas (TECNAL, rotor tipo ciclone TE-651/2). 50 g das sementes moídas foi imerso em 300 mL de água destilada (razão de 1:6 m/v), em um béquer de 500 mL. O sistema foi mantido sob agitação mecânica e aquecimento a 50 °C durante 1 hora. Decorrido o tempo, a mistura foi filtrada a vácuo, obtendo-se uma solução viscosa, que foi centrifugada por 15 minutos, a 11.000 rpm e 25 °C. Em seguida, filtrou-se novamente a vácuo para remoção de impurezas ainda presentes na solução. Precipitou-se a GLM pela adição de 300 mL de álcool etílico absoluto a 99,5%. A suspensão foi novamente centrifugada, nas mesmas condições descritas anteriormente, obtendo-se o precipitado que foi separado, congelado e liofilizado durante 24 horas, para então obter a GLM em forma de pó (SOUZA FILHO et al. 2013).

4.1.10 Preparação dos filmes nanocompósitos (NC)

Os filmes NC à base de solução de GLM foram preparados a partir das suspensões de nanopartículas NP_{ex} e NP_{pr} (item 4.1.4). No processo de nanoencapsulação, tornou-se necessário fazer alguns ajustes devido à precipitação das suspensões. Assim, foram utilizados 50 mg e 55 mg de TPP em 50 mL de água para as amostras NP_{ex} e NP_{pr}, respectivamente. Após obtenção das suspensões pelo

processo de nanoencapsulação, dos 100 mL obtidos, retirou-se uma alíquota de 20 mL na qual foi adicionada uma massa de GLM suficiente para se obter uma solução a 5 mg/mL. As suspensões de GLM + NP foram depositadas em placas de Petri, congeladas e liofilizadas (Liobras L101) durante 24 horas. Os filmes NC assim obtidos foram denominados NC_{ex} e NC_{pr}, respectivamente, para os filmes obtidos a partir do extrato do resíduo de acerola e o obtido a partir da vitamina C pura (BRITTO et al. 2014). O experimento foi realizado em duplicata. Adicionalmente, foi preparado filme NC controle, a fim de comparar a degradação relativa da vitamina C. Para isto, 30 mg de AA foi adicionado à solução aquosa de GLM (5 mg/mL) e o filme obtido conforme descrito acima. Esta amostra foi denominada FC_{AA}.

4.1.11 Avaliação do perfil de liberação da vitamina C

O perfil de liberação da vitamina C a partir dos filmes NC foi avaliado submetendo-se os filmes a agitação orbital (120 rpm) em 10 mL de solução de etanol água a 50%. Em intervalos de 0,5; 1; 2; 5 e 24 horas, foram retiradas alíquotas de 200 µL, diluídas para 10 mL de ácido metafosfórico 1% (m/v) e quantificadas a partir de curva de calibração de ácido ascórbico em ácido metafosfórico 1% (m/v) em um equipamento da Thermo Scientific, modelo MultiSkan GO.

4.1.12 Estabilidade da vitamina C em filmes nanocompósitos sob diferentes condições

A estabilidade da vitamina C nos NC (filmes liofilizados) foi avaliada submetendo-se os filmes a diferentes condições de estocagem: incidência de luz fluorescente, temperatura e saturação de O₂. Para exposição à luz, filmes NC foram colocados em câmara a 25 °C com intensidade de 5,88 lx (lux). Para influência da temperatura, os filmes NC foram colocados em câmara climática (marca Fitotec, modelo LT 2100 UTFP) a 35 °C na ausência de luz. Para influência do oxigênio (ausência de luz, 25 °C), os filmes NC foram condicionados em dessecador fechado cujo interior foi evacuado por meio de uma bomba a vácuo e injetado O₂ através de um cilindro de oxigênio, durante cerca de 5 minutos. Para análise, partes dos filmes (1/4) foram separadas e deixou-se liberar em 10 mL de solução de etanol:água a 50% por 5 horas (ausência de luz, 25°C) sob agitação orbital (120 rpm). A vitamina C

presente foi quantificada por espectrometria no UV-visível, retirando-se alíquotas de 200 μL e diluídas para 10 mL de ácido metafosfórico 1% (m/v).

4.1.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

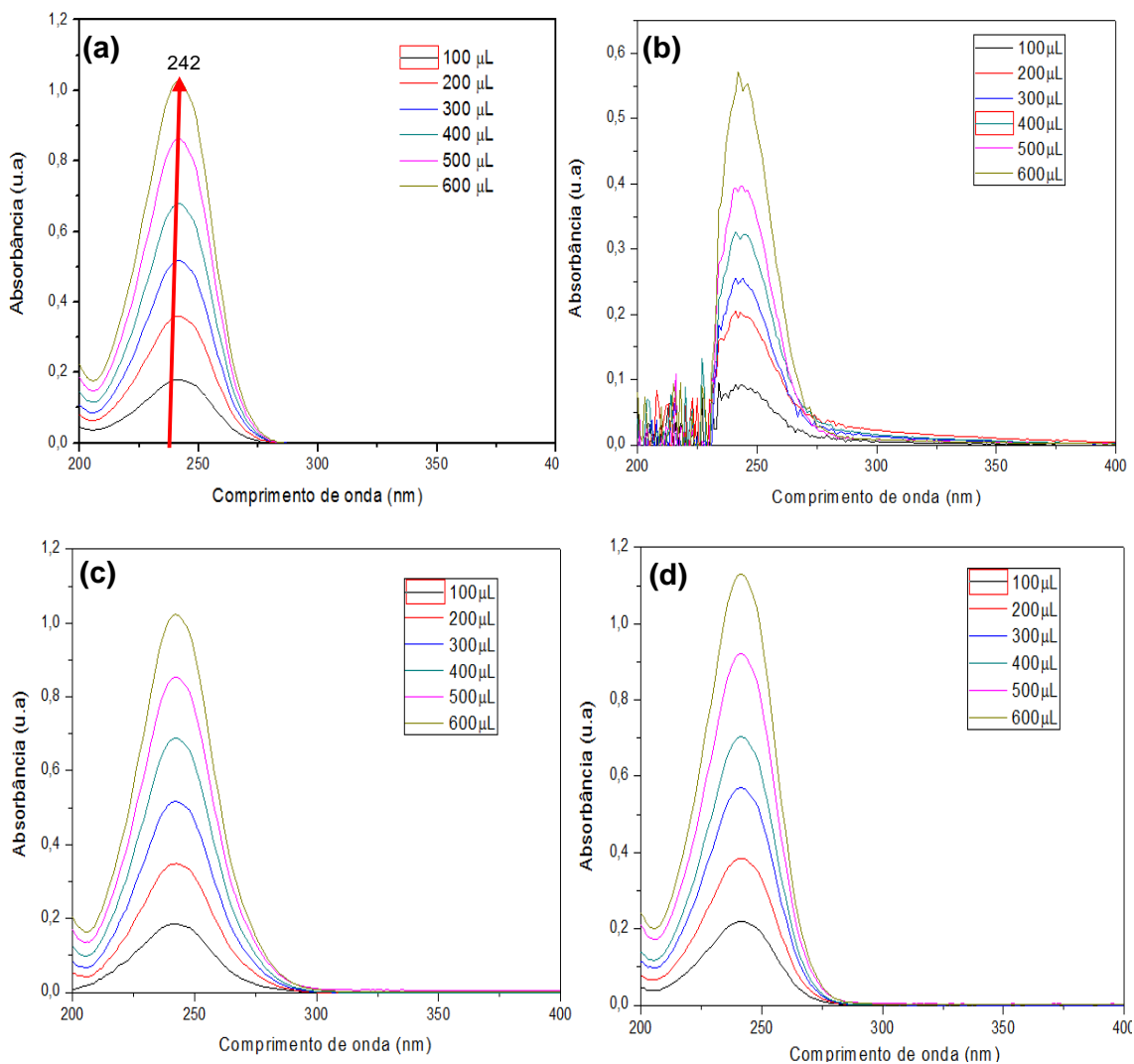
A morfologia das suspensões de NP_{ex} , NP_{pr} e dos filmes (NC_{ex} e NC_{pr}) obtidos por *casting* foram investigadas através de micrografias obtidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura, de marca TESCAN, modelo VEGA 3XMU localizado no Colegiado de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (CPGCM) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). As amostras de NP_{ex} e NP_{pr} foram colocadas em suportes de alumínio (*stubs*) e recobertas com ouro para melhorar a condutibilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

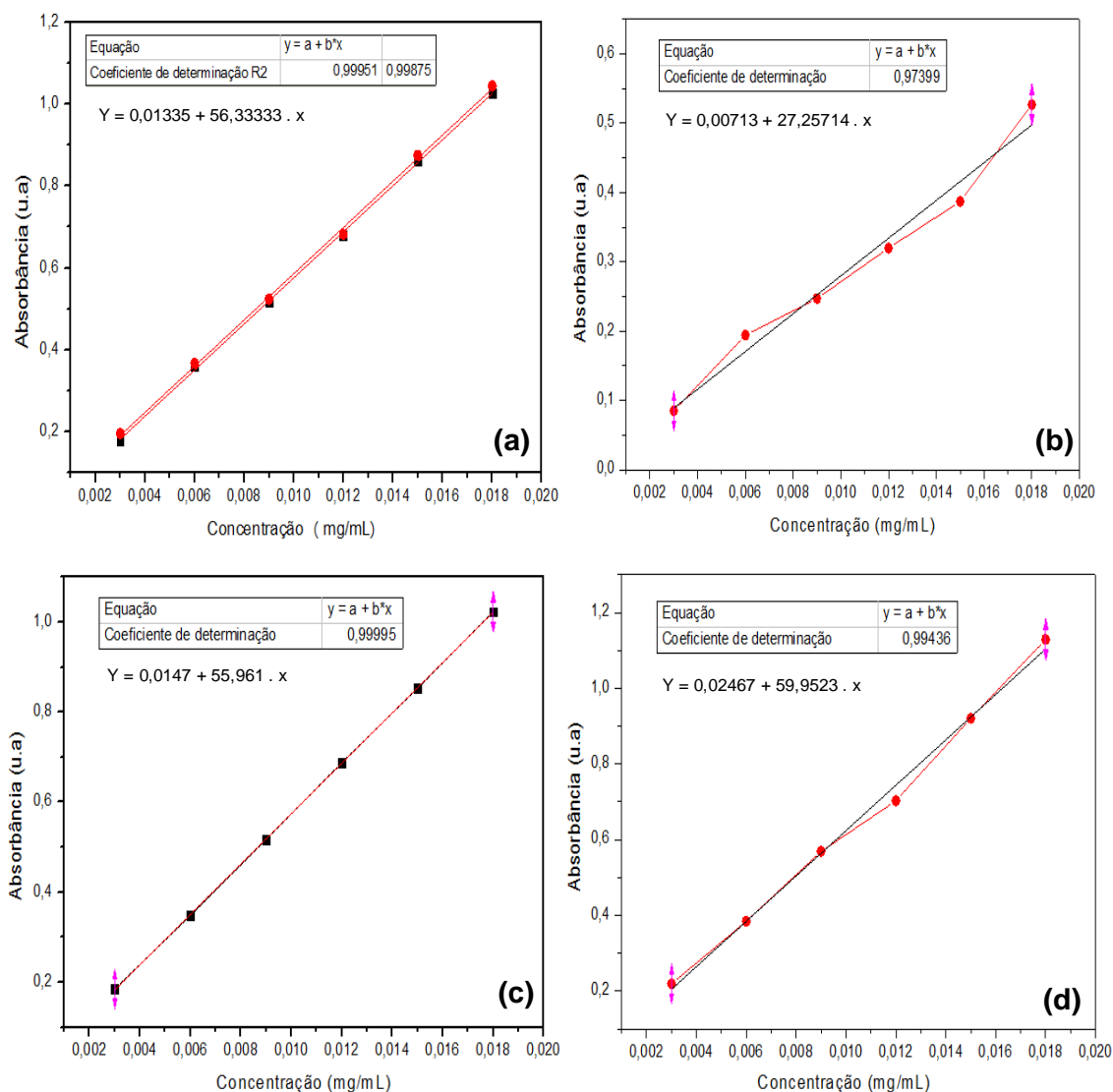
No teste para identificar o melhor solvente da vitamina C para levantar a curva de calibração, dentre os ácidos testados (oxálico, acético, clorídrico e metafosfórico), o que resultou em um melhor espectro foi o ácido metafosfórico a 1,0% (m/v) (Figura 12). Pode-se verificar que o pico de máxima absorbância da vitamina C é em 242 nm quando em meio aquoso de ácido metafosfórico a 1% (m/v).

Figura 12: Espectro na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) para a vitamina C em meio aquoso de ácido metafosfórico a 1% (m/v) (a), ácido oxálico (m/v) (b), ácido acético (v/v) (c) e ácido clorídrico (v/v) (d).



Depois da identificação do comprimento de onda de maior absorbância da vitamina C, para quantificar a concentração deste analito, foi construída uma curva de calibração linear para cada solvente (Figura 13). Moreira (2007) utilizou o ácido oxálico 0,4% (m/v) para calcular o teor de ácido ascórbico em extrato de bagaço de acerola por meio de espectrofotômetro a 520 nm, enquanto Lavarda (2011) empregou o ácido metafosfórico para determinar a concentração de vitamina C em polpa de acerola por titulação.

Figura 13: Curvas de calibração da vitamina C em ácido metafosfórico (a), ácido oxálico (b), ácido acético (c) e ácido clorídrico (v/v) (d).



Observa-se que a curva de calibração da vitamina C em ácido acético (Figura 13c) resultou em boa linearidade, com um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99995. Porém, o ácido acético pode resultar em menor estabilidade do ácido ascórbico em solução, implicando em cuidado redobrado nas análises. Além disso, entre as soluções mais utilizadas para extrair a vitamina C e também estabilizá-la, pode-se citar o ácido oxálico ou o ácido metafosfórico (m/v). Estes ácidos são capazes de prevenir a oxidação do ácido ascórbico pela ação de íons cobre (II) ou ferro (III) (SANTOS DA ROSA, et al. 2007).

Assim, a solução estoque utilizada para quantificar a vitamina C foi a solução contendo o ácido metafosfórico a 1% (m/v), pois, apresentou melhor coeficiente de determinação. O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99913$) indica uma boa linearidade dos dados obtidos e obediência à lei de Beer. Sendo assim, é possível afirmar que à medida que a concentração de vitamina C varia, a absorbância também sofrerá variação proporcionalmente.

A equação da reta obtida foi equivalente a $y = 0,01335 + 56,333335 x$, onde 'y' representa a absorbância medida espectrofotometricamente e 'x' a concentração de vitamina C presente nas soluções (mg/L). A concentração de vitamina C presente em todas as amostras foi calculada a partir da média dos parâmetros da equação da reta obtida para as curvas de absorbância de vitamina C versus concentração, fazendo-se as devidas transformações e considerando-se o fator de diluição das amostras.

5.2 ESTUDO PRELIMINAR DE DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRAÇÃO DE VITAMINA C

O estudo preliminar mostrou que o sistema de extração 5, obtido da combinação de quitosana em HCl 0,1% (v/v) + ácido oxálico 0,5% (m/v), apresentou o menor valor de degradação e, conseqüentemente, uma maior taxa de vitamina C retida (89,75%) quando exposta à presença de luz por 3 dias à 25 °C (Tabela 2). Assim, o solvente escolhido para a quitosana e para extração da vitamina C em estudos posteriores foi o HCl 0,1% (v/v), conforme os melhores resultados apresentados.

Tabela 2: Concentrações e percentagem de vitamina C presente nas soluções extratoras.

Soluções extratoras	Concentração inicial (mg/mL)	Concentração final (mg/mL)	Vitamina C retida (%)
Extração 1	0,733	0,573	78,17
Extração 2	0,713	0,440	61,71
Extração 3	0,645	0,384	59,53
Extração 4	0,685	0,419	61,16
Extração 5	0,644	0,578	89,75

O ácido acético é o solvente mais utilizado na preparação de NP de quitosana via gelificação ionotrópica (ALISHAHI et al. 2011; BRITTO et al. 2016; GAN et al., 2005). No entanto, este resultado comprova a necessidade de estudos adicionais, dependendo da substância ativa a ser encapsulada. Para a vitamina C, em particular, o sistema em ácido acético pode resultar em uma menor estabilidade da substância ativa dada a sua reatividade específica. Assim, o sistema a partir de HCl é uma alternativa potencial na preparação de NP de quitosana, ainda não explorada extensivamente.

5.3 TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO (AA)

Com base nos resultados da quantificação inicial de AA (Tabela 2) e considerando o teor de umidade encontrado para o resíduo de acerola (85,83%), foi calculado o teor de AA no resíduo úmido e seco (Tabela 3).

Tabela 3: Teores de AA presente no resíduo do processamento de acerola.

Soluções extratoras	Teor de umidade no resíduo (%)	Teor de AA no resíduo úmido (mg/100 g)	Teor de AA no resíduo seco (mg/100 g)
Extração 1	85,83	1.466,00	10.355,00
Extração 2	-	1.426,00	10.067,00
Extração 3	-	1.290,00	9.115,00
Extração 4	-	1.370,00	9.680,00
Extração 5	-	1.288,00	9.090,00

Analisando os teores de AA no resíduo seco do processamento de polpa de acerola, foram observados valores variando de 9.090,00 a 10.355,00 mg/100 g (Tabela 3). Os teores encontrados de AA no resíduo úmido foram compatíveis com registrados por autores em resíduo de polpa de acerola: 1.756,85 e 1.429,86 mg/100

g, para os resíduos gerados na passagem pelo triturador, no processamento de frutos nos estádios de maturação 1 e 6, respectivamente, segundo COSTA (2012); para acerola *in natura* madura de 1.074,00 mg/100 g, segundo VENDRAMINI e TRUCO (2000); e no extrato do bagaço de acerola de 1.057,00 mg/100 g, segundo MOREIRA (2007).

Apesar do resíduo utilizado nesse trabalho não ter passado por processos que possam ocasionar perda de vitamina C, em trabalho descrito por Costa (2012), este mesmo resíduo foi avaliado em outras etapas de processamento, onde obteve-se 355,94 e 730,68 mg/100g, para os resíduos gerados na passagem pelo decanter, no processamento de frutos nos estádios de maturação 1 e 6, respectivamente (1=coloração verde e 6=coloração vermelha intensa). Esta diferença na quantidade de vitamina C residual está diretamente relacionada ao processo, pois na etapa decanter as amostras passaram por um pré aquecimento (55 a 75 °C) e por pasteurização (90 °C), fatores que contribuem diretamente para a perda de vitamina C. Além disso, o estágio de maturação do fruto é um fator que reporta uma variação na concentração de vitamina C. Frutos no estágio de maturação inicial apresentam uma quantidade muito maior de vitamina C, por exemplo, 2.164,00 mg/100 g, segundo VENDRAMINI e TRUCO (2000). Em polpa de acerola comercial e orgânica os teores foram de 2.294,53 mg/100 g e 4.023,39 mg/100 g, respectivamente, segundo CARDOSO et al. (2011).

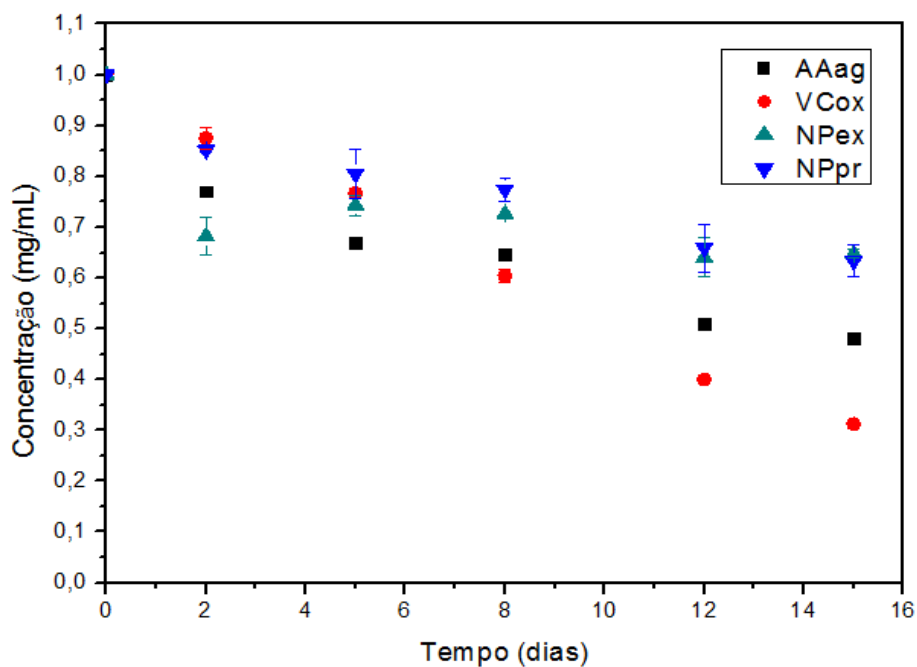
Quando comparado os valores de vitamina C apresentados nesse estudo com a quantidade contida em diversas frutas, a diferença se torna ainda maior. A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), é uma das principais referências em composição de alimentos brasileiros. Nessa tabela, os teores de vitamina C para as frutas *in natura* são: acerola (941,4 mg/100 g), abacaxi (34,6 mg/100g), caju (219,3 mg/100g), goiaba (99,2 mg/100g), laranja (56,9 mg/100g) e manga (65,5 mg/100g) (TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS – TACO, 2011). Desta forma, ao comparar os valores encontrados no resíduo em estudo com a ingestão diária recomendada para adultos, que estabelece um teor de 75 mg/dia para mulheres, 90 mg/dia para homens (NAS/USDA - *National Academy of Science, United States Department of Agriculture*) ou 45 mg/dia para adultos de ambos os sexos, de acordo com a ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, pode-se afirmar que o resíduo do processamento de polpa de acerola consiste numa fonte importante de vitamina C atingindo a ingestão diária recomendada (VANUCCI e ROCHA, 2012).

5.4 ESTABILIDADE DA VITAMINA C NANOENCAPSULADA EM DIFERENTES CONDIÇÕES

Para avaliar a validade do método de encapsulamento de vitamina C, foi estudada a degradação da mesma comparando-se sistemas encapsulados e não-encapsulados sob diferentes condições. A primeira delas expõe os sistemas na presença de luz, com as nanopartículas sintetizadas a partir da quitosana (NP_{ex} e NP_{pr}), comparando-as com o sistema não-encapsulado disperso em água (AA_{ag}) e não-encapsulado disperso em ácido oxálico (VC_{ox}).

Na Figura 14, é mostrada a variação da concentração de vitamina C nos diferentes sistemas estudados, quando submetidos à ação da luz.

Figura 14: Concentração de vitamina C (normalizado) em função do tempo, quando expostas à luz. NP_{ex}: extrato acerola encapsulado; NP_{pr}: vitamina C pura encapsulada; AA_{ag}: ácido ascórbico em água e VC_{ox}: extrato do resíduo de acerola em ácido oxálico.

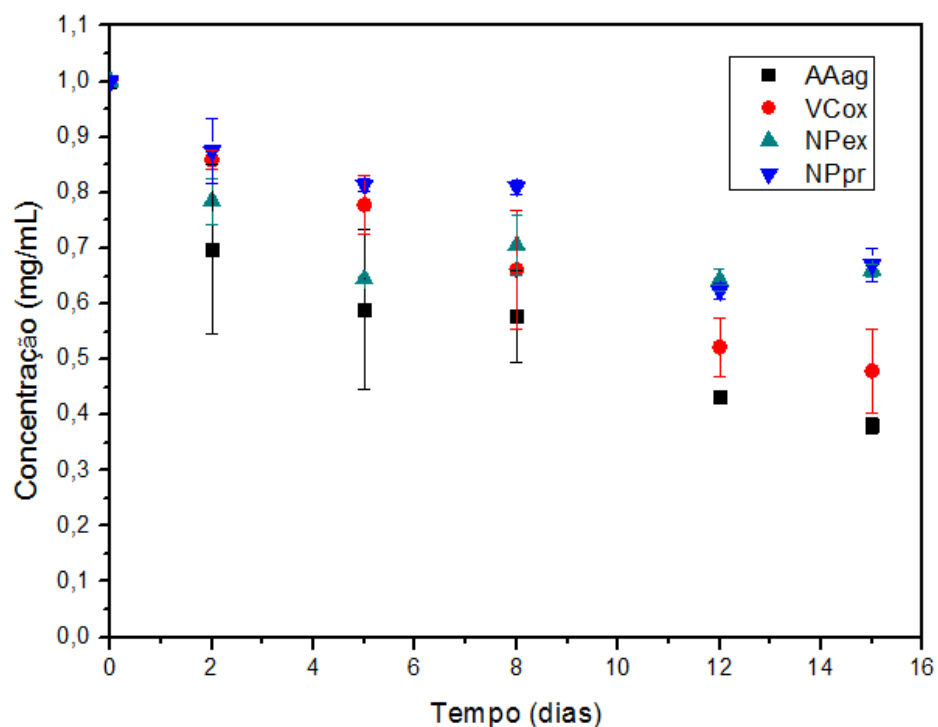


Observa-se que nos sistemas nanoencapsulados, o efeito na conservação da vitamina C foi mais pronunciado. Ou seja, para os sistemas em que a vitamina C se encontrava encapsulada, a degradação pela ação da luz foi bem mais lenta, apresentando uma concentração maior em relação aos demais, ao final do tempo de análise. Apesar que no segundo dia houve uma queda na concentração para NP_{ex}, a

variação da taxa de decaimento foi menor durante todo o período avaliado. Pois, comparando-se com o valor inicial, a condição encapsulada (NP_{ex} e NP_{pr}) mantém cerca de 64% da concentração inicial no décimo quinto dia. Este valor é elevado em comparação com os sistemas não encapsulados os quais apresentaram uma taxa de decaimento contínua, em que a concentração atinge 48% e 31% do valor inicial para AA_{ag} e VC_{ox} , respectivamente, no final dos 15 dias.

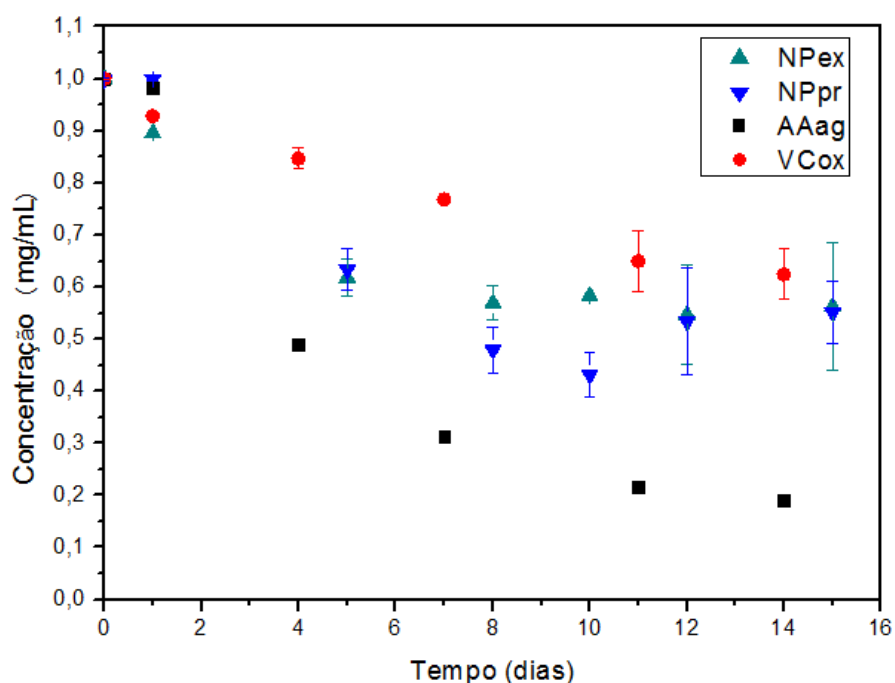
A degradação de vitamina C quando submetida à temperatura elevada, apresentou uma estabilidade ligeiramente maior quando comparado em meio aos sistemas nanoencapsulados (Figura 15). Comparando com a concentração inicial, as amostras encapsuladas (NP_{ex} e NP_{pr}) exibiram uma concentração equivalente a 66% da quantidade inicial, enquanto que para a vitamina C em meio de ácido oxálico (VC_{ox}) e em água (AA_{ag}) atingiram 38% e 47%, respectivamente, no final dos 15 dias. Britto et al. (2016) destacaram que sistemas nanoencapsulados com quitosana e TPP conferiram maior proteção à vitamina C pura quando na presença de luz e atmosfera oxidante.

Figura 15: Concentração de vitamina C (normalizado) em função do tempo, quando expostas a temperatura elevada. NP_{ex} : extrato acerola encapsulado; NP_{pr} : vitamina C pura encapsulada; AA_{ag} : ácido ascórbico em água e VC_{ox} : extrato do resíduo de acerola em ácido oxálico.



A estabilidade de vitamina C também foi investigada quando sob ação de O_2 (Figura 16). Os resultados foram semelhantes aos observados com os demais fatores de estudo, em que os sistemas que continham a vitamina C encapsulada apresentou concentração cerca de 56% do seu valor inicial, enquanto a não encapsulada acabou degradando-se a uma taxa ligeiramente maior, o que comprova que a eficácia é relativa ao encapsulamento. Pode-se inferir que a utilização de quitosana como matriz polimérica de encapsulamento e TPP como agente reticulante foi eficaz na proteção da vitamina C, reduzindo, desse modo, as taxas de degradação e, conseqüentemente, aumentando sua estabilidade durante 15 dias.

Figura 16: Concentração de vitamina C (normalizado) em função do tempo, quando expostas à atmosfera oxidante. NP_{ex}: extrato acerola encapsulado; NP_{pr}: vitamina C pura encapsulada; AA_{ag}: ácido ascórbico em água e VC_{ox}: extrato do resíduo de acerola em ácido oxálico.

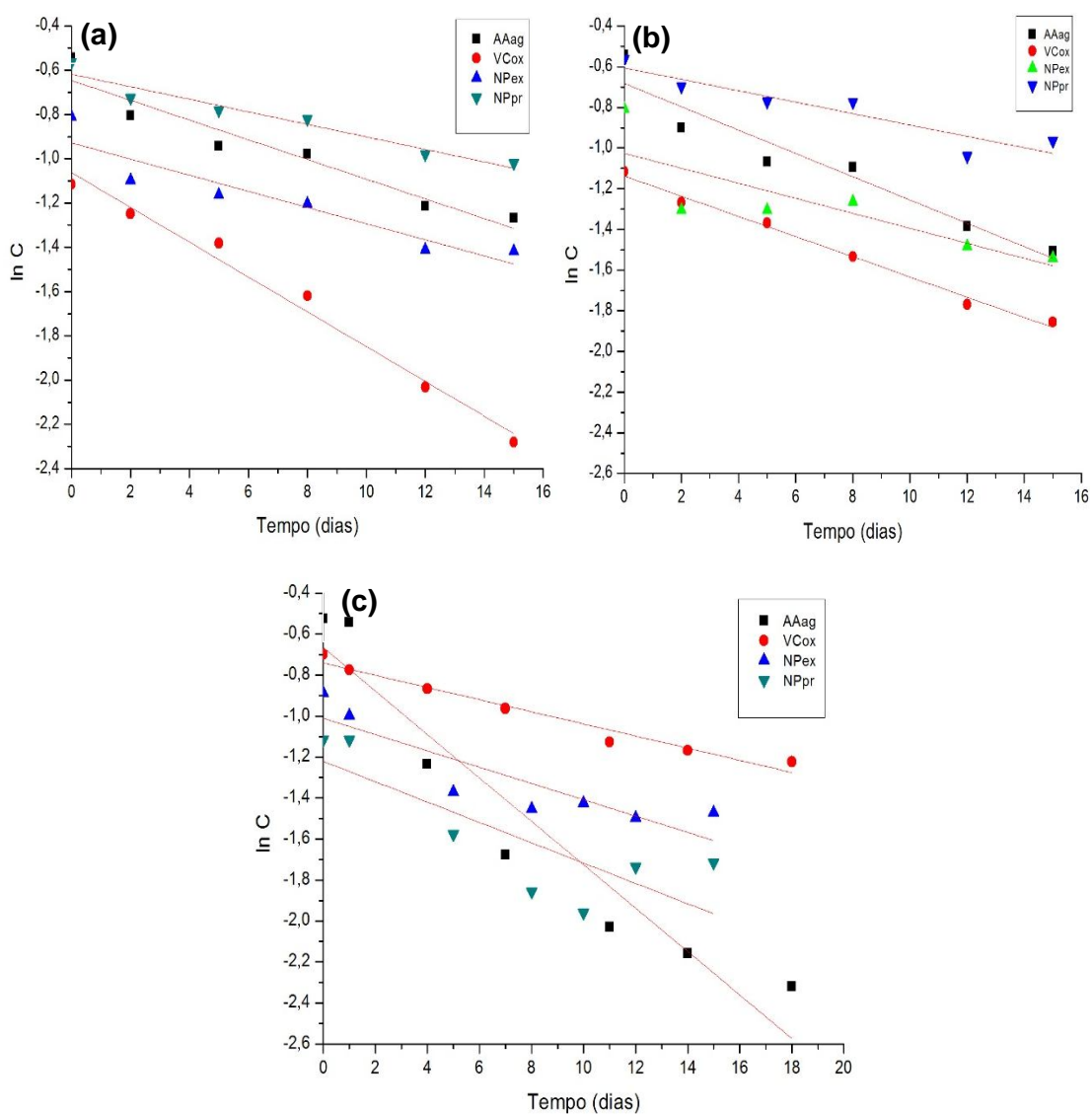


Em condições aeróbicas e na presença de um catalisador, o AA é transformado em ácido dehidroascórbico (ADHA) que é bastante estável em pH menor que 4. O ADHA (forma oxidada da vitamina C) apresenta entre 75 e 80% da atividade vitamínica do AA. A partir dos resultados discutidos, pode-se inferir que o fator mais crítico para degradação da vitamina C nos sistemas estudados foi a exposição a atmosfera oxidante, sendo, portanto, a condição de temperatura elevada (35 °C) a de maior estabilidade desta vitamina.

5.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

O modelo cinético de primeira ordem é o modelo mais utilizado e citado na literatura, descrevendo a degradação de AA para ADHA, permitindo o cálculo da constante cinética de degradação (k). No entanto, este modelo cinético não inclui a formação de outros produtos de degradação subsequente à degradação do ADHA (VAN BREE, 2012). A Figura 17 mostra a relação da concentração de vitamina C (AA) em função do tempo em diferentes condições de instabilidade.

Figura 17: Degradação do AA a partir modelo cinético de primeira ordem na presença de (a) luz, (b) temperatura e (c) ação sob oxigênio.



Neste trabalho, foi atribuído o modelo cinético de reação de primeira ordem, ajustados de acordo com a Equação 4 para a degradação do AA, porém outros também podem ser aplicados. As taxas de degradações (k) correspondem aos valores do coeficiente angular da reta e R^2 , o coeficiente de determinação. A Tabela 4 mostra esses valores calculados para as amostras em diferentes condições, bem como o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). Como pode ser observado, o modelo cinético de primeira ordem apresentou o melhor valor do coeficiente de determinação (R^2) para a amostra NP_{pr} em degradação sob luz seguido de NP_{ex} também sob luz. As degradações sob temperatura e oxigênio apresentaram valores de R^2 bem inferiores. Estes dados indicam que o modelo de primeira ordem foi o mais adequado para descrever a degradação da vitamina C nesses sistemas. Presume-se então, que principalmente para as condições sob oxigênio e temperatura possa estar ocorrendo diversas reações paralelas, restringindo a aplicação de um único modelo para explicar a degradação. Isto pode ocorrer visto que a complexidade nos sistemas nanoencapsulados é bem maior que para a degradação da vitamina C em soluções homogêneas.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos da degradação de AA sob diferentes condições. NP_{ex} : extrato acerola encapsulado; NP_{pr} : vitamina C pura encapsulada; AA_{ag} : ácido ascórbico em água e VC_{ox} : extrato do resíduo de acerola em ácido oxálico.

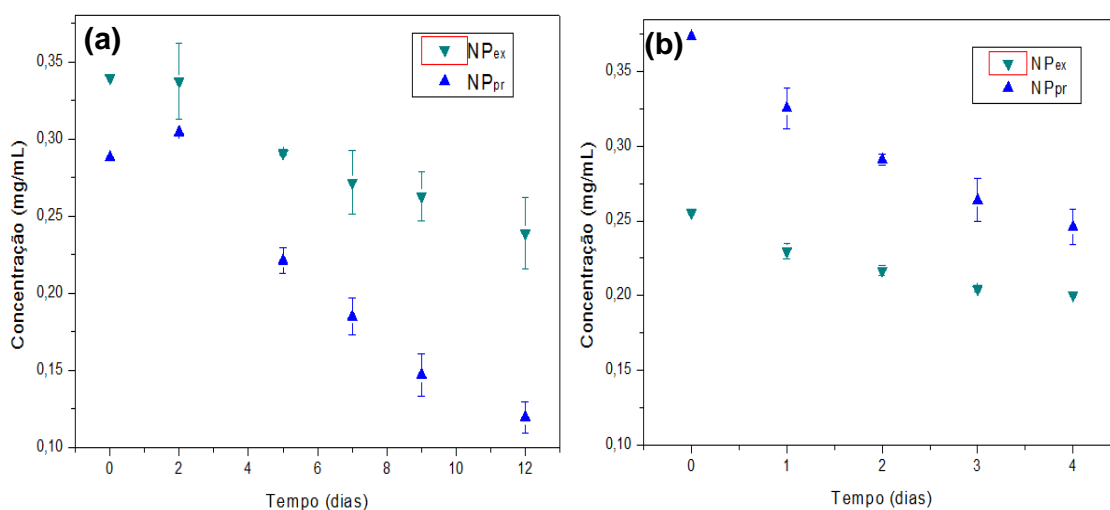
Amostras	Temperatura			Luz			Oxigênio		
	k (dias ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)	R^2	k (dias ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)	R^2	k (dias ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)	R^2
AA_{ag}	0,057	12,092	0,908	0,044	15,552	0,915	0,105	6,540	0,903
VC_{ox}	0,049	13,966	0,988	0,078	8,813	0,980	0,029	23,372	0,959
NP_{ex}	0,036	18,770	0,612	0,036	18,991	0,843	0,039	17,420	0,749
NP_{pr}	0,027	24,758	0,837	0,028	24,504	0,934	0,049	13,966	0,600

Observa-se que para as amostras em que o AA não está encapsulado, o tempo de meia-vida foi menor nas condições analisadas (exceto para análise sob ação de oxigênio), ou seja, o tempo necessário para que a concentração desta vitamina caia pela metade do valor inicial será menor. Dentre os sistemas, as NP_{pr} apresentaram o maior tempo de meia-vida quando na presença de temperatura e luz, 24,758 e 24,504 dias, respectivamente. Enquanto que a amostra AA_{ag} apresentou menor tempo de meia-vida, 6,540 dias em atmosfera oxidante. Por ser inversamente proporcional, os

valores de k (taxa de degradação) são menores para as NP_{ex} e NP_{pr} , logo sua degradação ocorrerá mais lentamente.

Para avaliar a influência de diferentes temperaturas e determinar a energia de ativação (E_a) dos sistemas NP_{ex} e NP_{pr} , inicialmente estes sistemas foram submetidos a temperaturas de 25, 30 e 35 °C. A partir da variação da concentração de vitamina C, observa-se que a degradação foi proporcional com o tempo de análise (Figura 18).

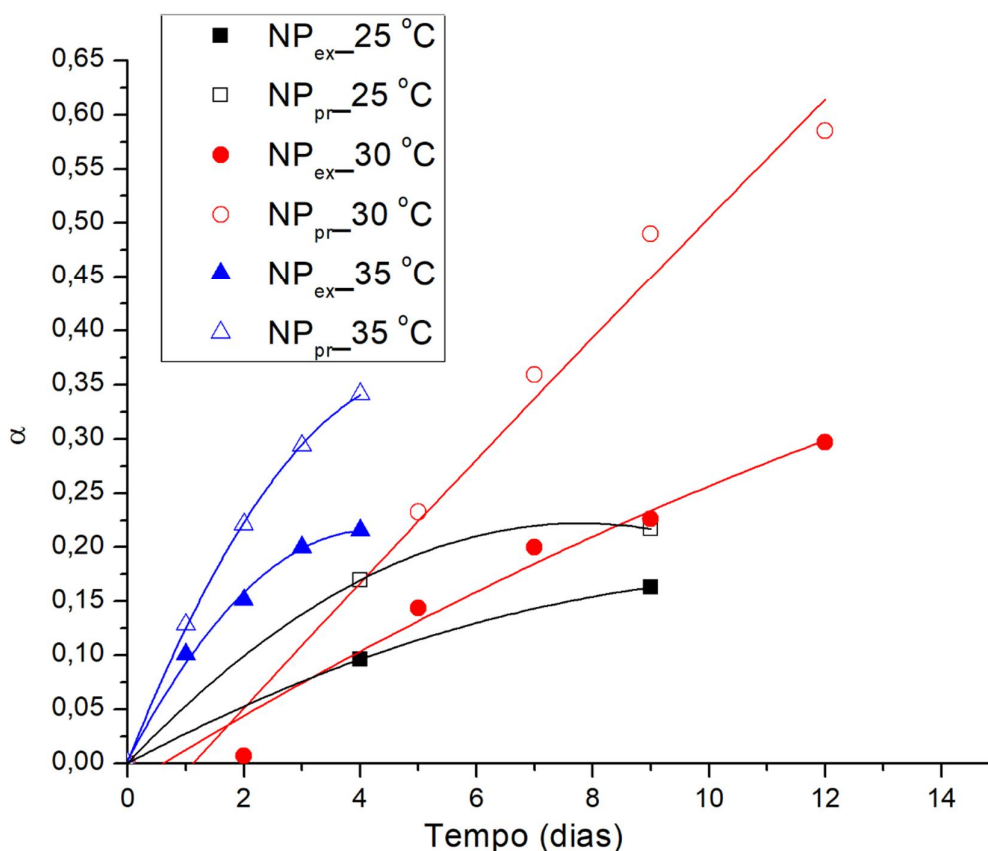
Figura 18: Concentração de vitamina C em função do tempo, quando expostas à 30 °C (a) e 35 °C (b). NP_{ex} : extrato acerola encapsulado; NP_{pr} : vitamina C pura encapsulada.



Na determinação da energia de ativação, os sistemas NP_{ex} e NP_{pr} apresentam taxas de degradação proporcionais às temperaturas. No entanto, dada a complexidade do sistema, as isotermas apresentaram variações em função do grau de conversão, α , dado por $\alpha = (C_0 - C_t) / C_0$, em que C_t e C_0 são as concentrações no tempo 't' e inicial, respectivamente (Figura 19). Assim, para os cálculos, os dados foram ajustados conforme uma curva polinomial de segunda ordem. No geral, as isotermas apresentam proporcionalidade ao grau de conversão em função do tempo. Por exemplo, tomando-se o quarto dia de armazenamento, observa-se que as isotermas a 25, 30 e 35 °C apresentam respectivamente valores de α iguais a 0,10; 0,14 e 0,22 para NP_{ex} e 0,17; 0,23 e 0,34 para NP_{pr} . Dessa forma, o valor de α é proporcionalmente maior para temperaturas maiores para um dado tempo. Isto confirma que quando em temperaturas mais elevadas a vitamina C degrada-se mais rapidamente (TIMOUMI; MIHOUBI e ZAGROUBA, 2007; OLIVEIRA et al. 2013; SAPEI e HWA, 2014). Outro fato relevante é que em todas as condições os valores de α

foram maiores para NP_{pr} em comparação com NP_{ex} . Isto indica a maior susceptibilidade à degradação da vitamina C no sistema de vitamina C pura.

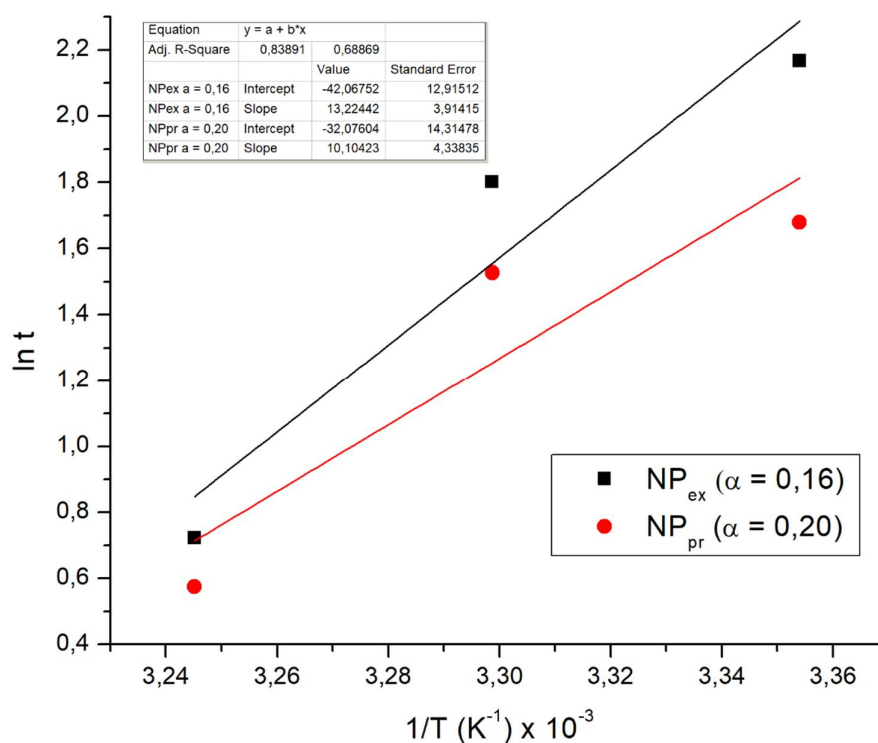
Figura 19: Degradação isotérmica das suspensões de NP_{ex} e NP_{pr} quando armazenada a 25, 30 e 35 °C, ajustados conforme uma curva polinomial de segunda ordem (linhas contínuas). NP_{ex} : extrato acerola encapsulado; NP_{pr} : vitamina C pura encapsulada.



Existem diversas formas de determinação do valor de E_a . Uma delas consiste em fixar o valor de α para as isotermas e construir um gráfico do logaritmo natural do tempo para atingir aquele valor de α em função do inverso da temperatura. A inclinação da curva resultará no valor de E_a (BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2007). Para NP_{ex} , o valor de α foi fixado em 0,16 e para NP_{pr} em 0,20, resultando em gráfico (Figura 20) cuja inclinação resultou nos valores de E_a de 26,3 e 20,1 kcal/mol, respectivamente, para NP_{ex} e NP_{pr} . Estes são, portanto, os valores de energia mínimo necessário para que se inicie o processo de degradação da vitamina C. Estudos anteriores relataram ampla variação na E_a para a degradação da vitamina C em diferentes sistemas alimentares. Quando verificado em maçãs, numa faixa de temperatura de 40 a 70 °C, a E_a foi de 3,54 kcal/mol (TIMOUMI; MIHOUBI e

ZAGROUBA, 2007). Em suco de laranja, para uma faixa de temperatura entre 70 e 98 °C, foi encontrado 27,5 kcal/mol (NISHA; REKHA, ANIRUDDHA, 2004). Em sucos de morango fresco armazenados a 8 e 28 °C, com e sem adição de açúcar foi estimada em 1,90 kcal/mol e 1,65 kcal/mol, respectivamente (SAPEI e HWA, 2014). Munyaka et al. (2010) registraram um valor de $E_a = 63,77$ kcal/mol para uma faixa de temperatura de 55 a 65 °C, em brócolis de inflorescência.

Figura 20: Gráfico linearizado da função de Arrhenius para as NP_{ex} e NP_{pr} . NP_{ex} : extrato acerola encapsulado; NP_{pr} : vitamina C pura encapsulada.



Essas diferenças nos valores da E_a na degradação da vitamina C, podem ser uma consequência de fatores como a faixa de temperatura, a matriz biológica e fatores que foram previamente investigados em outros estudos de degradação cinética da vitamina C, como presença de oxigênio, umidade e pH.

5.6 AVALIAÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

A partir dos resultados da Tabela 5, observa-se que a quantidade de TPP tem uma influência significativa no valor do tamanho médio das NP. Comparando NP_{ex}^1 e

NP_{ex}², cuja diferença em massa de TPP é de apenas 5 mg, o valor do tamanho das NP aumentou significativamente para a condição com maior TPP. Isto está de acordo com trabalho descrito por BRITTO et al. (2014), em que quantidades maiores de TPP resultam em NP maiores que tendem a se precipitar espontaneamente, configurando sistemas menos estáveis. Outro fato relevante é que o sistema controle com ácido ascórbico puro, NP_{pr}, apresentou tamanho médio menor quando comparado ao extrato do resíduo de polpa de acerola rico em vitamina C, NP_{ex}. Isto também foi relatado anteriormente em que as propriedades da substância ativa a ser encapsulada influencia grandemente nas características da NP (BRITTO et al., 2012). Particularmente nesse caso, o encapsulamento do extrato implicou em aumento do tamanho médio das NP. O extrato contém, além de vitamina C, outros componentes minoritários como antocianinas e polifenóis que podem influenciar as características da NP.

Tabela 5: Variação do tamanho e potencial zeta das nanopartículas em diferentes condições. NP_{ex}¹: suspensão de NP de vitamina C do extrato do resíduo de acerola utilizando 45 mg de TPP; NP_{ex}²: suspensão de NP de vitamina C do extrato do resíduo de acerola utilizando 50 mg de TPP. NP_{pr}: vitamina C pura encapsulada. Os índices 'Luz', 'Temp.' e 'Oxig.' indicam as suspensões de NP submetidas à ação da luz, temperatura e oxigênio (item 4.1.5). Os índices '4d', '7d' e '11d' indicam o número de dias armazenados nessas condições.

Sistemas	Tamanho das NP (nm)	Potencial Zeta (mV)
NP_{ex}¹	267±49	10,4±0,8
NP_{ex}²	373±43	17,1±0,5
NP _{pr}	220±4	21,2±0,8
NP_{ex}¹ – Luz^{4d}	202±5	16,2±0,9
NP_{ex}¹ – Temp.^{4d}	405±27	18,7±0,8
NP_{ex}¹ – Oxig.^{4d}	279±25	12,3±0,3
NP _{pr} – Luz ^{7d}	199,4±0,4	19,0±0,6
NP _{pr} – Temp. ^{7d}	231±8	19,2±0,6
NP _{pr} – Oxig. ^{7d}	213±2	20,5±0,6
NP _{pr} – Luz ^{11d}	246±4	18,8±8,8
NP _{pr} – Temp. ^{11d}	237±3	17,6±1,0
NP _{pr} – Oxig. ^{11d}	224±3	17,1±0,9

* Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3)

Quando exposta às condições de instabilidade as NP_{ex}¹ não apresentaram variação significativa e exibiram tamanho médio muito semelhante para as condições sob luz e oxigênio, enquanto que sob temperatura elevada, resultou num aumento considerável de tamanho durante os 4 dias de armazenamento. Portanto, esta condição é de maior instabilidade para as NP_{ex}¹. Não está claro ainda o mecanismo envolvido, mas geralmente em condições desfavoráveis as NP tendem a se aglomerar e precipitar (BRITTO et al., 2014). Para as NP_{pr}, observa-se que durante o período de armazenamento (11 dias) não apresentaram variação de tamanho significativa quando expostas em todas as condições (Tabela 5).

Em trabalho descrito por Britto et al. (2014), o valor encontrado para o tamanho médio das NP de quitosana com vitamina C pura foi de 325 nm, esta diferença quando comparada a este trabalho pode ser explicada devido às condições de preparação das NP serem diferentes. Por exemplo, o meio utilizado era composto por ácido acético e tinha maior concentração de TPP, fatores estes que influenciam diretamente a formação de nanopartículas. No geral, a análise do tamanho de partícula mostrou que as NP apresentaram tamanho uniforme e um aumento que foi significativo quando em temperatura elevada para as NP_{ex}¹.

Analisando o potencial zeta dessas NP, verifica-se que para as suspensões o valor encontrado, como esperado, foi positivo, devido ao caráter catiônico deste polieletrólito (quitosana). Uma vez que o potencial zeta está relacionado também com a estabilidade das NP, valores altos de potencial zeta (acima de ± 30 mV) formam suspensões de NP mais estáveis, pois as forças repulsivas tendem a prevenir a agregação em função das interações com as NP adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003). A Tabela 5 mostra que, sob influência da temperatura elevada (NP_{ex}¹ – Temp.), as NP_{ex}¹ apresentaram ligeiro aumento no potencial zeta. Isto indica que para a influência da temperatura, embora apresentando variação significativa de tamanho, o sistema permaneceu estável, sem tendência a se precipitar.

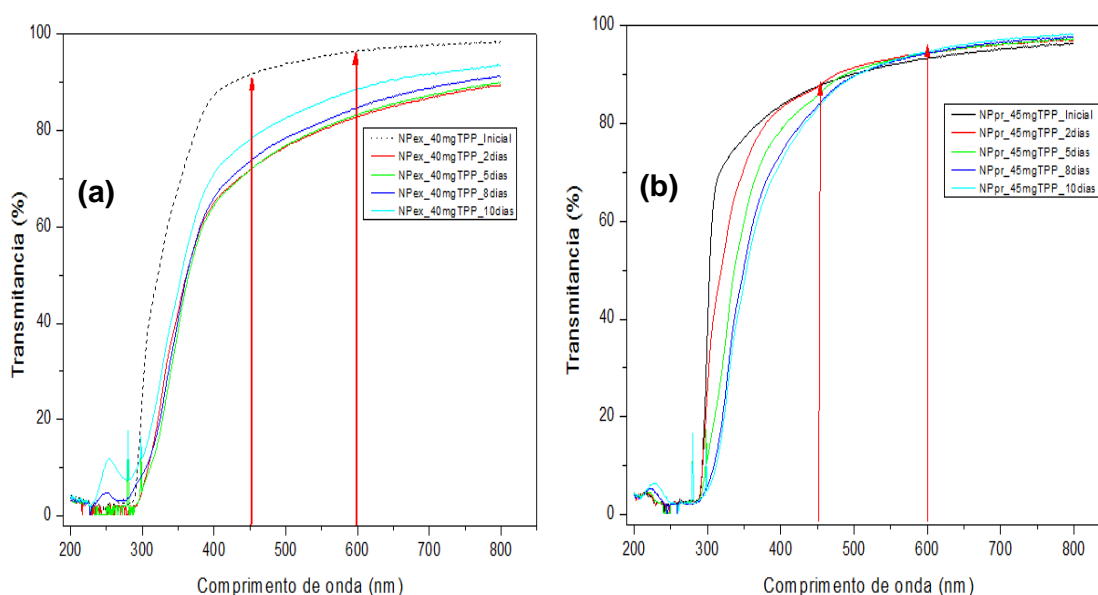
Ao comparar o potencial zeta das NP_{pr} inicial com as NP_{pr} nas condições de instabilidade durante os 11 dias de armazenamento, o potencial zeta teve uma pequena variação (desprezível) que está dentro do limite de erro para todas as condições. Assim, conclui-se que os sistemas apresentaram boa estabilidade durante o período de observação.

5.7 ANÁLISE DE TURBIDEZ

A análise da variação de transmitância é uma ótima ferramenta para avaliar a estabilidade das suspensões e a tendência à formação de aglomerados de

Figura 21: Variação da transmitância para as amostras a) NP_{ex} b) e NP_{pr} no intervalo de 800 a 200 nm durante 2, 5, 8 e 10 dias de armazenamento sob influência da temperatura (35 °C). NP_{ex}: extrato acerola encapsulado; NP_{pr}: vitamina C pura encapsulada.

suspensões de NP, visto que essas instabilidades no sistema implicam em variação na turbidez. A análise da transmitância no intervalo de 800 a 200 nm para as suspensões de NP_{ex} e NP_{pr} armazenada sob influência da temperatura a 35 °C, mostrou que houve variação significativa em função do tempo e também da quantidade de TPP (Figura 21).

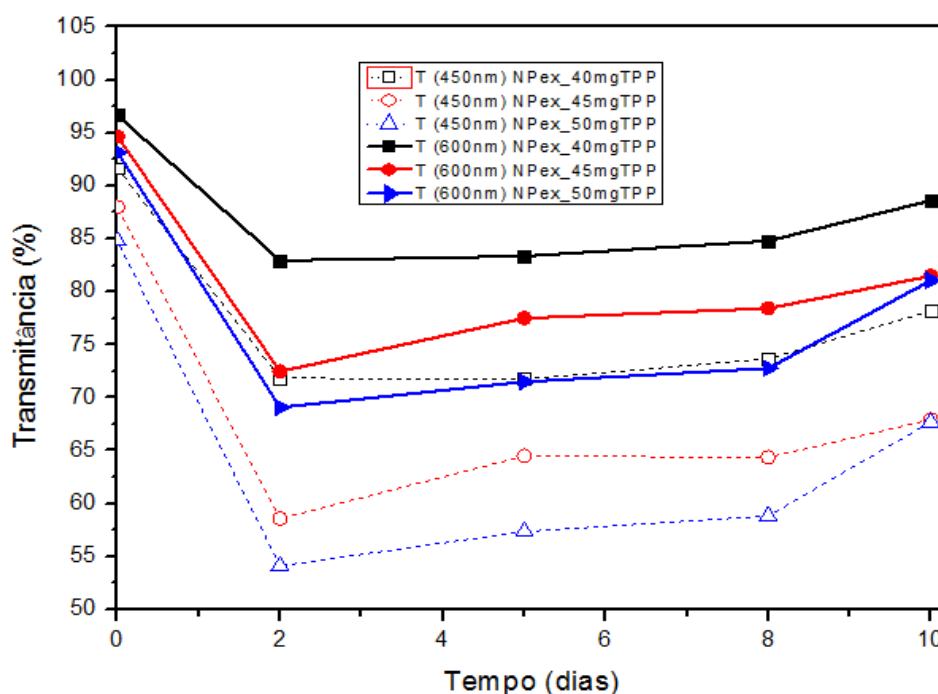


A partir dos dados da Figura 21, selecionando as transmitâncias para os comprimentos de onda em 450 e 600 nm, observa-se que ocorre inicialmente (segundo dia) uma queda expressiva na transmitância seguido de um ligeiro aumento para os dias subsequentes para a suspensão de NP_{ex} (Figura 22). Este comportamento indica que houve inicialmente um aumento da turbidez seguido de uma leve tendência à sua diminuição durante o tempo de armazenamento. Este aumento inicial da turbidez é indicativo de instabilidade do sistema que implica em um aumento do tamanho das NP, bloqueando a passagem da luz. Isto está de acordo com os resultados discutidos anteriormente obtidos pelas técnicas de DLS e potencial

zeta (item 5.6) para amostra armazenada sob temperatura. A partir do segundo dia, a turbidez começa a diminuir justamente porque a instabilidade no sistema atinge um ponto em que as NP ficam grandes, tendem a se aglomerar e, conseqüentemente, se precipitam.

A variação de turbidez também foi proporcional à quantidade de TPP adicionada para as NP_{ex}. Por exemplo, considerando a transmitância em 450 nm, a queda na transmitância foi de aproximadamente 20% para NP_{ex} obtida com 40 mg de TPP, enquanto que para NP_{ex} obtida com 50 mg de TPP esta diferença aumentou para 31%. Ou seja, a variação de turbidez foi bem maior para a amostra com 50 mg de TPP. Este comportamento está de acordo com o esperado, pois em estudos anteriores verificou-se que, ao aumentar a proporção de TPP, as NP aumentam de tamanho, implicando em aumento de turbidez no sistema (GAN et al., 2005).

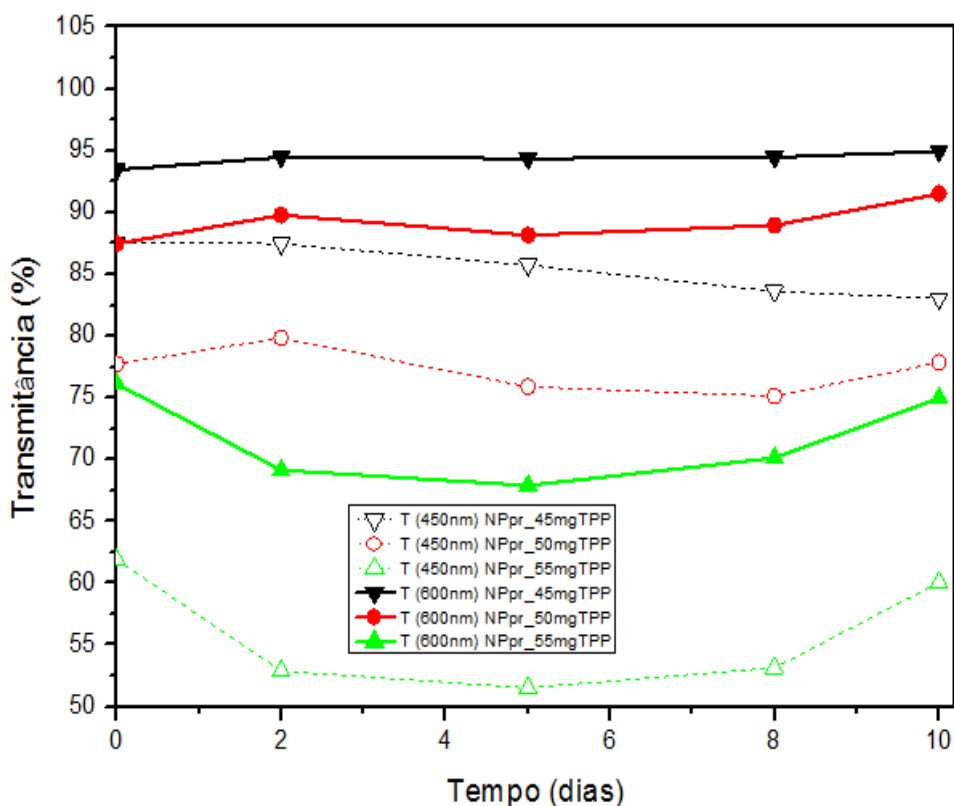
Figura 22: Variação da transmitância para nanopartículas de vitamina C obtidas a partir de extrato de resíduo do processamento de acerola (NP_{ex}) para os comprimentos de onda em 450 e 600 nm em função do tempo de armazenamento.



O comportamento da amostra NP_{pr} foi um pouco diferente, pois para as suspensões com menor concentração de TPP não houve aumento de turbidez no segundo dia (Figura 23). Ou seja, o sistema permaneceu praticamente estável. Uma possível explicação para esta maior estabilidade da vitamina C pura encapsulada em

relação ao extrato do resíduo encapsulado pode ser a influências de outros compostos, e.g., polifenóis, presentes no extrato, que podem interferir na estabilidade do sistema, principalmente em temperatura elevada. Por outro lado, ao aumentar a quantidade de TPP para 55 mg observa-se que o sistema teve um comportamento muito semelhante ao NP_{ex}, pois a turbidez inicial (t = 0) foi alta e aumentou expressivamente para o segundo dia (Figura 23).

Figura 23: Variação da transmitância para nanopartículas de vitamina C pura (NP_{pr}) para os comprimentos de onda em 450 e 600 nm em função do tempo de armazenamento.



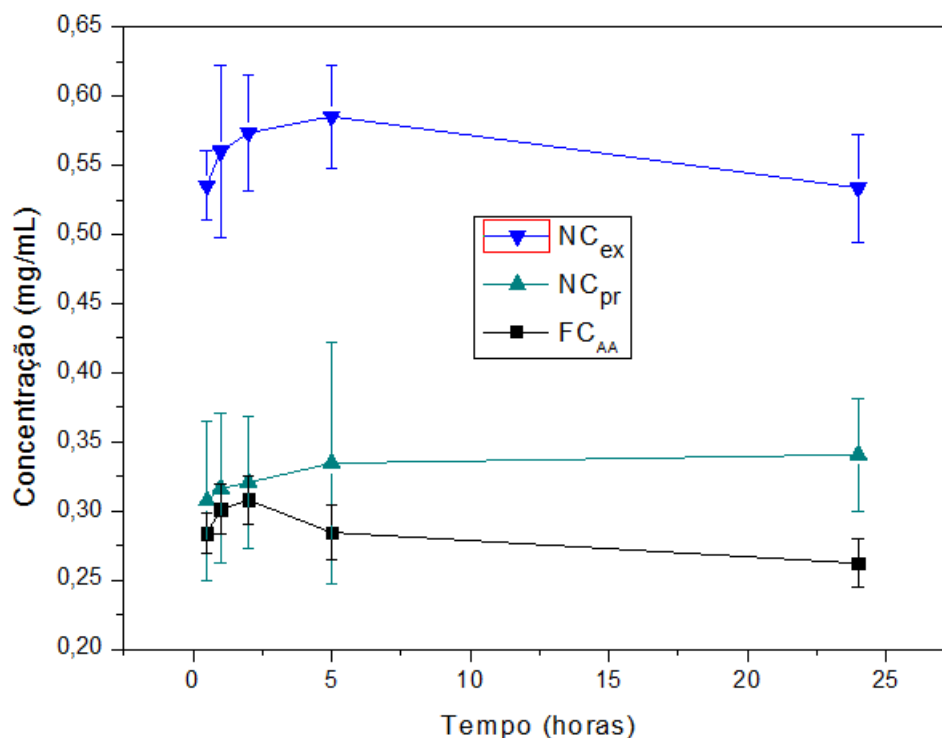
Da mesma forma, a turbidez tende a uma leve diminuição ao longo do tempo para esta condição que, como discutido, é devido à tendência de aglomeração e precipitação das NP.

5.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA VITAMINA C

O perfil de liberação é muito importante para definir a durabilidade teórica da substância encapsulada, no caso, a vitamina C. É possível observar que a partir dos

filmes nanocompósitos de GLM, em 5 horas, a concentração de vitamina C atinge uma taxa de liberação máxima, tendendo a seguir a uma leve queda devido à sua degradação (Figura 24). O filme controle (FC_{AA}) mostrou um comportamento predominantemente do tipo “burst”, com uma taxa de liberação maior durante o tempo de análise. Esse efeito foi menos pronunciado para os filmes NC contendo vitamina C encapsulada.

Figura 24: Perfil de liberação da vitamina C em etanol/água para os filmes nanocompósitos (liofilizados) de vitamina C obtida a partir de extrato de resíduo do processamento de acerola (NC_{ex}), de vitamina C pura (NC_{pr}) e filme controle de GLM adicionado de ácido ascórbico puro (FC_{AA}).

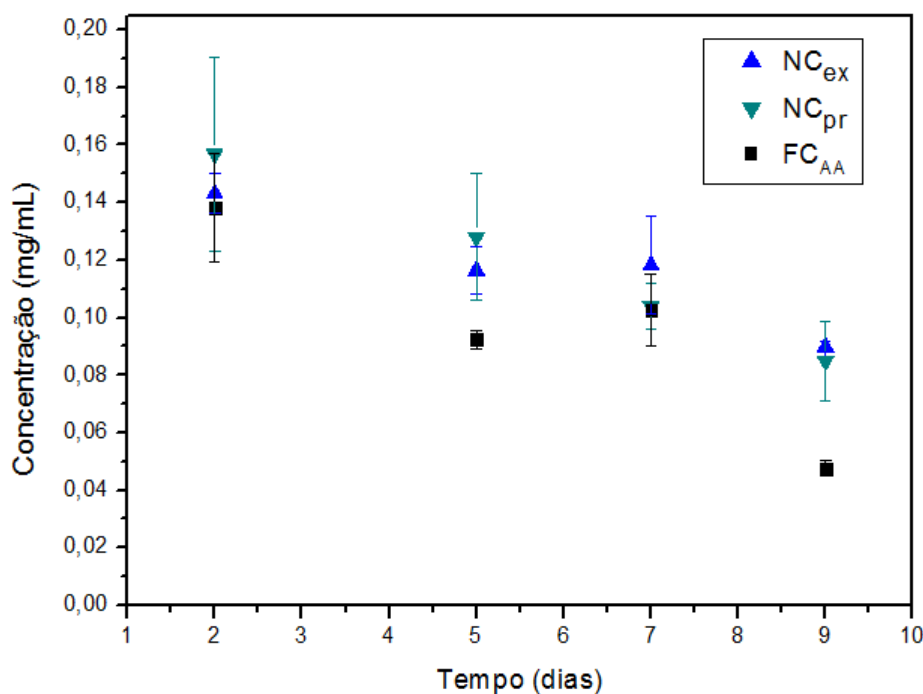


Em trabalho descrito por Alishahi et al. (2011), sistema contendo vitamina C pura em NP de quitosana apresentou taxa de liberação mais baixa em meio ácido. Por outro lado, também em NP de quitosana a vitamina C pura apresentou uma taxa de liberação mais rápida, com uma liberação em cerca de 36% após 2 h em meio neutro (BRITTO et al. 2014). É evidente que a propriedade particular desta vitamina (altamente solúvel em água), a matriz filmogênica e até mesmo o meio utilizado influencia seu perfil de liberação.

5.9 ESTABILIDADE DA VITAMINA C EM FILMES NANOCOMPÓSITOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

Em relação aos filmes NC submetidos a diferentes condições de armazenamento, observa-se claramente que nos sistemas NC, o efeito na conservação da vitamina C foi mais pronunciado. Para influência da luz (Figura 25), comparando-se com o valor inicial, a condição encapsulada (NC_{ex} e NC_{pr}) mantém cerca de 62% da concentração inicial de vitamina C no nono dia. Este valor é elevado em comparação com o controle não-encapsulado (FC_{AA}), em que a concentração atinge 34% no período final de análise.

Figura 25: Concentração de vitamina C em função do tempo, quando expostos à luz. NC_{ex} : nanocompósitos contendo extrato de resíduo de acerola; NC_{pr} : nanocompósitos adicionado de vitamina C pura; FC_{AA} : filme controle de GLM adicionado de ácido ascórbico puro.



Da mesma forma, quando exposto à temperatura de 35 °C, a capacidade de preservação da vitamina C foi mais eficiente para os filmes NC (Figura 26). Nesse caso, exibiram uma concentração equivalente a 78 e 88% da quantidade inicial de vitamina C, respectivamente, para os filmes NC_{ex} e NC_{pr} , ao final do período analisado. Por outro lado, a taxa de degradação da vitamina C foi maior para o sistema GLM +

vitamina C não-encapsulada (FC_{AA}), mantendo apenas 45% da concentração inicial de vitamina C (Figura 26).

Em concordância, a estabilidade da vitamina C sob ação de O_2 foi maior para o sistema NC_{ex} (Figura 27), no qual a concentração final atingiu cerca de 71% do seu valor inicial. Enquanto que para os sistemas NC_{pr} e FC_{AA} degradaram-se a uma taxa ligeiramente maior, 50 e 39%, respectivamente.

Figura 26: Concentração de vitamina C em função do tempo, quando exposta em temperatura elevada. NC_{ex} : nanocompósitos contendo extrato de resíduo de acerola; NC_{pr} : nanocompósitos adicionado de vitamina C pura; FC_{AA} : filme controle de GLM adicionado de ácido ascórbico puro.

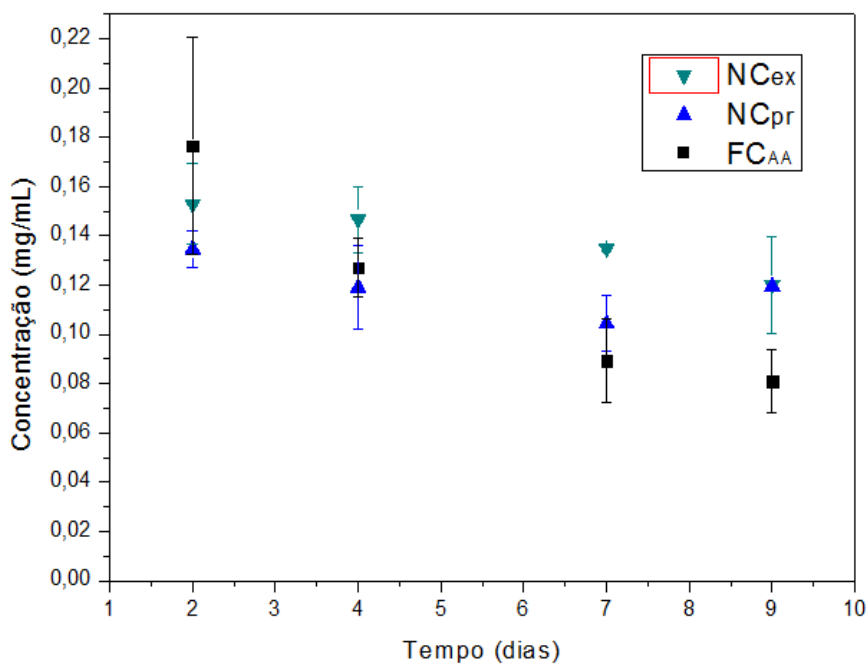
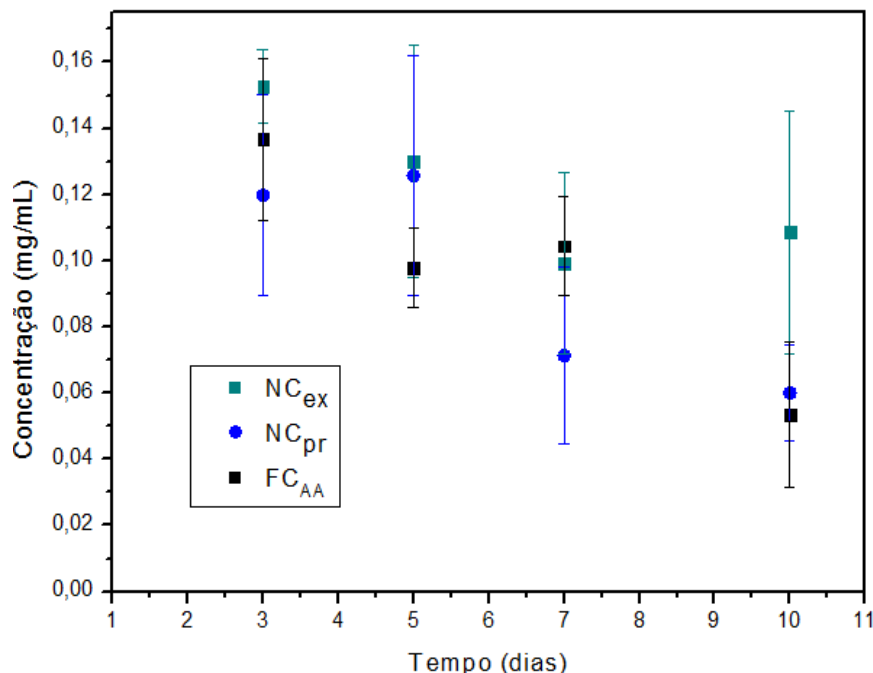


Figura 27: Variação da concentração de vitamina C em função do tempo, sob ação de O₂. NC_{ex}: nanocompósitos contendo extrato de resíduo de acerola; NC_{pr}: nanocompósitos de vitamina C pura; FC_{AA}: filme controle de GLM adicionado de ácido ascórbico puro.

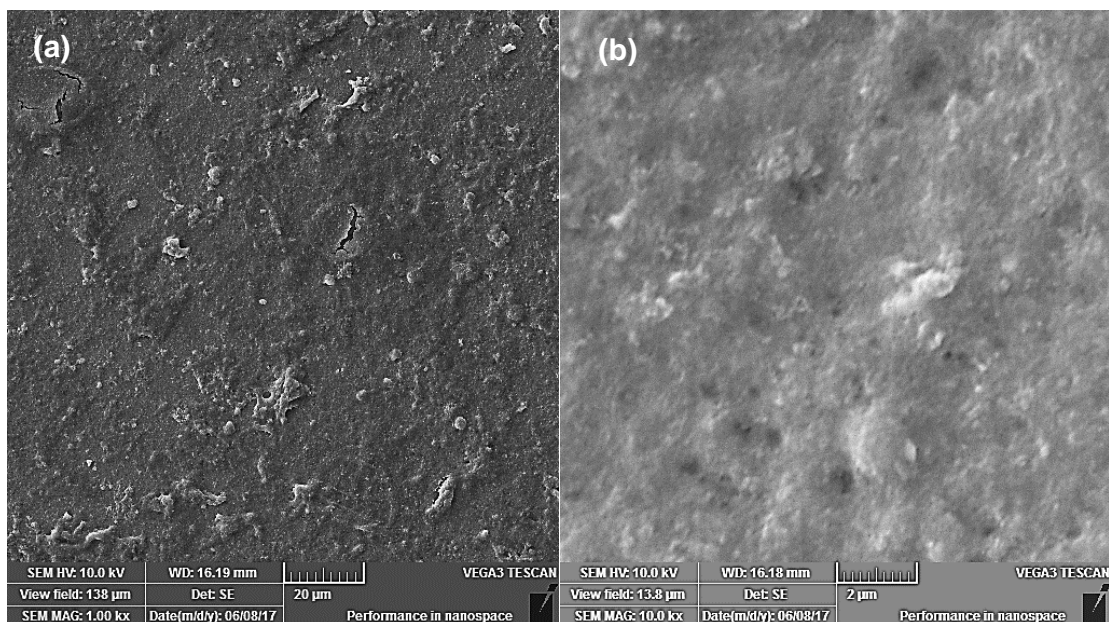


A partir dos resultados apontados, pode-se inferir que o fator mais crítico para degradação da vitamina C nos sistemas estudados foi a exposição a atmosfera oxidante, enquanto que a condição de temperatura elevada (35 °C) foi a de maior estabilidade desta vitamina quando nos filmes NC.

5.10 MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

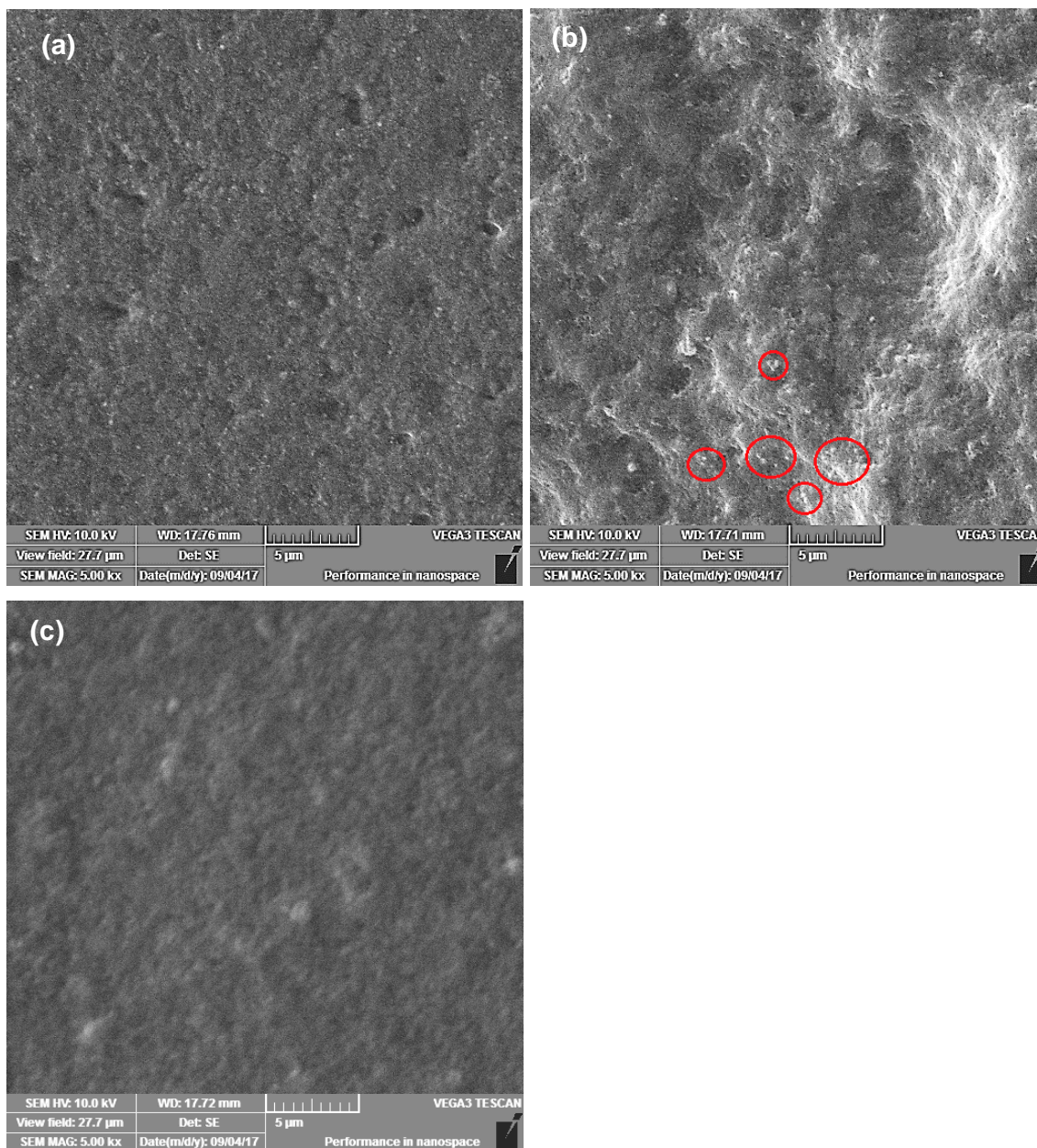
A análise morfológica mostrou que as NP apresentam formato esférico uniformemente distribuído (Figura 28). Em baixa magnitude (ampliação 1,0 k vezes) observa-se o carácter nanoparticulado da amostra NP_{ex} (Figura 28a). Quando observada sob magnitude maior (ampliação de 10,0 k vezes) no limite de ampliação do equipamento, é possível identificar a dimensão dessas estruturas na ordem de 200 nm (Figura 28b), confirmando os resultados anteriores por DLS.

Figura 28: Imagens obtidas por MEV da amostra NP_{ex} depositada em lâminas de vidro para **a)** baixa magnitude com ampliação 1,0 k vezes e **b)** alta magnitude com ampliação 10,0 k vezes.



A análise morfológica do filme de GLM pura apresentou estrutura rugosa com formação de estruturas próximas da escala nano, porém com rugosidades (Figura 29a). Ainda não está claro porque a GLM pura apresenta esta morfologia. Uma explicação pode estar relacionada à natureza coloidal da solução de polissacarídeos como a GLM, que em concentrações altas podem se aglomerar, formando estruturas maiores. No entanto, nos filmes NC é possível identificar a presença de nanopartículas nas amostras NC_{ex} e NC_{pr}, apresentando, no geral, um aspecto mais heterogêneo (Figura 29b e 29c) em relação à GLM pura. Estes resultados indicam uma boa dispersão da carga nanoparticulada na matriz filmogênica de GLM, sendo, portanto, adequado para preparação de formulações para revestimento de frutos e preparação de embalagens ativas.

Figura 29: Imagens obtidas por MEV dos filmes de **a)** GLM pura; **b)** NC de vitamina C obtida a partir de extrato de resíduo do processamento de acerola (NC_{ex}) e **c)** NC de vitamina C pura (NC_{pr}).



6. CONCLUSÕES

Um dos principais avanços obtidos neste trabalho foi a possibilidade de extrair vitamina C do resíduo agroindustrial do processamento de acerola, empregando solução aquosa de HCl a 0,1% (v/v) e quitosana a 3 mg/mL. A partir dessa vitamina C extraída do resíduo, a preparação de nanopartículas apresentou avanço no sentido de estabilizá-la com potencialidade de aplicação futura. De fato, o sistema nanoencapsulado mostrou-se satisfatório para preservação da vitamina C sob condições adversas como influência da luz, temperatura e oxigênio. Este resultado representa um impacto positivo para o setor agroindustrial no sentido do aproveitamento de resíduo e valorização de subprodutos, cujo teor calculado de vitamina C no resíduo úmido foi em média 1.368,00 mg/100 g.

Outro avanço encontrado foi quanto à cinética de degradação da vitamina C. Em geral, para soluções homogêneas, a vitamina C se degrada de acordo com o modelo cinético de primeira ordem. No entanto, a aplicação deste modelo foi mais adequada para suspensão de nanopartículas com ácido ascórbico puro (comercial). Isto indica que em sistemas heterogêneos, como nas suspensões de nanopartículas, o processo de degradação pode ser mais complexo, dificultando sua quantificação. Por outro lado, o cálculo da Energia de Ativação, indicou estar dentro do esperado para sistemas homogêneos.

Por fim, a preparação de filmes nanocompósitos à base de galactomanana mostrou que este polissacarídeo tem boas propriedades filmogênicas e adequado para preparação de nanocompósitos. Os filmes nanocompósitos apresentaram capacidade de preservação adicional para a vitamina C mesmo em condições adversas como sob influência da luz, temperatura e oxigênio. Isto mais uma vez destaca o potencial de aplicação destes materiais como embalagem ativa e confecção de formulações filmogênicas comestíveis para revestimento de frutas e alimentos minimamente processados.

7. PERSPECTIVAS

O presente trabalho mostra-se promissor em termos de estabilização da vitamina C em NP e sua aplicação para formação de filmes comestíveis. Para tanto, são necessários caracterizar os filmes quanto à espessura, atividade antimicrobiana e antioxidante, solubilidade, propriedades óticas (cor e opacidade), permeabilidade ao vapor de água e determinar as propriedades térmicas através da técnica de calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica. Além disso, realizar ensaio mecânico de tração e identificar grupos funcionais das espécies químicas através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

Por fim, a eficiência dos filmes para o revestimento poderá ser testada em frutas da região do Vale do São Francisco (por exemplo, manga e uva) e avaliada mudanças fisiológicas como cor do fruto, perda de água e grau de deterioração.

TRABALHOS PUBLICADOS E APRESENTADOS EM EVENTOS:

1. NASCIMENTO, J. A. A.; DUARTE, D. S.; LIMA, M. A. C.; BRITTO, D. Avaliação da estabilidade da vitamina C em filmes comestíveis nanocompósitos à base de galactomanana e nanopartículas de quitosana. X Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão – SCIENTEX, 2017, Juazeiro: UNIVASF. Anais do evento.
2. GOMES, L. K. S.; BRITTO, D.; NASCIMENTO, J. A. A.; TOSTES, B. V. A.; DUARTE, D. S.; DEON, M. D.; LIMA, M. A. C.; GONSALVES, A. A. Preparação e caracterização de nanopartículas para elaboração de nanocompósitos fotoprotetores. X Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão – SCIENTEX, 2017, Juazeiro: UNIVASF. Anais do evento.
3. NASCIMENTO, J. A. A.; DUARTE, D. S.; LIMA, M. A. C.; BRITTO, D. Obtenção e estabilização por nanoencapsulamento de vitamina C oriunda de resíduo agroindustrial. In: II Jornada de Integração da Pós-Graduação da Embrapa Semiárido, Petrolina, 2017.
4. NASCIMENTO, J. A. A.; DUARTE, D. S.; LIMA, M. A. C.; BRITTO, D. Estabilidade de filmes comestíveis nanocompósitos à base de polissacarídeos e vitamina C obtida de resíduo agroindustrial. In: IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Embrapa Instrumentação, São Carlos, 2017.
5. DUARTE, D. S.; NASCIMENTO, J. A. A.; BRITTO, D. Estudo de escalonamento na síntese de nanopartículas para encapsulamento de princípios ativos. In: IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Embrapa Instrumentação, São Carlos, 2017.
6. NASCIMENTO, J. A. A.; DUARTE, D. S.; GOMES, L. K. S.; MUDO, L. M. D.; BRITTO, D. Obtenção e caracterização de nanopartículas de vitamina C encapsulada a partir de resíduo do processamento de polpa de acerola. In: VIII Semana de Química da UAST/UFRPE, 2017, Serra Talhada. Anais do evento, 2017.
7. MUDO, L. M. D.; DUARTE, D. S.; NASCIMENTO, J. A. A.; MELO, N. F.; BRITTO, D. Encapsulação de DNA como estratégia de controle biológico e vacinas não-virais. In: VIII Semana de Química da UAST/UFRPE, 2017, Serra Talhada. Anais do evento, 2017.
8. DUARTE, D. S.; NASCIMENTO, J. A. A.; BRITTO, D.; FERNANDES, K. M. Scale-up in the synthesis of nanoparticles for encapsulation of active principles. In: XVI Brazilian MRS Meeting- SBPMat 2017, Gramado-RS. Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. p. 52610.
9. NASCIMENTO, J. A. A.; LIMA, M. A. C.; BRITTO, D. Edible nanocomposites based on galactomannan and chitosan nanoparticle for stabilizing vitamin C. In: XVI Brazilian MRS Meeting- SBPMat 2017, Gramado-RS. Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2017. p. 52626.
10. NASCIMENTO, J. A. A.; DUARTE, D. S.; LIMA, M. A. C.; BRITTO, D. Evaluation of the stability of nanoencapsulated vitamin C extracted from byproduct of acerola

industrial activity. In: XVI Brazilian MRS Meeting- SBPMat 2017, Gramado-RS. Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2017. p. 52204.

11. NASCIMENTO; J. A. A. SILVA; C. B.; DUARTE; D. S.; LIMA; M. A. C.; BRITTO; D. Avaliação da estabilidade da vitamina c obtida a partir de resíduo de polpa de acerola via técnica de encapsulação. IX Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão – SCIENTEX, 2016, Juazeiro: UNIVASF. Anais do evento.

12. SILVA; C. B.; LIMA; M. A. C.; BRITTO; D.; NASCIMENTO; J. A. A. Propriedades do extrato hidro-alcoólico da casca de uva nanoencapsulado em quitosana para aplicação em filmes. I Congresso de Ciências dos Materiais & V Escola de nanotecnologia da Rede Agronano, 2016, Juazeiro: UNIVASF. p.056.

13. NASCIMENTO; J. A. A.; SILVA; C. B.; DUARTE; D. S.; LIMA; M. A. C.; BRITTO; D. Métodos alternativos via complexo polissacarídeo de extração e conservação de vitamina C obtida a partir do resíduo de polpa de acerola. I Congresso de Ciências dos Materiais & V Escola de nanotecnologia da Rede Agronano, 2016, Juazeiro: UNIVASF. p.018.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. S. et al. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros**, v. 23, n. 5, p. 630-635, 2013.

ALISHAHI A. et al. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 935-940, 2011.

ALVES; V. F. **Cinética da degradação de ácido ascórbico em suco de laranja concentrado**. 2004. 70f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Paulista, Campus de Araraquara, Araraquara – SP. 2004.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, p. 92, 2017.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Extração e caracterização da galactomanana de sementes de *Caesalpinia pulcherrima*. **Polímeros**, v. 9, n. 2, p.54-59, 1999.

BENTO, J. F. et al. Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 192–199, 2013.

BRAGA, A. C. D. et al. Caracterização e obtenção de farinha do resíduo gerado no processo industrial de clarificação do suco de acerola. **Revista Semiárido De Visu**, v.1, n.2, p.126-133, 2011.

BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S. P. Kinetics of the thermal degradation of chitosan. **Thermochimica acta**, v. 465, n. 1, p. 73-82, 2007.

BRITTO, D. et al. N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. **Food Hydrocolloids**, v.27, n.2, p.487-493, 2012.

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.

BRITTO, D. et al. Analysis of thermal and aqueous suspension stabilities of chitosan based nanoencapsulated vitamins. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1126-1130, 2016.

BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 1 v, 2006. 690p.

BUCKERIDGE, M.S. et al. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. São Paulo: Artmed, 2004, cap. 1, p. 1-33.

CAETANO, A. C. S. et al. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal Food Technology**. v. 12, n. 2, p. 155-160, abr./jun. 2009.

CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. **Processos Químicos**, v. 1, n. 2, p. 9, jan./jul. 2007.

- CARDOSO, P. C. et al. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. **Food chemistry**, v. 126, n. 2, p. 411-416, 2011.
- CASTRO, P. G. **Xiloglucanas e galactomananas de leguminosas: interação com lectinas D-galactose-ligantes**. 2007. 100 f. Tese de Doutorado - Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE. 2007.
- CERQUEIRA, M. A.; et al. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p.408–414, 2009.
- CERQUEIRA, M. A. et al. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 12, p. 662-671, 2011.
- COELHO, M. Vitamin stability in premixes and feeds. A practical approach in ruminant diets. In: **Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium**. p. 127-145, 2002.
- COELHO, C. P. D. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos de poliestireno e argilas esmectíticas**. 2008. 107f. Doutorado (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2008.
- CORREIA, L. F. M.; FARAONI, A. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. **Revista Alimentos e Nutrição**. v. 19, n. 1, p. 83-95, jan./mar. 2008.
- COSTA, A. C. S. **Qualidade e atividade antioxidante na porção comestível e resíduos do processamento de acerola produzida no submédio do Vale do São Francisco**. 2012. 116f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Campus Centro de Ciência Agrárias, Areia – PB. 2012.
- DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.
- DEDAVID, A. B.; GOMES, I. C.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras**. Rio Grande do Sul: EDIPUCRS, 2007. 60 p.
- DEL-VALLE, V. et al. Optimization of an equilibrium modified atmosphere packaging (EMAP) for minimally processed mandarin segments. **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 3, p. 474-481, 2009.
- DE RITTER, E. Stability characteristics of vitamins in processed foods. **Food Technology**, v. 30, n.1, p. 48-51, 1976.
- DO PRADO SILVA, J. T. et al. Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 1005-1011, 2017.

- DOS SANTOS, T. C. et al. Nanocomposite chitosan hydrogels based on PLGA nanoparticles as potential biomedical materials. **European Polymer Journal**, v. 99, p. 456-463, 2017.
- EL MIRI, N. et al. Bionanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals: Rheology of film-forming solutions, transparency, water vapor barrier and tensile properties of films. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 156–167, 2015.
- ESTEVES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.
- FERREIRA, L. P. et al. Preparo de nanocompósitos de poli(succinato de butileno) (PDS) e argila motmorilonita organofílica via polimerização in situ. **Polímeros**, vol. 24, n. 5, p. 604-611, 2014.
- GAN, Q. et al. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2, p. 65-73, 2005.
- GHORBANZADE, T. et al. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146-152, 2017.
- GONSALVES, et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n.7, p. 1215-1223, 2011.
- GUILHERME, R. F. et al. Composição e cinética de degradação do ácido ascórbico em rações para aquicultura. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 33, n. 4, p. 1153-1158, 2009.
- GREGORY III, J. F. **In Chemical Changes in Food during Processing**; Richardson, T.; Finley J. W., eds. Springer: New York, 1985, cap. 17.
- HAN, H. J. et al. Extraction optimization and nanoencapsulation of jujube pulp and seed for enhancing antioxidant activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 93-100, 2015.
- HERBIG, A. L.; MAINGONNAT, J. F.; RENARD, M.G. C. Oxygen availability in model solutions and purées during heat treatment and the impact on vitamin C degradation. **LWT-Food Science and Technology**, p. 1-7, 2016.
- KANMANI, P.; RHIM, J. W. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. **Food Chemistry**, v. 148, p. 162-169, 2014.
- KUMAR, M. N. V R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

- LAVARDA, L. **Determinação da cinética de degradação térmica da vitamina C em polpa de acerola via aquecimento ôhmico**. 2011. 44f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre – RS, 2011.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 725p.
- LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R.; MATTOSO, L. C. Nanocompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 931-936, 2014.
- MAEDA, R. N. et al. Estabilidade de ácido ascórbico e antocianinas em néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 313-316, 2007.
- MAIA, G. A. et al. Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 130-134, 2007.
- MARTINS, C.R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.83-93, 2002.
- MDITSHWA, A. et al. Postharvest factors affecting vitamin C content of citrus fruits: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 95-104, 2017.
- MENEZES, A. R. V. et al. Estudo comparativo do pó da acerola verde (*Malpighia emarginata* D.C) obtido em estufa por circulação de ar e por liofilização. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p.1-8, 2009.
- MERCALI, G. D. et al. Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 47, n. 1, 91-95, 2012.
- MERCALI, G. D. et al. Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: effect of electric field frequency. **Journal of Food Engineering**, New York, v. 123, p. 1-7. 2013.
- MONTEIRO, A. A. S. **Síntese e caracterização de géis de galactomanana de fava danta (*Dimorphandra gardneriana*) para aplicação biológica**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Fortaleza – CE. 2009.
- MOREIRA, G. E. G. **Obtenção e caracterização do extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola**. 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal – RN. 2007.

MUNYAKA, A.; et al. Thermal stability of L-ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). **Journal of Food Science**, v. 75, p. 336-340, 2010.

NAGATANI, T. et al. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, p. 901-909, 1987.

NISHA, P.; REKHA, S. S.; ANIRUDDHA, B. P. A study on degradation kinetics of ascorbic acid in amla (*Phyllanthus emblica* L.) during cooking. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 5, p. 415–422, 2004.

OLIVEIRA, A. N. et al. Cinética de degradação e vida-de-prateleira de suco integral de manga. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, p. 172-178, 2013.

PEGADO, C. M. A; ANDRADE, L. A.; FÉLIX, L. P.; PEREIRA, I. M. Efeitos da invasão biológica de algaroba-*Prosopis juliflora* (Sw.) DC. sobre a composição e a estrutura do estrato arbustivo-arbóreo da caatinga no Município de Monteiro, PB, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 887-898, 2006.

PÉREZ-MASIÁ, R. et al. Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. **Food chemistry**, v. 168, p. 124-133, 2015.

PEREZ, N. M.; MELCHIADES, F. G.; BOSCHI, N. O. Avaliação comparativa e caracterização de tripolifosfatos de sódio comerciais. **Cerâmica Industrial**, v.14, n. 4, p. 11-14, jul./ago., 2009.

PETTA, V. et al. Dynamic light scattering study of an amelogenin gel-like matrix in vitro. **European journal of oral sciences**, v. 114, n. 1, p. 308-314, 2006.

POLLARD, M. A. et al. Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinioideae and Faboideae subfamilies by multidetection aqueous SEC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 70–84, 2010.

ROBERTS, G. A. F. Structure of chitin and chitosan. In: **Chitin Chemistry**. Macmillan Education UK, 1992. p. 1-53.

ROJAS, A. M.; GERSCHENSON, L. N. Ascorbic acid destruction in sweet aqueous model systems. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**. v. 30, n. 6, p. 567-572, 1997.

ROSENTHAL, I.; ROSEN, B.; BERNSTEIN, S. Effects of milk fortification with ascorbic acid and iron. **Milchwissenschaft**, v. 48, n. 12, p. 676-679, 1993.

SALAZAR, M. J. C. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. São Carlos – SP. 2015.

- SANTOS DA ROSA, J. et al. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 837-846, 2007.
- SAPEI, L.; HWA, L. Study on the kinetics of vitamin C degradation in fresh strawberry juices. **Procedia Chemistry**, v. 9, p. 62-68, 2014.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 276 – 737, 2003.
- SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in food science & technology**, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.
- SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776, 2006.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Bookman: Porto Alegre, 2002. 836p.
- SOARES, A. C. **Caracterização e modificação de membranas de quitosana-PEG com filmes automontados de jacalina e concanavalina**. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos - SP. 2012.
- SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, Washington, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.
- SOUSA, M. S. B. et al. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.
- SOUZA FILHO, M. et al. Extração e caracterização de galactomanana de vagens de Algaroba (*Prosopis juliflora*). **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2013.
- STEELE, C. J. Cereal fortification-technological problems. **Cereal Foods World**, v. 21, n. 10, p. 538-540, 1976.
- STORCK, C. R. et al. Qualidade microbiológica e composição de farinhas de resíduos da produção de suco de frutas em diferentes granulometrias. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 277, out./dez.2015.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4ª edição revisada e ampliada. Campinas – SP – 2011. Disponível em: https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwiZ oZ_9wd3YAhVMCpAKHdelCh0QFggqMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.cfn.org.br%2Fwp-content%2Fuploads%2F2017%2F03%2Ftaco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf&usg=AOvVaw3LjkXrnf-CZUHEAAAtllprX.pdf > Acessado em: 10 jan. 2016 às 10h30min.

TEIXEIRA, J. et al. Degradação do ácido ascórbico em goiabada industrializada submetida a diferentes condições de estocagem. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 281-286, 2006.

TIMOUMI, S.; MIHOUBI, D.; ZAGROUBA, F. Shrinkage, vitamin C degradation and aroma losses during infra-red drying of apple slices. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 1648-1654, 2007.

VAN BREE, I. et al. Modelling the degradation kinetics of vitamin C in fruit juice in relation to the initial headspace oxygen concentration. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 207-214, 2012.

VANNUCCI, H.; ROCHA, M. M. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: ácido ascórbico (Vitamina C). **International Life Sciences Institute Brasil**, v. 21, 2012. p. 12.

VENDRAMINI, A. L., L. C. TRUGO. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry** v.71, n. 2, p. 195-198, 2000.

YUAN, J. P.; CHEN, F. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5078-5082, 1998.