



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MÉRCIA MARIA ALFINETE SULUMINDINE INROGA

**MAÇÃS (*Malus domestica* Borkh) MINIMAMENTE PROCESSADAS
FORTIFICADAS COM β -CAROTENO NANOENCAPSULADO**

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MÉRCIA MARIA ALFINETE SULUMINDINE INROGA

**MAÇÃS (*Malus domestica* Borkh) MINIMAMENTE PROCESSADAS
FORTIFICADAS COM β -CAROTENO NANOENCAPSULADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências e tecnologia de alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Co-Orientador: Profa. Dra. Médelin Marques da Silva

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Inroga, Mércia Maria Alfinete Sulumindine
MAÇÃS (Malus domestica Borkh) MINIMAMENTE
PROCESSADAS FORTIFICADAS COM BETA-CAROTENO
NANOENCAPSULADO / Mércia Maria Alfinete Sulumindine
Inroga. -- 2018.

77 f.

Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Coorientadora: Médelin Marques da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Compostos bioativos. 2. Beta-caroteno. 3. Nanocápsulas. 4. Nanoemulsão. I. Rios, Alessandro de Oliveira, orient. II. Silva, Médelin Marques da, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autor: Mércia Maria Alfinete Sulumindine Inroga
Título da Dissertação: Maçãs (*Malus domestica Borkh*) minimamente processadas fortificadas com β -caroteno nanoencapsulado

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprovada em:/...../.....
Pela banca examinadora:

Docente em Escola Técnica Universitária

Homologada em:/...../.....
Por:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Orientador
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Coordenador do PPGCTA/UFRGS

Prof^ª. Dra. Médelin Marques da Silva
Co-orientadora
Docente do Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do ICTA/UFRGS

Banca: Prof. Dr Plinho Francisco Hertz
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de alimentos
PPGCTA/UFRGS

Banca: Prof^ª. Dra. Priscilla Pereira Dos
Santos
Docente do Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

Banca: Prof. Dr. Carlos Pagno

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida, meus filhos queridos Allen e Kelvin e ao meu esposo Filomeno, que são a razão da minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradecer a Deus, pelo dom da vida, ilumina os meus caminhos e me conduz.

Aos meus pais Júlio Sulumundine (*in memoria*), tenho a certeza que estaria orgulhoso, de mim e a minha mãe Maria Ivone Alfinete, por todos os ensinamentos dados e pelo amor incondicional. Agradeço ainda aos meus irmãos Julinho, Marito, Ninha e Maninho e aos demais familiares pelo apoio e carinho.

Ao meu querido e amado esposo Filomeno Inroga, por estar sempre ao meu lado, pelo companheirismo, amor, respeito, por me incentivar e apoiar em todos os momentos desta caminhada. Aos meus filhos, Allen Inroga e Kelvin Inroga pelo carinho e apoio de vocês, sinto por não ter sido uma mãe presente em alguns momentos. Obrigada pela compreensão.

Agradecimento especial vai para o meu orientador, professor Alessandro de Oliveira Rios, pela oportunidade dada de me receber como orientanda para frequentar o mestrado e aprender bastante. Pelo apoio, pelas correções e sugestões feitas, paciência e ter depositado confiança em mim. Vai a minha gratidão e apreço!

À minha co-orientadora, professora Médelin Marques da Silva, pela paciência, pelo apoio dado, confiança e dedicação desde o começo até ao fim do trabalho.

Agradecimento também vai para a professora Simone Hickman Flôres, do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, por estar sempre a par das minhas dúvidas, disponibilidade, sugestões e ajuda no trabalho.

Sem me esquecer dos meus amigos queridos, Alex Sandra, Renato e ao André, do Laboratório de Compostos Bioativos (Laboratório 211) que me auxiliaram nas minhas análises. Muito obrigada pela força e carinho. Vocês foram muito especiais para mim!

As colegas Fernanda, Camila, Helena, Liana, Aelson pela ajuda e aos demais colegas do Laboratório de Compostos Bioativos (Laboratório 211), vai o meu muito obrigado.

À minha amiga Andressa Diprat técnica do Laboratório 209, que me acolheu com muito carinho na minha chegada à UFRGS. Muito obrigada!

À banca, pela disponibilidade e contribuição.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de concluir esta etapa do curso.

Finalmente, agradecer a todos que contribuíram e me apoiaram para que o meu sonho se tornasse realidade.

“Que o alimento seja teu único remédio”

Hipócrates

RESUMO

O β -caroteno, um dos principais carotenoides, é um composto bioativo que apresenta propriedades antioxidantes e de pró-vitamina A. Em contrapartida, esse composto apresenta baixa estabilidade na presença de luz e altas temperaturas; assim como insolubilidade em matrizes alimentícias ricas em água, o que limita a sua utilização em alimentos. Neste contexto, objetivou-se desenvolver e aplicar nanocápsulas e nanoemulsões contendo β -caroteno, como fortificador em maçãs minimamente processadas, além de, avaliar os parâmetros de qualidade das maçãs e a estabilidade do β -caroteno durante a vida-de-prateleira do produto final armazenado sob refrigeração, durante 17 dias. Foram usadas maçãs cv. Gala, as quais foram submetidas a diferentes tratamentos (controle, solução com nanocápsulas de β -caroteno e solução com nanoemulsão de β -caroteno). Para tal, foi utilizado como material de parede das nanocápsulas poli- ϵ -caprolactona (PCL), um polímero biodegradável. Foram analisados os parâmetros de coloração, potencial hidrogeniônico (pH), acidez titulável, sólidos solúveis, textura e teor de carotenoides (β -caroteno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina). Em relação à cor, as fatias de maçã tratadas com sistemas nanométricos (nanocápsulas e nanoemulsões de β -caroteno) apresentaram maiores valores de b^* (maiores tons de amarelo) em todos os tempos de armazenamento. Quanto aos carotenoides, o teor de β -caroteno variou de acordo com o tratamento aplicado, sendo que as amostras controle apresentaram 82,2% e 70,6% menos β -caroteno que as fatias de maçã tratadas com as formulações de nanocápsulas e nanoemulsão, respectivamente. Os demais carotenoides (zeaxantina e β -criptoxantina), encontrados na maçã, apresentaram maior conteúdo em amostras tratadas com sistemas nanométricos até o sétimo dia de armazenamento. Esses resultados sugerem que o uso de sistemas nanométricos carregados com β -caroteno podem proporcionar a manutenção da qualidade de maçãs minimamente processadas.

Palavras chave: Compostos bioativos; carotenoides; vitamina A; nanocápsulas; nanoemulsão; poli- ϵ -caprolactona.

ABSTRACT

The β -carotene, a major carotenoid, is a bioactive compound that exhibits antioxidant properties and pro-vitamin A. In contrast, β -carotene has low stability in the presence of light and high temperatures; as well as insolubility in water-rich food matrices, which limits their use in food. In this context, the objective was to develop and apply nanocapsules and nanoemulsions containing β -carotene as a fortifier in minimally processed apples, in addition to evaluating the quality characteristics of apples and the shelf-life stability of β -carotene of the final product stored under cooling. Cv. Gala, which were submitted to different treatments (control, solution with β -carotene nanocapsules and β -carotene nanoemulsion solution). Poly- ϵ -caprolactone (PCL), a biodegradable polymer, was used as the wall material of the nanocapsules. Coloration, hydrogenation potential (pH), titratable acidity, soluble solids, texture and carotenoid content (β -carotene, lutein, zeaxanthin and β -cryptoxanthin) were analyzed. Regarding color, apple slices treated with nanometric systems (nanocapsules and β -carotene nanoemulsions) showed higher b^* values at all storage times. As for carotenoids, the β -carotene content varied according to the applied treatment, and the samples coated with distilled water showed 82.2% and 70.6% less β -carotene than the apple slices treated with the formulations nanocapsules and nano-emulsion, respectively. The remaining carotenoids (zeaxanthin and β -cryptoxanthin), found in apple, presented higher content in samples treated with nanometric systems until the seventh day storage. These results suggest that the use of nanometric systems loaded with β -carotene can provide maintenance of the quality of minimally processed apples.

Keywords: Bioactive compounds; carotenoids; vitamin A; nanocapsules; nanoemulsion; poly- ϵ -caprolactone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Principais carotenoides encontrados nos vegetais.....	20
Figura 02: Reações de carotenoides e radicais livres.....	23
Figura 03: Estrutura química do β -caroteno.....	24
Figura 04: Estrutura química e clivagem do β -caroteno.....	25
Figura 05: Degradação do β -caroteno.....	26
Figura 06: Estruturas para diferentes modelos de nanopartículas.....	30
Figura 07: Estrutura química da (a) ϵ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$. b) Estrutura da poli- ϵ -caprolactona representada pela sua unidade monomérica, a ϵ -caprolactona, com anel aberto.....	30
Figura 08: (a) Injeção da fase orgânica na fase aquosa da nanocápsula; (b) evaporação e (c) Nanocápsula contendo β -caroteno de $30\mu\text{g/mL}$	37
Figura 09: (a) Injeção da fase orgânica na fase aquosa da nanoemulsão; (b) evaporação e (c) Nanoemulsão contendo β -caroteno de $30\mu\text{g/mL}$	38
Figura 10: Colorímetro.....	40
Figura 11: Potenciômetro.....	41
Figura 12: Bureta.....	41
Figura 13: Refratômetro digital.....	42
Figura 14: Texturômetro.....	42
Figura 15: Ultra Turrax [®]	43
Figura 16: HPLC.....	44

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cv. Gala	Cultivar Gala
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
PMP	Produtos minimamente processados
MP	Minimamente processados
ERs	Espécies reativas
$^3\text{O}_2$	Oxigênio triplete
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
PLA	Ácidopolilático
PLGA	Ácidopoliglicólico
INDEC	Instituto Brasileiro do consumidor
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Span 60	Monoesterato de sorbitano
TCM	Triglicerídeos decadeia média
Tween 80	Polisorbato
MTBE	Éter-metil-terc-butílico
*CAR	Carotenoide no estado excitado
β -ionona	Trimetil ciclohexano conjugado

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. APRESENTAÇÃO.....	17
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4. REVISÃO.....	19
4.1. Compostos Bioativos	19
4.2. Carotenoides	20
4.2.1. Estrutura Química dos Carotenoides.....	21
4.2.2. Solubilidade.....	22
4.2.3. Espécies Reativas e Atividade Antioxidante.....	22
4.2.4. Atividade Pro-vitáminica dos Carotenoides.....	23
4.3. β -Caroteno	24
4.4. Fortificação	27
4.5. Nanoencapsulação	28
4.6. β -caroteno nanoencapsulado.....	31
4.7. Produtos minimamente processados.....	33
4.8. Aditivos Aplicados sobre Maças Minimamente Processadas.....	34
CAPITULO II-MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1. Materiais	36
5.2. Obtenção das nanocápsulas de β -caroteno de núcleo lipídico.....	36
5.3. Obtenção da nanoemulsão de β -caroteno	38
5.4. Caracterização das formulações produzidas	39
5.5. Preparo e tratamento das maçãs.....	39
5.6. Avaliação dos parâmetros de qualidade.....	40

6. ARTIGO	45
7. DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
7.1. Discussão Geral	65
7.2. Conclusões	66
7.3. Perspectivas	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos, a população demanda pela ingestão de alimentos contendo ingredientes funcionais, como forma de garantir o bem-estar e a saúde (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Segundo Salgado (2009), alimentos funcionais são aqueles que, além das qualidades nutricionais, contêm substâncias que ajudam na diminuição dos riscos de algumas doenças crônicas, sendo considerados promotores de saúde, devido a presença de compostos bioativos. De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), (1999) alimento funcional é “qualquer alimento ou ingrediente que além, das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos a saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.”

Nesse contexto, os carotenoides destacam-se pelo fato de possuírem capacidade de atuarem como precursores da vitamina A e como antioxidantes (DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ, PAREDES-LÓPEZ, 2000; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; LOBATO, *et al.*, 2013; Da SILVA *et al.*, 2016). Dietas baseadas na ingestão adequada de carotenoides, principalmente o β -caroteno (encontrado em frutas e verduras), reduzem o risco de doenças coronárias e proporcionam menores danos a molécula do DNA (AGUILO, 2015; CHAVES, 2015).

O β -caroteno é o pigmento responsável pela cor da cenoura e de maior atividade pró-vitamina A (CARDOSO, 1997), por causa de seus dois anéis β -ionona (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Esse composto é reconhecido como bioativo, por apresentar propriedades antioxidantes e capacidade de sequestrar e eliminar espécies reativas do oxigênio (CARDOSO, 1997; CHAVES, 2015; HALLIWEEL, 2015).

Apesar da elevada atividade antioxidante, este carotenoide apresenta baixa estabilidade na presença de luz, oxigênio, alta temperatura e baixo pH, o que limita o seu emprego nos alimentos (GONNET, LETHUAUT, BOURY, 2010; LOBATO *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-HUEZO *et al.*, 2004; TELEKI, HITZFELD, EGGERSDORFER, 2013).

As vantagens recém mencionadas que associam a ingestão de β -caroteno a hábitos saudáveis de alimentação, são melhores exploradas quando é realizada a aplicação deste composto bioativo em alimentos *in natura* ou processados, uma vez que a procura pelos consumidores, por alimentos práticos, rápidos, saudáveis e de qualidade elevada tem sido cada vez mais notória. Fatores socioeconômicos vêm influenciando diretamente sobre a

demanda de produtos alimentícios, o que exige que o setor alimentício ofereça em um maior grau produtos de consumo imediato, de fácil preparo e ao mesmo tempo nutritivos (OMS-LIU *et al.*, 2008).

Nesse cenário, surgem como opção os vegetais minimamente processados, que vêm ganhando espaço em muitas gôndolas de supermercados e lojas (PAGANI, 2012). De acordo com Cenci (2011), produtos minimamente processados (PMP) são frutas ou hortaliças modificadas fisicamente, mas que mantêm o seu estado fresco e metabolismo ativo. Entretanto, os PMP apresentam algumas desvantagens quando comparados aos íntegros, como o escurecimento enzimático, custo elevado em relação ao produto convencional e são bastante perecíveis em relação aos produtos integro (AGUILO, 2015).

O presente trabalho, para minimizar o escurecimento enzimático, é feita a incorporação do β -caroteno encapsulado nas maçãs (MP), uma vez que este é considerado um componente antioxidante, e que pode retardar a oxidação das maçãs, inibindo a alteração de cor e odores desagradáveis, além de promover ação provitamínica A no organismo humano (ALVES-RODRIGUES, SHAO, 2004; HAMERSKI *et al.*, 2013; YÚFERA, 1998).

No sentido nutricional, populações em risco de deficiência de vitamina A, dependem de carotenoides provitamínicos A para atingirem suas recomendações diárias (ROCK *et al.*, 1998). A deficiência da vitamina A (hipovitaminose A) é um problema nutricional em todo o mundo, sendo frequentemente associada a má nutrição (RIVEIRA, CANELA-GARAYOA, 2012; ROSS, 2012). No Brasil a hipovitaminose A é considerada uma das principais deficiências na área da saúde pública e nos países em desenvolvimento 50 milhões de crianças apresentam carência dessa vitamina, o que pode originar xerofthalmia, cegueira e morte (PENTEADO, 2003).

Portanto, a fortificação é uma alternativa sustentável que visa reduzir deficiências de micronutrientes em populações vulneráveis, pelo aumento do seu teor em alimentos básicos da dieta. O aporte da vitamina A via dieta é representada basicamente por fontes de provitamina A presentes nos alimentos de origem vegetal, uma vez que os alimentos de origem animal, fornecedores de vitamina A, apresentam custo elevado para as populações de países em desenvolvimento (MILLS *et al.*, 2009). Deste modo, medidas a curto e médio prazo, como a suplementação medicamentosa e a fortificação de alimentos devem ser considerados para minimizar a deficiência de vitamina A, podendo se focalizar no consumo de alimentos, como frutas e vegetais MP que contêm carotenoides com maior acessibilidade.

Portanto, o papel do β -caroteno na saúde pública torna-se muito relevante (PENTEADO, 2003).

Porém, o uso do β -caroteno livre nos alimentos pode ser limitado, devido a sua baixa solubilidade em matrizes ricas em água e baixa biodisponibilidade; no entanto a técnica da nanoencapsulação pode representar uma alternativa para permitir a solubilização e proteger este pigmento contra os danos térmicos e fotodegradação (ANTON *et al.*, 2008 ; Da SILVA *et al.*, 2016); HASAN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2003; STENEKES *et al.*, 2000; TAN, NAKAJIMA, 2005; WEISS, *et al.*, 2006;

De acordo com Assis *et al.* (2012), a nanoencapsulação consiste em um processo em que uma fina cobertura polimérica envolve sólidos, líquidos ou gases formando nanopartículas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas. O material encapsulado é denominado núcleo, composto bioativo ou fase interna. Enquanto, a cobertura pode ser designada como material de parede, carreador, membrana, casca ou revestimento (DA a SILVA *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2015; HORST, 2009; LOBATO *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos evidenciam as vantagens da encapsulação de carotenoides. Tan, Nakajima (2005) estudaram a estabilidade do β -caroteno encapsulado pelo método de emulsificação-*evaporação* utilizando hexano na fase orgânica e tween 20[®] como emulsificante. As nanodispersões apresentaram diâmetro de 40 a 260 nm e foi verificada que após 12 semanas de armazenamento à 4° C, ainda permanecia de 25 a 56% de β -caroteno no sistema. Dos Santos *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade do licopeno nanoencapsulado, preparado pela técnica de deposição interfacial do polímero poli- ϵ -caprolactona, durante a fotossensibilização (5° C à 25° C), aquecimento (60° C à 80° C) e refrigeração a (5° C). Os autores concluíram que a nanoencapsulação fornece efeito protetor que impede a rápida degradação do licopeno sob fatores como luz, oxigênio e temperatura. A nanoencapsulação além de proteger, pode prolongar a sua capacidade de extinguir o oxigênio singlete.

Deste modo, é importante a associação da tecnologia de nanoencapsulamento de carotenoides, como o β -caroteno, com a de PMP, o que pode oferecer alimentos saudáveis de alto valor nutricional ao consumidor.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e aplicar nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões contendo β -caroteno em maçãs cv. Gala minimamente processadas, como também avaliar a estabilidade físico-química desses produtos durante sua vida útil sob refrigeração.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir nanocápsulas de núcleo lipídico pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado utilizando como material de parede poli- ϵ -caprolactona (PCL) e nanoemulsões contendo β -caroteno;
- Caracterizar as formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico e de nanoemulsões contendo β -caroteno quanto ao tamanho e índice de polidispersão por difração a laser;
- Realizar o processamento mínimo de maçãs cv. Gala com a aplicação de nanocápsulas e nanoemulsões de β -caroteno como aditivo fortificador;
- Avaliar as características físico-químicas (textura, pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, teor de carotenoides) das maçãs minimamente processadas contendo β -caroteno nanoencapsulado (β -caroteno na forma de nanocápsulas e nanoemulsões);
- Acompanhar a estabilidade físico-química (textura, pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, perda de peso, teor de carotenoides) das maçãs minimamente processadas contendo β -caroteno armazenadas sob refrigeração durante sua vida útil.

3. APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está dividida na forma de capítulos. Sendo que no capítulo I encontra-se uma revisão bibliográfica dos principais aspetos inerentes a dissertação. No capítulo II estão descritos os materiais e métodos utilizados durante a realização do trabalho, para a obtenção das formulações produzidas (nanocápsulas e nanoemulsões), caracterização das formulações obtidas; e aplicação destas em matriz alimentar. No capítulo III, consta o artigo produzido a partir dos resultados obtidos. No capítulo IV, uma discussão geral e conclusão do trabalho.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4. REVISÃO

4.1. Compostos Bioativos

Evidências científicas demonstram que há uma grande melhoria em relação a saúde e redução de doenças crônicas, devido ao consumo de vegetais (frutas, hortaliças, cereais e alimentos derivados) e isto ocorre em virtude da presença de compostos bioativos. Estas substâncias bioativas ou metabólitos secundários de origem vegetal, também são designadas fitoquímicos ou fitonutrientes (AJILA *et al.*, 2007; BELNSTEIN, 2001; HANNUM, 2004).

Portanto, vários estudos *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado que estes compostos são responsáveis pela alta atividade antioxidante e antiinflamatória, associada a propriedades benéficas à saúde. Assim, podem ser classificadas como substâncias funcionais, promovendo o bem-estar e a saúde (KWAK, JUKES, 2001; YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

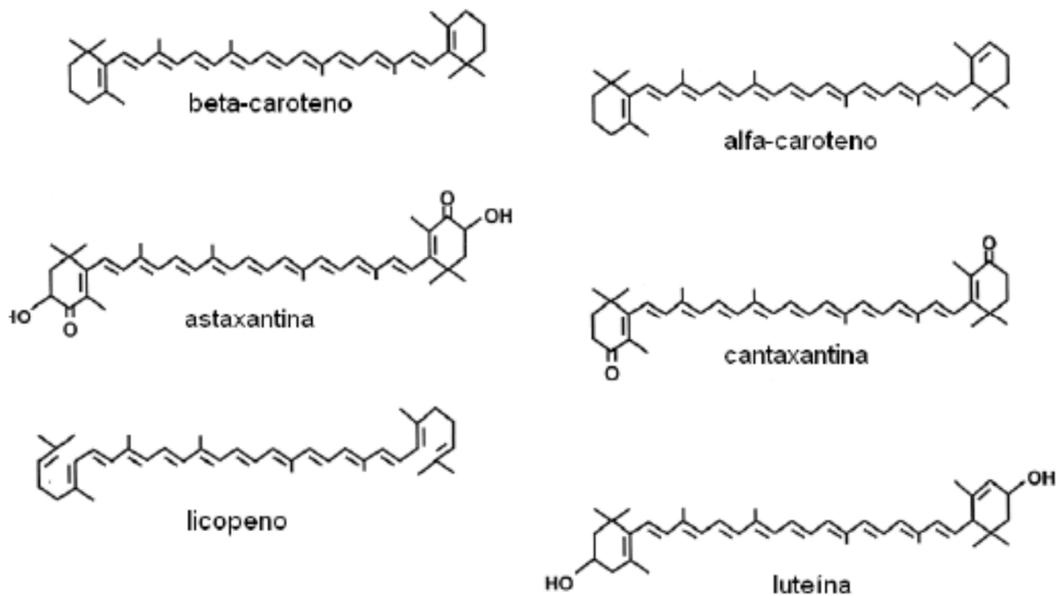
De acordo com a resolução RDC n° 2 de 07 de janeiro de 2002, compostos bioativos são aqueles que estão presentes em fontes alimentares, sendo estes de origem natural ou sintética, que possuem ação metabólica ou fisiológica específica, desde que comprovada à segurança para o consumo humano (BRASIL, 2002). Existem diversos compostos bioativos, os quais são amplamente estudados devido aos grandes benefícios por eles proporcionados. Estes compostos, na sua classificação fazem parte do reino vegetal, são substâncias orgânicas de baixo peso molecular e o organismo humano não é capaz de sintetizá-los, sendo que para a obtenção destes, é necessário o consumo de alimentos que os tenham e quando consumidos de maneira equilibrada são promotoras do bem-estar e saúde (HOLST, WILLIAMSON, 2008).

Os compostos bioativos são constituintes extra nutricionais e ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos, sendo estes pertencentes as classes dos alcaloides, compostos nitrogenados, compostos organossulfurados, compostos fenólicos e carotenoides (FERREIRA, ABREU, 2007).

4.2. Carotenoides

Os carotenoides são uma classe de pigmentos naturais, responsáveis pela cor que vai desde o amarelo até o vermelho de frutas, flores e folhas, sendo que neste último pode ser mascarado pela presença da clorofila (UENEJO, JUNIOR; PASTORE, 2007; VALDUGA *et al.*, 2009; Da SILVA *et al.*, 2016; Da SILVA *et al.*, 2017). Na natureza existem cerca de 600 carotenoides, os principais encontrados em vegetais são o α -caroteno, β -caroteno, licopeno, zeaxantina e criptoxantina (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010), como apresentado na figura 01.

Figura 01: Principais carotenoides encontrados nos vegetais.



Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA *et al.* (2008).

4.2.1. Estrutura Química dos Carotenoides

Os carotenoides são definidos como tetraterpenoides (hidrocarbonetos de ocorrência natural e seus derivados), ou seja, a união de 8 unidades isoprenoides, formando um esqueleto com uma cadeia carbônica de 40 átomos de carbono, exceto a crocetina e a bixina que possuem menos que 40 átomos de carbono na cadeia carbônica (HAMMOND, RENZI, 2013). A cadeia carbônica de alguns carotenoides apresenta um ou dois anéis β -ionona nas extremidades (De MORAIS, 2006).

A estrutura química dos carotenoides é composta por ligações simples e duplas de forma alternada ou conjugada (Figura 01), (LEMMENS, 2014). Os carotenoides possuem grupo cromóforo com capacidade de absorção da luz na região do visível a um comprimento de onda de 450 μm , responsável pela cor dos alimentos e o aumento no número de ligações conjugadas resulta em maiores bandas de absorção de comprimentos de onda maiores, que tornam os carotenoides mais avermelhados (FERNÁNDES *et al.*, 2012)

Por outro lado, são classificados em dois grandes grupos, os carotenos ou hidrocarbonetos carotenoides, constituídos por átomos de carbono e hidrogênio, por exemplo o licopeno e β -caroteno; e as xantofilas ou carotenoides oxigenados, constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio na estrutura da molécula, podendo ser epóxi, carbonila, hidroxí, grupos funcionais metoxi ou ácido carboxílicos, exemplos são cantaxantina (oxo), zeaxantina (hidroxí), espiriloxantina (metoxi) e torularodina (ácido carboxílicos) (G. BRITTON, 2004, HAMMOND, RENZI, 2013; RODRIGUES AMAYA, 1999; OLIVEIRA, 2000;).

As ligações duplas podem ocorrer na forma *cis* ou *trans*, sendo a forma *trans* mais frequentemente encontrada na natureza. Estas são estáveis na faixa de pH de 3,0 à 7,0 da maioria dos alimentos (RIBEIRO, 2008).

O processamento e a estocagem de alimentos podem provocar a isomerização das moléculas dos carotenoides, o que altera a cor dos mesmos. Os compostos com todas as ligações na forma *trans* apresentam uma cor mais escura, em contrapartida, o aumento de ligações *cis* resulta em um enfraquecimento gradual da cor (YUFERA, 1998).

4.2.2. Solubilidade

Os carotenoides são moléculas lipossolúveis ou solúveis em lipídeos e em solventes orgânicos como éter de petróleo, éter etílico, metal sulfureto de carbono clorofórmio e acetona (BOBBIO, BOBIO, 2001) limitando a utilização destes em água devido a sua baixa solubilidade em alimentos não lipofílicos, exceto quando ocorre a formação de complexos com proteínas. Estes dissolvem nos lipídios e em alguns casos, formando soluções coloidais (PENTEADO, 2003; RIBEIRO, 2008).

4.2.3. Espécies Reativas e Atividade Antioxidante

As espécies reativas (ERs), são produzidas pelo metabolismo aeróbico, a partir do oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) que é a forma estável do oxigênio na atmosfera, este reage com moléculas contendo carbono e hidrogênio para obtenção de energia e calor. Por outro lado, pode ser obtido por disfunções biológicas (infecções) e fontes exógenas, como o consumo de bebidas alcoólicas e consumo de cigarro e pesticidas (PISOSCHI, POP, 2015).

As espécies reativas (ERs) quando ligadas ao átomo de oxigênio são designadas de espécies reativas de oxigênio (EROs), por exemplo os radicais peroxil (ROO^*), radical hidroxil ($^*\text{OH}$) e o radical superóxido (O_2^*) e não-radicalares, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quando ligadas aos átomos de nitrogênio são designadas espécies reativas de nitrogênio (ERNs), por exemplo o dióxido de nitrogênio (NO_2^-) e óxido nítrico (NO^-) e os não radicalares, o ácido nitroso (HNO_2) (HALLIWELL, 2001; GIASSON *et al.*, 2002).

Dentre as EROs o radical ($^*\text{OH}$) é a espécie mais reativa, a qual é causadora de danos oxidativos em macromoléculas de DNA, proteínas, lipídeos e aminoácidos (HALLIWELL, GUTTERRIDGE, 1990). No entanto, as ERs são produzidas de forma controlada por causa dos antioxidantes, portanto, quanto maior for a produção de EROs e ERNs comparativamente aos antioxidantes é gerado o estresse oxidativo (PISOSCHI, POP, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Culminando com complicações de saúde como a diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, artrite e envelhecimento precoce (HALLIWELL, 2015; OZDEMIRETI, 2009; RAO *et al.*, 2011).

Os carotenoides atuam como antioxidantes suprimindo o oxigênio singlete e ligando-se aos radicais ROO^* para inibir a peroxidação lipídica, devido a variação da estrutura química

relacionada ao sistema de ligações duplas conjugadas que confere alta reatividade, grupos funcionais ligados aos anéis e grupos terminais (cíclicos e acíclicos) (CHITARRA, CHITARRA, 2005; TIRAPEUI *et al.*, 2002). Por exemplo, o sequestro do radical ROO·, ocorre com a adição deste às ligações duplas da estrutura da molécula do carotenoide inibindo assim a peroxidação lipídica (BARREIROS, DAVID, 2006).

Os carotenoides ao combaterem as espécies reativas de oxigênio, podem interagir de três maneiras diferentes (Figura 02): transferência de elétron, remoção de íons de hidrogênio ou adição de espécies radicalares, respectivamente reação 1, 2 e 3 (De MORAIS, 2006; LINO, 2012).

Figura 02: Reações de carotenoides e radicais livres.



Onde: ROO* é o radical, CAR é o carotenoide.

Fonte: De MORAIS (2006).

Evidências científicas têm demonstrado os efeitos sobre a saúde relacionados ao consumo desta classe de compostos, em virtude da sua elevada atividade antioxidante contra danos oxidativos causados pelos EROs. Esses efeitos estão intimamente associados à proteção contra a degeneração macular, cataratas, câncer e doenças cardiovasculares (EVANS, JOHNSON, 2010; DANIELS *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2014; SINDHU *et al.*, 2013; SHARONI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2016).

4.2.4. Atividade Pro-vitamínica dos Carotenoides

Além da atividade antioxidante apresentada pelos carotenoides, alguns desses possuem a propriedade de serem convertidos em vitamina A. Essa conversão ocorre no fígado, com a clivagem na posição central da molécula, pela enzima 15, 15'-dioxigenase, produzindo duas moléculas de vitamina A (MOHAMED *et al.*, 2001). Sendo está uma capacidade contemplada

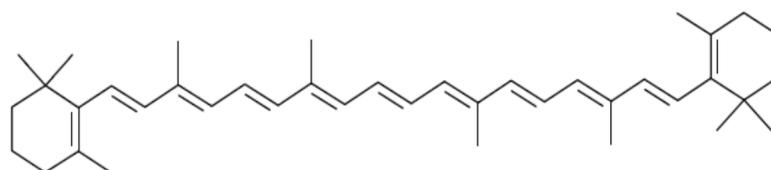
pelo β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina e estes são geralmente encontrados em alimentos como a batata doce, cenoura, abóbora, vegetais folhosos e em variadas frutas (COURRAND *et al.*, 2013). Para tal, é necessário que estes compostos tenham na sua estrutura pelo menos um anel β -ionona não substituído, uma cadeia lateral isoprenoide com 11 átomos de carbono e com a terminação das funções aldeído, carboxila ou álcool (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Todavia, o β -caroteno é o carotenoide de maior atividade pró-vitáminica A, ao qual atribui-se 100% de atividade. Por sua vez, o α -caroteno e a β -criptoxantina tem cerca de 50% da atividade pró-vitáminica A (RODRIGUES-AMAYA, KIMURA, 2004; RIBEIRO, 2008).

4.3. β -Caroteno

O β -caroteno, (Figura 03) é um carotenoide dicíclico com anéis β -ionona em ambas as extremidades da molécula (CADENAS, PACKER, 2002, GONNET *et al.*, 2010). Esse composto ocorre na natureza associado a um certo número de pigmentos quimicamente relacionados e tem sido utilizado como corantes em alimentos (SOCACIU, 2008).

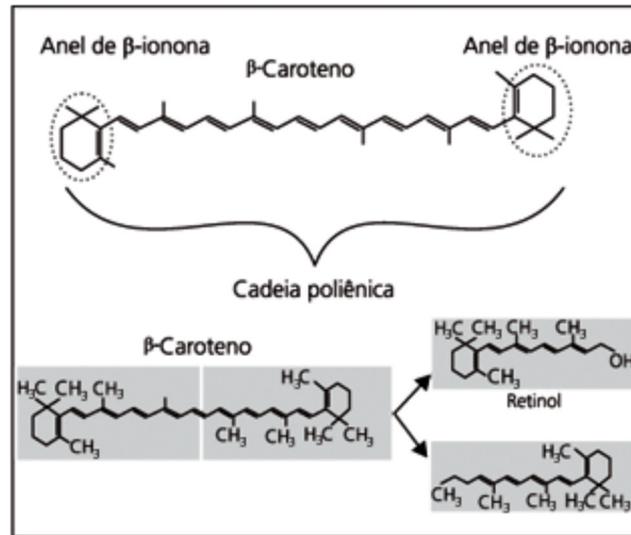
No entanto, o β -caroteno exibe simetria molecular interna, onde uma metade da molécula é idêntica à outra metade, propriedade esta que proporciona a clivagem do β -caroteno (Figura 04), produzindo duas moléculas idênticas de retinol, tornando este o carotenoide de maior potencial provitaminico A (CADENAS, PACKER, 2002, GONNET *et al.*, 2010).

Figura 03: Estrutura química do β -caroteno.



Fonte: BRITTON *et al.* (2008)

Figura 04: Estrutura química e clivagem do β -caroteno.

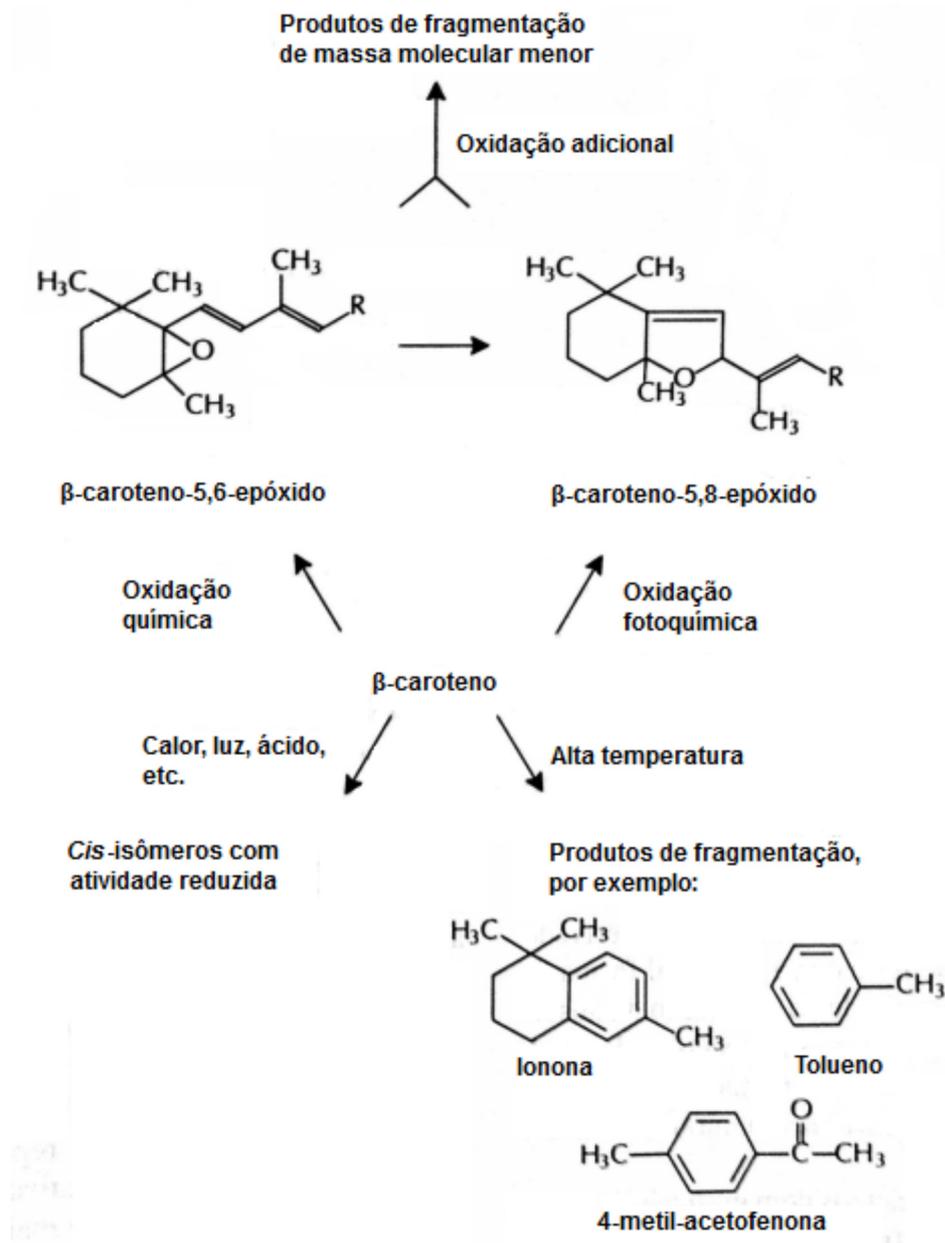


Fonte: LINO (2012).

Grande parte do β -caroteno hoje utilizado é produzido através de síntese química, resultando em uma molécula equivalente ao que se encontra na natureza. Porém fontes naturais são cada vez mais utilizadas para substituir a variante sintética (SOCACIU, 2008).

A oxidação do β -caroteno envolve a formação do 5,6-epóxido, o qual pode isomerizar para 5,8-epóxido. Oxidações induzidas por meio fotoquímico geram mutacromos como produtos primários da degradação e, como produto final, compostos de peso molecular baixo (Figura 05) (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Como resultado da formação destes compostos ocorre à perda total da cor e da atividade biológica (RODRIGUES-AMAZA, 2001). Altas temperaturas, o β -caroteno também pode fragmentar formando compostos de baixo peso molecular (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Figura 05: Degradação do β -caroteno.



Fonte: DAMODARAN, PARKIN, FNNEMA (2010).

O β -caroteno tem a capacidade de agir como antioxidante, por desativação do oxigênio singlete, superóxidos e radical hidroxil, assim como por reação com radicais livres peroxil ($\text{ROO}\cdot$). Esses radicais atacam o β -caroteno formando o $\text{ROO-}\beta$ -caroteno \cdot , no qual o radical peroxil se liga à posição C7 do β -caroteno, enquanto um par de elétrons desemparelhado é

removido, ao longo do sistema de ligações duplas conjugadas (DAMODARAN, PARKIN, FNNEMA, 2010).

Porém, a utilização industrial deste, torna-se difícil devido a sua instabilidade sob fatores como calor, luz e oxigênio, sendo sua degradação muito rápida em condições ambientais, apresentando baixa estabilidade em relação aos antioxidantes sintéticos (GONNET et al., 2010; MATTEA *et al.*, 2009; TELEKI, 2013).

No entanto, por não existir uma legislação que estabeleça o valor da ingestão diária recomendada de β -caroteno, o teor desta foi baseado na ingestão diária de vitamina A. De acordo com a RDC nº269 de 22 de setembro de 2005, recomenda-se a ingestão de 600 μ g de retinol para adultos, o que equivale a aproximadamente 3,6 μ g de β -caroteno (BRASIL, 2005).

4.4. Fortificação

Fortificação ou enriquecimento de alimentos é um método utilizado para reforçar o valor nutritivo dos alimentos, favorecendo a prevenção às carências nutritivas (BRASIL, 2007; WHO, 2006).

De acordo com a Legislação Brasileira é considerado alimento fortificado aquele que é permitido o enriquecimento ou fortificação desde que 100 mL ou 100 g do produto, pronto para consumo, forneçam no mínimo 15% da ingestão diária recomendada (IDR) de referência, no caso de líquidos, 30% da IDR de referência, no caso de sólidos. Podendo ser considerado fortificado/enriquecido e declarado no rótulo "alto teor" ou "rico", conforme o Regulamento Técnico de Informação Nutricional Complementar (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1998).

De acordo com Vellozo e Fisberg (2010), a OMS reconhece quatro tipos de fortificação de alimentos, tais como 1-A fortificação universal ou em massa, esta que ocorre de forma obrigatória e consiste na adição de micronutrientes a alimentos consumidos pela maioria da população; 2- É indicada em países onde vários grupos populacionais apresentam risco elevado para deficiência de ferro; 3- Fortificação em mercado aberto, iniciativas das indústrias de alimentos, com o objetivo de agregar maior valor nutricional aos seus produtos; 4-Fortificação focalizada em aquela que visa o consumo dos alimentos enriquecidos por

grupos populacionais de elevado risco de deficiência. Pode ocorrer de forma obrigatória ou voluntária, de acordo com a significância em termos de saúde pública.

A fortificação domiciliar comunitária, tem sido considerada e explorada em países em desenvolvimento. Pode ter sua composição programada e é de fácil aceitação pelo público-alvo. Porém, apresenta ainda custo elevado, diferentemente das outras formas, e requer que a população seja orientada. Neste tipo de fortificação geralmente são adicionados suplementos às refeições. Para além de agregar valor nutricional, a fortificação de alimentos tem como vantagens, não requerer a mudança de hábitos alimentares, baixo risco de intoxicação, importante em locais com baixa disponibilidade de alimentos fontes de vitaminas e minerais (BRASIL, 2007; WHO, 2006).

No entanto, os micronutrientes mais estudados e aplicados às técnicas da fortificação de alimentos são o ferro, ácido fólico, vitamina D, cálcio, zinco e vitamina A (LOBO; TRAMONTE, 2004). A fortificação com vitamina A é realizada com a utilização de carotenoides, pelo fato destas apresentarem menor toxicidade quando comparados com a vitamina A na sua forma íntegra (ZANCUL, 2004)

No Brasil, por exemplo, existem políticas públicas de fortificação de alimentos, como a fortificação das farinhas com ferro e ácido fólico, fortificação da alimentação infantil com micronutrientes e a fortificação do sal com iodo. Sendo este último é essencial para a produção de hormônios tireoidianos, responsável pelo metabolismo e crescimento físico e neurológico (BRASIL, 2007).

A deficiência de vitamina A é um grave problema de saúde pública mundial. Em longo prazo a fortificação de alimentos com vitamina A é uma alternativa efetiva (MILAGRE, 2007).

4.5. Nanoencapsulação

A nanotecnologia é uma área emergente da ciência que estuda materiais e elementos de pequenas dimensões, na escala nanométrica (AGUILO, 2015). As recentes aplicações da nanotecnologia em sistemas alimentares estão centradas, principalmente, em produtos funcionais, embalagens e controle microbiano (CUSHEN *et al.*, 2011).

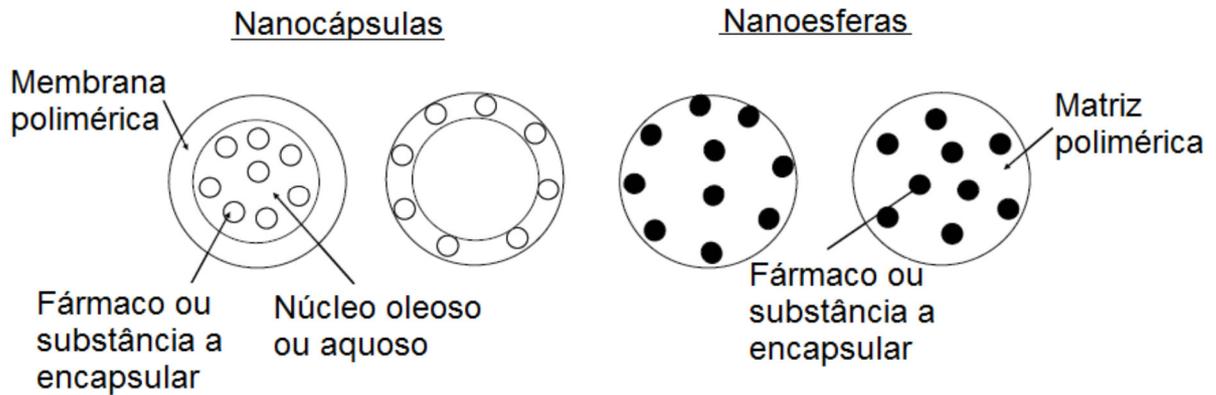
De acordo com DURAN, MATTOSO, MORAIS. (2006), nanopartículas são sistemas carregados de compostos bioativos que apresentam diâmetro inferior a 1000 nm. O uso de

nanopartículas vem crescendo consideravelmente, pelo fato de conferirem maior estabilidade, solubilidade, absorção intracelular e a liberação controlada do composto bioativo, devido ao seu reduzido tamanho (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; ANTON, 2008). As nanopartículas compreendem as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si pela presença ou ausência de óleo em suas composições (Figura 06). Nanoesferas são estruturas sólidas na qual a substância bioativa de interesse é dispersa numa matriz polimérica sólida. As nanocápsulas, tem uma estrutura típica de membrana-núcleo onde o núcleo, frequentemente oleoso, é revestido pelo material polimérico, podendo o composto bioativo estar dissolvido neste núcleo ou adsorvido a parede polimérica. O núcleo das nanocápsulas pode ser aquoso ou oleoso, e a escolha do tipo de núcleo depende da natureza do composto bioativo (lipofílico ou hidrofílico), que se pretende encapsular, podendo o composto bioativo estar na forma líquida ou sólida ou como dispersão molecular (FATHI, MOZAFARI, MOHEBBI, 2012; FESSI *et al.*, 1998). As cápsulas podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho, macrocápsulas (>5000nm), microcápsulas (200-5000nm) e nanocápsulas (<200 nm) (AZEVEDO, 2005).

Neste contexto, de acordo com Khayata *et al.* (2012) e Leo *et al.* (2004) muitos métodos têm sido utilizados para a síntese de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros biodegradáveis tais como a nanoprecipitação e emulsificação com a evaporação do solvente (BYUN *et al.*, 2011; TAN, NAKAJIMA, 2005). No entanto, O método da nanoprecipitação, é chamado de deposição interfacial do polímero pré-formado ou método de deslocamento do solvente (FESSI *et al.*, 1998), sendo este um método simples, rápido e facilmente reproduzível, razão pela qual é o método mais utilizado para a síntese das nanocápsulas, aliado a obtenção de nanopartículas com alta eficiência de encapsulação e por ser efetivo para nanoencapsular compostos lipofílicos (FESSI *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2008).

De acordo com Anton. (2008); Dos Santos *et al.* (2016); Hans, Lowman (2002); Huang *et al.* (2010); Letchford, Burt (2007); Shao *et al.* (2003) para a síntese das nanocápsulas são utilizados produtos naturais ou sintéticos, tais como alguns polissacarídeos de plantas (goma arábica), goma xantana e os sintéticos homopolímeros de poliéster, tais como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade.

Figura 06: Estruturas para diferentes modelos de nanopartículas.

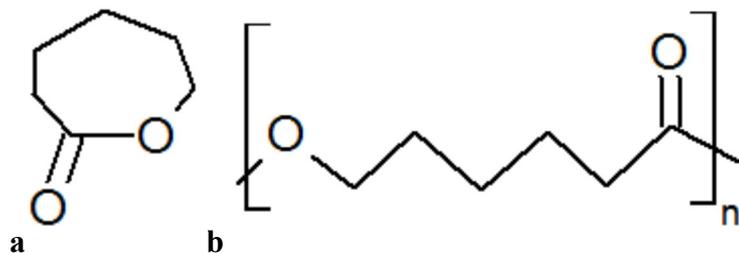


Fonte: HERCULANO (2014).

Nos últimos anos, alguns estudos têm utilizado nanocápsulas em aplicações alimentares com o PCL como sistema de suporte para os ingredientes bioativos alimentares (ZOMBRANO-ZARAGOZA, 2014). A poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um biopolíester, uma importante classe de polímeros biodegradáveis formados a partir da abertura do anel do monômero ϵ -caprolactona seguido por polimerização (Figura 07) (LINO, 2012).

Uma das vantagens da utilização do PCL como material de parede, reside no fato de este ser um polímero biodegradável e o produto de degradação, o ácido ϵ -hidroxicaproico, é inócuo, podendo ser absorvido pelo organismo e depois removido por metabolismo (DURAN, 2006).

Figura 07: Estrutura química da (a) ϵ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$. b) Estrutura da poli- ϵ -caprolactona representada pela sua unidade monomérica, a ϵ -caprolactona, com anel aberto



Fonte: LINO, 2012.

Já a nanoemulsão consiste numa dispersão muito fina composta por uma fase de óleo e uma fase aquosa, com tamanho de gota, em escala manométrica (SANGUANSRI, AUGUSTIN, 2006). Em função do seu tamanho, quando o tamanho das gotículas é inferior a 200 nm, estas são transparentes ou translúcidas e quando o tamanho de gotículas se encontra entre 200-500nm, estas são leitosas e possuem estabilidade contra sedimentação (PONTES, 2001).

4.6. β -caroteno nanoencapsulado

Nos últimos anos, foi observado um aumento significativo na aplicação da nanotecnologia (LOBATO *et al.*, 2013). De acordo com DURAN, MATTOSO; MORAIS (2006), a nanotecnologia é uma área de pesquisa e desenvolvimento ampla e multidisciplinar, uma vez que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, compósitos e biomateriais). Na área de alimentos, a identificação bacteriana e monitoramento de controle de qualidade usando biosensores, sistemas de embalagens ativas são exemplos de aplicação da nanotecnologia (LOBATO *et al.*, 2013). Porém, a nanoencapsulação é uma tecnologia desenvolvida para proteger substâncias gerando partículas com dimensões manométricas pelo uso de técnicas, como nanoemulsificação, nanocompositos e nanoestruturação, aumentando assim a estabilidade e promovendo a funcionalidade, que inclui a liberação controlada dos compostos bioativos. Diversos autores relatam a importância da nanoencapsulação, pois essa técnica é responsável pela maior estabilidade e funcionalidade dos compostos encapsulados, o que inclui também a liberação controlada dos compostos bioativos tais como, antioxidantes, ômega-3, vitaminas, carboidratos e lipídios (ASSIS *et al.*, 2012; LOBATO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016).

Alguns estudos avaliaram o comportamento do β -caroteno nanoencapsulado, usando técnicas da nanoencapsulação para melhorar a estabilidade dos carotenoides. Por exemplo, TAN, NAKAJIMA (2005) estudaram a estabilidade de β -caroteno pelo método de emulsificação-evaporação utilizando hexano como fase orgânica e tween 20[®] como emulsificante. As nanodispersões apresentaram diâmetro de 40 a 260 nm e foi verificado que após 12 semanas de armazenamento à 4° C, o teor de β -caroteno foi de 25% em relação quantidade inicial de 56%.

Também foram produzidas nanocápsulas de β -caroteno, utilizando amido como material de parede, para adicionar em sucos, com as vantagens de melhorar a solubilidade do β -caroteno em água, prolongar a vida-de-prateleira de sucos enriquecidos com esse tipo de aditivo e melhorar a absorção corpórea (ASSIS *et al.*, 2012).

Em outro estudo, Da Silva *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade das nanocápsulas obtidas a partir de uma mistura de β -caroteno, α -caroteno e luteína (BALNs) e nanocápsulas de β -caroteno sintético (BNs). Os autores relataram que logo após o preparo ambas as formulações apresentaram alta eficiência de encapsulação (aproximadamente 100 %) e após 100 dias de armazenamento ainda restava cerca de $67,62 \pm 7,77$ % de β -caroteno nas BALNs e $11,69 \pm 1,65$ % de β -caroteno nas BNs. O teor de β -caroteno nas BALNs foi maior do que nas BNs, provavelmente devido ao sinergismo que ocorre entre os compostos (β -caroteno, α -caroteno e luteína).

Dos Santos *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade do licopeno nanoencapsulado, preparado pela deposição interfacial do polímero poli- ϵ -caprolactona, durante a fotossensibilização (5°C à 25°C), aquecimento (60°C à 80°C) e refrigeração (5°C). Os autores concluíram que a nanoencapsulação fornece efeito protetor que impede a rápida degradação do licopeno sob fatores como luz, oxigênio e temperatura. A nanoencapsulação além de proteger, pode prolongar a capacidade do licopeno em extinguir o oxigênio singlete.

Em um estudo realizado por Lobato (2013), foi avaliada a estabilidade das nanocápsulas de bixina (BIX-LNC) durante o armazenamento em temperatura ambiente (25°C) e durante experimentos de fotossensibilização à 5 , 15 , 25°C , utilizando rosa de bengala como sensibilizador em condições de saturação com ar e nitrogênio (N_2), durante 300 minutos. Além disso, observou-se a estabilidade térmica do sistema nanométrico de bixina durante aquecimento à 65 , 80 e 95°C , na ausência da luz, durante 120 minutos. Ambos os experimentos de sensibilização e aquecimento foram realizados em sistemas-modelo de etanol-água (2:8). A distribuição do tamanho das partículas (BIX-LNC) apresentou um perfil monomodal, com diâmetro médio de $199,00 \pm 1,80$ nm. As BIX-LNC foram obtidas com aproximadamente 100 % de eficiência de encapsulação. Durante o armazenamento as BIX-LNC foram consideradas estáveis por não apresentarem alterações significativas no diâmetro do potencial zeta. Após 119 dias de armazenamento o teor residual de bixina foi de $45,7 \pm 1,1$ % em relação ao inicial. Durante a fotossensibilização, a bixina livre apresentou energia de ativação de $7,09$ e $8,96$ Kcal/mol nas condições de saturação com ar e N_2 , respectivamente. A

bixina encapsulada (BIX-LNC) apresentou energia de ativação de 11,48 e 16,31 Kcal/mol sob as mesmas condições de saturação com ar e N₂. Nos experimentos de aquecimento, a bixina livre e encapsulada (BIX-LNC) apresentaram energia de ativação de 15,06 e 23,81 Kcal/mol, respectivamente. Dessa forma, a encapsulação demonstrou ser uma técnica adequada para proteger a molécula de bixina.

4.7. Produtos minimamente processados

Com o fenômeno da globalização, aliado a falta de tempo por motivos profissionais e a dinâmica do dia a dia, surgiram mudanças de comportamento alimentar e do estilo de vida da população mundial. Como consequência há um aumento considerável pela procura de alimentos minimamente processados (HOLTZ, 2006).

Oms-Liu *et al.* (2010) afirmam que o aumento na produção e no consumo de frutas minimamente processadas pode ser explicado pelo estilo de vida dos consumidores modernos, aliado ao fato da maior procura por produtos *in natura*, pelos seus grandes benefícios, evitando o consumo de alimentos industrializados.

Apesar dos produtos minimamente processados proporcionarem saúde e bem-estar, alguns autores como Paula *et al* (2009) afirmam que, ultimamente, vem crescendo o número de doenças infecciosas associadas ao consumo de frutas minimamente processadas que chama atenção da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e do INDEC (Instituto Brasileiro do Consumidor). Dessa forma, após o processamento estas deverão apresentar boa qualidade físico-química e microbiológica, pelo fato de serem bastante perecíveis. Os produtos minimamente processados (PMP) podem apresentar alterações indesejáveis, como o escurecimento enzimático. Essa desordem fisiológica é desencadeada durante as etapas de descascamento e corte dos produtos vegetais, pois nesse momento os substratos fenólicos localizados nos vacúolos entram em contato com as enzimas catalizadoras das reações de oxidação dos polifenóis que estão associadas as estruturas das membranas dos plasmídeos (SILVA *et al.*, 2007), levando a perda de vitaminas, ao escurecimento e a perda de sabor característico (SOUZA, DURIGAN, 2007).

Nesse contexto, a maçã é uma fruta que pode ser comercializada na forma de produto minimamente processado e representa a terceira fruta mais consumida pelas famílias Brasileiras (IBGE, 2010). Assim, destaca-se que o processamento de maçãs é de extrema

importância, tendo em conta a procura elevada deste produto. Contudo, é importante manter as características sensoriais do produto final, como cor, brilho, textura e sabor (HODGES, TOIVONEN, 2008).

4.8. Aditivos Aplicados sobre Maças Minimamente Processadas

A complexidade do processamento de alimentos associado a necessidade de aumentar a vida útil dos mesmos, torna o produto vulnerável a deterioração oxidativa. Portanto é necessário a utilização de substâncias capazes de oferecer proteção oxidativa (RICHARD-FORGET *et al.*, 1992).

De acordo com DAMODARAN, PARKIN, FNNEMA, 2010. (2010) muitas substâncias são incorporadas aos alimentos com o propósito funcional, no entanto quando usados em alimentos processados, são designados de aditivos alimentares.

Alguns aditivos, como sal, sacarose, antioxidantes, cloreto de cálcio, ácido ascórbico e corantes podem ser utilizados para prevenir o escurecimento enzimático, aumentar a vida de prateleira e melhorar a estabilidade, propriedades organolépticas e nutritivas dos produtos minimamente processados (RIBEIRO, 2008).

Por exemplo, o cloreto de cálcio tem mostrado efeito positivo quando aplicado por imersão em frutos e hortaliças, minimamente processadas, tornando as células dos tecidos vegetais mais estruturadas. (MELO *et al.*, 2009).

Deste modo, uma alternativa inovadora seria a utilização do β -caroteno nanoencapsulado e nanoemulsionado. Isso com o objetivo de diminuir a susceptibilidade à oxidação, melhorar a solubilidade, melhorar a absorção corpórea e contribuir nutricionalmente, já que o β -caroteno é considerado um suplemento vitamínico (FAVORO-TRINDADE *et al.*, 2008; WEISSE *et al.*, 2006)

CAPITULO II-MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Compostos Bioativos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As análises de caracterização físico-químicas das formulações nanométricas desenvolvidas foram feitas em parceria com a Faculdade de Farmácia, também pertencente a mesma Instituição.

5.1. Materiais

Foram utilizados o Polímero PCL (Poli- ϵ -caprolactona), o Span 60[®] (monoestearato de sorbitano), o TCM (Triglicerídeos de cadeia média), a acetona, o β -caroteno sintético (sigma Aldrich[®], USA), o Tween 80[®] e a água milli-Q[®]. Os demais compostos químicos utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico.

As maçãs “Galas” (*Malus domestica* Borkh) utilizadas no experimento, foram adquiridas na cidade de Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil. Foram colhidas após atingirem a maturidade (75% da superfície com cor vermelha). Os frutos foram transportados para o Laboratório de Compostos Bioativos (Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

5.2. Obtenção das nanocápsulas de β -caroteno de núcleo lipídico

As nanocápsulas de β -caroteno de núcleo lipídico foram preparadas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, de acordo com a metodologia descrita por Venturini *et al.* (2011), onde foram preparadas duas fases, uma orgânica e outra aquosa.

O polímero poli- ϵ -caprolactona (0,5g), TCM (800 μ l), Span 60[®] (0,19g), foram dissolvidos em uma mistura de acetona (270 mL) e etanol (15 mL), a qual permaneceu sob agitação magnética à 40° C em banho-maria durante 40 minutos (Figura 08). Após homogeneização do PCL, TCM e Span 60[®], o β -caroteno sintético a uma concentração de 30 μ g/mL foi acrescido e mantido sob agitação durante 10 minutos à 40°C, com isso obteve-se a fase orgânica da formulação de nanocápsulas. Esta fase orgânica foi injetada sobre a fase aquosa, aquela produzida com Tween 80[®] e água MilliQ[®] (Figura 8a). Essa mistura permaneceu sob agitação magnética por 10 min à 25°C. A formulação de nanocápsulas (30

$\mu\text{g/mL}$ de β -caroteno) foi reduzida por meio de rota-evaporador, até atingir um volume final de 50 mL (figura 8b e 8c).

Figura 08: (a) Injeção da fase orgânica na fase aquosa da nanocápsula; (b) evaporação e (c) Nanocápsula contendo β -caroteno de $30\mu\text{g/mL}$.

a



b



c



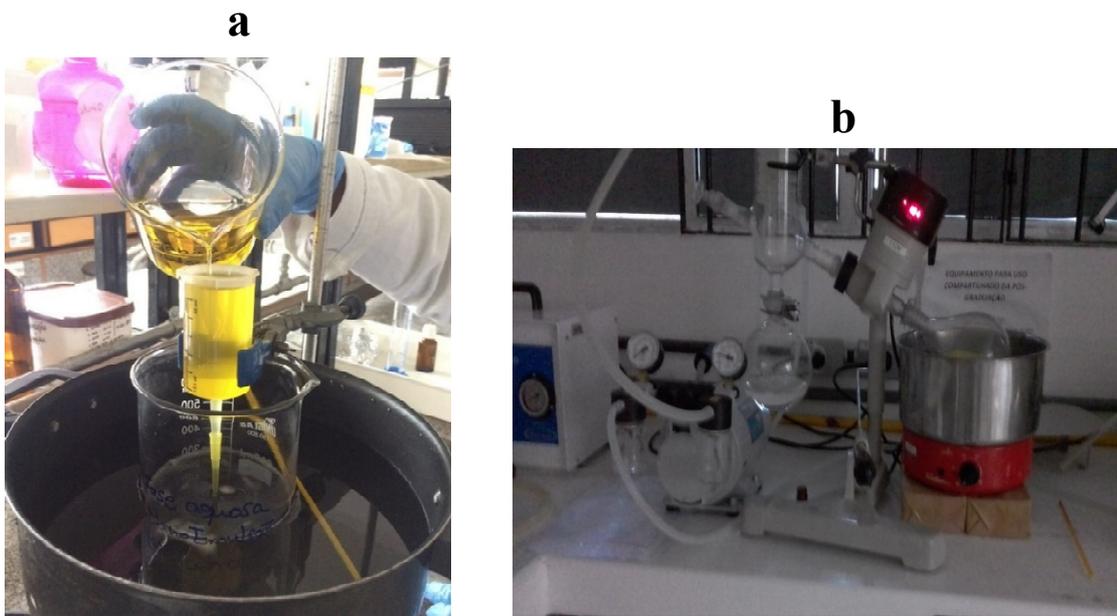
Fonte: do autor

5.3. Obtenção da nanoemulsão de β -caroteno

Estas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Venturini *et al.* (2011), aonde foram preparadas duas fases, uma orgânica e outra aquosa. Um diferencial é que na fase orgânica da nanoemulsão não foi utilizado o PCL (material de parede).

O TCM (800 μ l), Span 60[®] (0,19g), foram dissolvidos em acetona (270mL) e etanol (15mL), configurando uma mistura que permaneceu sob agitação magnética à 40° C em banho-maria durante 40 minuto. Após homogeneização do TCM e Span 60[®], o β -caroteno foi acrescido ao meio e mantido sob agitação durante 10 minutos à 40° C, com isso obteve-se a fase orgânica da formulação de nanoemulsão. A fase orgânica foi injetada sobre a fase aquosa, a qual foi produzida com Tween 80[®] e água MilliQ[®] (Figura 9a). Essa mistura permaneceu sob agitação magnética por 10 min à 25 °C. A solução da nanoemulsão (30 μ g/mL de β -caroteno) foi reduzida por meio de rota-evaporador até atingir um volume final de 50 mL. (Figura 9b e 9c).

Figura 09: (a) Injeção da fase orgânica na fase aquosa da nanoemulsão; (b) evaporação e (c) Nanoemulsão contendo β -caroteno de 30 μ g/mL



c

Fonte: do autor

5.4. Caracterização das formulações produzidas

Após síntese das formulações (nanocápsula e nanoemulsão), estas foram caracterizadas utilizando as variáveis dependentes, o diâmetro do tamanho das partículas e o valor do span. Estas análises foram realizadas no mesmo período de armazenamento das maçãs “Gala”. O diâmetro médio das partículas e o valor da amplitude foram mensuradas por difração a laser (LD, Mastersizer 2000R® 5.61, Malvern Instruments, Reino Unido).

5.5. Preparo e tratamento das maçãs

Maçãs cv. Gala foram selecionadas, lavadas, sanitizadas com hipoclorito de sódio 150 ppm, enxaguadas e fatiadas com auxílio de lâmina afiada.

Após o corte, as fatias foram imersas por dois (2) minutos nos seguintes tratamentos: (1) maçãs minimamente processadas cv. Gala imersas em água destilada; controle, (2) maçãs minimamente processadas cv. Gala imersas em solução de nanocápsulas de β -caroteno (30 $\mu\text{g/mL}$) e (3) maçãs minimamente processadas cv. Gala imersas em solução de nanoemulsão de β -caroteno (30 $\mu\text{g/mL}$).

As maçãs tratadas foram mantidas sob refrigeração à 4° C durante 17 dias, sendo que aos 0, 3, 7, 12 e 17 dias de armazenamento foram realizadas as análises físico-químicas.

5.6. Avaliação dos parâmetros de qualidade

5.6.1. Coloração. A cor das amostras foi determinada usando um colorímetro (Figura 10), portátil Konica Minolta modelo CR-400[®], Singapura. Esse equipamento utiliza método objetivo, por meio de um sistema de leitura de três parâmetros (CIE L a* b*), proposto pela Comissão Internacional de l'Eclairage (CIE) em 1971, o qual permite aferir a intensidade de absorção na região visível para obtenção dos parâmetros L, a* e b*. A coordenada L representa a luminosidade (L= 0; preto e L= 100; branco) e a coordenada a* está relacionada a dimensão verde-vermelho; (+a* = vermelho e -a* = verde) e a coordenada b* está associada a dimensão azul-amarelo (+b* = amarelo e -b* = azul).

Figura 10: Colorímetro.



Fonte: <https://www.google.com.br>

5.6.2. Potencial hidrogenionico (pH). O pH das nanocápsulas e nanoemulsão de β -caroteno foi mensurado à 25°C com um potenciômetro (Quimis[®], Q400A, Diadema, São Paulo) (Figura 11) previamente calibrado com solução tampão para calibração pH 4,0 e 7,0. Onde foram utilizadas 10 g de maçã, e 50 mL de água destilada, sendo que essa mistura foi

homogeneizada e posteriormente feita a leitura. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

Figura 11: Potenciômetro.



Fonte: https://www.hexasystems.com.br/upload/produtos/1255_detalhe.jpg

5.6.3. Acidez Total Titulável. Para a análise de acidez total titulável, determinada por meio de titulação, utilizou-se uma bureta graduada (Figura 12), onde foram utilizadas 10 g de maçã, e 90 mL de água destilada, sendo essa mistura homogeneizada e titulada com hidróxido de sódio a 0,1 N até que a solução atingisse pH 8,2. O resultado foi expresso em gramas de ácido málico/100 g de amostra. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

Figura 12: Bureta.



Fonte: <https://www.tplaboratorioquimico.com/wp-content/uploads/2014/12/bureta1-1-1.jpg>

5.6.4. Sólidos Solúveis Totais. A determinação do teor de sólidos solúveis foi realizada em um refratômetro portátil digital Pocket ATAGO model PAL-3 (Japão) (Figura 13), sendo os resultados expressos em °Brix. O aparelho foi calibrado a temperatura ambiente à 25°C, com água destilada e as leituras das amostras em triplicata (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Figura 13: Refratômetro digital.



Fonte: <https://www.milkpoint.com.br/img/artigo/conteudo/32326/>

5.6.5. Textura. A determinação da firmeza foi realizada em um texturômetro, com variação de velocidade de 0,01 a 40 mm/s, força de resolução de 0,1 g e uma força de resolução de distância de 0,001mm. (Figura 14) Stable Micro Systems (SMS), Extralab®, Brasil (RODRIGUES, 2013).

Figura 14: Texturômetro.



Fonte: https://blogextralab.files.wordpress.com/2012/06/post_12.png.

5.6.6. Extração de carotenoides da maçã

A análise de carotenoides foi realizada de acordo com o método de Rodrigues-Amaya (1999), onde os pigmentos foram extraídos exaustivamente em equipamento Ultra Turrax (IKA[®] T25 Digital-1/min×1000, Alemanha) (Figura 15). Como solvente extrator utilizou-se acetona refrigerada, e a amostra foi composta de 1 g da mesma. O extrato obtido foi saponificado com uma solução de KOH (10%) metanólico. Os extratos foram mantidos no escuro por 12 h e posteriormente transferidos para uma solução de éter de petróleo: éter etílico (1:1) (v/v) e lavados com água destilada para a remoção do álcali. Após a lavagem, os extratos foram concentrados em um rota- evaporador (modelo Fisaton[®] 801/802, São Paulo, SP, Brasil), secados em N₂ e armazenados à -18 °C para posterior injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).

Figura 15: Ultra Turrax[®].



Fonte: <https://pim-resources.coleparmer.com/item/1/ika-9024222-t-25-ultra-turrax-digital-homogenizer-kit-1594377.jpg>

5.6.7. Identificação e quantificação de carotenoides

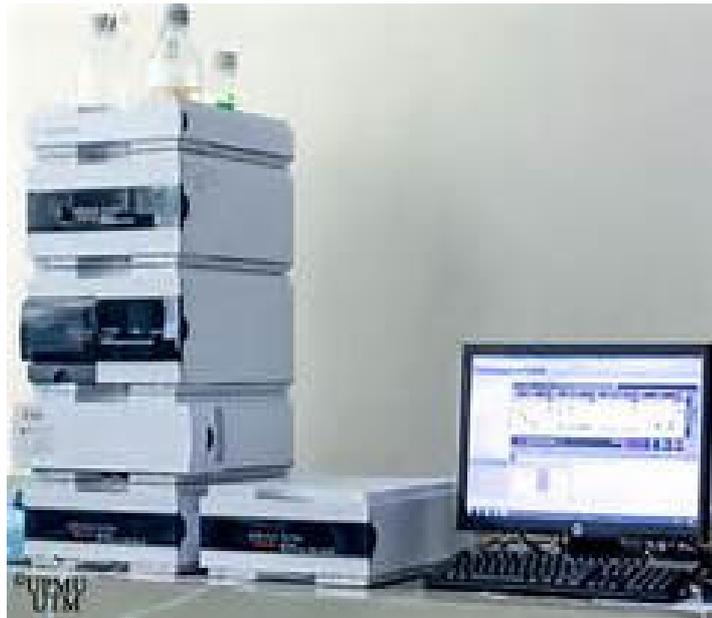
A identificação e quantificação dos carotenoides foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por MERCADANTE, BRITTON, RODRIGUES-AMAYA (1998).

Os extratos foram diluídos em éter-metil-terc-butilíco (MTBE) e colocadas em ultrassom por 3 minutos e, então, injetados em HPLC (Figura 16). Esse HPLC é equipado com um desgaseificador, uma bomba quaternária e um injetor automático acoplado a uma coluna

polimérica de fase reversa C30, 250 mm×4,6 mm, 3mm. A aquisição e o processamento de dados foram realizados com auxílio do Software CHEMSTATION®.

O β -caroteno foi eluído isocraticamente com uma taxa de fluxo de 1mL/min utilizando como fase móvel água/metanol/terc-butileter (MTBE) a partir de 5:90:5, atingindo 0:95:5 em 12 minutos, 0:89:11 em 25 minutos, 0:75:25 em 40 minutos e, finalmente, 00:50:50 depois de 60 minutos. Os cromatogramas foram processados em um comprimento de onda fixo, na absorção máxima do β -caroteno (450 μ m). Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico previamente filtrados em um sistema de filtração à vácuo Millipore® utilizando uma membrana de 0,22 μ m para solventes orgânicos.

Figura 16: HPLC.



Fonte: MERCADANTE, BRITTON, RODRIGUES-AMAYA (1998).

6. ARTIGO

Apples (*Malus domestica* Borkh) minimally processed fortified with nanoencapsulated β -carotene

Mércia Maria Alfinete Sulumindine Inroga^a, Médelin Marques da Silva^{a,b}, Rufino Fernando Flores Cantillano^c, Karina Paese^d, Silvia Stanisçuaski Guterres^d, Simone Hickmman Flôres^a, Alessandro de Oliveira Rios^a

^a*Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil, merciasulumundine@gmail.com, simone.flores@ufrgs.br, alessandro.rios@ufrgs.br*

^b*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, ERS 239, Km 68, n. 3505, Rolante, RS, CEP 95690-000, Brazil, medelin.silva@rolante.ifrs.edu.br*

^c*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), BR 392, Km 78, 9º Distrito, Monte Bonito, Pelotas, RS CEP 96010-971, Brazil, fernando.cantillano@embrapa.br*

^d*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS CEP 90610-000, Brazil, karinapaese@gmail.com, silvia.guterres@ufrgs.br*

Abstract

The aim of this study was to produce minimally processed apple associated with nanometric systems (nanocapsules and nanoemulsion) loaded of β -carotene and evaluate the physical-chemical and phytochemical stability of this food product during cold storage (4 °C; 0, 3, 7, 12 and 17 days). After the minimum processing, the samples were covered with distilled water (C), β -carotene nanocapsules (NC) or β -carotene nanoemulsion (NE), and then stored up to 17 days. The dependent variables observed were color, pH value, titratable acidity, soluble solids, texture and carotenoid content (β -carotene, lutein, zeaxanthin and β -cryptoxanthin). The samples covered with distilled water presented 82.2% and 70.6% less β -carotene than apple slices treated with NC and NE formulation, respectively. The results obtained for this work confirm that the use of nanometric systems loaded with β -carotene support the maintenance of quality of minimally processed apples.

Keywords: Nanoencapsulation; poly- ϵ -caprolactone; vitamin A; carotenoids; bioactive compound.

1. Introduction

The market of fresh-cut products is one of the sectors of food industry with the highest growth in recent years, due to the demand for fresh food with high practicality and nutrient value (Sipahi et al., 2013). The International Fresh-cut Produce Association (IFPA) defines fresh-cut product as any vegetable that is physically altered from its original form and keeps its fresh state (IFPA, 1999).

Apples (*Malus domestica* Borkh), fruits that are highly popular and consumed in all parts of the world, are widely used in the composition of fruit salad and snacks, in other words, in fresh-cut form. The search for a healthy lifestyle find in minimally processed products an excellent alternative, since it is difficult to have time to prepare fruits and vegetables with the hectic life that much of the world's population possess.

Moreover, apple consumption has been associated with a decreased risk of chronic and degenerative diseases, due to its wide variety of phytochemicals compounds that provide high antioxidant activity and anticancer properties (Boyer; Liu, 2004). Among these phytochemicals, apples are a good source of polyphenols, such as hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols, anthocyanidins, flavonols and dihydrochalcones (Tsao et al., 2005). Because apples are rich in these polyphenols, the enzymatic browning of their surface occurs easily when the vegetable tissues are damaged (Eissa et al., 2006; Holderbaum et al., 2010).

The opposite occurs with the carotenoid content, since its concentrations are low in apple fruits in comparison with those in other fruit species. For example, *Carica papaya* L. (papaya) has about 25 times more α -carotene, β -carotene and lycopene and 30 times more β -cryptoxanthin, lutein and zeaxanthin than apple (Khoo et al., 2011). In the beginning of development, apples have great amounts of photosynthetic pigments, such as chlorophyll and carotenoids, in their pulp. However, with the maturation evolution a considerable proportion of these carotenoids is lost (Ampomah-Dwamena et al., 2012).

Therefore, it is important the enrichment of food products, and this action can be achieved by the addition of bioactive compounds to food matrices. However, bioactive compounds when added in the free form can present significant losses caused by exposure to light, oxygen and high temperatures (Bakowska, Kucharska and Oszmianski, 2003; Bonn et al., 2010). An alternative to this obstacle is the use of bioactive compounds in the encapsulated form, which prevents degradation / isomerization and allows solubilization of

their in aqueous matrices. Moreover, encapsulated substances can be released in a controlled form (Joye et al., 2014).

The nanotechnology has been used in this context and, this technique is considered one of the main technology in the last decade, since it allows innovations in the field of agriculture and food industry (Sekhon, 2014). Nanoencapsulation produce particle solution or solid particles, with sizes ranging from 10 nm to 1 μ m. Bioactive compounds can be nanoencapsulated by different types of nanometric systems, such as nanoemulsion or nanocapsules. A typical nanoemulsion is kinetically stable and contains oil, water and an emulsifier (Gupta et al., 2016). While the nanocapsules are vesicular systems in which the active compound is imprisoned to an oily or aqueous cavity surrounded by a polymeric membrane (Soppimath et al., 2001).

In the case of enrichment of food products, the carotenoid highlighted is the β -carotene. Besides providing antioxidant activity, the β -carotene present pro-vitamin A activity since they possess β -ionone ring at the end of their hydrocarbon chain (Kopeck et al., 2014). A poor intake of vitamin A, in the case of children of pre-school age can induce night blindness, impair growth and the immune system (Islam et al., 2016). In general, the main source of vitamin A in human diet comes from fruits and vegetables and its deficiency (hypovitaminosis) is recognized as a public health problem worldwide, with a greater focus on developing countries in Africa, Asia and Latin America (OMS, 2011; Sommer, 2011). Based on the recently mentioned fact it is emphasizes the importance of enriching food products that are abundant in certain regions, which present low levels of β -carotene.

The present research group recently published papers on the nanoencapsulation of bioactive compounds. In one of these was produced, by the interfacial deposition of the preformed polymer, characterized, and evaluated the stability of nanocapsules obtained from a blend of β -carotene, α -carotene, and lutein (BALNs) and nanocapsules of synthetic β -carotene (BNs) (Da Silva, et al., 2016). In sequence, a study on the stability of co-nanoencapsulated carotenoids (blend of β -carotene, α -carotene, and lutein) in lipid-core nanocapsules under different industrial treatments such as thermal and UV-light treatment was published (Da Silva et al., 2017). Then, several studies have been conducted in the field of nanotechnology, few combine nanoencapsulation with minimally processed products, and none of them approaches the enrichment of vitamin A in poor products in this vitamin (Danza et al., 2015; Rößle et al., 2011; Zambrano-Zaragoza et al., 2014; Zambrano-Zaragoza et al., 2016).

Therefore, considering the importance of β -carotene for human health and that nanotechnology can be used to promote solubility, stability and control of the release of the interest compound, the objective of this study was to produce fresh-cut apple associated with nanometric systems loaded of β -carotene and evaluate the physical-chemical and phytochemical stability of this food product during cold storage.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The poly- ϵ -caprolactone biopolymer (PCL; $M_w \approx 80,000$; Sigma Aldrich[®], USA) was used as wall material for nanocapsules formulation. While the other materials such as Span 60[®] (sorbitan monostearate; Sigma Aldrich[®], USA), medium chain triglycerides (TCM; Delaware[®], Brazil), synthetic β -carotene (Sigma Aldrich[®], USA), Tween 80[®] (polysorbate; Delaware[®], Brazil) and Milli-Q[®] water (Millipore, USA) were used for nanocapsules and nanoemulsion formulation. All other reagents were of analytical and chromatographic grade.

In this experiment were used 'Gala' apples (*Malus domestica* Borkh) from Vacaria city, Rio Grande do Sul, Brazil (28°30'44''S - 50°56'02''W), they were harvested when reached commercial maturity (75% of the surface with red color). The fruits were transported to the Bioactive Compound Laboratory (Institute of Food Science and Technology, UFRGS), where they were kept at 1 ° C for 24 h with a relative humidity (R.H.) of 85-90 % prior to use.

2.2. Nanosystems preparation

2.2.1. Development of nanocapsules and nanoemulsion loaded with β -carotene

The nanocapsules and nanoemulsion formulation loaded with β -carotene was prepared by the interfacial deposition of the preformed polymer technique according to Venturini et al. (2011), where an organic and other aqueous phase were prepared. To produce the β -carotene nanocapsules was used wall material (PCL), and to develop β -carotene nanoemulsions was not used wall material (PCL). PCL (500 mg), TCM (800 μ l), Span 60[®] (190 mg), were dissolved in a mixture of acetone (270 mL) and ethanol (15 mL), which remained under magnetic stirring at 40° C for 40 minutes. After homogenization of PCL, TCM and Span 60[®], was added β -carotene and kept under magnetic stirring at 40°C for 10 minutes to obtain the

organic phase of nanocapsules formulation. This organic phase was injected into the aqueous phase, which contained Tween 80[®] (385 mg) and Milli-Q[®] water (265 mL). The mixture remained under magnetic stirring at 25 ° C for 10 min and the β -carotene nanocapsules formulation (30 μ g /mL) was concentrated in a rotary evaporator until a final volume of 50 mL.

2.2.2. Nanosystems characterization

The nanocapsules and nanoemulsion formulations were characterized using the dependent variables particle mean diameter and span value. These analyzes were performed at the same storage times of 'Gala' apples. The particle mean diameter and span value was measured by laser diffraction (LD, Mastersizer 2000[®] 5.61, Malvern Instruments, United Kingdom).

2.3. Minimum processing of apples and their enrichment with β -carotene

'Gala' apples were sanitized with a sodium hypochlorite solution (150 ppm) for 10 minutes, to reduce the microbial load present in the material. During the minimal processing the apples were sliced and dipped for 2 minutes in solutions containing the following treatments [C - distilled water (control), NC - nanocapsules formulation (30 μ g/mL of β -carotene) and NE - nanoemulsion formulation (30 μ g/mL of β -carotene)]. Then, the apple slices were placed on sieves to drain the excess of water contained in the samples. After that, the slices of 'Gala' apple were placed in polyethylene packaging and stored at 4 °C with 85-90 % R.H. for 17 days, and the analyzes described in the sequence were performed at 0, 3, 7, 12 and 17 days of storage.

2.4-Evaluation of quality parameters

2.4.1-Coloring: The color of the samples was determined using a Konica Minolta[®] equipment (CR-400, Singapore). An objective reading method was used, CIE L, a*, b*, which was proposed by the International Commission of l'Eclairage (CIE) in 1971. This system allows to measure the intensity of absorption in the visible region to obtain the parameters L,

a* and b*. The coordinate L represents the brightness, while a* and b* are responsible for the chromaticity.

2.4.2-pH value: The pH value of the nanocapsules and nanoemulsions formulations loaded with β -carotene were measured at 25°C with a potentiometer (Quimis®, Q400A, Diadema,

São Paulo) previously calibrated with buffer solution for pH 4.0 and 7.0.

2.4.3-Titratable Acidity (TA): For analysis of titratable acidity, 10 g of apple and 90 ml of distilled water were used, and this mixture was homogenized and titrated with sodium hydroxide until the solution reached pH 8.2.

2.4.4-Soluble Solids (SS): The determination of the soluble solids content was carried out in a refractometer at 25°C, the results were expressed in °Brix.

2.4.5-Texture: Texture determination was performed in a texturometer at 25 ° C, with velocity range of 0.01 to 40 mm / s, resolution force of 0.1 g and a distance resolution force of 0.001 mm. Stable Micro Systems (SMS), Extralab®, Brazil (RODRIGUES, 2013).

2.4.6-Extraction and determination of β -carotene on apple: The extraction and determination of carotenoids was performed according Rodriguez-Amaya (1999), where the pigments were extracted exhaustively in Ultra Turrax® equipment (IKA Ultra Turrax® digital, model T25, Germany) at a speed of 8000 rpm. For the carotenoids extraction was used 1000 mg of sample and refrigerated acetone as extracting solvent, the extract obtained was saponified with a solution of methanolic KOH (10%). The extracts were kept overnight in the dark, then transferred to a solution of petroleum ether: ethyl ether (1: 1) (v / v) and washed with distilled water to remove the alkali. After washing, it was concentrated in a rotary evaporator for subsequent injection into the high performance liquid chromatograph (HPLC). Thus, the extracts were injected into a chromatograph equipped with a degasser, a quaternary pump and an automatic injector coupled to a reverse phase polymer column (C30, 250 mm \times 4.6 mm, 3 mm). The mobile phase gradient (flow rate of 1 mL/min) was water/methanol/tert-butylether from 5:90:5, reaching 0:95:5 in 12 minutes, 0:89:11 in 25 minutes, 0:75:25 in 40 minutes, and finally 00:50:50 after 60 minutes, the chromatograms were processed at the maximum absorption of β -carotene (450 μ m). All solvents used were of chromatographic grade and previously filtered in a Millipore® vacuum filtration system using a 0.22 μ m membrane for organic solvents.

2.5. Statistical analysis

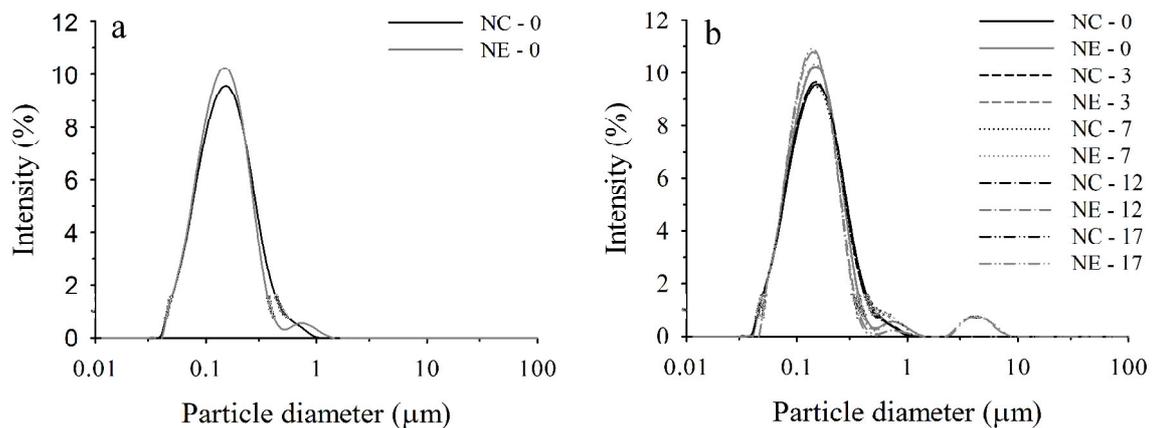
The formulations of the NC and NE were performed in triplicate, and the experimental design was completely randomized. The physico-chemical data were subjected to variance analysis (ANOVA), using SAS 8.0 software and, when significant the Tukey test ($p \leq 0.05$) was applied. And the results of β -carotene content over the storage period were expressed as means \pm standard deviations in graphics.

3. Results and Discussion

3.1. Nanosystems characterization

The particle diameter was performed at 0, 3, 7, 12 and 17 days of storage (4 °C) of nanocapsules (NC) and nanoemulsion (NE) formulations. NC formulation showed a monomodal behavior with a diameter ($D_{4,3}$) of 165 ± 0.58 nm and span value of 1.57 ± 0.01 , while NE formulation demonstrated a bimodal behavior with a diameter ($D_{4,3}$) of 160 ± 0.58 nm and span value of 1.41 ± 0.01 (Figure 1a). The span value in a suspension is related to the homogeneity of the particles size distribution, and it was observed that both formulations (NC and NE) presented statistical difference between their span values. Nanocapsules demonstrated a monomodal behavior, suggesting that there was good homogeneity in particle size dimension throughout the storage. In contrast, nanoemulsions demonstrated a bimodal behavior throughout the storage, indicating contamination of particles larger than 1 nm in the formulation; this is probably due to the agglomeration of the particles. The Figure 1b shows that bimodal behavior of the NE formulation occurs over the days of storage. This indicates contamination by particles with a diameter greater than 1 μ m in the nanoemulsion formulation, probably due to particles agglomeration. In contrast, Cao-Hoang et al. (2011) observed monomodal behavior for synthetic β -carotene into Tween[®] 80 micelles, this fact can be explained due to differences between the encapsulation methods used. Very similar data were found in a study developed by Da Silva et al. (2016), where synthetic β -carotene nanocapsules were produced by the same technique of present work, and presented a mean diameter ($D_{4,3}$) of 190.33 ± 32.81 nm and span value of 1.71 ± 0.13 .

Figure 1. Particle size distribution (intensity), obtained by LD, of nanocapsules (NC) and nanoemulsion (NE) formulations immediately after preparation (a) and over the storage time (0, 3, 7, 12 and 17 days) (b).



3.2. Physical-chemical and phytochemical stability of fresh-cut 'Gala' apple during cold storage

Immediately after minimal processing and immersion in treatments C, NC and NE (day 0), the apples showed the color coordinates presented in table 1. It is possible to observe that apple slices treated with both nanometric systems (NC and NE) presented yellowish color. This characteristic is due to β -carotene entrapped by the formulations, which occurs as an orange pigment (Takyi, 2001). During the shelf-life of fresh-cut apples no statistical difference was observed in the L parameter, suggesting that immersion in nanometric formulations of β -carotene (NC and NE) does not affect negatively the samples brightness.

Independent of the observed factor (type of formulation and storage time), the a^* coordinate did not present statistical difference. The maintenance of the a^* value on the slices of apples treated (NC and NE formulation) was probably because of antioxidant properties of the nanoencapsulated compound (β -carotene). The opposite was mentioned by Zambrano-Zaragoza et al. (2014), where fresh-cut "Red Delicious" apples showed changes in the a^* values below 29% after 18 days of storage (4 °C) when treated with nanocapsules and nanospheres of α -tocopherol.

In relation to b^* values, it was observed that in all storage periods the lower b^* values occurred in apples wedges treated with control solution (C) when compared to those treated

with nanometric systems (NC and NE). This episode is explained by the apparent coloration (yellow) of the β -carotene formulations (NC and NE), which provides increases in the b^* value of the samples.

Table 1. Color coordinates (L, a^* and b^*) of fresh-cut 'Gala' apples treated with different formulations (control, nanocapsules and nanoemulsion) stored at 4 °C for 17 days.

Storage time (days)	Formulation		
	C	NC	NE
	L		
0	78.28 ± 0.28 A a	76.56 ± 2.37 A a	75.24 ± 1.72 A a
3	78.80 ± 1.04 A a	76.08 ± 0.84 B a	74.60 ± 1.31 B a
7	76.95 ± 1.63 A a	76.63 ± 0.67 A a	76.02 ± 1.68 A a
12	77.33 ± 1.56 A a	77.46 ± 0.96 A a	75.29 ± 0.67 A a
17	74.76 ± 2.92 A a	77.91 ± 0.84 A a	73.93 ± 3.11 A a
	a^*		
0	-0.84 ± 0.27 A a	-0.65 ± 1.84 A a	0.83 ± 0.82 A a
3	-0.83 ± 1.67 A a	0.27 ± 0.68 A a	0.94 ± 0.56 A a
7	0.03 ± 1.54 A a	-0.28 ± 0.57 A a	0.73 ± 1.28 A a
12	1.04 ± 1.88 A a	-0.33 ± 1.20 A a	1.42 ± 1.02 A a
17	2.03 ± 1.71 A a	-0.40 ± 0.71 A a	2.08 ± 2.44 A a
	b^*		
0	26.88 ± 1.41 B a	46.56 ± 0.82 A a	44.99 ± 1.46 A a
3	27.09 ± 4.49 B a	44.74 ± 2.11 A ab	44.98 ± 1.67 A a
7	28.12 ± 2.97 B a	42.51 ± 2.80 A abc	42.21 ± 2.02 A a
12	28.80 ± 3.82 B a	39.53 ± 1.79 A c	42.37 ± 1.74 A a
17	30.77 ± 3.54 B a	40.64 ± 0.55 A bc	42.03 ± 2.45 A a

Mean ± standard deviation followed by the same capital letter in the row and by the same lowercase letter in the column do not differ significantly (Tukey; $p \leq 0.05$). C (distilled water; control), NC (nanocapsules formulation with 30 $\mu\text{g/mL}$ of β -carotene) and NE (nanoemulsion formulation with 30 $\mu\text{g/mL}$ of β -carotene).

Over time the pH values of apple usually increases due to their climatic respiration (Hulme et al., 1963), as occurred succinctly in the control samples. However, the treated apples with NC and NE formulations demonstrated a higher stability of the pH values during their shelf-life, probably due to the components of the nanometric systems (Table 2). For example, the PCL which is one of the products used in the formulation of β -carotene nanocapsules can provide greater acidity to the medium in which it is found, since the wall degradation of nanocapsules release of acidic species and contributes to the decrease of pH

values (Can et al., 2011). This high stability observed in the pH values favors the absence of microbial growth on the fresh-cut products (Soliva-Fortuny, Elez-Martinez & Martin-Belloso, 2004).

The variations in malic acid content (TA) are shown in table 2. Before the discussion of data it is important to emphasize the importance of acidity, since it affects the fruits flavor. Independent of the observed factor (type of formulation and storage time), the TA did not present statistical difference. According to Sadler and Murphy (1998), acids in fruit tend to decrease with fruit maturity. However, in the present study, this difference was not observed, probably the pre-treatment of apples with 1-MCP (1-methylcyclopropene) delayed the maturation and senescence of them during the shelf-life. The 1-MCP is used in the extension of the post-harvest life and maintenance of the quality of vegetal products. Under normal conditions, ethylene gas binds to protein receptors of plasma membrane, which generates responses to maturation. The 1-MCP binds to these receptor sites, inhibiting the action of ethylene and retarding the ripening process (Blankenship; Dole, 2003).

The table 2 shows the behavior of SS in apples slices stored for 17 days. The control samples had a 5.82 % decrease in SS with respect to their initial days (0), whereas the apples dipped in NC and NE formulation not showed changes in SS values during shelf-life. According to Conforti and Totty (2007), the soluble solids variations depend of the coating composition. A study conducted by Rößle et al. (2011) obtained similar results to the present work, since the apples treated with probiotic bacteria not demonstrated changes in their content of soluble solids during storage. However, Zambrano-Zaragoza et al. (2014) report a reduction of soluble solids content in fresh-cut “Red Delicious” apples stored for 18 days (4° C) and treated with xanthan gum, nanospheres of α -tocopherol, nanospheres of α -tocopherol/xanthan gum, nanocapsules of α -tocopherol, nanocapsules of α -tocopherol/xanthan gum, nanoemulsion of α -tocopherol and nanoemulsion of α -tocopherol/xanthan gum.

In general, the minimally processed apples treated with NC formulation presented greater firmness from the third to the time of storage, ranging from $8,77 \pm 1.67$ N to 8.83 ± 0.95 N. This fact probably occurred due to the presence and the released control of the β -carotene bioactive compound, which protects and inhibits the action of the pectin methyl esterase by the homogeneous distribution of the nanocapsules of β -carotene (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). The pectin methyl esterase is responsible for hydrolysis of pectic

substances present in the cell wall of plant tissues, which leads to loss of firmness of the plant material (Soliva-Fortuny et al., 2003).

Table 2. Physical-chemical parameters of fresh-cut 'Gala' apples treated with different formulations (control, nanocapsules and nanoemulsion) stored at 4 °C for 17 days.

Storage time (days)	Formulation		
	C	NC	NE
	pH		
0	3.99 ± 0.05 A b	3.98 ± 0.10 A a	4.07 ± 0.15 A a
3	3.91 ± 0.08 B b	3.96 ± 0.03 B a	4.12 ± 0.05 A a
7	4.02 ± 0.02 A ab	4.03 ± 0.01 A a	4.13 ± 0.08 A a
12	4.18 ± 0.08 A a	4.08 ± 0.08 A a	4.24 ± 0.05 A a
17	4.09 ± 0.10 A ab	3.98 ± 0.11 A a	4.09 ± 0.08 A a
	TA (% malic acid/g)		
0	0.26 ± 0.04 A a	0.25 ± 0.02 A a	0.29 ± 0.05 A a
3	0.29 ± 0.04 A a	0.29 ± 0.01 A a	0.25 ± 0.02 A a
7	0.24 ± 0.02 A a	0.23 ± 0.02 A a	0.23 ± 0.04 A a
12	0.23 ± 0.03 A a	0.24 ± 0.01 A a	0.23 ± 0.00 A a
17	0.21 ± 0.02 A a	0.25 ± 0.07 A a	0.23 ± 0.03 A a
	SS (°Brix)		
0	11.33 ± 0.58 A ab	13.00 ± 1.73 A a	14.67 ± 3.51 A a
3	11.67 ± 0.58 A ab	15.00 ± 2.65 A a	13.67 ± 2.08 A a
7	11.33 ± 0.58 A ab	15.33 ± 2.08 A a	12.00 ± 1.73 A a
12	13.00 ± 1.00 A a	12.00 ± 0.00 A a	13.33 ± 1.53 A a
17	10.67 ± 0.58 A b	11.00 ± 1.00 A a	11.00 ± 1.00 A a
	Texture (N)		
0	8.69 ± 0.67 A a	8.77 ± 1.67 A a	7.74 ± 0.69 A a
3	6.61 ± 1.91 AB a	10.01 ± 1.72 A a	6.07 ± 0.29 B a
7	8.79 ± 1.21 AB a	9.27 ± 1.99 A ab	5.40 ± 0.41 B a
12	6.51 ± 0.93 A a	8.97 ± 1.78 A ab	5.87 ± 1.59 A a
17	6.57 ± 1.38 A a	8.83 ± 0.95 A ab	6.53 ± 1.22 A a

Mean ± standard deviation followed by the same capital letter in the row and by the same lowercase letter in the column do not differ significantly (Tukey; $p \leq 0.05$). C (distilled water; control), NC (nanocapsules formulation with 30 µg/mL of β-carotene) and NE (nanoemulsion formulation with 30 µg/mL of β-carotene).

The figure 2 illustrates the β-carotene content present in each analysis period (0, 3, 7, 12 and 17 days) of fresh-cut 'Gala' apples treated with C, NC and NE. Observing the graph, it is possible to report that β-carotene content varied according to applied treatment (C, NC and NE formulation) and time of storage for apples. The samples covered with distilled water (control) presented 82.2% and 70.6% less β-carotene than apple slices treated with NC and

NE formulation, respectively. It should also be noted that release of β -carotene increased gradually to the 7th day of storage of the apples treated with nanometric solutions (NC and NE). Zambrano-Zaragoza et al. (2016) investigated the release kinetics of β -carotene nanocapsules/xanthan gum coating in fresh-cut melon and observed that systems loaded with β -carotene nanocapsules (alone or in combination with xanthan gum) presented in a first moment the maximum release of β -carotene (from 0 days to ninth day of storage). They explained this fact by the diffusion of β -carotene and/or the opening of the nanocapsules on the fruit. When analyzing this data it becomes clear the possibility to obtain fortified vegetables products by nanoencapsulation technique.

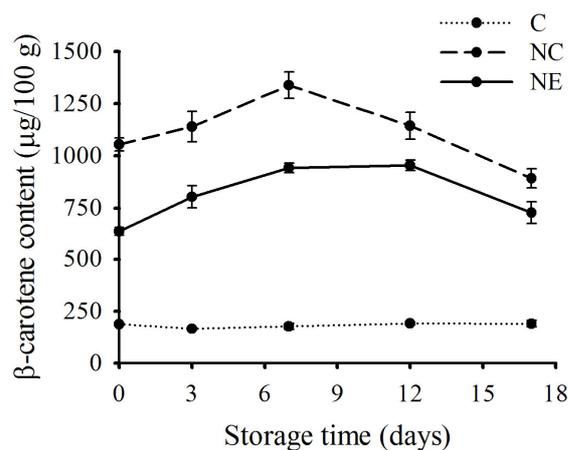
On the other hand, from day 7th to day 17th there was a decrease in the β -carotene content, this degradation is probably due to the lower amounts of β -carotene in the remaining nanocapsules and the adverse conditions (presence of light and oxygen) that affect the compounds of interest.

Immediately after the minimum processing of fruits and their respective treatment with nanometric systems (NC and NE), it was observed a higher β -carotene content in the samples coated by NC formulation. During the formulation production partial losses of the compounds of interest can occur, due to process conditions such as homogenization time, shear rate of homogenization (expressed in terms of the rpm of the homogenizer) and number of cycles between each homogenization that can affected the physical and chemical stability of formulation (Silva et al., 2011). Another study, conducted by Tan and Nakajima (2005), observed that pronounced loss of β -carotene in nanoemulsion is due to a larger surface area of this system and to a free radicals production during homogenization. The absence of wall material in a nanoemulsion exposes the encapsulated compounds to oxidation, which can be facilitated in the presence of oxygen and light.

Both formulations (NC and NE) demonstrated similar behavior regarding the β -carotene retention during the refrigerated storage (4°C). However, the carotenoid content present in the apples treated by NC formulation was higher than those treated by NE formulation in all shelf-life days. This statistical difference between the carotenoid content present in apples treated with NC and NE formulations can be attributed to the retention capacity of each system with vegetable matrix.

Zambrano-Zaragoza et al. (2014) observed the effect of nano-coatings produced with α -tocopherol and xanthan gum (nanoemulsion, nanoemulsion/xanthan gum, nanocapsules, nanocapsules/ xanthan gum, nanospheres, nanospheres/ xanthan gum containing DL- α -tocopherol) on shelf life and browning index of fresh-cut "Red Delicious" apples. It was found that apple pieces treated with DL- α -tocopherol nanocapsules had a better visual appearance in relation to the other samples, this was probably due to the increased homogeneity distribution on surface area covered.

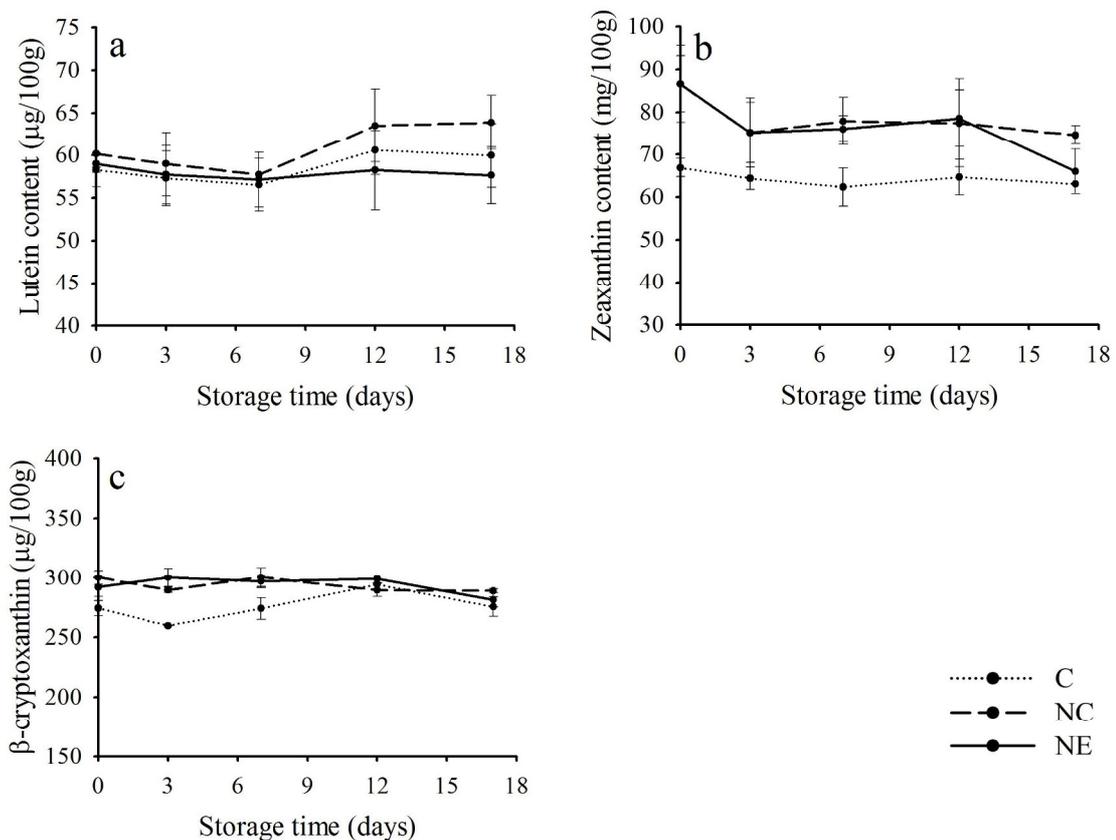
Figure 2. β -carotene content in the fresh-cut 'Gala' apples treated with different formulations (C, NC - 30 μ g/mL of β -carotene and NE - 30 μ g/mL of β -carotene) and stored (4 °C) for 17 days.



The measurement of β -carotene content by HPLC allows the quantification of other carotenoids of the sample. In the case of apple, there is also lutein, zeaxanthin and cryptoxanthin. During the refrigerated storage of the apple slices, there was no statistical difference between the lutein content of treated apples (C, NC and NE formulation). And in general (up to 7 days of storage), during the apple wedges shelf-life the levels of zeaxanthin and cryptoxanthin were higher in the samples treated by nanometric formulations (NC and NE; Figure 3). This demonstrates the protective effect of nanometric system and β -carotene on the other carotenoid in the sample.

To summarize the recently explained results, it should be noted that the minimally processed "Gala" apples covered with β -carotene nanocapsules presented higher retention of carotenoids and good visual characteristics during the refrigerated storage.

Figure 3. Carotenoid content (Lutein, zeaxanthin and β -cryptoxanthin) in the fresh-cut 'Gala' apples treated with different formulations (C, NC - 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of β -carotene and NE - 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of β -carotene) and stored (4 °C) for 17 days.



4. Conclusion

The nanometric systems (nanocapsules and nanoemulsion) loaded with β -carotene used in association with fresh-cut 'Gala' apples demonstrated high efficiency in the fortification of these products, additionally helped to increase the shelf-life. Among these systems, the apple slices treated with β -carotene nanocapsules showed superior results

regarding the carotenoid content, it can be attributed to the retention capacity of each system with vegetable matrix. Then, the results obtained by this study suggest that the association of nanometric systems with fresh-cut apples promotes the enrichment of these products, which demonstrates an opportunity for the industrial food sector.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil), and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, Brazil) for the financial support provided for this research.

6. References

- Ampomah-Dwamena, C., Dejnopratt, S., Lewis, D., Sutherland, P., Volz, R. K. & Allan, A. C. (2012). Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus x domestica*) carotenogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4497-4511.
- Bakowska, A. M., Kucharska, A. Z. & Oszmianski, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation and storage on stability of anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81, 349-355.
- Blankenship, S. M. & Dole, J. M. (2003). 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 1-25.
- Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J. & Decker, E. A. (2010). Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 515-532.
- Boyer, J. & Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3, 517S-520S.

Can, E., Udenir, G., Kanneci, A. I., Kose, G. & Bucak, S. (2011). Investigation of PLLA/PCL blends and paclitaxel release profiles. *AAPS PharmSciTech*, 12, 1442-1453.

Cao-Hoang, L., Fougère, R. & Waché, Y. (2011). Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. *Food Chemistry*, 124, 42-49.

Conforti, F. D. & Totty, J. A. (2007). Effect of three lipid/hydrocolloid coatings on shelf life stability of golden delicious apples. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1101-1106.

Da Silva. M. M., Nora, L., Flores Cantillano, R. F., Paese, K.; Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., Costa, T. M. & Rios, A. O. (2016). The Production, Characterization, and the Stability of Carotenoids Loaded in Lipid-Core Nanopcapsules. *Food and BioprocessTechnology*, 9, 1148-1158.

Da Silva. M. M., Paese, K., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., Rutz, J. K.; Flores Cantillano, R. F., Nora, L. & Rios, A. O. (2017). Thermal and ultraviolet–visible light stability kinetics of co-nanoencapsulated carotenoids. *Food and Bioproducts Processing*, 105, 86-94.

Danza, A., Conte, A., Mastromatteo, M. & Del Nobile, M. A. (2015). A New Example of Nanotechnology Applied to Minimally Processed Fruit: The Case of Fresh-Cut Melon. *Food Processing & Technology*, 6.

Eissa, H. A., Fadel, H. H. M., Ibrahim, G. E., Hassan, I. M. & Elrashid, A. A. (2006). Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products. *Food Research International*, 39, 855-863.

Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, A. & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *The Royal Society of Chemistry*, 12, 2826-2841.

Holderbaum, D. F., Kon, T., Kudo, T. & Guerra, M. P. (2010). Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: Dynamics during fruit development. *Hort Science*, 45, 1150-1154.

Hulme, A. C., Jones, J. D. & Woollorton, L. S. C. (1963). The Respiration Climacteric in Apple Fruits. *The Royal Society*, 158, 514-535.

IFPA, International Fresh-cut Produce Association. Handling Guidelines for the Fresh-cut Produce Industry, 3^o ed., 5-7, Alexandria, VA (1999).

Islam, S. N., Nusrat, T., Begum, P. & Ahsan, M. (2016). Carotenoids and β -carotene in orange fleshed sweet potato: A possible solution to vitamin A deficiency. *Food Chemistry*, 199, 628 – 631.

Joye, I. J., Davidov-Pardo, G. & McClements, D. J. (2014). Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 40, 168-182.

Khoo, H. E., Prasad, K. N., Kong, K. W., Jiang, Y. & Ismail, A. (2011). Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. *Molecules*, 16, 1710-1738.

Kopec, R. E., Cooperstone, J. L., Schweiggert, R. M., Young, G. S.; Harrison, E. H., Francis, D. M., Clinton, S. K. & Schwartz, S. J. (2014). Avocado Consumption Enhances Human Postprandial Provitamin A Absorption and Conversion from a Novel High- β -Carotene Tomato Sauce and from Carrots. *The Journal of Nutrition*, 144, 1158-1166.

OMS. *Guideline: Vitamin A supplementation in infants and children 6–59 months of age*. Geneva: World Health Organization. 2011.

Röbke, C., Auty, M. A. E., Brunton, N., Gormley, R. T. & Butler, F. (2011). Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 203-209.

Rodriguez-Amaya, D. B. A. (1999). *Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Some Physico chemical properties of carotenoids, 14-22.

Sadler, G.D. & Murphy, P.A. (1998). pH and titratable acidity. In: Suzanne Nielsen, S. (Ed.), *Food Analysis*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 101–116.

Sekhon, B.S. (2014). Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 38, 21-33.

Silva, H.D., Cerqueira, M. A., Sousa, B.W. S., Ribeiro, C., Avides, M.C., Quintas, M.A.C., Coimbra, J.S.R., Carneiro-da-Cunha, M.G. & Vicente, A. A. (2011). Nanoemulsions of β -carotene using a highenergy emulsification-evaporation technique. *Journal of food Engineering*, 102, 130-135.

Sipahi, R.E., Castell-Perez, M.E., Moreira, R.G., Gomes, C. & Castillo, A. (2013). Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*). *LWT-Food Science and Technology*, 51, 9–15

Soliva-Fortuny, R. C., Lluch, M. A., Quiles, A., Grigelmo-Miguel, N. & Martín-Belloso, O. (2003), Evaluation of textural properties and Microstructure During Storage of Minimally Processed Apple. *Journal of Food Science*, 68, 312-317.

Soliva-Fortuny, R. C., Elez-Martinez, P., & Martín-Belloso, O. (2004). Microbiological and biochemical stability of fresh-cut apples preserved by modified atmosphere packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, 215–224.

Sommer, A. *Vitamin A deficiency disorder: origins of the problem and approaches to its control*. AgBioWorld. Disponível em: <http://www.agbioworld.org/biotechinfo/topics/goldenrice/vit_a.html>. Acesso em: 24 jan. 2018.

- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1-20.
- Tan, C. P. & Nakajima, M. (2005). β -carotennanodispersion: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 92, 661-671.
- Takvi, E. E. K. (2001). *Bioavailability of Carotenoids from Vegetables versus Supplements*. In *Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion*; Watson, R.R., Ed.; CRC Press LCC: Danvers, MA, USA, 19–31.
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E. & Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4989-4995.
- Venturini, C.G., Jäger, E., Oliveira, C. P., Bernardi, A., Battastini, A. M. O. & Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. (2011). Formulation of Lipid Core Nanocapsules. *Colloids And Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 375, 1-3.
- Zambrano-Zaragoza, M. L., Mercado-Silva, E., Del Real, A. Gutiérrez-Cortez, E., Cornejo-Villegas, M. A. & Quintanar-Guerrero, D. (2013). The effect of nano-coatings with α -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut “Red Delicious” apples. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 188-196.
- Zambrano-Zaragoza, M. L., Quintanar-Guerrero, D., Del Real, A., Piñon-Segundo, E & Zambrano-Zaragoza, J. F. (2016). The release kinetics of β -carotene nanocapsules/xanthan gum coating and quality changes in fresh-cut melon (cantaloupe). *Carbohydrate Polymers*, 157, 1874-1882.

7. DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1. Discussão Geral

De acordo com os resultados obtidos, o uso de formulações nanométricas (NC e NE) surge como uma alternativa para que seja possível conferir maior estabilidade, solubilidade, e aplicabilidade do β -caroteno em maçãs minimamente processadas.

Nesse estudo, maçãs 'Gala' minimamente processadas tratadas com formulações nanométricas (NC e NE) de β -caroteno e armazenadas por até 17 dias a 4°C foram avaliadas quanto aos parâmetros físico-químicos de coloração, pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e textura e fitoquímicos de carotenoides individuais. As maçãs tratadas com formulações nanométricas apresentaram maior estabilidade em comparação com as maçãs tratadas com água destilada (controle). Isso pode ser observado, por exemplo, por meio do parâmetro de textura, já que as fatias de maçãs tratadas com a formulação de nanocápsulas de β -caroteno apresentaram resultados promissores na conservação da sua textura.

Em relação as coordenadas de cor, os maiores valores de b^* foram encontrados nas maçãs tratadas por soluções nanométricas de β -caroteno, o que indica uma tonalidade amarela. Essa coloração não desconfigura os padrões de cor originais do produto, o que contribui para a aceitação do mesmo pelos consumidores.

As maçãs 'Gala' tratadas por soluções nanométricas de β -caroteno apresentaram ao longo do armazenamento refrigerado (4 °C) conteúdos de carotenoides superiores às maçãs controle. Isso contribui para a manutenção da qualidade do produto durante sua vida-de-prateleira, já que o composto encapsulado é um agente antioxidante. Além disso, foi possível o enriquecimento (fortificação) da matriz alimentícia estudada com β -caroteno (vitamina A).

7.2. Conclusões

A nanoencapsulação é uma alternativa para a indústria de alimentos. Pois, o uso desta técnica pode melhorar a solubilidade e a estabilidade do β -caroteno as condições adversas, principalmente quando este é incorporado em alimentos. Assim, este pigmento nanoencapsulado apresenta potencial para ser utilizado na fortificação nutricional e coloração de alimentos. Pararelamente a esse fato, houve maior retenção de β -caroteno, nas maçãs tratadas com formulação de nanocápsulas; sendo que as fatias contendo β -caroteno apresentaram maior estabilidade quando comparada com às maçãs controle.

Nanocápsulas são capazes de permanecer na superfície das maçãs, com melhorando a qualidade durante o armazenamento sob refrigeração. O uso da formulação de nanocápsulas contendo β -caroteno foi mais eficaz quando comparadas com a formulação de nanemulsões contendo β -caroteno.

7.3. Perspectivas

As formulações contendo β -caroteno nanoencapsulado são promissoras, podendo ser utilizadas na indústria de alimentos como antioxidante ou corante natural. Um campo de aplicação das nanocápsulas seria no setor de bebidas, como por exemplo, o uso do pigmento como corante natural em isotônicos.

Sugere-se ainda, a realização de estudos *in vitro*, pelo método ABTS, para determinar a atividade antioxidante do β -caroteno nanoencapsulado, aplicado em produtos alimentares.

Sugere-se também estudos *in vitro*, sobre o mecanismo de liberação do β -caroteno nanoencapsulado.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998(*). Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Republicada por ter saído com incorreção, do original. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, de 30 de março de 1998.
- AGUILO, A. T. *et al.* **Uso de Nanoemulsion Enriquecidas En Betacaroteno Y Vitamina E como recobrimentos comestíveis**: Estudio De La Bioaccesibilidade De Substancias activas, TCC, Universidade de Lleida-2015
- AJILA, C. M., NAIDU, K. A., BHAT, S. G., PRASADA RAO, U. J. S. Bioactive compounds and antioxidant potential of peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 982-988, 2007.
- ALVES-RODRIGUES, A., and A. Shao, 2004, The science behind lutein: Toxicology Letters, v. 150, p. 57-83.
- ANTON, N., BENOIT, J. P, SAULNIER, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates- A review. **Journal of Controlled Release**, 128, 185-199.
- ASSIS. L. M, *et al* **Características de nanopartículas e potenciais aplicações em Alimentos**, Revisão, Campinas, Brazilian Journal of food tecnology v.15.n.2, P.99-109, abr, Jun. 2012.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97 -2005.
- BARREIROS, A., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reative species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1 p. 113-123 -2006.
- BELNSTEIN, J. The protective factors of fruit and vegetables. Food Teach. Int., 10:12-4-2001.
- BOBBIO, P. A. BOBBIO, F. O. **Química de processamento de alimentos**. São Paulo: Varela- 2001.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Resolução RDC n.2, de 02 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento Técnico das substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e ou de saúde. Brasília, DF. ANVISA, 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02-02rdc.htm>.> Acesso em: 5 de julho de 2018.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de atenção Básica. Carências de Micronutrientes. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Resolução de diretoria colegiada-RDC nº 269 de 22 set, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n.16, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 1999.
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSENS, S.; PFANDER, H. **Carotenoids: Volume 4: Natural Functions**. Basel: Birkhäuser Basel 2008.
- BYUN, Y., HWANG, J.B., SUNG HWAN BANG, S. H., DARBY, D., COOKSEY, K., DAWSON, P. L., PARKA, H. J., WHITESIDE, S. Formulation and characterization of *o*-tocopherol loaded poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanoparticles. *LWT - Science and Technology*, v. 44, p. 24 - 28, 2011.
- CADENAS. E., PACKER L. **Hand book of Antioxidants**, 2nd edition. Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
- CARDOSO, Sergio F. **Fotofísica de Carotenoides e o Papel antioxidante de β -caroteno**. Universidade Federal do Rio de Janeiro-CT. Química Nova.20(5), 1997.
- CENCI, Sergio A. **Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças-Tecnologia, Qualidade e Sistemas de Embalagens**. Embrapa Agroindústria de alimentos. Rio de Janeiro, 2011.
- CHAVES, Daniela. **Fojo Seixas Compostos Biotivos dos Alimentos 1ª edição**, Coleção Nutrição Clínica Funcional, editora Metha, São Paulo-2015.
- CHITARA, M. I. F., CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005.
- COURRAUD, J. *et al.* Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. *Food Chemistry*, v. 136, n. p. 871-877, 2013.
- CUSHEN. M. **Nanotechnologies in the food industry e Recent developments, risks and regulation**. Trends in Food Science & Technology, p.1-17, 2011.
- DA SILVA. M. M, *et al.* **The Production, Characterization, and the Stability of Carotenoids Loaded in Lipid-Core Nanopcapsules**. Food Bioprocess Technol, journal Springer Science-Business Media New York-2016.
- DA SILVA. M. *et al.* (2017). Thermal and ultraviolet-visible light stability kinetics of co-nanocapsuled carotenoids, **Food Bioproducts Processing**, p. 86-94, 2017.

- DAMODARAN. S., PARKIN. K.L., FENNEMA. O.R, Química de Alimentos de Fennema, 4ª edição, editora Artmed, Porto Alegre- 2010.
- DANIELS, J. *et al.* A randomized controlled trial increasing fruit and vegetable intake and how this influences the carotenoid concentration and activities of PON-1 and LCAT in HDL from subjects with type 2 diabetes. **Cardiovascular Diabetology**, p. 13-16, 2014.
- DE MORAIS. F. L. **Carotenoides: Características Biológicas e Químicas**. Universidade de Brasília -CET. Mar, 2006.
- DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A. R., PAREDES-LÓPES, O., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2000, 40, 173.
- DONHOWE, E. G., FLORES, F. P., KERR, W. L., WICKER, L., & KONG. F. (2014). Characterization and in vitro bioavailability of b-carotene: effects of microencapsulation method and food matrix. *LWT e Food Science and Technology*, 57 (1), 42 e 48.
- DOS Santos, P.P., Paese, K., Guterres, S.S., Pohlmann, A. R., Costa, T. H., Jablonski, A., Florês, S. H., Rios, A. O., (2015) Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study, Springer Science, 107, 1-11.
- DOS SANTOS, P.P., PAESE, K., FLORS, S. H., RIOS, A. O. CHISTÉ, R. C. 2016, a review, **Food Science and Technology**.
- DURAN. N., MATTOSO. L. H. C., De MORAIS. P. C. **NANOTECNOLOGIA- Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**, Artliber Editora, São Paulo, 2006.
- EVANS, J. A., JOHNSON, E. J. The role of phytonutrients in skin health. **Nutrients**, v. 2, p. 903-928, 2010.
- FATHI, M., MOZAFARI, M.R., MOHEBBI., M. **Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems** Trends in Food Science & Technology, v.23, p. 13-27. 2012.
- FAVORO-TRINDADE, C.S., PINHO, ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n.2, p.103-112, 2008.
- FERNÁNDEZ, G. E., CARVAJAL, L. I., JARÉN, G. M., GARRIDO, F. J., PÉREZ, G. A., HORNERO, M. D., Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, v.46, n. 2, p. 438-450, 2012.

- FERREIRA, I. C. F. R., ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, n. 2, p. 33-39, 2007.
- FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P. Procédé de preparation de systems colloid auxdispersibles d'une substancesous forme de nanocapsules. **European Patent 274961 A1**, 20 July 1998.
- G. BRITTON, S. LIAAEN-JENSEN, H. PFANDER, Carotenoides Handbook, Birkhauser, 2004.
- GIASSON, B. I. *et al.* The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 32, n. 12, p. 1264-1275, 2002.
- GONNET. M., LETHUAUT. L., BOURY. F., New trends inencapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v.146 (3), p.276-290. 2010.
- HALLIWEEL B. Free radicals and other reactive species in disease. **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**, p. 1-9, 2015.
- HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implication for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, p. 685-716, 2001.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HAMERSKI, L., REZENDE, M. J. C., SILVA, B., V. Usando as Cores da Natureza para Atender aos Desejos do Consumidor: Substâncias Nturais com Corantes na Indústria Alimentícia. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.
- HAMMOND, B. R., RENZI, L. M., Carotenoids. *Advances In Nutrition*, v. 4, p. 474-476, 2013.
- HANNUN, S. M. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44: 1-17, 2004.
- HANS, M. L., LOWMAN, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 319 e 327.
- HASAN, A. S., SOCHA, M., LAMPRECHT, A., GHAZOUANI, F. E., SAPIN, A., HOFFMAN, M., MAINCENT, P., & UBRICH, N. (2007). Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of nanoparticles on the reduction of burst release. International Journal of Pharmaceutics*, 344, 53-61.

- HERCULANO, E. D. óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* nanoencapsulado para utilização como conservante em alimentos, Dissertação-Universidade Federal do Ceará-Fortaleza, 2014.
- HODGES. D. MARKES., TOIVONEN. PETER. M. A. **Quality of fresh-cut fruits and vegetable as affected by exposure to abiotic Stress**, A review, Postharvest Biology and Technology, Canada, 48 (2008) 155-162.
- HOLST, B., WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 73-82, n. 2, 2008.
- HOLTZ. Selma. G. **Aplicação de Ozônio e Revestimento Comestíveis Em Morangos**. Trabalho de conclusão de Curso. Viçosa, Brasil-2006.
- HORST, B. L. **Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginate através das técnicas de impregnação, conservação e Spraydrying**. 103p. Dissertação-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- HUANG, Q. YU, H., RU, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75, R50 e R57.
- INSTITUTO BRASILEIRO De ESTATISTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamento familiares 2009**: Aquisição alimentar domiciliar. Rio de Janeiro, 2010.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4ª ed, 2008. 1020p.
- KHAYATA, N., ABDELWAHED, W., CHEHNA, M. F., CHARCOSSET, C., FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 423, p. 419 - 427, 2012.
- KWAK, N., JUKES, D., J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**. v.12, n. 2, p. 99-107, 2001.
- LEE, K. E., CHO, S. H., LEE, H. B., JEONG, S. Y., YUK, S. H. (2003). Microencapsulation of lipid nanoparticles containing lipophilic drug. **Journal of Microencapsulation**, 20, 489-496.

- LEMMENS, L. *et al*, **Carotenoid Bioaccessibility in Fruit and vegetable Based Food Products** Affected by Products (micro). Structural Characteristics and The Presence of Lipids: A review, *Trends in Food Science Technology*.125-135, 2014.
- LEO, E., BRINA, B., FORNI, VANDELLI, M. In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 133-141, 2004.
- LETCHEFORD, K., BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259-269, 2007.
- LINO, R. C. **Desenvolvimento de filmes de metil celulose incorporados por nanopartículas de Poli- ϵ -caprolactona/ β -caroteno**; Dissertação-Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em ciências e tecnologias de alimentos, Florianópolis, 2012.
- LOBATO, K. B. S., Paese, K., Forgearini, J.C., Guterres, S.S., Jablonski, A., Rios, A. O. (2013). Characterisation and stability bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, 141, 3906-3912.
- LOBO, A. S., TRAMONTE, V. L. C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. *Revista de Nutrição*, Campinas, SP, v. 17, n. 1, p. 107-113, jan./mar. 2004.
- MA, L. *et al*. A dose-response meta-analysis of dietary lutein and zeaxanthin intake in relation to risk of age-related cataract. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 242, p. 63-70, 2014.
- MATTEA, F., MARTIN, Á., MATÍAS-GAGO, A. & COCERO, M. J. **Super critical anti solvent precipitation from an emulsion: beta-carotene nanoparticle formation**. *Journal of Supercritical Fluids*, v.51(2), p.238-247, 2009.
- MELO, A. M., VELASBOAS, E.V. B., JUSTOS, C. F. **Uso de aditivos químicos para conservação pós-colheita de banana Maçã minimamente processada**. *Ciência e tecnologia de Lavras*, v.26, n.33, n.1, p.228-236, jan./fev., 2009.
- MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. **Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*)**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 4102-4106, 1998.

- MILAGRES, R. C. R. M. *et al.*; A deficiência de vitamina A em crianças no Brasil e no mundo. *Ciências e Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 5, p. 1253-1266, set./out. 2007.
- MILLS, J. P. *et al.* **Sweet potato β -carotene bioefficacy is enhanced by dietary fat and not reduced by soluble fiber intake in Mongolian gerbils.** *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v.139, p. 44-50, jan 2009.
- MOHAMED, N., HASHIM, R., RAHMAN, N. A., ZAIN, S. M., J. *MolStuct: Theochem.* 2001, 538, 245.
- OLIVEIRA, J., PALOU, A.; *J. Chromatogr., A* 2000, 881, 543.
- OMS-OLIU, G. *et al.* **Edible coatings with anti browning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears.** *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.50, p.87-94, 2008.
- OMS-OLIU, G. *et al.* recente approach using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Post harvest Biology and Technology*, v.57, p. 139-148, 2010.
- OZDEMIR, E. *et al.* *Selenium* and plasma malondialdehyde levels and antioxidant enzyme activities in patients with obsessive-compulsive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, p. 62-65, 2009.
- PAGANI, A. A. C. *et al.* **Efeito da Biopelícula de Alginato de Sódio em maçãs Minimamente processadas.** *Revista GEINTEC-Ião Cristovão/SE-2012.vol.2/n.5/p.436-444.*
- PAULA. N. R. F *et al.* **Qualidade de Produtos minimamente Processados e comercializados em Gondolas de Supermercados na Cidade de Lavras-MG,** *cienc. Agrotec.* Lavras, v.33, n.1, p.219-227, jan/fev., 2009.
- PENTEADO.M. De. V. C, **Vitaminas-Aspectos nutricionais, bioquímicos clínicos e analíticos.** 1ªedição Brasileira, editor Manole, São Paulo-2003.
- physicochemical characterization and stability study, *Springer Science*, 107, 1-11.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.
- PONTES, S. F. O. **Desenvolvimento de Nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filmes de metilcelulose para uso em alimentos,** *Tese Doctor Scientiae,* Universidade Federal, 2001.

- RAO, S. *et al.* Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 2-7, 2011.
- RIBEIRO, H.S., CHU, B-S., ICHIKAWA, S., NAKAJIMA, M. Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method. **Food Hydrocolloids**, v.22, p. 12 – 17, 2008.
- RICHARD-FORGET, F. C., GOUPY, P. M., NICOLAS, J. J. **Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v.40, n.11, p.2. 108-113, 1992.
- RIVEIRA, S. M., CANELA-GARAYOA, R., Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1224, p. 1-10, 2012.
- RODRIGUES-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Some Physico chemical properties of carotenoids, 14-22, 1999.
- RODRIGUES-AMAYA, D. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington: ILSI Press, 64p.2001.
- RODRIGUES-AMAYA, D. B., KIMURA, M. Harvest plush and book for **carotenoid Analysis**. Washington: IFPRI; Cali: CIAT, 2004, 58p.
- RODRIGUEZ-HUEZO, M. E., PEDROZA-ISIAS, R., PRADO-BARRAGAN, L. A., BERISTAIN, C. I., VERNON-CARTER, E. J., 2004. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. **Journal of Food Science** 69, 351-359.
- ROSS, A. C. (2012). Vitamin A and retinoic acid in T celle related immunity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 96 (5), 1166S e 1172S.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA. M.; AMAYA-FARFAIN, J. Fontes Brasileiras de carotenoides: tabela Brasileiras de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: MRA/SBF, 2008.
- SALGADO J.M., Guias dos funcionais: quando a alimentação é melhor remédio. São Paulo: Edi Ouro; 2009.
- SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. **Nanoscale materials development a food industry perspective**. Trends Food Sci. Tech. 2006; 17 (10):547-556.
- SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLA-COSTA, T., GUTERRES, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and

- nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003.
- SHAOO, SK., LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discov Today**, v. 8; p. 1120; 2003.
- SHARONI, Y. *et al.* Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, p. 259-269, 2012.
- SINDHU, E. R. *et al.* Effect of carotenoid lutein on N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma and its mechanism of action. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. 4, p. 320-327, 2013.
- SILVA, J. M. *et al.* **Uso de antioxidante 4-hexylresorcinol em abacaxi minimamente processado**. Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha, v.8, n.2, p.101-107, 2007.
- SOCACIU, C. **Food Colorants Chemical and Funetional Properties**, CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL- EUA, 2008.
- SOUZA, B. S.; DURIGAN, J. F. **Processamento mínimo de abacaxi**. In: MORETTI, C. L. (Ed.). Manual de processamento Mínimo de frutas e Hortaliças, Brasília: Embrapa/SEBRAE, p.195-202. 2007.
- STENEKES, R. J., LOEBIS, A. E., FERNANDES, C. M.; CROMMELIN, D. J., & HENNINK, W. E. (2000). Controlled release of liposomes from biodegradable dextran microspheres: A novel delivery concept. **Pharmaceutical Research**, 17 690-695.
- TAN, C. P.; NAKAJIMA, M. **β -caroten nano dispersion: preparation, characterization and stability evaluation**. Food Chemistry. v.92, p.661-671, 2005
- TELEKI, A., HITZFELD, A., & EGGERSDORFER, M. (2013). 100 Years of vitamins: the science of formulation is the key to functionality. **Kona Powder and Particle Journal**, 30, 144 e 163.
- TIRAPEGUI, J. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. São Paulo (SP): Atheneu, 2002.
- UENEJO, M., JUNIOR, M. R. M., PASTORE, G. M. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Biotransformação para Formação de Compostos de aroma. Revisão. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 616-622, 2007.
- VALDUGA, E. *et al.* Produção de Carotenoides: Microrganismos como Fonte de Pigmentos Naturais. Revisão. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 9, 2429-2436, 2009.

- VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VELLOZO, E. P.; FISBERG, M. A. contribuição dos alimentos fortificados na prevenção da anemia ferropriva. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 140-147, maio 2010a.
- VENTURINI, C.G. *et al* Formulation of Lipid Core Nanocapsules. *Colloids And Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v.375, n.1-3, 2011.
- WEISS, T. J. *et al.* **Functional materials in food nanotechnology**. *Journal of Food Science*, Hoboken, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.
- WHO/FAO. Guidelines on food fortification with micronutrientes. 2006. http://www.who.int/nutrition/guide_food_fortification_micronutrients.pdf.
- WU, J. *et al.* Intakes of luteína, zeaxanthin and other carotenoids and age-related macular degeneration during 2 decades of prospective follow-up. **JAMA Ophthalmol**, v. 133, n. 12, p. 1415-1424, 2015.
- YAMAGUCHI, K.K.L. *et al.* Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.
- YAN, B. *et al.* Specific serum carotenoids are inversely associated with breast cancer risk among Chinese women: a case-control study. **British Journal of Nutrition**, v. 115, p. 129-137, 2016.
- YUFERA, E. P. *Química de los alimentos*, editorial Sintesis, Madrid-1998.
- ZANCUL, M. S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Social) — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- ZOMBRANO-ZARAGOZA. M. L, *et al.* **The effect of nano-coating With α -tocferol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut “Red Delicious” apples.** *Journal of Innovative Food Science and Emerging Technologies* 22 (2014)188