



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

**Nanoencapsulamento de óleo de chia e zeaxantina utilizando mucilagens como
material estruturante: desenvolvimento, caracterização e aplicação**

CAMILA DE CAMPO

PORTO ALEGRE

2018

CAMILA DE CAMPO

Nanoencapsulamento de óleo de chia e zeaxantina utilizando mucilagens como material estruturante: desenvolvimento, caracterização e aplicação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres
Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

de Campo, Camila
Nanoencapsulamento de óleo de chia e zeaxantina
utilizando mucilagens como material estruturante:
desenvolvimento, caracterização e aplicação / Camila
de Campo. -- 2018.
179 f.
Orientador: Simone Hickmann Flôres.

Coorientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Tese (Doutorado) -- 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. mucilagem de chia. 2. mucilagem de cacto. 3.
estabilidade. 4. aplicação de nanopartículas. 5.
iogurte. I. Hickmann Flôres, Simone, orient. II. de
Oliveira Rios, Alessandro, 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

Autora: Camila de Campo

Título da Tese: Nanoencapsulamento de óleo de chia e zeaxantina utilizando mucilagens
como material estruturante: desenvolvimento, caracterização e aplicação

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

Aprovada em:/...../.....

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

Pela Banca Examinadora:

Por:

Prof^ª. Dr^ª. Simone Hickmann Flôres
Orientadora
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS.

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues
Coordenador do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos
PPGCTA/UFRGS.

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Co-orientador
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS.

Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres
Diretora do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

Banca: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Doutor em Ciência de Alimentos
PPGCTA/UFRGS.

Banca: Prof^ª. Dr^ª. Jordana Corralo Spada
Doutora em Engenharia Química
DEQUI/UFRGS

Banca: Prof^ª. Dr^ª. Médelin M. da Silva
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos
UFPEL

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao universo e à Deus pela oportunidade que tive, por ter tido saúde, coragem e resiliência, que foram essenciais para concretizar essa etapa.

À minha amada família que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos e sempre me apoiou com muito amor. Não posso deixar de agradecer especialmente aos meus pais e à Rejane, que sempre fizeram tanto por mim e me ensinaram que é preciso batalhar, ser persistente e enfrentar os nossos medos. Essa conquista é nossa! Eu amo vocês!

Agradeço imensamente à minha orientadora Simone pela oportunidade, por ter confiado a mim esse desafio que me fez crescer e superar meus limites. Obrigada por sempre ter acreditado em mim, me mostrando que eu seria capaz e no final iria dar tudo certo, e deu! Obrigada por ter sempre dedicado um tempo ao meu trabalho, pela disponibilidade sempre que precisei e por ter dado o suporte necessário quando surgiram as dúvidas e dificuldades.

Agradeço ao meu co-orientador, professor Alessandro, pelo auxílio e sugestões durante a execução da minha pesquisa e por sempre ter tido “5 minutinhos” para tirar alguma dúvida.

Ao Diego pelo apoio, amor e compreensão. Obrigada por ter compreendido minha ausência, os longos finais de semana de estudo e por sempre ter me incentivado e continuar me incentivando tanto!

Às minhas amigas Letícia e Vitória. Ah amigas, vocês não sabem como são importantes para mim! Obrigada pelo apoio, por me escutarem, me acalmarem, mesmo que distante. A amizade de vocês foi essencial para me dar força e coragem para realização desta etapa. Essa conquista merece ser compartilhada e comemorada com vocês!

Agradeço a Dali e ao Jaci, por terem sido minha família em Porto Alegre, meus companheiros de vida, que dividiram comigo a casa, os momentos felizes, as angústias e os momentos difíceis. Obrigada por sempre terem me ouvido, me apoiado e vibrado comigo a cada conquista. Com certeza teria sido muito mais difícil sem vocês! Nem tenho palavras para agradecer por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Compostos Bioativos (Lab 211) por tudo que compartilhamos. Obrigada pelas risadas, momentos de descontração, de desabafo e pela ajuda nos momentos difíceis.

Agradeço especialmente aos meus amigos queridos: Renato, Tainara e Vanessa. Obrigada pela amizade, pelo apoio, por compartilharem comigo as conquistas e ouvirem os meus desabafos. Do 211 para a vida!

Às minhas amadas amigas, que vem comigo desde o mestrado: Anne, Médelin e Priscilla. Agradeço imensamente a amizade, o carinho, a torcida, e por estarem sempre presentes, mesmo que distante. Faço um agradecimento especial à Pri, pela ajuda nos experimentos e escrita dos artigos, tenho certeza que sem teu apoio eu não teria chego até aqui! Obrigada por ter me acalmado, por ter se disponibilizado mesmo em finais de semana e feriados. Obrigada pela paciência, amizade e por ter compartilhado tanto comigo! Tudo que sei hoje devo muito a ti!

À Fernanda por ter me ajudado tanto com as análises e por não ter medido esforços sempre que precisei! Obrigada pelas caronas, pelas risadas e pela amizade.

Aos meus queridos bolsistas de iniciação científica, Matheus, Laura e Carol. Obrigada pelo empenho e ajuda nos experimentos.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos por sempre terem sido tão queridos e receptivos comigo.

À professora Tania, pela ajuda nas análises e pela disponibilidade em ajudar sempre.

À Karina por compartilhar comigo seus conhecimentos. Obrigada pelo empenho e contribuições para o meu trabalho e por sempre ter me recebido e se disponibilizado a sanar minhas dúvidas.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

A todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Muito obrigada!

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

O interesse em ácidos graxos poli-insaturados e compostos bioativos tem aumentado nos últimos anos, por contribuírem na diminuição do risco de desenvolver doenças, tais como câncer e doenças cardiovasculares. Entre os óleos que contêm ácidos graxos poli-insaturados, o óleo de chia se destaca por possuir alto teor de ômega 3. Entre os carotenoides, a zeaxantina representa potencial para ser aplicada em alimentos por atuar na diminuição do risco de desenvolver doenças oculares. No entanto, tais compostos são instáveis na presença de luz, calor e oxigênio e insolúveis ou pouco solúveis em água, o que limita sua aplicação em alimentos. Diante disso, o nanoencapsulamento representa uma alternativa promissora para aumentar a estabilidade e permitir a dispersão desses compostos em alimentos ricos em água. No intuito de oferecer produtos mais naturais aos consumidores, os materiais sintéticos utilizados no encapsulamento têm sido substituídos por polímeros naturais, como as mucilagens. Nesse contexto, no primeiro estudo, nanopartículas de óleo de chia (CSO-NP) foram desenvolvidas com mucilagem de chia como material estruturante. Em um segundo estudo, desenvolveu-se nanopartículas de zeaxantina (Zea-NP) utilizando mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*) como material estruturante. Na terceira parte da pesquisa, no intuito de avaliar a influência da adição de nanopartículas em uma matriz alimentícia rica em água e verificar sua estabilidade quando incorporadas em um alimento, além de enriquecer um produto com zeaxantina e aumentar seu valor agregado, as nanopartículas de zeaxantina (Zea-NP) foram incorporadas em iogurte, por ser um alimento amplamente consumido e por possuir alta quantidade de água. Inicialmente, ambas as nanopartículas desenvolvidas foram caracterizadas em relação ao tamanho da partícula, potencial zeta, valor de span, eficiência de encapsulação, morfologia, pH, viscosidade, propriedades térmicas e espectroscopia no infravermelho (FT-IR). A capacidade de carga das CSO-NP e cor das Zea-NP também foram avaliadas. As CSO-NP e uma emulsão desenvolvida, a fim de comparações, tiveram sua estabilidade avaliada durante 28 dias de armazenamento em condições aceleradas (40 °C), sem a presença de luz. A estabilidade das Zea-NP e de uma nanoemulsão de zeaxantina (Zea-NE) também foi avaliada em diferentes temperaturas (4, 25 e 40 °C), durante 28 dias, na ausência de luz. Para avaliar a aplicação das Zea-NP em uma matriz alimentícia, três formulações de iogurte foram desenvolvidas: controle (CY), com adição de nanopartículas (Y-NP) e com adição de nanoemulsão (Y-NE). Os iogurtes foram armazenados durante 28 dias a 4 °C em potes plásticos fechados e suas características físico-químicas e a retenção de zeaxantina em Y-NP e Y-NE foram avaliadas semanalmente. As características sensoriais e morfologia do CY, Y-NP e Y-NE foram avaliadas logo após o preparo. Também foi realizada a análise de digestão *in vitro*, a fim de avaliar a bioacessibilidade da zeaxantina em Y-NP e Y-NE. Os resultados do primeiro estudo demonstraram que as CSO-NP apresentaram formato esférico, diâmetro médio de $205 \pm 4,24$ nm, potencial zeta de $-11,58 \pm 1,87$ mV e valor de span de $1,76 \pm 0,09$, o que indicou uma distribuição de partícula homogênea. Além disso, as CSO-NP apresentaram alta eficiência de encapsulação (82,8%) e capacidade de carga de 35,38%. Ao longo do armazenamento não foram verificadas mudanças significativas no valor de span e potencial zeta e apesar de ter ocorrido aumento significativo no diâmetro da partícula ao final do período e de terem sido observadas mudanças no pH, as CSO-NP apresentaram maior estabilidade que a emulsão ao longo do armazenamento em condições aceleradas. Conforme os resultados do segundo estudo, as Zea-NP apresentaram formato esférico, diâmetro médio de $184 \pm 3,54$ nm, potencial zeta de $-14,8 \pm 0,42$ mV, valor de span de $1,18 \pm 0,06$ e eficiência de encapsulação de 96,57%. Durante o armazenamento em diferentes temperaturas, as Zea-NP não apresentaram alterações significativas no valor de span, pH e cor. Em relação ao diâmetro da partícula, foi observado um aumento nas amostras armazenadas nas temperaturas de 25 e 40 °C após o primeiro dia de armazenamento, que permaneceu constante até o fim do período. Apesar

dessas mudanças, as Zea-NP apresentaram estabilidade satisfatória, ao considerar que ao final do armazenamento a 25 e a 40 °C, apresentaram 39,66% e 31,30% de retenção de zeaxantina, respectivamente, enquanto que para as Zea-NE, a retenção do carotenoide foi de 20,64% e 0,73% nas mesmas temperaturas. Quando as Zea-NP foram armazenadas a 4 °C, verificou-se que houve uma maior retenção de zeaxantina (56,29%). De acordo com os resultados do terceiro estudo, ao final do período de armazenamento, o Y-NP apresentou maior pH e menor acidez do que o CY, além de maior intensidade de cor b*, devido à presença do carotenoide. Apesar do Y-NP ter demonstrado menor viscosidade e maior sinérese do que o CY, essas alterações não foram perceptíveis na análise sensorial. Além disso, ao final do armazenamento a retenção de zeaxantina foi de 22,31% no Y-NP e 16,84% no Y-NE. Quanto à digestão *in vitro*, o Y-NP apresentou menor concentração de zeaxantina nas micelas do que o Y-NE e conseqüentemente menor bioacessibilidade, o que pode sugerir que as Zea-NP forneceram uma liberação controlada do carotenoide. Os resultados deste trabalho evidenciaram que foi possível obter nanopartículas com características adequadas e com alta estabilidade, através do uso da mucilagem de chia e da mucilagem de cacto como material estruturante, o que viabiliza o uso dessas mucilagens em substituição a polímeros sintéticos no nanoencapsulamento. Devido as características satisfatórias, ambas as nanopartículas obtidas demonstraram potencial para serem aplicadas em alimentos. Além disso, quando incorporadas em iogurte, apesar de as nanopartículas de zeaxantina terem apresentado menor bioacessibilidade, ainda apresentaram vantagem em relação à nanoemulsão, devido à sua capacidade de proteção ao composto encapsulado, o que conferiu maior estabilidade ao carotenoide. Tais resultados indicam que as nanopartículas possuem potencial de utilização em processos industriais e tecnológicos.

Palavras-chave: mucilagem de chia; mucilagem de cacto; estabilidade; aplicação de nanopartículas; iogurte; digestão *in vitro*.

ABSTRACT

The interest in polyunsaturated fatty acids and bioactive compounds has increased in the last years, due to its contribution in reducing the risk of developing diseases, such as cancer and cardiovascular diseases. Among oils which contain polyunsaturated fatty acids, chia oil stands out due to its high omega 3 content. Among the carotenoids, zeaxanthin represents potential to be applied in foods due to its capacity in reducing the risk of developing eye diseases. However, such compounds are unstable in the presence of light, heat and oxygen and insoluble or poorly soluble in water, which limits its application in food. In this view, nanoencapsulation represents a promising alternative to increase stability and allow dispersion of these compounds in water-rich foods. In order to offer more natural products to consumers, the synthetic materials used in encapsulation have been replaced by natural ones, such as mucilages. In this context, in the first study, chia oil nanoparticles (CSO-NP) were developed with chia mucilage as structuring material. In a second study, zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP) were developed using cactus cladode mucilage (*Opuntia monacantha*) as structuring material. In the third part of the research, in order to evaluate the influence of nanoparticles addition in a water-rich food matrix and to verify its stability when incorporated into a food, besides enriching a product with zeaxanthin and add value, zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP) were incorporated into yogurt, due to its ample consumption and high water amount. Initially, both developed nanoparticles were characterized in terms of particle size, zeta potential, span value, encapsulation efficiency, morphology, pH, viscosity, thermal properties and infrared (FT-IR) spectroscopy. The loading capacity of CSO-NP and Zea-NP color were also evaluated. CSO-NP and an emulsion developed for comparative purposes, had their stability evaluated for 28 days of storage under accelerated conditions (40 °C), without light presence. The stability of Zea-NP and a zeaxanthin nanoemulsion (Zea-NE) was also evaluated at different temperatures (4, 25 and 40 °C) for 28 days in the absence of light. To evaluate the Zea-NP application in a food matrix, three yogurt formulations were developed: control (CY), with nanoparticles addition (Y-NP) and with nanoemulsion addition (Y-NE). Yogurts were stored for 28 days at 4 °C in closed plastic pots and their physicochemical characteristics and zeaxanthin retention in Y-NP and Y-NE were evaluated weekly. The sensory characteristics and morphology of CY, Y-NP and Y-NE were evaluated after preparation. *In vitro* digestion analysis was also performed to evaluate the zeaxanthin bioaccessibility in Y-NP and Y-NE. The results of the first study showed that CSO-NP presented spherical shape, mean diameter of 205 ± 4.24 nm, zeta potential of -11.58 ± 1.87 mV and span value of 1.76 ± 0.09 , which indicated a homogeneous particle distribution. In addition, CSO-NP presented high encapsulation efficiency (82.8 %) and load capacity of 35.38 %. No significant changes in span and zeta potential values were observed during storage, and although there was a significant increase in particle size at the end of the period and changes in pH, CSO-NP presented higher stability than emulsion during storage at accelerated conditions. According to the results of the second study, the Zea-NP presented spherical shape, mean diameter of 184 ± 3.54 nm, zeta potential of -14.8 ± 0.42 mV, span value of 1.18 ± 0.06 and encapsulation efficiency of 96.57 %. During storage at different temperatures, Zea-NP did not show significant changes in the span value, pH and color. Regarding the particle size, an increase in samples stored at temperatures of 25 and 40 °C was observed after the first day of storage, which remained constant until the end of the period. Despite these changes, Zea-NP presented satisfactory stability, considering that at the end of the storage at 25 and 40 °C, presented 39.66 % and 31.30 % of zeaxanthin retention, respectively, whereas for Zea-NE, carotenoid retention was 20.64 % and 0.73 % at the same temperatures. When stored at 4 °C, Zea-NP presented higher zeaxanthin retention (56.29 %).

According to the results of the third study, at the end of the storage period, Y-NP presented higher pH and lower acidity than CY and higher intensity in color b* due to the presence of the carotenoid. Although Y-NP showed lower viscosity and higher syneresis than CY, these changes were not perceived in sensory analysis. In addition, at the end of storage, zeaxanthin retention was 22.31 % in Y-NP and 16.84 % in Y-NE. Regarding *in vitro* digestion, Y-NP presented lower zeaxanthin concentration in micelles than Y-NE, and consequently lower bioaccessibility, which may suggest that Zea-NP provided a controlled release of the carotenoid. The results of this work showed that it was possible to obtain nanoparticles with adequate characteristics and high stability using chia and cactus mucilage as structuring materials, which allows the use of these mucilages in substitution to synthetic polymers in nanoencapsulation. Due to the satisfactory characteristics, both obtained nanoparticles showed potential to be applied in food. In addition, when incorporated into yogurt, although the zeaxanthin nanoparticles showed less bioaccessibility, they still had advantage over nanoemulsion, due to its capacity to protect the encapsulated compound, which conferred greater stability to the carotenoid. These results indicate that nanoparticles have potential to be used in industrial and technological processes.

Key-words: chia mucilage; cactus mucilage; stability; nanoparticles application; yogurt; *in vitro* digestion.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Estrutura química do β -caroteno (a), α -caroteno (b), β -criptoxantina (c).....	31
Figura 2. Estrutura química da zeaxantina.	32
Figura 3. <i>Goji berry</i> (<i>Lycium barbarum</i> L.).....	34
Figura 4. Representação esquemática de nanoesfera e nanocápsula.	38
Figura 5. Imagens ópticas da semente de chia inteira (a) e mucilagem da chia envolvendo a semente após hidratação em água (b), utilizando magnificação de 10x e 40x.....	44
Figura 6. Composição da estrutura da mucilagem de chia; I β -D-xilose; II α -D-glucose; III ácido 4-O-metil- α -D-glucorônico; IV ácido aldobiurônico; V tetrassacárido (unidade estrutural).....	45

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 7- Etapas principais da extração da mucilagem da chia: (a) imersão das sementes em água e agitação; (b) separação da mucilagem da semente com auxílio de peneira e bomba à vácuo; (c) mucilagem de chia após secagem.	69
Figura 8 - Etapas principais da extração da mucilagem: (a) cladódios higienizados e secos; (b) trituração dos cladódios em processador; (c) precipitação do sobrenadante com etanol 95 %; (d) mucilagem do cladódio de cacto após secagem.	70
Figura 9 - Etapas do preparo das nanopartículas de óleo de chia (CSO-NP).....	72
Figura 10 - CLAE com detector UV e coluna C 30.	73
Figura 11 - Etapas do preparo das nanopartículas de zeaxantina (Zea-NP).....	75
Figura 12 - Equipamento Mastersizer utilizado para medir diâmetro da partícula e valor de span.....	76
Figura 13 - Equipamento Zetasizer, Nano ZS utilizado para medir potencial zeta.....	76
Figura 14 - (a) Viscosímetro rotacional Brookfield; (b) Reômetro HAAKE.....	77
Figura 15 - Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama.	78
Figura 16 - Microscópio eletrônico de transmissão.	81
Figura 17 - (a) Analisador termogravimétrico; (b) calorímetro.	82
Figura 18 - Espectrofotômetro utilizado para a análise de FT-IR.....	82
Figura 19 - Colorímetro utilizado para as medidas de cor.	83
Figura 20 - Câmara BOD, utilizada no experimento de estabilidade.....	84
Figura 21. Iogurte contendo nanopartículas e nanoemulsão de zeaxantina.	85

Figura 22. Amostras de iogurte armazenadas em câmara BOD (4 °C) para o teste de estabilidade.	86
Figura 23. Texturômetro utilizado para as análises de textura dos iogurtes.	87

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 1

Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: characterization and stability evaluation

Fig 1. Nanoparticle size distribution (volume) of CSO-NP with different concentrations of CSO (a) 0.5 mg/mL (b) 0.75 mg/mL and (c) 1.25 mg/mL obtained by laser diffraction (LD).	103
Fig 2. TEM images of CSO-NP at (a) 200 x and (b) 300 x magnifications [bar 100 nm].	104
Fig 3. (a) Thermogravimetric analysis (TGA), (b) dTG and (c) Differential Scanning Calorimetry (DSC) of CSM and CSO-NP.	107
Fig 4. Fourier transform infrared (FT-IR) of chia seed oil (CSO), chia seed mucilage (CSM) and chia seed oil nanoparticles (CSO-NP).	108

CAPÍTULO 4 – ARTIGO 2

Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: characterization and stability evaluation under different temperatures

Fig. 1. Response surface for mean diameter (nm) as a function of CM (%) and CO (mg).	128
Fig. 2. Particle size distribution (volume) of Zea-NP with different concentrations of zeaxanthin extract (a) 10 µg/mL, (b) 20 µg/mL, (c) 30 µg/mL and (d) 40 µg/mL.	130
Fig. 3. Particle size distribution (volume) of Zea-NP (a) and Zea-NE (b).	132
Fig. 4. TEM images of Zea-NP (a) and Zea-NE (b) at 200 x magnification [bar 100 nm]. ...	134
Fig. 5. Thermogravimetric analysis (a) and dTG curves (b) of CM, Zea-NP, and Zea-NE. ...	135
Fig. 6. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) of chia seed oil (CSO), cactus cladode mucilage (CM) and zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP).	136
Fig. 7. Zeaxanthin retention in Zea-NP and Zea-NE stored at 4 °C, 25 °C and 40 °C during 28 days.	142

CAPÍTULO 5 – ARTIGO 3

Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis

Fig. 1 pH (a), titratable acidity (b) and syneresis (c) of control yogurt (CY), yogurt added of nanoparticles (Y-NP) and yogurt added of nanoemulsion (Y-NE) during 28 days of storage at 4 °C.	159
Fig. 2 Color parameters of CY, Y-NE, and Y-NP during 28 days of storage at 4 °C. (a) L values (lightness), (b) a* (red-green intensity), (c) b* (yellow-blue intensity).....	161
Fig. 3 Viscosity (Pa.s ⁻¹) of CY, Y-NE, and Y-NP during 28 days of storage at 4 °C.....	163
Fig. 4 Zeaxanthin retention (%) in Y-NP and Y-NE during 28 days of storage at 4 °C.....	164
Fig. 5 TEM images of CY (a), Y-NP (b) and Y-NE (c) at 13500 x (a) and 26500 x (b,c) magnification [bar 500 nm (Fig 5a) and 200 nm (Fig 5b and 5c)]......	165
Fig. 6 Sensory analyses scores for appearance, color, flavor, consistency, texture, taste, aftertaste and overall acceptability of CY, Y-NP and Y-NE.....	166

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em óleos vegetais (%).....27

Tabela 2. Composição e concentração dos sais utilizados para preparo dos fluidos utilizados na análise de digestão *in vitro*.....89

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 1

Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation

Table 1. CSO-NP stability during 28 days of storage at 40 °C..... 109

Table 2. Fatty acid stability (mg/100g) of chia seed oil nanoparticles (CSO-NP) and emulsion containing chia seed oil during 28 days of storage at 40 °C under dark conditions..... 111

CAPITULO 4 – ARTIGO 2

Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as wall material: characterization and stability evaluation under different temperatures

Table 1. Coded levels for independent variables in 2² full-factorial design..... 123

Table 2. Full-factorial design 2² and the response for the dependent variable mean diameter. 128

Table 3. Regression coefficients for mean diameter..... 129

Table 4. Stability of mean diameter and span value of Zea-NP and Zea-NE stored at 4 °C, 25 °C and 40 °C during 28 days. 139

Table 5. Stability of pH and color (L, a* and b*) of Zea-NP and Zea-NE stored at 4 °C, 25 °C and 40 °C during 28 days..... 141

CAPITULO 5 – ARTIGO 3

Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis

Table 1. Texture parameters for control yogurt (CY), yogurt with nanoparticles (Y-NP) and yogurt with nanoemulsion (Y-NE), during 28 days of storage at 4 °C..... 162

SUMÁRIO

DIAGRAMA CONCEITUAL	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3 COMPOSTOS BIOATIVOS	25
3.1 Ácidos graxos poli-insaturados	25
3.1.1 <i>Óleo de chia</i>	27
3.1.2 <i>Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados</i>	29
3.2 Carotenoides	30
3.2.1 <i>Zeaxantina</i>	32
3.2.1.1 <i>Goji berry</i> como fonte de zeaxantina.....	33
3.2.2 <i>Estabilidade dos carotenoides</i>	36
4 NANOENCAPSULAMENTO	37
4.1 Materiais de parede utilizados no nanoencapsulamento	39
4.1.1 <i>Polissacarídeos</i>	40
4.1.2 <i>Gomas e mucilagens</i>	42
4.1.3 <i>Mucilagens</i>	43
4.1.3.1 <i>Mucilagem de chia</i>	43
4.1.3.2 <i>Mucilagem de cacto <i>Opuntia</i> ssp</i>	47
4.1.3.2.1 <i>Mucilagem de cacto da espécie <i>Opuntia monacantha</i></i>	49
5 APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA EM ALIMENTOS	51
6 REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	68
7 MATERIAIS E MÉTODOS	68
7.1 Materiais	68
7.2 Extração das mucilagens para uso como material estruturante	68
7.2.1 <i>Extração da mucilagem de chia</i>	68

7.2.2	<i>Extração da mucilagem do cladódio de cacto (Opuntia monacantha)</i>	69
7.3	Composição centesimal da mucilagem de chia	70
7.4	Preparo das soluções de mucilagem	71
7.5	Preparo das nanopartículas de óleo de chia (CSO-NP)	71
7.6	Obtenção do extrato de zeaxantina	72
7.7	Determinação da pureza do extrato de zeaxantina	72
7.8	Determinação da concentração do extrato de zeaxantina para preparo das nanopartículas	73
7.9	Preparo das nanopartículas de zeaxantina (Zea-NP)	74
7.10	Caracterização das nanopartículas	75
7.10.1	<i>Diâmetro médio da partícula</i>	75
7.10.2	<i>Potencial zeta</i>	76
7.10.3	<i>Viscosidade</i>	77
7.10.4	<i>pH</i>	77
7.10.5	<i>Determinação do teor de óleo de chia das CSO-NP</i>	77
7.10.6	<i>Derivatização dos ácidos graxos</i>	78
7.10.7	<i>Eficiência de encapsulação das CSO-NP</i>	79
7.10.8	<i>Determinação do teor de zeaxantina nas nanopartículas e eficiência de encapsulação</i>	80
7.10.9	<i>Capacidade de carga</i>	80
7.10.10	<i>Propriedades morfológicas</i>	80
7.10.11	<i>Propriedades térmicas (TGA e DSC)</i>	81
7.10.12	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	82
7.10.13	<i>Análise colorimétrica</i>	82
7.10.14	<i>Estudo de estabilidade das nanopartículas</i>	83
7.10.14.1	<i>Estabilidade das CSO-NP em condições aceleradas</i>	83
7.10.14.2	<i>Estabilidade das Zea-NP e Zea-NE em diferentes temperaturas</i>	84
7.11	Produção do iogurte	84
7.12	Aplicação das Zea-NP e Zea-NE no iogurte	85
7.13	Caracterização do iogurte	86
7.13.1	<i>Acidez total titulável</i>	86
7.13.2	<i>Sinérese</i>	87
7.13.3	<i>Propriedades de textura</i>	87
7.13.4	<i>Viscosidade</i>	88

7.13.5 Morfologia dos iogurtes	88
7.13.6 Determinação da estabilidade da zeaxantina no iogurte.....	88
7.13.7 Análise sensorial	89
7.14 Digestão <i>in vitro</i>	89
7.14.1 Preparo das soluções estoque e fluidos simulantes	89
7.14.2 Análise de digestão <i>in vitro</i>	90
7.14.3 Determinação da bioacessibilidade	90
8 REFERÊNCIAS	92
CAPÍTULO 3 - ARTIGO 1	93
Abstract	94
1 Introduction	94
2 Materials and methods	96
2.1 Materials.....	96
2.2 Mucilage extraction	96
2.3 Proximate analyses of CSM.....	96
2.4 Preparation of CSM solution.....	97
2.5 Preparation of chia seed oil nanoparticles (CSO-NP).....	97
2.6 Characterization of CSO-NP	98
2.6.1 Particle size distribution	98
2.6.2 Zeta potential.....	98
2.6.3 Viscosity	98
2.6.4 pH	98
2.6.5 Gas chromatography flame ionization detector (GC-FID).....	99
2.6.6 Encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC).....	99
2.6.7 Transmission electron microscopy (TEM)	100
2.6.8 Thermal properties	100
2.6.9 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)	100
2.6.10 Accelerated stability study	101
3 Results and discussion	101
3.1 Proximate analyses of CSM.....	101
3.2 Preparation and physicochemical characterization of CSO-NP.....	102
3.2.1 Preliminary tests	102
3.2.2 Mean diameter and morphology (TEM).....	103

3.2.3 Zeta potential, pH and Viscosity	104
3.2.4 Encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC).....	105
3.2.5 Thermal Analysis.....	106
4 Conclusion.....	112
Acknowledgements.....	113
5 References.....	113
CAPÍTULO 4 – ARTIGO 2.....	118
Abstract.....	119
1 Introduction.....	119
2 Materials and methods.....	121
2.1 Materials.....	121
2.2 Cactus mucilage extraction	121
2.3 Obtention of CM solution	122
2.4 Zeaxanthin extraction and purity determination	122
2.5 Determination of zeaxanthin extract concentration	122
2.6 Experimental design to nanoparticles obtention	123
2.7 Preparation of zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP)	123
2.8 Characterization of Zea-NP and Zea-NE	124
2.8.1 Particle size distribution and span value	124
2.8.2 Zeta potential and pH.....	124
2.8.3 Viscosity	124
2.8.4 Colorimetric analysis	125
2.8.5 Morphology	125
2.8.6 Thermal properties	125
2.8.7 High-performance Liquid Chromatography	125
2.9 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR).....	126
2.10 Encapsulation efficiency of Zea-NP	126
2.11 Determination of Zea-NP and Zea-NE stability	127
2.12 Statistical analysis	127
3 Results and discussion.....	127
3.1 Zeaxanthin extract and purity determination	127
3.2 Experimental design	127
3.3 Preliminary tests of zeaxanthin encapsulation	129

3.4	<i>Characterization of Zea-NP and Zea-NE</i>	131
3.4.1	<i>Particle size distribution and span value</i>	131
3.4.2	<i>Zeta potential and pH</i>	132
3.4.3	<i>Viscosity</i>	133
3.4.4	<i>Sample color</i>	133
3.4.5	<i>Morphological properties</i>	134
3.4.6	<i>Thermal properties</i>	135
3.4.7	<i>Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)</i>	136
3.5	<i>Encapsulation efficiency of Zea-NP</i>	137
3.6	<i>Determination of Zea-NP and Zea-NE stability under different temperatures</i>	138
4	Conclusion	143
	Acknowledgments	143
5	References	143
CAPÍTULO 5 – ARTIGO 3		150
Abstract		151
1 Introduction		151
2 Materials and methods		153
2.1	<i>Materials</i>	153
2.2	<i>Preparation of zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP) and zeaxanthin nanoemulsion (Zea-NE)</i>	153
2.3	<i>Yogurt manufacture</i>	154
2.4	<i>Yogurt analyses</i>	154
2.4.1	<i>pH and titratable acidity</i>	155
2.4.2	<i>Syneresis</i>	155
2.4.3	<i>Color</i>	155
2.4.4	<i>Texture analyses</i>	155
2.4.5	<i>Viscosity</i>	156
2.4.6	<i>Determination of Zea-NP and Zea-NE stability in yogurt</i>	156
2.4.7	<i>Yogurt morphology</i>	156
2.4.8	<i>Sensory analyses</i>	157
2.4.9	<i>In vitro digestion</i>	157
2.4.10	<i>Zeaxanthin bioaccessibility after in vitro digestion</i>	158
2.5	<i>Statistical analysis</i>	158

3 Results and discussion	158
3.1 <i>pH, titratable acidity and syneresis</i>	158
3.2 <i>Color measurements</i>	160
3.3 <i>Texture analyses</i>	161
3.4 <i>Viscosity</i>	162
3.5 <i>Zeaxanthin retention</i>	163
3.6 <i>Yogurt morphology</i>	164
3.7 <i>Sensory analyses</i>	165
3.8 <i>Zeaxanthin bioaccessibility after in vitro digestion</i>	166
4 Conclusion	168
Acknowledgements	168
5 References	169
CAPÍTULO 6- DISCUSSÃO GERAL	173
CAPÍTULO 7 - CONCLUSÃO GERAL	176
CAPÍTULO 8 – PERSPECTIVAS FUTURAS	177

Diagrama conceitual

Por que?

Devido à preocupação com a saúde e com a segurança alimentar, a busca por produtos naturais que possam servir como fonte de antioxidantes tem aumentado significativamente, ao considerar os benefícios que tais compostos podem trazer à saúde humana. No entanto, devido à instabilidade e suscetibilidade a oxidação desses compostos frente a altas temperaturas, oxigênio e luz, novas tecnologias são necessárias para aumentar sua vida útil e garantir sua funcionalidade. Frente a isso, o nanoencapsulamento representa uma alternativa promissora para disponibilizar ao consumidor compostos naturais mais estáveis.

Tendo em vista as perspectivas de consumo de produtos naturais e no intuito de oferecer alimentos livres de ingredientes sintéticos aos consumidores, o uso de polímeros naturais como material de parede no nanoencapsulamento têm sido relatado. Diante disso, a exploração e a viabilidade de utilização de novos materiais de parede naturais devem ser investigadas. Nesse contexto, as mucilagens de chia e do cladódio de cacto da espécie *Opuntia monacantha* são polissacarídeos naturais ainda não explorados nessa área, com características promissoras para uso como material estruturante no nanoencapsulamento. Estes polissacarídeos apresentam vantagens em relação aos polímeros sintéticos, por terem menor custo, não serem tóxicos e serem de fácil obtenção e extração, além de contribuírem para a sustentabilidade ambiental, por serem de origem vegetal. O uso de mucilagens no nanoencapsulamento pode ainda garantir uma maior gama de aplicação dos compostos encapsulados em alimentos, como em produtos direcionados para o público vegano e vegetariano. Além disso, através da aplicação de compostos nanoencapsulados com materiais de parede naturais em alimentos, é possível oferecer ao consumidor um produto mais seguro.

A aplicação de compostos nanoencapsulados em alimentos representa uma alternativa promissora para o aumento de sua estabilidade na matriz alimentícia, o que garante uma maior funcionalidade, além do aumento de sua vida de prateleira. Sendo assim, é necessário o estudo acerca da influência da adição de nanopartículas nas características dos alimentos, além da avaliação da bioacessibilidade do composto nanoencapsulado após a digestão *in vitro*.

Hipóteses da pesquisa:

- Mucilagens podem ser utilizadas para substituir polímeros sintéticos no nanoencapsulamento;
- É possível nanoencapsular óleo de chia com mucilagem de chia como material estruturante.
- É possível nanoencapsular zeaxantina com mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*) como material estruturante;
- Através do nanoencapsulamento é possível aumentar a estabilidade do óleo de chia e do carotenoide zeaxantina;
- Nanopartículas de zeaxantina podem ser aplicadas em iogurte e contribuir para o aumento da estabilidade do carotenoide no produto ao longo do armazenamento.

Metodologia experimental:

- Extração e caracterização da mucilagem de chia.
- Nanoencapsulamento de óleo de chia com mucilagem de chia como material estruturante.
- Caracterização e avaliação da estabilidade das nanopartículas de óleo de chia.
- Nanoencapsulamento de zeaxantina com mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*) como material estruturante;
- Caracterização e avaliação da estabilidade das nanopartículas de zeaxantina;
- Aplicação das nanopartículas de zeaxantina em iogurte;
- Caracterização físico-química e análise sensorial do iogurte com adição de nanopartículas de zeaxantina;
- Avaliação da bioacessibilidade da zeaxantina no iogurte, após a digestão *in vitro*.

Resposta:

É possível utilizar polímeros naturais, tais como mucilagem de chia e mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*) no nanoencapsulamento de óleo de chia e zeaxantina, respectivamente, a fim de substituir polímeros sintéticos;

O nanoencapsulamento foi efetivo no aumento da estabilidade do óleo de chia e do carotenoide zeaxantina, o que indica o potencial de uso das mucilagens estudadas como material estruturante;

As nanopartículas de zeaxantina podem ser aplicadas em iogurte e manter sua capacidade de proteger o carotenoide contra degradação durante o armazenamento do produto;

Os iogurtes adicionados de nanopartículas apresentaram menor bioacessibilidade de zeaxantina do que os iogurtes adicionados de nanoemulsão, o que sugere que, devido a presença do material estruturante, pode ter ocorrido liberação controlada do carotenoide.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a preocupação com a saúde humana e a busca por uma alimentação mais saudável tem aumentado. Além disso, evidências sobre a diminuição do risco de desenvolver doenças através do consumo de alimentos ricos em antioxidantes têm sido relatadas. Frente a isso, compostos bioativos como polifenóis, vitaminas, minerais, ácidos graxos poli-insaturados, e carotenoides têm sido estudados para potenciais aplicações em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e alimentos funcionais.

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) como o ômega-3 e ômega-6 possuem uma ampla aplicação em produtos farmacêuticos e alimentícios. Além disso, são ácidos graxos com grande interesse industrial e comercial, devido aos seus potenciais efeitos benéficos, relacionados à manutenção da saúde mental e redução do risco de doenças inflamatórias, cardiovasculares, hipertensão, diabetes e câncer. Os óleos vegetais estão entre as principais fontes de ácidos graxos. Entre eles, se destaca, o óleo de semente de chia (*Salvia Hispanica L.*) que é uma fonte rica em PUFAs, visto que 85% dos ácidos graxos que o compõe são poli-insaturados, incluindo o ômega-3 e ômega-6. Além disso, o óleo de chia é a fonte vegetal com maior conteúdo de ômega-3 (em torno de 60%) (AYERZA E COATES, 2011; SEGURACAMPOS *et al.*, 2014), portanto, constitui uma fonte importante deste ácido graxo para aplicação em alimentos.

Além do interesse nos PUFAs, compostos bioativos como os carotenoides também têm sido alvo de estudo para incorporação em alimentos, visto que, o consumo de alimentos ricos nesses compostos, como frutas e vegetais, tem sido associado à diminuição do risco de desenvolver doenças crônicas e degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares (VAN DUYN E PIVONKA, 2000). Dentre os carotenoides existentes, a zeaxantina ainda é pouco estudada, entretanto, possui uma grande importância por ser responsável pela diminuição de problemas relacionados à visão, como a degeneração macular. Entre as fontes ricas em zeaxantina, o *Goji berry* se destaca por possuir maior quantidade do carotenoide em relação a outras fontes conhecidas como o milho, pimenta e o ovo (SAJILATA *et al.*, 2008).

Os óleos vegetais como o óleo de chia, e os carotenoides como a zeaxantina, são compostos com características funcionais com potencial de aplicação industrial para melhoria nutricional de alimentos. Porém, estes compostos são suscetíveis à degradação quando expostos ao calor, luz e oxigênio. Além disso, por serem lipossolúveis, seu uso em alimentos com alto teor de água é limitado, o que torna necessário a exploração de novas tecnologias que aumentem a estabilidade e dispersão de tais compostos. A maior conscientização sobre os benefícios para

a saúde associado ao consumo de alimentos contendo ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides, tem despertado o interesse em encontrar tecnologias que sejam capazes de aumentar sua estabilidade frente a condições adversas e ao processamento de alimentos, além de permitir a sua incorporação em matrizes alimentícias com maior conteúdo de água. Nesse contexto, a nanotecnologia vem sendo explorada por ser capaz de proporcionar maior estabilidade, permitir a dissolução de compostos hidrofóbicos em matrizes hidrofílicas, além de proporcionar uma liberação controlada ao longo do tempo (LOBATO *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2015).

No processo de nanoencapsulamento, biopolímeros sintéticos ou naturais podem ser utilizados como material de parede a fim de proteger os compostos encapsulados. Os biopolímeros naturais possuem vantagens em relação aos sintéticos por serem biocompatíveis, não tóxicos, de baixo custo e poderem ser facilmente modificados para obtenção das características desejadas (DEOGADE *et al.*, 2012).

Polissacarídeos extraídos de plantas e sementes constituem fontes naturais de biopolímeros ainda não explorados como material de parede no nanoencapsulamento. As mucilagens são polissacarídeos naturalmente abundantes em certas sementes e cactos e representam uma fonte promissora para substituição de polímeros sintéticos no nanoencapsulamento. A semente de chia (*Salvia hispânica* L.), quando colocada em contato com a água, libera um polissacarídeo mucilaginoso que constitui cerca de 5 a 6 % da semente em peso seco (MUÑOZ *et al.*, 2012). A mucilagem da semente de chia já tem sido recentemente utilizada para estabilizar emulsões óleo em água (CAPITANI *et al.*, 2016) e como material de parede no microencapsulamento (TIMILSENA *et al.*, 2016). Por ser um polissacarídeo facilmente extraível, com propriedades emulsificantes e estabilizantes, possuir alta viscosidade e capacidade de retenção de água mesmo em baixas concentrações, a mucilagem da chia constitui um polissacarídeo promissor para uso no nanoencapsulamento.

Outros polissacarídeos naturais podem ser encontrados em diferentes espécies de cactos. Os cactos do gênero *Opuntia* possuem hastes ou caules modificados conhecidos como cladódios que são caracterizados por conter mucilagem, que constitui cerca de 14 % do cladódio em peso seco (SAENZ, 2000; GINESTRA *et al.*, 2009). A espécie de cacto *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw., popularmente conhecida como arumbeva, possui ampla distribuição no Rio Grande do Sul e assim como as demais espécies de cacto apresenta cladódio e frutos comestíveis (KINUPP, 2007); o que a torna uma potencial fonte para extração de mucilagem. No entanto, o uso da mucilagem obtida a partir desta espécie de cacto ainda não é

explorado na literatura. Portanto, são necessários estudos que avaliem o seu potencial de aplicação tecnológica.

Nesse contexto, a utilização da mucilagem da chia e da mucilagem obtida do cacto da espécie *Opuntia monacantha* são fontes de polissacarídeos ainda não explorados no nanoencapsulamento, com potencial de uso para substituição de polímeros sintéticos. Além disso, o nanoencapsulamento de óleo de chia e de zeaxantina representa uma alternativa viável para aumentar a estabilidade e permitir a dispersão desses compostos, o que possibilita o aumento de sua vida útil e sua aplicação em diferentes matrizes alimentícias. Desta maneira, a viabilidade de utilização dessas mucilagens como material estruturante deve ser avaliada.

A aplicação de compostos nanoencapsulados em alimentos pode auxiliar no aumento de sua vida de prateleira, além de promover uma liberação controlada do composto durante a digestão. No entanto, estudos que abordem o efeito das nanopartículas nas características dos alimentos, além de sua estabilidade quando aplicadas em uma matriz alimentar, ainda são escassos na literatura. Além disso, o interesse em incorporar compostos bioativos mais estáveis em alimentos é uma tendência crescente, devido a busca do consumidor por alimentos que contenham compostos naturais e ao interesse em substituir ingredientes artificiais. Diante disto, se faz necessário o estudo da influência da aplicação de nanopartículas em alimentos, além da avaliação da bioacessibilidade após a digestão.

O iogurte é um dos alimentos lácteos mais consumidos no mundo inteiro com alto conteúdo de proteínas e vitaminas, porém pobre em compostos bioativos. Devido a isso, a indústria tem investido em novos ingredientes que agreguem valor ao produto a fim de aumentar os seus efeitos benéficos à saúde. Desta maneira a aplicação de compostos nanoencapsulados em iogurte, como os carotenoides, se torna uma alternativa interessante para incorporar compostos mais estáveis e com maior funcionalidade, adicionando propriedades funcionais ao produto. Sendo assim, a adição de compostos bioativos nanoencapsulados em iogurtes é uma alternativa promissora que deve ser explorada.

Esta tese está estruturada em 8 capítulos, onde no capítulo 1 é apresentada a fundamentação teórica utilizada no embasamento desta pesquisa, no capítulo 2 está descrita a metodologia utilizada para a realização dos experimentos e nos capítulos 3, 4 e 5 estão os artigos científicos resultantes deste trabalho. Os capítulos 6 e 7 englobam a discussão e conclusão geral dos resultados obtidos. Por fim, no capítulo 8, encontram-se as perspectivas para trabalhos futuros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a estabilidade de nanopartículas de óleo de chia e de zeaxantina com mucilagem de chia e mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*) como material estruturante, respectivamente, além de aplicar as nanopartículas de zeaxantina em iogurte.

2.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver e caracterizar nanopartículas de óleo de chia com mucilagem de chia como material estruturante;
2. Desenvolver e caracterizar nanopartículas de zeaxantina extraída do *Goji berry*, (*Lycium barbarum*) com mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*) como material estruturante;
3. Avaliar a estabilidade das nanopartículas de óleo de chia, através de teste de oxidação em condições aceleradas;
4. Avaliar a estabilidade das nanopartículas de zeaxantina, através da exposição a diferentes temperaturas;
5. Aplicar as nanopartículas de zeaxantina em iogurte;
6. Analisar a influência da adição das nanopartículas de zeaxantina nas propriedades físico-químicas e sensoriais do iogurte e avaliar a estabilidade da zeaxantina no produto durante armazenamento;
7. Avaliar a bioacessibilidade da zeaxantina nos iogurtes após a digestão *in vitro*.

CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos são substâncias sintetizadas naturalmente por organismos vivos e podem ser encontrados em alimentos na forma de polifenóis, fitoesteróis, fitoestrógenos, vitaminas, minerais, ácidos graxos, probióticos, prebióticos, entre outros (CHEN *et al.*, 2006; AZARI *et al.*, 2010). Os compostos bioativos obtidos de fontes naturais estão relacionados com importantes atividades biológicas e seus efeitos benéficos em relação à saúde estão ligados às suas propriedades antioxidantes, proteção contra danos oxidativos a componentes celulares, efeitos anti-inflamatórios e diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (VOLP *et al.*, 2009).

Os compostos bioativos variam extensamente em estrutura química e conseqüentemente, na função biológica. No entanto, apresentam algumas características em comum: são substâncias orgânicas que não são sintetizadas pelo organismo humano e apresentam ação protetora na saúde humana. Além disso, estão presentes em sua maioria em frutas e vegetais e estão relacionados com o sistema de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta e agressão de insetos e patógenos (LAJOLO E HORST, 2009).

Os compostos bioativos mais comumente encontrados em frutas e vegetais são os compostos fenólicos, vitaminas C e E e carotenoides; os quais são conhecidos como potentes antioxidantes (CHINNICI *et al.*, 2004; LERFALL, 2016). Já os óleos e oleaginosas em geral são considerados fontes de ácidos graxos poli-insaturados.

A incorporação de compostos bioativos em alimentos é uma maneira simples de desenvolver novos alimentos funcionais, que são capazes de fornecer benefícios à saúde humana e diminuir o risco de contrair certas doenças (CHEN *et al.*, 2006). Dentre os compostos bioativos, os carotenoides e os ácidos graxos poli-insaturados têm sido alvo de estudo devido às suas propriedades funcionais.

3.1 Ácidos graxos poli-insaturados

Os ácidos graxos são moléculas grandes que compreendem uma cadeia de hidrocarbonetos não polares, com um grupo de ácidos carboxílicos (COOH) em uma das extremidades e um grupo metil (CH₃) na outra extremidade. Os ácidos graxos podem ser saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados conforme o número de ligações duplas presentes na cadeia (TIMILSENA *et al.*, 2017).

Os ácidos graxos com múltiplas ligações duplas insaturadas são denominados ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (TAKAHATA *et al.*, 1998). Os PUFAs, não são sintetizados pelo corpo humano em quantidades suficientes, portanto, são considerados ácidos graxos essenciais, que devem ser obtidos através da dieta ou suplementação. O ácido α -linolênico é o ácido graxo mais disponível tanto em óleos de fonte animal como vegetal, enquanto que o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA) são encontrados em animais marinhos como peixes e em algas (GANESAN *et al.*, 2009).

Os PUFAs encontrados em óleos vegetais são ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido α -linolênico (ω 3) e o ácido linoleico (ω 6), enquanto que peixes e algas possuem ácidos graxos de cadeia longa como o EPA e DHA, pertencentes aos ácidos graxos ω -3 (ω -3) e ácido araquidônico (AA) pertencente aos ácidos graxos ω -6 (ω -6). Os ácidos graxos de cadeia longa são sintetizados no corpo humano através dos ácidos graxos de cadeia curta, que atuam como precursores, desde que presentes em quantidades suficientes. Portanto, o ácido α -linolênico e linoleico são considerados como “verdadeiros” ácidos graxos essenciais (RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos e clínicos sugerem que óleos e gorduras ricos em ácidos graxos poli-insaturados como ω -3 e ω -6, desempenham um papel vital na manutenção da saúde humana, por serem capazes de diminuir o risco de doenças vasculares e neurodegenerativas, artrite, diabetes e certos tipos de câncer. Além disso são capazes de fornecer energia e são carreadores de nutrientes solúveis em lipídios (ORSAVOVA *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, devido à preocupação com a saúde e mudanças no estilo de vida, a demanda por ácidos graxos poli-insaturados provenientes de fontes vegetais tem aumentado. Uma das características importantes que deve ser considerada ao selecionar a fonte ideal de PUFAs é a proporção ω -3: ω -6 presente no óleo. A proporção de ω -3: ω -6 ideal para os ácidos graxos proporcionarem benefícios à saúde varia de 1:1 a 1:4 (DOLINSKY, 2009). Dietas ocidentais baseadas em produtos industrializados são altamente ricas em ω -6 e deficientes em ω -3 (relação de ω -3: ω -6 em torno de 1:20), o que gera um desequilíbrio na ingestão destes ácidos graxos. Sendo assim, o consumo de óleos com maior quantidade de ω -3 deve ser introduzido na dieta (TIMILSENA *et al.*, 2017). A Tabela 1 mostra a composição de PUFAs de alguns óleos vegetais.

Tabela 1. Conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em óleos vegetais (%).

Óleos vegetais	Ácido α -linolênico (ω -3)	Ácido linoleico (ω -6)	PUFAs
Chia	60	20,4	80,4
Linhaça	58,2	15,3	73,5
Nozes	15	50	65
Girassol	0,16	62,2	62,36
Cânhamo	0,36	59,4	59,76
Gergelim	0,21	40,9	41,11
Canola	11,9	18,8	30,7
Oliva	1,6	16,4	18
Coco	-	1,6	1,6

Fonte: Adaptado de Timilsena *et al.*, 2017.

A demanda comercial de ácidos graxos ômega-3 tem crescido nos últimos anos; e a demanda global estimada de ingredientes contendo ômega-3 foi de USD 1.595 milhões em 2010 e é estimado em mais de USD 4.000 milhões em 2018 (RESEARCH, 2013).

Os PUFAs de cadeia longa, comercialmente disponíveis, geralmente provêm de óleos de peixes gordurosos, como atum, sardinha, cavala, arenque e trutas. No entanto, por possuírem sabor forte e não poderem ser incorporados em dietas vegetarianas e veganas, seu uso é restrito. Sendo assim, novas fontes de óleo vegetal tem sido exploradas no intuito de substituir a aplicação do óleo de peixe em matrizes alimentares (TIMILSENA *et al.*, 2017).

3.1.1 Óleo de chia

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta nativa do México e Guatemala. A composição da semente da chia inclui proteínas (16-26%), lipídios (30-34%), carboidratos (42%, dos quais 34% são fibras), além da presença de minerais e micronutrientes (MUÑOZ *et al.*, 2013). Juntamente com o milho, feijão e amaranto, a chia era um componente central na dieta de muitas civilizações pré-colombianas na América e suas sementes foram valorizadas como fonte de óleo para medicamentos (CAHILL, 2003). A semente e o óleo de chia possuem atividade antioxidante, devido à presença de tocoferol, fitoesterol, carotenoides e compostos fenólicos que promovem efeitos benéficos à saúde humana (ÁLVAREZ-CHÁVEZ *et al.*, 2008; IXTAINA *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-CRUZ E PAREDES-LÓPEZ, 2014). Entre os compostos fenólicos identificados no óleo de chia estão o ácido clorogênico, ácido cafeico, miricetina, quercetina e campferol (REYES-CAUDILLO *et al.*, 2008; CAPITANI *et al.*, 2012). Da Silva *et al.* (2017), encontraram vitamina E e carotenoides em semente de chia cultivada no estado do Rio Grande do Sul, sendo que a zeaxantina foi o principal carotenoide presente na semente

(80,7%) com níveis maiores ($46 \mu\text{g}/100\text{g}^{-1}$) do que outros cereais como o sorgo ($15,48 \mu\text{g}/100 \text{g}^{-1}$) (CARDOSO *et al.*, 2015).

Além disso, os ácidos graxos do óleo de chia podem ser uma fonte alternativa de ômega-3 para vegetarianos e pessoas que tem alergia a peixes e frutos do mar, uma vez que o óleo de chia não apresenta problemas associados a outras fontes nutricionais como a linhaça e peixes, que causam odor e sabor desagradáveis e podem ainda causar problemas digestivos (AYERZA, 2009; MARINELI *et al.*, 2015).

Como pode ser observado na Tabela 1, a semente de chia possui a maior porcentagem de ácido α -linolênico (60%) que pode ser encontrada em fontes de origem vegetal (AYERZA E COATES, 2011; SEGURA-CAMPOS *et al.*, 2014). Conforme as condições climáticas, localização geográfica e variedade das plantas, o conteúdo de óleo e a composição de ácidos graxos da semente pode variar (COATES E AYERZA, 2009; TIMILSENA *et al.*, 2017). A concentração de ω -3 e ω -6 em óleos de semente de chia produzidas nos Estados Unidos, Argentina, Chile, México e Itália apresentaram variações de 6,3% para 69% e 15,3% para 46,3%, respectivamente (SEGURA-CAMPOS *et al.*, 2014). Da Silva *et al.* (2017), encontraram 26% de ω -3 e ω -6 em semente de chia brasileira cultivada no Rio Grande do Sul e 23,8% para sementes cultivadas no Mato Grosso.

Nas últimas décadas, a semente de chia emergiu como uma nova fonte de ácidos graxos ω -3 e sua presença no mercado mundial tem aumentado rapidamente (JULIO *et al.*, 2018). Devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados presente no óleo de chia (mais de 80%), este óleo é considerado como um dos mais saudáveis (SEGURA-CAMPOS *et al.*, 2014) e é utilizado para reduzir o risco de diabetes, hipertensão, doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (AVC), além de servir como precursor de moléculas sinalizadoras, como a prostaglandina (ESCALONA-GARCÍA *et al.*, 2016).

Ixtaina *et al.* (2011), extraíram o óleo de chia por prensagem e com solvente e encontraram como principal ácido graxo o α -linolênico. A razão de ácidos graxos ω -3/ ω -6 variou de 3,32 (extraído por prensagem) a 4,18 (extraído com solvente). Os valores foram superiores aos obtidos para outros óleos vegetais como o de canola (0,45), oliva (0,13), soja (0,15) e nozes (0,20). Os autores relataram que os ácidos graxos presentes no óleo de chia, em ordem de abundância, foram os seguintes: ácido α -linolênico (C18:3), ácido linoleico (C18:2), ácido oleico (C18:1), ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0).

Da Silva *et al.* (2017), avaliaram a composição química de óleo de semente de chia brasileira e encontraram ácido α -linolênico e ácido linoleico na proporção de 3,6:1.

Timilsena *et al.* (2017), estudaram as propriedades físico-químicas e térmicas de óleo de chia australiano e encontraram ácido α -linolênico e ácido linoleico na proporção de 3:1, sendo esta proporção ideal para manutenção da saúde. No mesmo estudo, em relação as propriedades térmicas, o óleo de chia se manteve estável até 300 °C. Desta maneira, por possuir características físico-químicas adequadas, o óleo de chia representa uma excelente fonte de ácidos graxos para utilização em indústrias alimentícias.

3.1.2 Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados

Os PUFAs são compostos por duas ou mais ligações duplas em sua estrutura presentes na configuração *cis*. Devido a sua composição química estrutural, composta por grupos de metileno bis-álílicos (-CH=H-**CH**₂-CH=CH-), os PUFAs são sensíveis a oxidação, isomerização e polimerização quando em contato com oxigênio, umidade, calor, luz e íons metálicos (TIMILSENA *et al.*, 2017). A oxidação que ocorre nos PUFAs, devido ao seu alto grau de instauração, é realizada por um processo que envolve espécies reativas onde estão envolvidas três etapas: iniciação (produção de radicais livres), propagação e terminação (produção de produtos não radicalares). Essas etapas envolvem a formação de hidroperóxidos, que por sua vez reagem para formar produtos de oxidação secundários ou terciários, o que leva a decomposição dos ácidos graxos. Dessa maneira, a oxidação leva à formação de produtos de degradação que podem ser prejudiciais à saúde, além de produzir alterações nas características sensoriais do óleo (ESCALONA-GARCÍA *et al.*, 2016).

Antioxidantes naturais ou sintéticos são capazes de minimizar as reações de oxidação em óleos, retardando a oxidação lipídica através de diferentes mecanismos de ação. Antioxidantes sintéticos tais como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) e terbutil hidroquinona (TBHQ) têm sido utilizados como antioxidantes sintéticos, porém, seus efeitos sobre a saúde humana e suas rotas metabólicas têm sido questionados (BODOIRA *et al.*, 2017).

Sendo assim, a incorporação de ácidos graxos essenciais em alimentos é um desafio, visto que é necessário preservar a sua funcionalidade durante o processamento, armazenamento e transporte. Portanto, um sistema adequado de proteção e entrega destes ácidos graxos é essencial para preservar sua funcionalidade e atributos organolépticos nos alimentos (TIMILSENA *et al.*, 2016). Desta forma, tecnologias que aumentem a estabilidade de ácidos graxos são necessárias, a fim de garantir seu uso em processos na indústria de alimentos e aumentar sua vida útil.

3.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipofílicos pertencentes a um grupo com mais de 600 compostos já identificados, sendo que aproximadamente 50 deles estão presentes na dieta humana. Estes compostos são classificados como poli-isoprenoides, com 8 unidades de isopreno compostas por 40 átomos de carbono (KULCZYŃSKI *et al.*, 2017). A maior parte dos carotenoides é constituída por uma cadeia central de carbono, de ligações simples e duplas alternadas e possuem diferentes grupos terminais cíclicos ou acíclicos (BRITTON *et al.*, 2004).

Tais compostos constituem um grupo importante de pigmentos naturais e são responsáveis pelas cores de muitas frutas, hortaliças, gema de ovo, crustáceos e alguns peixes (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008). As principais fontes de carotenoides são as folhas verdes e frutas, juntamente com a clorofila, porém, também podem ser encontrados em outras partes da planta como raízes (cenoura e mandioca), sementes (milho e urucum) e em flores vermelhas, laranjas e amarelas (SAINI *et al.*, 2015). Na indústria de alimentos, os carotenoides são usados como corantes alimentares naturais.

Conforme sua estrutura química, os carotenoides podem ser divididos em dois grupos: carotenos quando constituídos por carbono e hidrogênio, como por exemplo, β -caroteno, α -caroteno e licopeno; ou xantofilas quando constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio, como por exemplo, zeaxantina, luteína, astaxantina e β -criptoxantina (GAMMONE *et al.*, 2015).

Os carotenoides possuem um sistema de ligações dupla na cadeia poliênica, responsável pela sua capacidade de absorver luz no visível em uma faixa de comprimento de onda de 450 a 570 nm, e pela sua atividade antioxidante. Além disso, podem possuir ou não anel nas extremidades da cadeia e grupos funcionais (carbonila, hidroxila, entre outros) (DAMODARAN *et al.*, 2010; HAVAUX, 2014).

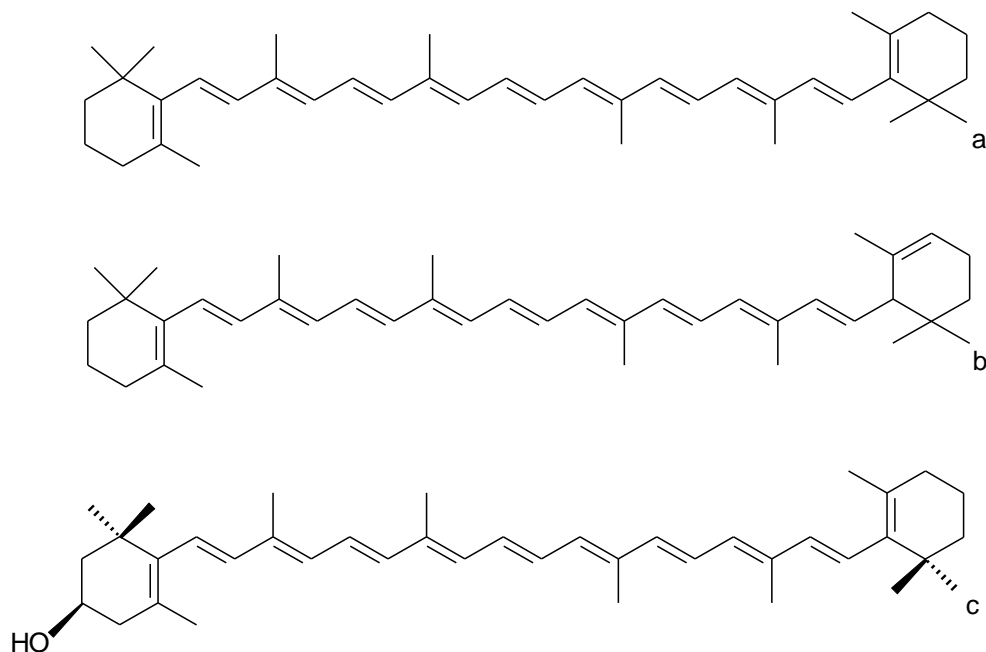
Os carotenoides fornecem benefícios à saúde humana por contribuírem na diminuição da incidência de certos tipos de câncer, doenças metabólicas e doenças cardiovasculares. Estes efeitos positivos na saúde estão relacionados à sua atividade antioxidante, resultante de sua capacidade de desativar espécies reativas como o oxigênio singlete (JOMOVA E VALKO, 2013). Além disso, possuem função anti-inflamatória e são capazes de promover aumento na resposta imunológica (WOODSIDE *et al.*, 2015).

Assim, tais pigmentos podem proteger as células de danos oxidativos provocados por espécies reativas de oxigênio (EROS) que constituem moléculas não radicais derivadas do oxigênio, como peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete, que podem ser gerados no

citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e o DNA (SHAMI E MOREIRA, 2004). Estas propriedades podem ser úteis também para a preservação de alimentos (CHRISTAKI *et al.*, 2013), uma vez que os carotenoides podem ser utilizados como corantes naturais e alguns de seus compostos podem doar átomos de hidrogênio às espécies reativas.

Além de suas propriedades antioxidantes, alguns carotenoides possuem atividade pró vitamina A, podendo ser convertidos em vitamina A no corpo humano, como é o caso do β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina (ROBERTS *et al.*, 2009). A transformação destes carotenoides em vitamina A ocorre por clivagem central (mecanismo principal), onde o composto é dividido ao meio, formando duas moléculas de retinal no caso do β -caroteno ou uma molécula no caso dos demais carotenoides pró-vitamínico A que são, posteriormente, transformadas em retinol (RAO E RAO, 2007). Para serem caracterizados como pró-vitamínicos, os carotenoides devem possuir em sua estrutura o anel β -ionona não substituído e uma cadeia lateral isoprenoide com pelo menos 11 átomos de carbono com terminação de uma função álcool, aldeído ou carboxila (Figura 1).

Figura 1. Estrutura química do β -caroteno (a), α -caroteno (b), β -criptoxantina (c).



Fonte: BOBBIO, 2003.

Há alguns anos o interesse em carotenoides era restrito àqueles que possuem atividade pró-vitamina A. No entanto, atualmente, o enfoque também é direcionado para as outras atividades

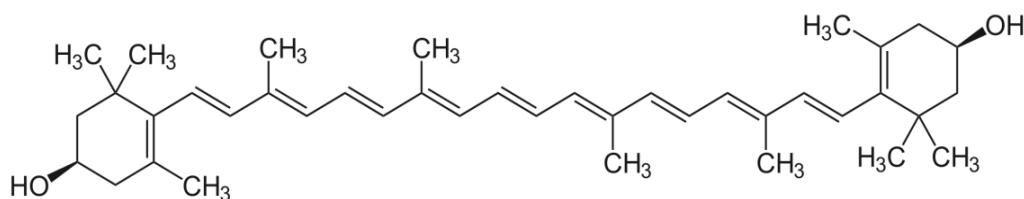
biológicas que estes compostos podem exercer, tais como os efeitos benéficos contra câncer, doenças cardíacas e degeneração macular. Tais benefícios têm estimulado o estudo sobre o papel destes compostos como antioxidantes (LAJOLO E HORST, 2009).

Nesse contexto, a luteína e a zeaxantina são carotenoides que vem sendo estudados para aplicação em alimentos, por estarem relacionados com a diminuição do risco de desenvolvimento da degeneração macular.

3.2.1 Zeaxantina

A zeaxantina é um pigmento de cor amarela e sua molécula apresenta 9 ligações conjugadas de carbono. Em cada extremidade de sua estrutura está presente um anel ionona ao qual está ligado um grupo hidroxila (Figura 2) (SAJILATA *et al.*, 2008). Além disso, a zeaxantina é um carotenoide isômero da luteína, ambos pertencentes ao grupo das xantofilas e dos carotenoides não precursores de vitamina A encontrados na região macular.

Figura 2. Estrutura química da zeaxantina.



Fonte: DAMODARAN *et al.*, 2010.

Devido ao seu potencial antioxidante, diversos estudos demonstraram que a luteína e a zeaxantina são carotenoides que desempenham papéis importantes em atrasar o aparecimento e reduzir riscos de catarata e degeneração macular, ambas responsáveis por 56 % dos casos mundiais de cegueira (MA *et al.*, 2012; PASCOLINI E MARIOTTI, 2012; MURRAY *et al.*, 2013). Tais efeitos benéficos estão atribuídos a capacidade destes pigmentos em proteger os olhos contra as radiações ultravioleta, através da formação de uma camada protetora de pigmento na retina macular, o que mantém sua integridade (GARCIA-LAYANA *et al.*, 2013).

GONZALEZ *et al.*, 2003, evidenciaram a capacidade da zeaxantina em proteger a pele contra edemas e hiperplasia causada pela exposição aos raios UV. DWYER *et al.*, 2004, em um estudo sobre saúde arterial, revelaram que a presença de zeaxantina no plasma pode exercer efeito protetor contra a aterosclerose precoce.

Os carotenoides constituem uma classe de antioxidantes capazes de eliminar espécies reativas em sistemas biológicos. Experimentos *in vitro* confirmaram que a β -criptoxantina e a zeaxantina demonstraram maior capacidade de proteção contra espécies reativas quando comparadas com o β -caroteno e licopeno. Devido ao mesmo tamanho da cadeia conjugada, a β -criptoxantina e a zeaxantina possuem a mesma função antioxidante (JOMOVA E VALKO, 2013).

A zeaxantina foi reconhecida como segura para consumo humano (GRAS), o que permite sua utilização como aditivo em alimentos (BERNSTEIN *et al.*, 2016). A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) concluiu que a ingestão de 0,10 mg/kg de peso corporal/ dia de zeaxantina é reconhecida como segura, o que corresponde em média a 7 mg de zeaxantina para uma pessoa com 70 kg (EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, 2012).

Assim como os demais carotenoides, a zeaxantina não é sintetizada pelo corpo humano, portanto, deve ser obtida através da dieta. Os alimentos que contêm maiores concentrações do pigmento são: couve, milho amarelo, espinafre, pimenta e *Goji berry* (SAJILATA *et al.*, 2008). Folhas de batata doce, dente de leão e nabo verde também são alimentos ricos em zeaxantina (SAINI E KEUM, 2018). O *Goji berry* tem sido estudado como fonte de pigmento vermelho-alaranjado rico em zeaxantina (CARLE E SCHWEIGGERT, 2016).

3.2.1.1 *Goji berry* como fonte de zeaxantina

O *Goji berry* (*Lycium barbarum* L.) é um fruto de 1-2 cm de comprimento, de cor vermelho-alaranjada, pertencente à família das solanáceas (Figura 3). O fruto é originário da China, Tibete e outras partes da Ásia (AMAGASE E FARNSWORTH, 2011). Aproximadamente 70 espécies de *Lycium* são encontradas em regiões distintas distribuídas em partes temperadas e subtropicais da América do Norte, América do Sul, África do Sul, Eurásia e Austrália (FUKUDA *et al.*, 2001).

Os frutos são colhidos no verão e outono e são consumidos frescos nas zonas de cultivo e na forma seca (desidratado) nos demais lugares em que é comercializado, ou transformado em produtos alimentares como sucos ou ainda adicionado em iogurtes e granolas (PROTTI *et al.*, 2017). O fruto seco é caracterizado por possuir a parte exterior mais endurecida, porém a polpa ainda se mantém macia (AMAGASE E FARNSWORTH, 2011).

Figura 3. *Goji berry* (*Lycium barbarum* L.).



Fonte: Amagase e Farnsworth (2011).

O *Goji berry* é considerado como uma fonte rica de ácidos orgânicos e compostos fenólicos como os ácidos cinâmicos e catequinas (DONNO *et al.*, 2015; PROTTI *et al.*, 2017). Devido à presença de flavonoides e carotenoides, que conferem propriedades antioxidantes, seu consumo pode melhorar a imunidade, diminuir o risco de doenças ligadas ao estresse oxidativo, como câncer e ainda pode atuar diminuindo os efeitos causados pelo envelhecimento (AMAGASE E FARNSWORTH, 2011). Estudos já comprovaram que o consumo do fruto pode auxiliar no tratamento de problemas oculares (AMAGASE E FARNSWORTH, 2011) e redução de peso corporal (AMAGASE, 2010). Além disso, no organismo humano pode agir como regulador metabólico, agente neuroprotetor e imunomodulador (AMAGASE *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, o interesse no consumo do *Goji berry* aumentou no mundo inteiro devido as suas propriedades benéficas, relacionadas ao seu alto valor nutricional e concentração de compostos bioativos (ZHONG *et al.*, 2013). Em estudos recentes, o fruto foi adicionado em cerveja (DUCRUET *et al.*, 2017) e em cereais à base de arroz extrusados (KOSIŃSKA-CAGNAZZO *et al.*, 2017), a fim de conferir propriedades antioxidantes aos produtos.

O *Goji berry* é fonte de macronutrientes incluindo carboidratos (46%), proteínas (13%), gordura (1,5%) e fibra dietética (16%). Micronutrientes como vitaminas e minerais também constituem o fruto. Cada 100g de *Goji berry* contém até 60 mg de cálcio, 5,4 mg de ferro, 434 mg de potássio, 1,48 mg de zinco e 48 mg de vitamina C (ZHONG *et al.*, 2013).

O *Goji berry* é rico em diferentes classes de antioxidantes como polifenóis e carotenoides. Os carotenoides estão presentes em 0,03 – 0,50 % m/m no fruto seco e são responsáveis por sua cor característica (PENG *et al.*, 2005), sendo a zeaxantina o principal carotenoide, seguido de β -criptoxantina e β -caroteno (AMAGASE E FARNSWORTH, 2011). Os carotenoides no *Goji berry* podem se apresentar na forma livre, parcialmente esterificada ou totalmente esterificada, sendo que o conteúdo de ésteres de zeaxantina no amadurecimento do fruto pode chegar a 77,5% dos carotenoides totais (PENG *et al.*, 1998).

Blasi *et al.* (2018) extraíram carotenoides do *Goji berry*, adicionaram em azeite de oliva extra virgem e avaliaram as mudanças químicas e estabilidade do óleo quando submetido a fritura. Os resultados demonstraram que os carotenoides presentes no fruto, principalmente a zeaxantina, preservaram os ácidos graxos poli-insaturados contra a oxidação.

Protti *et al.* (2017) avaliaram o conteúdo de carotenoides em *Goji berry* desidratado, através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, e encontraram 750,7 $\mu\text{g/g}$ de zeaxantina, seguido de 65,1 $\mu\text{g/g}$ de β -criptoxantina, 45,7 $\mu\text{g/g}$ de luteína e 34,4 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno. Em outro estudo desenvolvido por LIU *et al.*, 2014, onde o perfil de carotenoides do *Goji berry* em 4 estágios de maturação foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência as quantidades encontradas para zeaxantina, β -criptoxantina e β -caroteno foram 381,6 $\mu\text{g/g}$, 17,59 $\mu\text{g/g}$ e 28,99 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, para o fruto em estágio maduro.

Inbaraj *et al.* (2008) analisaram o conteúdo de carotenoides em *Goji berry in natura* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e encontraram zeaxantina dipalmitato como principal carotenoide (1143,7 $\mu\text{g/g}$), seguido de β -criptoxantina monopalmitato e isômeros (32,9 - 65,5 $\mu\text{g/g}$), zeaxantina monopalmitato e isômeros (11,3 - 62,8 $\mu\text{g/g}$), all-*trans* β -caroteno (23,7 $\mu\text{g/g}$) e all-*trans* zeaxantina (1,4 $\mu\text{g/g}$).

O conteúdo e perfil de carotenoides pode variar conforme o estágio de maturação dos frutos. Os carotenoides esterificados podem aumentar com a maturação, enquanto que os carotenoides livres, como a zeaxantina podem ser menos abundantes em frutas maduras (LI *et al.*, 2006). Ma *et al.* (2008), observaram maior conteúdo de carotenoides livres do que esterificados em *Goji berry* desidratado. A secagem e o armazenamento geralmente levam à transformação/degradação dos carotenoides, onde os que estiverem na forma esterificada sofrem transformação enzimática, liberando a forma livre e na degradação oxidativa, ocorre formação de produtos de oxidação dos carotenoides.

O conteúdo de zeaxantina presente no *Goji berry* é superior ao encontrado em outros alimentos que também são fonte do carotenoide, como pimenta (16,65 µg/ g), ovo (7,62 µg/ g) (PERRY *et al.*, 2009), milho (5,28 µg/ g) e espinafre cru (3,31 µg/ g) (SAJILATA *et al.*, 2008). Portanto, o fruto pode ser considerado fonte de carotenoides e a zeaxantina é o principal pigmento por estar presente em maior quantidade.

3.2.2 Estabilidade dos carotenoides

A incorporação de compostos bioativos em alimentos apresenta vários desafios, principalmente em relação a sua estabilidade durante processamento e armazenamento. Interações indesejáveis com a matriz alimentar e a garantia de sua estabilidade sem perder a funcionalidade também são aspectos que devem ser considerados quando se pensa na aplicação destes compostos (ERATTE *et al.*, 2018).

A presença de ligações duplas na cadeia de carbono dos carotenoides, que confere propriedades antioxidantes e de absorção de luz aos mesmos, também é responsável por torná-los mais propensos à degradação quando expostos a altas temperaturas e luz durante o processamento e armazenamento (ACHIR *et al.*, 2010).

A isomerização e oxidação são as duas principais alterações que ocorrem durante o processamento e são as duas maiores causas de degradação dos carotenoides. A oxidação é dependente da disponibilidade de luz, e é estimulada por enzimas, metais e co-oxidação com hidroperóxidos de lipídeos (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2001). Na isomerização, os carotenoides que naturalmente existem na forma *trans*, podem ser transformados em seus isômeros *cis* quando submetidos ao tratamento térmico, devido a exposição a solventes orgânicos, luz, oxigênio e tratamento com ácidos (CALVO E SANTA-MARÍA, 2008; DAMODARAN *et al.*, 2010). O pH e a presença de íons metálicos como ferro, alumínio, cobre e magnésio, que possuem características catalíticas, também afetam a estabilidade dos carotenoides (BOON *et al.*, 2010).

Em alimentos, a degradação dos carotenoides não só leva a perda de suas propriedades funcionais, como também diminui o valor nutricional, reduz a coloração e causa perda das características organolépticas (MARTÍNEZ-DELGADO *et al.*, 2017). No entanto, os carotenoides são mais estáveis nas matrizes alimentícias do que quando extraídos das mesmas; devido a maior exposição quando extraídos dos alimentos, tornam-se mais suscetíveis a degradação por fatores externos como luz e temperatura, o que pode causar a isomerização (BOON *et al.*, 2010).

Assim, como os demais carotenoides a zeaxantina também apresenta instabilidade frente a temperatura e condições de processamento, portanto é importante a escolha de um método que preserve a sua estabilidade para aplicação em alimentos.

Por serem compostos lipofílicos, a incorporação dos carotenoides em óleos vegetais, por exemplo, torna-os mais biodisponíveis do que na matriz vegetal, podendo também prevenir sua degradação (MARTÍNEZ-DELGADO *et al.*, 2017). Diferentes técnicas têm sido aplicadas na preservação de compostos bioativos, tais como, copigmentação, complexação e polimerização, acilação e encapsulamento (MAHDAVI *et al.*, 2014). Dentre estas técnicas o encapsulamento se apresenta como um meio prático de aumentar a estabilidade destes compostos, visto que os métodos químicos apresentam algumas desvantagens, como a dificuldade em controlar as interações durante o processo (CAVALCANTI *et al.*, 2011).

4 NANOENCAPSULAMENTO

Os sistemas de encapsulamento são classificados de acordo com o tamanho da partícula em micro (entre 1 μm e 5000 μm), macro (maior que 5000 μm) e nano (menor do que 1 μm) (JAFARI, 2017). As nanocápsulas apresentam vantagens em relação as microcápsulas, como melhor dispersão, absorção, liberação controlada e maior superfície de contato (MOZAFARI *et al.*, 2006; HANDFORD *et al.*, 2014).

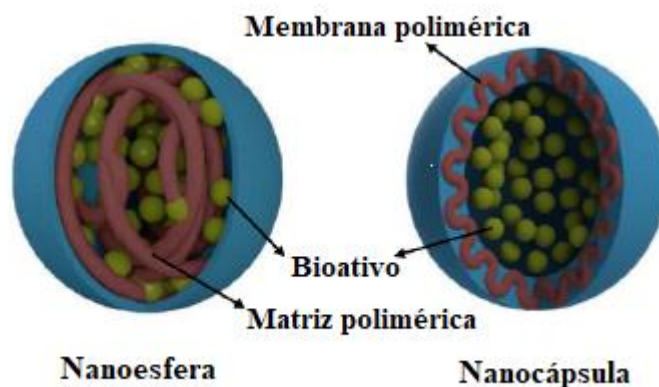
Técnicas de preservação, tais como o nanoencapsulamento, podem ser utilizadas a fim de diminuir a degradação de compostos bioativos. Apesar da utilização de nanotecnologia ser ainda pouco explorada na área de alimentos, existem diversos estudos que demonstram seu potencial de uso em praticamente todos os segmentos da indústria, desde a agricultura (pesticidas, fertilizantes, vacinas utilizadas em animais e detecção de patógenos de plantas) até o processamento de alimentos (encapsulação de realçadores de sabor ou odor, compostos bioativos e agentes de textura) utilizados para melhoria na qualidade dos alimentos, em embalagens e para suplementos nutricionais (nutracêuticos com maior estabilidade e biodisponibilidade) (DUNCAN, 2011).

Dentro da indústria de alimentos, a nanotecnologia tem sido utilizada com aplicações inovadoras, incluindo o uso de nanoemulsões, nanocompósitos e nanocápsulas, além do desenvolvimento de embalagens inteligentes, nanosensores e nanobiosensores para controle de qualidade e segurança alimentar (BRANDELLI, BRUM & DOS SANTOS, 2017). Além disso, a nanotecnologia pode proporcionar aumento da estabilidade e promoção da funcionalidade,

que inclui maior biodisponibilidade e liberação controlada de compostos bioativos e solubilidade destes em meio aquoso (BAJPAI *et al.*, 2018)

As nanopartículas podem ser produzidas por dois processos conhecidos como *top-down* e *bottom-up*. No processo *top-down* um grande grupo do material é dividido em partículas nanométricas por uma força externa (física, química ou mecânica). Já no processo *bottom-up*, átomos, moléculas ou partículas pequenas se juntam em nanoestruturas (JOYE *et al.*, 2016). Conforme o método de preparo e sua composição, nanocápsulas ou nanoesferas podem ser obtidas. Nanocápsulas são sistemas em que o composto é aprisionado a uma cavidade cercada por uma membrana polimérica, já nas nanoesferas o composto fica disperso fisicamente e uniformemente na matriz polimérica (Figura 4) (MOHANRAJ E CHEN, 2006). A presença de óleo nas nanocápsulas leva à formação de uma estrutura vesicular, enquanto que a sua ausência nas nanoesferas, fornece uma organização matricial das cadeias poliméricas (GUTERRES *et al.*, 2007).

Figura 4. Representação esquemática de nanoesfera e nanocápsula.



Fonte: Adaptado de Jafari (2017).

O nanoencapsulamento de compostos bioativos representa uma tecnologia viável para aumentar a estabilidade física de substâncias ativas, protegê-las das interações com os ingredientes alimentares e aumentar a sua bioatividade, devido ao seu tamanho subcelular (DONSÌ *et al.*, 2011). Através do encapsulamento é possível aumentar a estabilidade e permitir a solubilidade dos compostos por meio da dispersão de componentes hidrofílicos em matrizes hidrofóbicas e vice-versa (KLAYPRADIT E HUANG, 2008).

Como o núcleo está protegido de outros componentes dos alimentos e do meio-ambiente, os compostos encapsulados podem aumentar o conteúdo nutricional dos alimentos sem afetar

seu sabor, aroma ou textura. Ainda, os compostos encapsulados podem aumentar a vida útil de alimentos, além de terem sua estabilidade prolongada pela proteção exercida pelo material de parede (AUGUSTIN E HEMAR, 2009).

Além disso, o uso da nanotecnologia pode aumentar a vida de prateleira de alimentos através do emprego de embalagens com compostos bioativos nanoencapsulados que apresentem propriedades antimicrobianas (DURÁN E MARCATO, 2013) ou antioxidantes que podem ajudar a controlar a oxidação e evitar a formação de sabores e textura indesejáveis (LOPEZ-RUBIO *et al.*, 2006).

Estudos recentes demonstraram que o nanoencapsulamento pode proteger óleos essenciais (LV *et al.*, 2014; HERCULANO *et al.*, 2015) contra a degradação, através da diminuição da oxidação, devido ao efeito protetor exercido pelo material de parede.

Através do nanoencapsulamento também é possível aumentar a estabilidade de compostos bioativos como os carotenoides, tornando-os mais estáveis frente à temperatura, luz e oxigênio (DOS SANTOS *et al.*, 2016; BRUM *et al.*, 2017). Assim, tal técnica pode contribuir para o aumento da estabilidade de compostos bioativos e óleos, o que aumenta seu potencial de aplicação em alimentos e garante perdas menores durante processamentos industriais. Além disso, através do nanoencapsulamento é possível incorporar compostos hidrofóbicos como a zeaxantina e o óleo de chia em matrizes hidrofílicas, o que aumenta seu potencial de aplicação em alimentos contendo alto teor de água.

4.1 Materiais de parede utilizados no nanoencapsulamento

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas com materiais de parede sintéticos ou naturais e podem ser utilizadas para encapsular medicamentos ou compostos bioativos. Na escolha do material de parede é importante que sejam selecionados materiais “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS), a fim de aumentar a segurança das nanopartículas em seu uso pretendido (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Os polímeros sintéticos mais utilizados no nanoencapsulamento são: poli (ácido lático) (PLA) e seus co-polímeros poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) e poli- ϵ -caprolactona (PCL) que são conhecidos pela sua biocompatibilidade e biodisponibilidade (HANS E LOWMAN, 2002). Entretanto, os polímeros sintéticos são hidrofóbicos, o que limita sua aplicação (OH E LEE, 2013). A fim de melhorar suas propriedades e biocompatibilidade, alguns estudos combinaram sua utilização com polímeros naturais, como proteínas e

polissacarídeos e também peptídeos sintéticos (LEE *et al.*, 2003; OH E LEE, 2013; ZIA *et al.*, 2017).

Para uso em alimentos, os materiais de parede utilizados no nanoencapsulamento devem ser de grau alimentício, biodegradáveis e capazes de formar uma barreira entre o núcleo e seus arredores. Diferentes materiais de parede podem ser utilizados e sua escolha depende da natureza do composto ativo que se deseja encapsular, tamanho das nanopartículas desejado, solubilidade, estabilidade em água e perfil de liberação (MOHANRAJ E CHEN, 2006; RAO E GECKELER, 2011). Deste modo, polímeros sintéticos que sejam reconhecidos como GRAS, proteínas e polissacarídeos podem ser utilizados como materiais de parede, sendo que as características físico-químicas das nanopartículas podem ser influenciadas pela combinação de diferentes polímeros (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Além disso, as características do material de parede influenciam na eficiência de encapsulação, estrutura do núcleo e outras características físico-químicas (AUGUSTIN E HEMAR, 2009).

Os polímeros naturais possuem vantagens em relação aos sintéticos por possuírem menor custo (LIU *et al.*, 2008), serem biodegradáveis, compatíveis e não-tóxicos (GHUMMAN *et al.*, 2018). Além disso, o uso de materiais naturais contribui para a sustentabilidade, visto que a utilização de matérias-primas de origem natural causa menor impacto ambiental (RIBEIRO *et al.*, 2016). Entre os polímeros naturais, os polissacarídeos se destacam por serem abundantes na natureza, além de seu processamento geralmente ser de baixo custo (YANG *et al.*, 2015).

4.1.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são os polímeros dos monossacarídeos provenientes de diferentes fontes, como algas (alginato), origem vegetal (pectina, goma guar, amido), origem microbiana (dextran, goma xantana) e origem animal (quitosana) (SINHA E KUMRIA, 2001). Muitas vezes podem ser extraídos de raízes, tubérculos, caules e sementes de produtos vegetais, nos quais atuam como reserva de energia, ou ainda podem ser encontrados na estrutura celular de tecidos vegetais, onde contribuem para a integridade estrutural (TONELI *et al.*, 2005).

Além disso, os polissacarídeos podem possuir carga negativa como o alginato e a pectina ou carga positiva como a quitosana. Os polissacarídeos apresentam vantagens por serem facilmente modificados quimicamente e bioquimicamente, serem estáveis, não-tóxicos, hidrofílicos, formadores de gel e biodegradáveis (LIU *et al.*, 2008). Outra característica significativa dos polissacarídeos é a sua capacidade de formar soluções viscosas mesmo em concentrações baixas (TIMILSENA *et al.*, 2015).

Por serem biocompatíveis, possuírem alta capacidade de absorção de água, serem de fácil obtenção e extração e de baixo custo, os polissacarídeos podem ser utilizados em aplicações diversas. Além destas vantagens, pode-se citar a estabilidade em uma ampla faixa de pH (NAYAK E PAL, 2012), o que aumenta sua gama de aplicações.

Quando em solução os polissacarídeos possuem a capacidade de formar géis. Este processo envolve diferentes mecanismos de associação entre cadeias, que dependem das características do polímero aplicado. Dessa forma, os géis formados irão apresentar formas estruturais e texturas diferentes, o que torna possível sua aplicação em uma ampla variedade de produtos e processos na área de alimentos (TONELI *et al.*, 2005), que incluem fibras dietéticas, filmes comestíveis, estabilizantes de emulsões, agentes de revestimento em produtos de confeitaria e alimentos fritos, agentes encapsulantes de aromas em pó e alguns óleos e também como substitutos de gordura em carnes e produtos lácteos (LI E NIE, 2016).

Polissacarídeos naturais provenientes de plantas, como as mucilagens tem sido estudados e sua aplicabilidade e eficácia foram comprovadas para aplicação em diferentes formulações de medicamentos, agentes formadores de filme, formulações viscosas como soluções oftálmicas, suspensões (CHAMARTHY E PINAL, 2008; ALONSO-SANDE *et al.*, 2009) e também como material de parede no desenvolvimento de microcápsulas (MEDINA-TORRES *et al.*, 2013; OTÁLORA *et al.*, 2015; TIMILSENA *et al.*, 2016).

Devido as suas propriedades, micro/nanopartículas preparadas a partir de polissacarídeos podem desempenhar um papel importante na área farmacêutica, em cosméticos, na indústria de alimentos, entre outros. Sendo assim, os polissacarídeos constituem um material promissor para ser empregado como material de parede no encapsulamento (YANG *et al.*, 2015). Além disso, a biodisponibilidade de compostos encapsulados em matrizes polissacarídicas é maior devido à presença de grupos hidrofílicos, tais como hidroxila, carboxila e amino na estrutura dos polissacarídeos, o que aumenta a sua adesão no tecido epitelial e mucosas (MARTÍNEZ *et al.*, 2012).

Nanopartículas sintetizadas a partir de polímeros naturais como polissacarídeos tem sido desenvolvidas e devido a isso, polímeros derivados de plantas como as gomas e mucilagens tem chamado atenção para serem utilizados em alimentos funcionais ou como materiais de parede no encapsulamento (NAJI-TABASI *et al.*, 2017).

Portanto, os polissacarídeos são promissores para serem utilizados como biopolímeros na obtenção de nanopartículas e podem ser utilizados para substituir polímeros sintéticos. Além

disso, a busca por novas fontes de polímeros biodegradáveis especialmente os derivados de plantas, tem impulsionado os estudos sobre polissacarídeos, como as gomas e mucilagens.

4.1.2 Gomas e mucilagens

Gomas e mucilagens são hidrocoloides vegetais, formados por monossacarídeos, muitos deles combinados com ácidos urônicos. Além disso, ambas contêm moléculas hidrofílicas que podem combinar com a água para formar soluções viscosas ou géis. No entanto, possuem algumas diferenças, visto que as gomas são substâncias geralmente liberadas pelas plantas como forma de proteção, por exemplo, após uma lesão ou quebra da parede celular, ou ainda por fatores adversos do tempo, como a seca, enquanto as mucilagens são produtos normais do metabolismo de vegetais, formadas dentro das células e podem ser removidas com água quente ou fria. Geralmente, as gomas se dissolvem facilmente em água enquanto as mucilagens formam dispersões viscosas, capazes de absorver mais de cem vezes o seu peso em água (JANI *et al.*, 2009).

Como exemplo de gomas pode-se citar: arábica, tragacanto e guar. As mucilagens podem ser encontradas em diferentes partes das plantas, como em células epidérmicas de folhas (*Pereskia aculeata* Miller), na casca das sementes (linhaça, chia, psyllium), raízes (inhame), lamela média (*Aloe vera*) e cladódios e frutos de cactos (*Opuntia* ssp.) (SÁENZ *et al.*, 2004; EVANS E EVANS, 2009).

Os hidrocoloides como as gomas e mucilagens são comumente usados como fibras dietéticas, agentes espessantes, gelificantes, emulsionantes e estabilizantes, além de poderem ser utilizados como substitutos da gordura. Aplicações dos hidrocoloides em filmes biodegradáveis, como agentes encapsulantes e como inibidores de cristalização também são citadas na literatura (ALPIZAR-REYES *et al.*, 2017). Em aplicações farmacêuticas e industriais, as gomas e mucilagens apresentam vantagens por serem biodegradáveis, biocompatíveis, não-tóxicas, além de possuírem baixo custo, serem de fácil obtenção e provenientes de fontes comestíveis, o que aumenta sua amplitude de aplicação e aceitação do público em geral em relação a materiais e produtos sintéticos (JANI *et al.*, 2009).

A mucilagem é um carboidrato complexo, composto por fibras dietéticas, que possui composições variadas dependendo da espécie (SÁENZ *et al.*, 2004). Nas plantas, a mucilagem faz parte da fração polissacarídica e atua como um reservatório de água (SÁENZ *et al.*, 2004; STINTZING E CARLE, 2005). As mucilagens extraídas de sementes são hidrocoloides naturais de baixo custo que constituem uma fonte ideal para o desenvolvimento de produtos

saudáveis que ofereçam benefícios à saúde humana, tornando-os uma opção com potencial para aplicação em alimentos (ARCHANA *et al.*, 2013; NAYAK *et al.*, 2015) e na indústria farmacêutica (ARCHANA *et al.*, 2013; HUANBUTTA *et al.*, 2016).

Ghayempour *et al.* (2015) utilizaram goma tragacanta para encapsular óleo de menta e relataram que a concentração do material de parede, emulsificante, agente cross-linking e tempo de processo devem ser controlados para obter nanocápsulas com menor diâmetro de partícula. No estudo, a liberação do óleo das nanocápsulas foi avaliada através de um ensaio microbiológico após diferentes tempos de agitação. Nesse ensaio, a atividade antimicrobiana das nanocápsulas desenvolvidas foi confirmada, devido à redução de 100% de população bacteriana após 12 h de agitação, o que sugere a liberação do óleo de menta das nanocápsulas.

As mucilagens tem sido mais utilizadas em microencapsulamento, como relatado por Kaushik *et al.* (2016) que utilizaram proteína da semente de linhaça e mucilagem de linhaça para encapsular óleo de linhaça, e obtiveram uma alta eficiência de encapsulação (87%) e o óleo encapsulado foi protegido contra a oxidação durante 30 dias de armazenamento.

Bustamante *et al.* (2017) utilizaram diferentes proporções de mucilagens de chia e de linhaça, proteínas solúveis de chia e linhaça e maltodextrina para microencapsular *Lactobacillus plantarum* e *Bifidobacterium infantis* por secagem por atomização com diferentes temperaturas, a fim de avaliar a influência das mucilagens e proteínas de fonte natural na sobrevivência dos probióticos após o encapsulamento. Como resultados, percebeu-se que a utilização de mucilagem de chia e de linhaça aumentou a sobrevivência dos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, independente da temperatura de secagem utilizada, indicando que tais hidrocoloides podem ser utilizados no encapsulamento por terem apresentado alta eficiência de encapsulação e proteção aos probióticos encapsulados.

4.1.3 Mucilagens

4.1.3.1 Mucilagem de chia

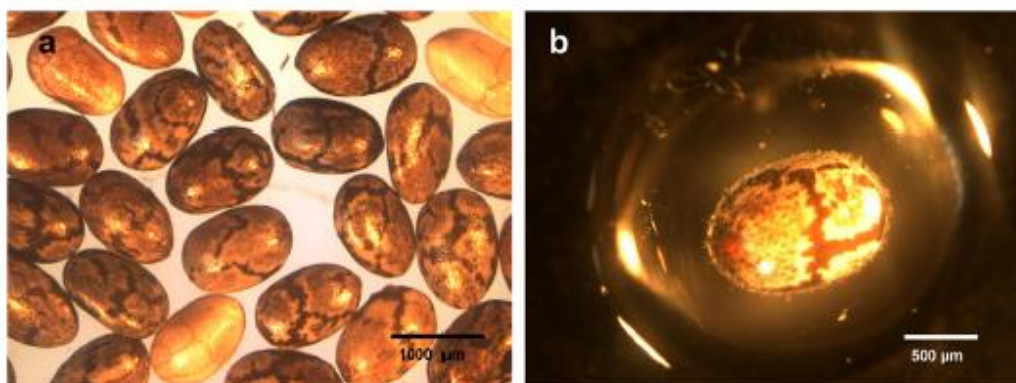
A chia (*Salvia Hispanica* L.) (Figura 5a) é uma planta herbácea pertencente à família *Lamiaceae*, da qual também fazem parte plantas como a hortelã, tomilho, alecrim e orégano. É originária do México e Guatemala (MUÑOZ *et al.*, 2012), porém, é cultivada em vários países e a produção anual mundial de semente de chia é de cerca de 30.000 toneladas (DANIELLS, 2013). No Estado do Rio Grande do Sul, a chia apresenta destaque devido ao aumento do seu cultivo na região noroeste do estado (ZANATTA *et al.*, 2016). Devido a suas características funcionais e nutricionais a importância da semente de chia aumentou nos últimos anos (DICK

et al., 2015) e tem sido incluída em produtos como iogurtes, massas, pães e na nutrição esportiva (FRANKLIN E HONGU, 2016).

Quando a semente de chia é colocada em contato com a água, um polissacarídeo mucilaginoso que constitui 5-6 % da semente é exsudado (HERNÁNDEZ, 2012). A semente de chia é composta por três camadas; uma camada exterior onde se encontra a mucilagem; uma camada intermediária composta por células pouco estruturadas; e o endocarpo. No momento em que a semente entra em contato com a água, pequenos filamentos na superfície começam a se desenrolar e quando as sementes ficam totalmente hidratadas, estes filamentos se agregam, distribuindo-se uniformemente sobre a superfície em volta da semente (Figura 5b) (MUÑOZ *et al.*, 2012).

Em sua forma completamente hidratada, a mucilagem forma uma cápsula transparente e contínua com espessura média de aproximadamente $414 \pm 35 \mu\text{m}$. Este gel mucilaginoso atinge sua viscosidade máxima após 2 h de hidratação (MUÑOZ *et al.*, 2012).

Figura 5. Imagens ópticas da semente de chia inteira (a) e mucilagem da chia envolvendo a semente após hidratação em água (b), utilizando magnificação de 10x e 40x.

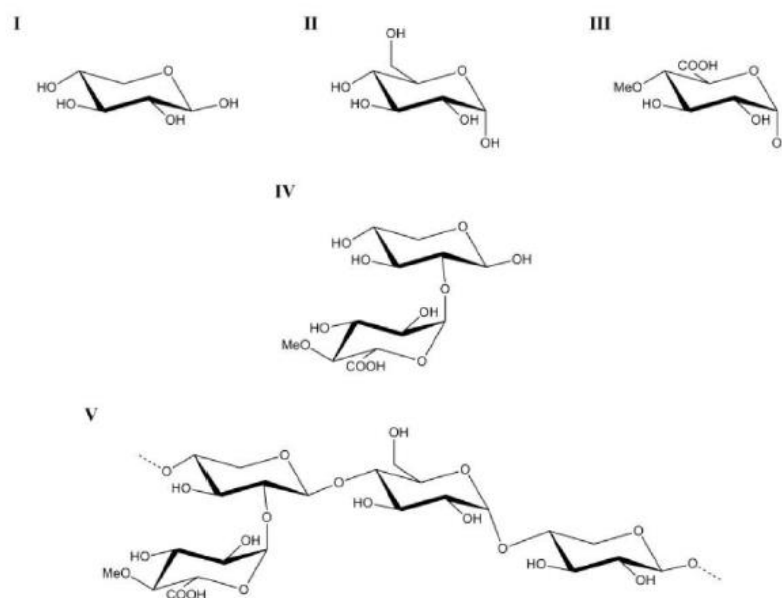


Fonte: MUÑOZ *et al.*, 2012.

Após imersão em água e secagem por ar quente, as sementes ficam rodeadas por um filme fino formado pela mucilagem remanescente. Mesmo quando reidratada, a mucilagem extraída da semente forma uma solução altamente viscosa (MUÑOZ *et al.*, 2012). Ainda, a solubilidade da mucilagem de chia é maior do que de outras gomas, como goma guar e goma xantana (CAPITANI *et al.*, 2012). Além disso, apresenta boas propriedades mucilaginosas mesmo em baixas concentrações em soluções aquosas e devido a isso foi descrita pela FAO como uma potencial fonte de mucilagem polissacarídica (HULSE, 1996).

A mucilagem de chia é um heteropolissacarídeo aniônico de alto peso molecular entre 800 e 2000 kDa (LIN *et al.*, 1994). Estruturalmente é composta por xilose e glicose como principais açúcares em uma proporção de aproximadamente 2:1. Ácidos urônicos como o ácido glicurônico e galacturônico e outros dois açúcares neutros (arabinose e galactose), também foram detectados (TIMILSENA *et al.*, 2016). Contém também uma pequena quantidade de proteínas que pode ser adsorvida na interface óleo-água (AVILA-DE LA ROSA *et al.*, 2015). A estrutura da mucilagem da chia está representada na Figura 6.

Figura 6. Composição da estrutura da mucilagem de chia; I β -D-xilose; II α -D-glicose; III ácido 4-O-metil- α -D-glicurônico; IV ácido aldobiurônico; V tetrassacárido (unidade estrutural).



Fonte: RAMOS *et al.*, 2013.

Em relação à composição centesimal, a mucilagem de chia possui 15% de umidade, 48% de carboidratos, 23,22% de ácido urônico, 8% de cinzas, 4% de proteínas e 1,78% lipídios (MUÑOZ *et al.*, 2012). Essa composição pode variar conforme o método de extração e origem da semente da chia da qual a mucilagem foi extraída. A localização geográfica e condições climáticas podem influenciar na composição centesimal e concentração de nutrientes da semente de chia (AYERZA, 2009).

A mucilagem de chia contém um alto teor de fibras (principalmente as solúveis) e exerce efeito positivo no metabolismo de lipídios (GUIOTTO *et al.*, 2016; TAVARES, 2016). A

mucilagem também é capaz de formar géis de alta viscosidade no organismo humano, responsáveis pela sensação de saciedade e esvaziamento lento do estômago (MUÑOZ *et al.*, 2013).

Quanto à sua utilização, a mucilagem pode ser incorporada em diferentes produtos na indústria de alimentos e em diferentes aplicações tais como, espessante, agente formador de gel, estabilizante, emulsionante ou agente de suspensão (CAPITANI *et al.*, 2012; SALGADO-CRUZ *et al.*, 2013) devido a sua capacidade de retenção de água, viscosidade (SALGADO-CRUZ *et al.*, 2013) e alta solubilidade em água (60% m/v a 25 °C) o que a torna um importante ingrediente na indústria de alimentos (CAPITANI *et al.*, 2016).

Além disso, pode ser utilizada como substituto de gordura já que possui capacidade de hidratação, alta viscosidade e é capaz de manter o frescor, principalmente de produtos assados (ALFREDO *et al.*, 2009). Portanto, pode ser utilizada em formulações em que se deseja reduzir o teor de gordura e também pode ser utilizada no desenvolvimento de alimentos funcionais, devido ao seu alto teor de fibras (FERNANDES E SALAS-MELLADO, 2017).

Além de aplicações em alimentos, o uso da mucilagem de chia como material de parede no microencapsulamento foi reportado por Timilsena *et al.* (2016), que microencapsularam óleo de chia com mucilagem de chia em combinação com proteína da semente de chia e relataram que o óleo de chia microencapsulado apresentou vida útil 6 vezes maior do que o óleo não encapsulado, o que indica que os materiais de parede utilizados protegeram o óleo contra degradação durante o armazenamento. Além disso, as microcápsulas apresentaram alta eficiência de encapsulação (93,9%) e alto rendimento no processo de encapsulação (98%).

A mucilagem de chia também já foi utilizada para estabilizar emulsões óleo em água em um estudo realizado por Guiotto *et al.* (2016). Os autores avaliaram a capacidade da mucilagem de chia em estabilizar emulsões contendo lecitina de girassol e uma mistura de óleo de girassol e óleo de chia. Como resultados, percebeu-se que a mucilagem de chia apresentou um bom desempenho como estabilizante e emulsificante, visto que a adição de 0,75% de mucilagem contribuiu para obter emulsões estáveis durante o armazenamento sob refrigeração, devido à redução da mobilidade das partículas de óleo pela formação de uma rede tridimensional.

Capitani *et al.* (2016) também avaliaram a capacidade da mucilagem de chia em estabilizar emulsões óleo em água. Os autores relataram que a adição de mucilagem de chia (0,75%) nas emulsões melhorou a estabilidade contra a separação de fase gravitacional, devido ao aumento da viscosidade na fase aquosa, o que limitou a mobilidade das gotículas de óleo nas emulsões. Além disso, os resultados sugeriram uma possível estratificação da mucilagem em torno da fase

oleosa, o que reflete a capacidade da mucilagem de chia atuar como agente emulsificante e estabilizante.

Por ser um biopolímero natural, hidrofílico, com alto teor de fibras e capaz de estabilizar emulsões óleo em água, a mucilagem de chia constitui uma alternativa promissora para ser utilizada tanto no micro como no nanoencapsulamento, com grande potencial de exploração na área de alimentos.

4.1.3.2 Mucilagem de cacto *Opuntia* ssp.

O cacto (gênero *Opuntia*, família Cactácea) é uma planta nativa do continente americano, também cultivada nos países mediterrâneos, África central e do Sul, Oriente médio, Austrália e Índia. O cultivo comercial é realizado na Itália, México, Espanha, Brasil, Chile, Argentina e Califórnia (STINTZING E CARLE, 2005). As cactáceas são conhecidas por suas vantagens econômicas e agrônômicas, por serem capazes de suportar a escassez de água, altas temperaturas e solos pobres em nutrientes (STINTZING E CARLE; 2005; SEPÚLVEDA *et al.*, 2007).

O cacto *Opuntia* ssp. também conhecido como “pera espinhosa” ou “cacto nopal” é o cacto comestível mais cultivado no mundo (VILLASEÑOR, 2008). Estes cactos possuem duas partes comestíveis. Uma delas é a “haste carnuda”, também conhecida como cladódio, caule de cacto, folha de cacto ou “nopalito”. A outra parte comestível são os frutos, que possuem casca grossa, polpa de sabor delicado e um grande número de sementes (EL-SAMAHY *et al.*, 2006).

Os cladódios dos cactos possuem alto teor de fibras, incluindo a pectina, lignina, celulose, e hemicelulose (DE SANTIAGO *et al.*, 2018). Além disso, plantas pertencentes à família das cactáceas possuem frutos e cladódios mucilaginosos, que quando manipulados ou cortados secretam um fluido característico, tendo como principal constituinte a mucilagem (CÁRDENAS E GOYCOOLEA, 1997). Na fisiologia das plantas, a mucilagem desempenha um papel importante, assegurando baixa transpiração para adaptação em climas áridos, visto que as cactáceas se desenvolvem em condições de estresse (ALVAREZ *et al.*, 1992).

A mucilagem obtida das espécies de cactos é caracterizada pela sua capacidade de absorção de água e de se tornar viscosa em solução. Devido a estas características é um componente com excelentes perspectivas para aplicações industriais (SÁENZ *et al.*, 2004). Os cladódios de cactos *Opuntia* ssp. são considerados fonte potencial de polissacarídeos, como pectinas e mucilagens que podem ser utilizadas como hidrocolóides pela indústria de alimentos (MEDINA-TORRES *et al.*, 2000; SÁENZ *et al.*, 2004; SEPÚLVEDA *et al.*, 2007). Tais

hidrocoloides são utilizados como aditivos alimentares para modificar a aparência, sabor, textura e estabilidade de sopas processadas, pães, sorvetes e bebidas (DOGAN *et al.*, 2007).

A estrutura química de mucilagens provenientes de cladódios das cactáceas do gênero *Opuntia* de diferentes espécies tem sido estudada. Amin *et al.* (1970), avaliaram a mucilagem obtida de *Opuntia ficus indica* e a descreveram como um polissacarídeo neutro de aproximadamente 55 resíduos, sem ácido urônico, contendo arabinose, ramnose, galactose e xilose. Em contrapartida, Trachtenberg e Mayer (1980), reportaram que a mucilagem de *O. ficus indica* é composta por arabinose, galactose, ramnose, xilose e ácido galacturônico. De acordo com os autores, a diferença na composição da mucilagem se deve a sua contaminação com outros componentes da parede celular ou métodos de purificação que não foram eficazes (SÁENZ *et al.*, 2004). Esses interferentes também explicam as diferenças obtidas por diferentes autores em relação a massa molar. Cárdenas *et al.* (1997), indicaram que a massa molar da mucilagem de *O. ficus indica* é de $3,0 \times 10^6$, já Medina-Torres *et al.* (2000) encontraram um valor menor de $2,3 \times 10^4$, enquanto que Trachtenberg e Mayer (1980) encontraram um valor superior de $4,3 \times 10^6$.

Kalegowda *et al.* (2017) avaliaram as características de mucilagem extraída dos cladódios de *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw e encontraram ramnose, arabinose, xilose, galactose, glicose e ácido urônico como principais açúcares e massa molar de $1,9 \times 10^6$ kDa.

Outros minerais como cálcio e potássio, carboidratos e fibras, também fazem parte da composição da mucilagem do cacto *Opuntia* ssp. Sepúlveda *et al.* (2007) relataram que a mucilagem seca de *O. ficus indica* possui em média 5,6% de umidade, 7,3% de proteínas, 37,3% de cinzas, 1,14% de nitrogênio, 9,86% de cálcio e 1,55% de potássio.

As mucilagens extraídas de cacto podem ser utilizadas na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica, entre outras. Esses polissacarídeos tem a capacidade de absorver grandes quantidades de água e podem se dissolver e se dispersar, formando coloides viscosos ou gelatinosos (LÓPEZ, 1995). Devido as suas propriedades emulsificantes, a mucilagem de *O. ficus indica* é um hidrocoloide promissor para ser utilizado na indústria de alimentos (MEDINA-TORRES *et al.*, 2000; SÁENZ, 2002). Seu uso já foi estudado na produção de coberturas comestíveis para aumentar a vida de prateleira de morangos (DEL-VALLE *et al.*, 2005), fatias de kiwi (ALLEGRA *et al.*, 2016), e figos (ALLEGRA *et al.*, 2017). Aquino *et al.* (2009), também avaliaram o efeito da mucilagem de *O. ficus indica* como pré-tratamento para inibir o escurecimento de bananas durante secagem convectiva. O uso da mucilagem também foi avaliado no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (ESPINO-DÍAZ *et al.*, 2010).

Recentemente, estudos apontaram o uso da mucilagem de cacto *O. ficus indica* combinada com outros materiais de parede no microencapsulamento. Zamora-Vega *et al.* (2012), microencapsularam *Sacharomyces boulardii* utilizando alginato de sódio combinado com inulina e mucilagem e observaram que a levedura encapsulada apresentou maior contagem e células mais viáveis quando comparado com a levedura livre após 30 dias de armazenamento a 4 °C. Os autores também relataram que a levedura, encapsulada e livre, demonstraram viabilidade celular de 76,1% e 63,3%, respectivamente após 35 dias de armazenamento.

Otálora *et al.* (2015) microencapsularam betatalaínas obtidas dos frutos do cacto *O. ficus indica* por atomização com mucilagem extraída do cladódio do cacto e maltodextrina como materiais de parede. Como resultado deste estudo, foi apontado que a adição de mucilagem do cacto aumentou a eficiência de encapsulação, diminuiu o conteúdo de umidade das microcápsulas, o que garantiu maior estabilidade, além de ter contribuído para a formação de partículas com alto conteúdo de fibras e mais uniformes em forma e tamanho. Sendo assim, a partir dos resultados deste estudo, foi possível perceber que a mucilagem estudada é uma fonte promissora de polissacarídeos que pode ser utilizada no encapsulamento com potencial de uso na indústria de alimentos.

Medina-Torres *et al.* (2013) avaliaram as características da mucilagem de *O. ficus indica* seca por atomização e o seu potencial para microencapsular ácido gálico pelo mesmo processo de secagem. Os autores concluíram que através da secagem por atomização foi possível obter a mucilagem, que se apresentou como um pó estável com tamanho de partícula pequeno e alta viscosidade. Ainda, o estudo comprovou a eficácia da mucilagem do cacto como material de parede, devido ao aumento da estabilidade do ácido gálico microencapsulado.

Tendo em vista a ampla aplicação que a mucilagem de cacto *Opuntia* ssp. possui, além de suas características promissoras para utilização no encapsulamento, a exploração de novas espécies provenientes desse gênero, constitui uma alternativa viável para obtenção de hidrocoloides naturais que substituam polímeros sintéticos no nanoencapsulamento.

4.1.3.2.1 Mucilagem de cacto da espécie *Opuntia monacantha*

O gênero *Opuntia* está representado no Brasil por mais de 150 espécies, que são comumente conhecidas como “opuntias” ou “palmas-forrageiras” (TAYLOR E ZAPPI, 2004). Scheinvar (1985) identificou duas espécies de cactos selvagem de *Opuntia* (*O. dillenii* var. *reitzii* Scheinvar e *O. monacantha* (Willd.) Haw) exclusivas na vegetação da restinga no estado de Santa Catarina.

A espécie de cacto *Opuntia monacantha* Haw. pertencente à família das cactáceas é nativa do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai e foi introduzida e naturalizada na Austrália, China, Cuba, Himalaias, Índia e África do Sul (VALENTE *et al.*, 2010). No Brasil, a espécie está distribuída nos estados da Bahia, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ZAPPI E TAYLOR, 2018). Na região costeira do sul do Brasil, a *Opuntia monacantha* apresenta uma distribuição mais ampla do que outras espécies do gênero *O. megapotamica* e *O. viridirubra*, por exemplo (KINUPP *et al.*, 2011).

A *O. monacantha* pode ser utilizada para a criação de cochonilhas a fim de se obter corantes naturais, como o vermelho-carmim que é utilizado para aplicação em alimentos, tais como iogurtes e bebidas alcoólicas. As espécies de cochonilha crescem espontaneamente sobre a *O. monacantha*, formando colônias esbranquiçadas (KINUPP *et al.*, 2011).

Além disso, a *O. monacantha* representa uma fonte potencial para extração de polissacarídeos mucilaginosos. Assim como outras espécies do gênero *Opuntia*, a *O. monacantha* possui “hastes modificadas” (cladódios) que geralmente possuem formato oblongo ou oblongo-espatulado (LENZI E ORTH, 2012). Segundo Yang *et al.* (2008), os polissacarídeos extraídos dos cladódios de *O. monacantha* apresentam efeito anti-diabetes e moderada atividade anti-tumor (VALENTE *et al.*, 2007).

Valente *et al.* (2010) analisaram os constituintes químicos dos cladódios do cacto de *O. monacantha* e concluíram que o perfil nutricional encontrado é similar ao da espécie *Opuntia ficus indica*. Dick *et al.* (2018) extraíram mucilagem do cacto da espécie *Opuntia monacantha* e avaliaram suas características físico-químicas. Os autores relataram que a mucilagem apresentou alta solubilidade (> 85 %), boa capacidade emulsificante e promoveu estabilidade em emulsões com diferentes proporções de óleo, o que torna viável seu uso como agente emulsificante ou estabilizante.

A mucilagem proveniente do cladódio de cacto *Opuntia monacantha*, apesar de não ser muito explorada, representa potencial para ser utilizada como material estruturante no nanoencapsulamento por se tratar de um biopolímero natural. Além disso, esta mucilagem é de fácil obtenção, considerando que a espécie *Opuntia monacantha* está presente em abundância no estado do Rio Grande do Sul. Sendo assim, é importante avaliar o potencial tecnológico deste polissacarídeo como material estruturante no nanoencapsulamento.

5 APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA EM ALIMENTOS

A aplicação da nanotecnologia no setor de alimentos apresenta grande crescimento no campo da investigação científica. Sistemas de liberação controlada de compostos conferidos pela nanoencapsulação, nanobiossensores para detecção e quantificação de patógenos, de compostos orgânicos e de alterações em alimentos, já têm sido estudados e apresentam resultados promissores na área de alimentos (LIAKOS *et al.*, 2018).

O mercado de produtos nanotecnológicos na indústria de alimentos se aproximou a US\$ 1 bilhão, conforme relatado por Bernardes *et al.* (2014), onde a maior parte investida está em bebidas e em embalagens contendo nanopartículas. De acordo com a Future Market Insights (FMI) é previsto um crescimento de 9,4 % ao ano no mercado de encapsulamento no setor alimentício, o que representará US\$ 5464,6 milhões até 2020 (FMI, 2015).

Através do uso de nanopartículas com propriedades antimicrobianas em embalagens para alimentos, por exemplo, é possível aumentar a vida de prateleira e segurança microbiológica dos produtos, devido à liberação gradual de compostos antimicrobianos ao longo do armazenamento, que conferem proteção contra a deterioração (DUNCAN, 2011).

Os principais líderes mundiais da indústria de alimentos como Kraft, H.J Heinz, Nestlé, Unilever e Hershey's estão investindo fortemente na pesquisa e desenvolvimento da nanotecnologia para aplicação em produtos alimentícios como leite, vegetais, carnes e produtos de panificação (PATEL *et al.*, 2018).

A nanotecnologia tem sido apontada por revolucionar diversos setores, como a agricultura e a indústria de alimentos, desde a produção, processamento, até o armazenamento. A aplicação da nanotecnologia no setor de alimentos representa uma possibilidade de gerar inovações nas características de produtos alimentícios, tais como textura, atributos sensoriais, cor e sabor (LIAKOS *et al.*, 2018). As principais funções e vantagens de se aplicar a nanotecnologia em alimentos são: aumento da estabilidade e proteção de compostos contra a degradação durante o processamento, armazenamento e distribuição; aumento da bioacessibilidade de ingredientes funcionais, enaltecendo seu valor nutricional; e aumento da vida útil de alimentos através do uso de nanoestruturas, que podem conferir propriedades antioxidantes (PONCE *et al.*, 2018).

A redução do tamanho da partícula para a escala nano pode melhorar a disponibilidade, a entrega e a dispersão de compostos bioativos e, portanto, sua atividade biológica. Sendo assim, a nanotecnologia pode ser utilizada para solubilizar e dispersar compostos lipofílicos, como os carotenoides em alimentos com alto conteúdo de água, como sucos e outras bebidas (PONCE *et al.*, 2018).

Ilyasoglu & El (2014) ao realizar o nanoencapsulamento de óleo de peixe com caseinato de sódio e goma arábica como material de parede, aplicaram as nanopartículas obtidas em suco de frutas e avaliaram as características sensoriais da bebida e a bioacessibilidade de EPA + DHA ao final da digestão *in vitro*. De acordo com os resultados, o suco de frutas contendo as nanopartículas apresentou uma boa aceitação sensorial e o nanoencapsulamento proporcionou uma bioacessibilidade de $47,37 \pm 10,65\%$ de EPA + DHA no suco, ao final da simulação do processo digestivo.

Ghorbanzade *et al.* (2017) avaliaram a influência da incorporação de nanolipossomas de óleo de peixe nas características físico-químicas e sensoriais de iogurte comercial. A adição de nanolipossomas resultou em uma diminuição da acidez, sinérese e índice de peróxidos do produto, além de um aumento da estabilidade do óleo de peixe. Além disso, o iogurte contendo nanolipossomas de óleo de peixe apresentou características sensoriais similares ao iogurte controle (sem adição de nanolipossomas).

Medeiros *et al.* (2019) nanoencapsularam β -caroteno extraído de melão, utilizando proteína do soro de leite concentrada e isolada e gelatina como material de parede. Nesse estudo, foi avaliada a influência da adição das nanopartículas e do extrato livre nas características de cor e estabilidade de iogurte comercial. Os iogurtes contendo as nanopartículas apresentaram 4 % de perda da cor amarela (parâmetro b^*), enquanto que os iogurtes contendo o extrato livre apresentaram uma redução de 48 %, ao final de 60 dias de armazenamento a 4 °C. Além disso, foi observado que através do nanoencapsulamento foi possível promover uma maior dispersão do carotenoide no iogurte, que apresentou uma coloração amarela homogênea, o que não ocorreu para o iogurte contendo extrato livre, que demonstrou perda de coloração e uma aparência heterogênea, devido ao carotenoide que não se dispersou totalmente na matriz.

No entanto, pesquisas que avaliem a influência da aplicação da nanotecnologia em alimentos ainda são limitadas, sendo necessário o aprofundamento de estudos nessa área.

6 REFERÊNCIAS

ACHIR, N. et al. Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 112, n. 3, p. 349-361, 2010. ISSN 1438-9312.

ALFREDO, V.-O. et al. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, n. 1, p. 168-173, 2009. ISSN 0023-6438.

ALLEGRA, A. et al. The influence of *Opuntia ficus-indica* mucilage edible coating on the quality of 'Hayward' kiwifruit slices. *Postharvest Biology and Technology*, v. 120, p. 45-51, 2016. ISSN 0925-5214.

ALLEGRA, A et al. The effectiveness of *Opuntia ficus-indica* mucilage edible coating on post-harvest maintenance of 'Dottato' fig (*Ficus carica* L.) fruit. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 12, p. 135-141, 2017. ISSN 2214-2894.

ALONSO-SANDE, M. et al. Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 72, n. 2, p. 453-462, 2009. ISSN 0939-6411.

ALPIZAR-REYES, E. et al. Functional properties and physicochemical characteristics of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed mucilage powder as a novel hydrocolloid. *Journal of Food Engineering*, v. 209, p. 68-75, 2017. ISSN 0260-8774.

ÁLVAREZ-CHÁVEZ, L. M. et al. Chemical Characterization of the Lipid Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica* L.). *International Journal of Food Properties*, v. 11, n. 3, p. 687-697, 2008. ISSN 1094-2912.

ALVAREZ, M. et al. The anionic glycan from the cactus *cereus peruvianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 34, n. 1, p. 283, 1992. ISSN 1559-0291.

AMAGASE, H. Comparison of *Lycium barbarum*-containing Liquid Dietary Supplements to Caffeinated Beverages on Energy/Caloric Metabolism Activity and Salivary Adrenocortical Hormone levels in Healthy Human Adults. *The FASEB Journal*, v. 24, n. 1, p. 540.13-540.13, 2010.

AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N. R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 1702-1717, 2011. ISSN 0963-9969.

AMAGASE, H.; NANCE, D. M. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized *Lycium barbarum* (Goji) Juice, GoChi. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v.14 n. 4, p. 1075-5535 (Print), 2008.

AMAGASE, H.; SUN B FAU - NANCE, D. M.; NANCE, D. M. Immunomodulatory effects of a standardized *Lycium barbarum* fruit juice in Chinese older healthy human subjects. *Journal of Medicinal Food*, v.12, n.5, p. 1559-1165 (Electronic), 2009.

AMIN, E. S.; AWAD, O. M.; EL-SAYED, M. M. The mucilage of *Opuntia ficus-indica* mill. Carbohydrate Research, v. 15, n. 1, p. 159-161, 1970. ISSN 0008-6215.

AQUINO, L. V. et al. Inhibición del Oscurecimiento con Mucílago de Nopal (*Opuntia ficus indica*) en el Secado de Plátano Roatán. Información tecnológica, v. 20, p. 15-20, 2009. ISSN 0718-0764.

ARCHANA, G. et al. Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications. Carbohydrate Polymers, v. 98, n. 1, p. 89-94, 2013. ISSN 0144-8617.

AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. Chemical Society Reviews, v. 38, n. 4, p. 902-912, 2009. ISSN 0306-0012.

AVILA-DE LA ROSA, G. et al. Viscoelasticity of chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage dispersion in the vicinity of an oil-water interface. Food Hydrocolloids, v. 49, p.200-207, 2015. ISSN 0268-005X.

AYERZA, R. The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors. Journal of Oleo Science, v.58, n.7, p. 1347-3352 (Electronic), 2009.

AYERZA, R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). Industrial Crops and Products, v. 34, n. 2, p. 1366-1371, 2011. ISSN 0926-6690.

AYERZA, R.; COATES W FAU - LAURIA, M.; LAURIA, M. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. Journal of Oleo Science, v.58, n.7 (Print), 2009. ISSN 1346-3352.

AZARI, R. et al. Light signaling genes and their manipulation towards modulation of phytonutrient content in tomato fruits. Biotechnol Advances, v. 28, n.1, p. 108-118, 2010.

BAJPAI,V.K. et al. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety and security. Journal of Food and Drug Analysis, v.26, n. 4, p. 1201-1214, 2018.

BERNSTEIN, P. S. et al. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. Progress in Retinal and Eye Research, v. 50, p. 34-66, 2016. ISSN 1350-9462.

BERNARDES, P.C. et al. Nanotechnology in the food industry. Bioscience Journal, v. 30, n.6, p.1919-1932.

BLASI, F. et al. Changes in extra-virgin olive oil added with *Lycium barbarum* L. carotenoids during frying: Chemical analyses and metabolomic approach. Food Research International, v. 105, p. 507-516, 2018. ISSN 0963-9969.

BODOIRA, R. M. et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: Study of the effect of natural antioxidants. LWT - Food Science and Technology, v. 75, p. 107-113, 2017. ISSN 0023-6438.

BOON, C. S. et al. Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, n. 6, p. 515-532, 2010. ISSN 1040-8398.

BRANDELLI, A.; BRUM, L.F.W.; DOS SANTOS, J.H.Z. Nanostructured bioactive compounds for ecological food packaging. *Environmental Chemistry Letters*, v. 15, n.2, p.193-204, 2017. ISSN 1610-3661.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. P. *Carotenoids: Handbook*, 2004.

BRUM, A. A. S. et al. Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and stability evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 522, n. Supplement C, p.477-484, 2017. ISSN 0927-7757.

BUSTAMANTE, M. et al. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chemistry*, v.216, n.1, p.97-105, 2017.

CAHILL, J. P. Ethnobotany of Chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Economic Botany*, v. 57, n. 4, p. 604-618, 2003.

CALVO, M. M.; SANTA-MARÍA, G. Effect of illumination and chlorophylls on stability of tomato carotenoids. *Food Chemistry*, v. 107, n. 4, p. 1365-1370, 2008. ISSN 0308-8146.

CAPITANI, M. I.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Stability of oil-in-water (O/W) emulsions with chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage. *Food Hydrocolloids*, v. 61, p. 537-546, 2016. ISSN 0268-005X.

CAPITANI, M. I. et al. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, v. 45, n. 1, p. 94-102, 2012. ISSN 0023-6438.

CARDOSO, L. D. M. et al. Tocochromanols and carotenoids in sorghum (*Sorghum bicolor* L.): diversity and stability to the heat treatment. *Food Chemistry*, v.172, n.1, p. 900-908, 2015.

CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. M. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*, 2016.

CATANEO, C., B. et al. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. *Ciências Agrárias*, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*, v. 44, n. 2, p. 499-509, 2011. ISSN 0963-9969.

CHAMARTHY, S. P.; PINAL, R. Plasticizer concentration and the performance of a diffusion-controlled polymeric drug delivery system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 331, n. 1, p. 25-30, 2008. ISSN 0927-7757.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, n. 5, p. 272-283, 2006. ISSN 0924-2244.

CHINNICI, F. et al. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 15, p. 4684-9, 2004. ISSN 0021-8561.

CHRISTAKI, E. et al. Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, p. 5-11, 2013.

COATES, W.; AYERZA, R. Chia (*Salvia hispanica* L.) seed as an n-3 fatty acid source for finishing pigs: Effects on fatty acid composition and fat stability of the meat and internal fat, growth performance, and meat sensory characteristics. *Journal of Animal Science*, v. 87, n. 11, p. 3798-3804, 2009. ISSN 0021-8812.

CÁRDENAS, A.; GOYCOOLEA. Reología en solución del mucílago del nopal (*Opuntia ficus indica*). Congreso Nacional y V Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, Monterrey, México. Anais do VII Congreso Nacional y V Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. p.171-172, 1997.

DA SILVA, B. P. et al. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food Chemistry*, v. 221, p. 1709-1716, 2017. ISSN 0308-8146.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de Alimentos de Fennema*, 2010.

DANIELLS, S. Chia boom: With 239% growth, chia category set to hit \$1 bn by 2020. Super grains! From chia to quinoa, 2013.

DE CAMPO, C. et al. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, v. 234, n. Supplement C, p. 1-9, 2017. ISSN 0308-8146.

DE SANTIAGO, E. et al. Impact of cooking process on nutritional composition and antioxidants of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, v. 240, p. 1055-1062, 2018. ISSN 0308-8146.

DEL-VALLE, V. et al. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, v. 91, n. 4, p. 751-756, 2005. ISSN 0308-8146.

DEOGADE, U. M.; DESHMUHK, V. N.; SAKARKAR, D. M. Natural Gums and Mucilage's in NDDS: Applications and Recent approaches. *International Journal of PharmTech Research*, v. 4, n. 2, 2012.

DICK, M. et al. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 130, p. 198-205, 2015. ISSN 0144-8617.

DICK, M. et al. Valorization of *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw. cladodes to obtain a mucilage with hydrocolloid features: Physicochemical and functional performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 123, p. 900-909, 2018.

DOGAN, M.; KAYACIER, A.; IC, E. Rheological characteristics of some food hydrocolloids processed with gamma irradiation. *Food Hydrocolloids*, v. 21, n. 3, p. 392-396, 2007. ISSN 0268-005X.

DOLINSKY, M. *Nutrição Funcional*. Editora Roca. São Paulo, SP, 2009, 204 p.

DONNO, D. et al. Goji berry fruit (*Lycium spp.*): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 1070-1085, 2015. ISSN 1756-4646.

DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, n. 9, p. 1908-1914, 2011. ISSN 0023-6438.

DOS SANTOS, P. P. et al. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends in Food Science & Technology*, v. 53, p. 23-33, 2016. ISSN 0924-2244.

DOS SANTOS, P.P. et al. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 17, n. 2, p. 1-11, 2015. ISSN 1388-0764.

DOS SANTOS, P.P. et al. Stability study of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules under temperature and photosensitization. *LWT - Food Science and Technology*, v. 71, p. 190-195, 2016. ISSN 0023-6438.

DUCRUET, J. et al. Amber ale beer enriched with goji berries – The effect on bioactive compound content and sensorial properties. *Food Chemistry*, v. 226, p. 109-118, 2017. ISSN 0308-8146.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 363, n. 1, p. 1-24, 2011. ISSN 0021-9797.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 48, n. 6, p. 1127-1134, 2013. ISSN 1365-2621.

DWYER, J. H. et al. Progression of Carotid Intima-Media Thickness and Plasma Antioxidants: The Los Angeles Atherosclerosis Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 24, n. 2, p. 313-319, 2004.

EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, N. A. A. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lutein and maintenance of normal vision (ID 1603, 1604, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, v. 10, n. 6, p. 2716-n/a, 2012. ISSN 1831-4732.

EL-SAMAHY, S. K. et al. Chemical and rheological characteristics of orange-yellow cactus-pear pulp from Egypt. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* v. 8, p. 39-51, 2006.

ERATTE, D. et al. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 71, p. 121-131, 2018. ISSN 0924-2244.

ERATTE, D. et al. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, v. 19, p. 882-892, 2015. ISSN 1756-4646.

ESCALONA-GARCÍA, L. A. et al. Oxidation kinetics and thermodynamic analysis of chia oil microencapsulated in a whey protein concentrate-polysaccharide matrix. *Journal of Food Engineering*, v. 175, p. 93-103, 2016. ISSN 0260-8774.

ESPINO-DÍAZ, M. et al. Development and Characterization of Edible Films Based on Mucilage of *Opuntia ficus-indica* (L.). *Journal of Food Science*, v. 75, n. 6, p. E347-E352, 2010. ISSN 1750-3841.

EVANS, W. C.; EVANS, D. Introduction. In: (Ed.). *Trease and Evans' Pharmacognosy (Sixteenth Edition)*: W.B. Saunders, p.485-486, 2009. ISBN 978-0-7020-2933-2.

FERNANDES, S. S.; SALAS-MELLADO, M. D. L. M. Addition of chia seed mucilage for reduction of fat content in bread and cakes. *Food Chemistry*, v. 227, p. 237-244, 2017. ISSN 0308-8146.

FRANKLIN, A. M.; HONGU, N. Chia seeds. The university of Arizona 2016.

FUTURE MARKET INSIGHTS (FMI), *Food Encapsulation Market: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment 2015 – 2020*; Disponível em: <<http://www.futuremarketinsights.com/reports/food-encapsulation-market>>. Acesso em: nov. 2018.

FUKUDA, T.; YOKOYAMA, J.; OHASHI, H. Phylogeny and Biogeography of the Genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 19, n. 2, p. 246-258, 2001. ISSN 1055-7903.

GAMMONE, M. A.; RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food Nutrition Research*, v. 59, p. 26762, 2015. ISSN 1654-661X (Print).

GANESAN, B.; BROTHERSEN C FAU - MCMAHON, D. J.; MCMAHON, D. J. Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 54, n. 1 p. 98-114, 2014. ISSN 1040-8398 (Electronic).

GARCIA-LAYANA, A. et al. Effects of lutein and docosahexaenoic Acid supplementation on macular pigment optical density in a randomized controlled trial. *Nutrients*, v.5, n.2, p.543-551, 2013. (Electronic).

GHAYEMPOUR, S.; MONTAZER, M.; MAHMOUDI RAD, M. Tragacanth gum as a natural polymeric wall for producing antimicrobial nanocapsules loaded with plant extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, n. Supplement C, p. 514-520, 2015. ISSN 0141-8130.

GHUMMAN, S. A. et al. Polymeric microspheres of okra mucilage and alginate for the controlled release of oxcarbazepine: In vitro & in vivo evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. ISSN 0141-8130.

GINESTRA, G. et al. Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 21, p. 10323-10330, 2009. ISSN 0021-8561.

GONZALEZ, S. et al. Dietary lutein/zeaxanthin decreases ultraviolet B-induced epidermal hyperproliferation and acute inflammation in hairless mice. *Journal of Investigative Dermatology*, v.121, n.2, p. 399-405, 2003.

GUIOTTO, E. N. et al. Stability of Oil-in-Water Emulsions with Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and Chia (*Salvia hispanica* L.) By-Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 93, n. 1, p. 133-143, 2016. ISSN 1558-9331.

GUTERRES, S.S. et al. Polymeric nanoparticles, nanoespheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug target Insights*, v.2, p.147-157, 2007.

HANFORD, C. E. et al. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: Opportunities, benefits and risks. *Trends in Food Science & Technology*, v. 40, n. 2, p. 226-241, 2014. ISSN 0924-2244.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002. ISSN 1359-0286.

HAVAUX, M. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, v. 79, n. 4, p. 597-606, 2014. ISSN 0960-7412.

HERCULANO, E. D. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, v. 61, n. 2, p. 484-491, 2015. ISSN 0023-6438.

HERNÁNDEZ, L. M. Mucilage from chia seeds (*Salvia hispanica* L.): microstructure, physico-chemical characterization and applications in food industry. 2012. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências de Engenharia- Escuela de ingeniería, pontificia universidad catolica de Chile, Santiago de Chile, 2012.

HUANBUTTA, K.; SANGNIN, T.; SITTIKIJYOTHIN, W. Physicochemical characterization of gum from tamarind seed: Potential for pharmaceutical application. *Asian J Pharm Sci*, v. 11, n. 1, p. 176-177, 2016.

HULSE, J. Flavours, spices and edible gums: opportunities for integrated agroforestry systems UN, F. A. O. O. T. 1996.

ILYASOGLU, H.; EL, S.N. Nanoencapsulation of EPA/DHA with sodium caseinate - gum arabic complex and its usage in the enrichment of fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, v. 56, p. 461-468, 2014. ISSN 0023-6438.

INBARAJ, B. S. et al. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–APCI–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, n. 4, p. 812-818, 2008. ISSN 0731-7085.

JAFARI, S. IXTAINA, V. Y. et al. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, n. 2, p. 166-174, 2011. ISSN 0889-1575.

JAFARI, S.M. *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*, Elsevier, 2017.

JANI, G. K. et al. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. 5, p. 309-323, 2009.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 70, p. 102-110, 2013. ISSN 0223-5234.

JOYE, I. J.; DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. *Nanotechnology in Food Processing*. In: (Ed.). *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press, 2016. p.49-55. ISBN 978-0-12-384953-3.

JULIO, L. M. et al. Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids. *LWT*, v. 89, p. 581-590, 2018. ISSN 0023-6438.

KALEGOWDA, P.; CHAUHAN, A. S.; NANJARAJ URS, S. M. *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw cladode mucilage: Physico-chemical, rheological and functional behavior. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, n.10, p. 1057-1064, 2017.

KAUSHIK, P. et al. Microencapsulation of flaxseed oil in flaxseed protein and flaxseed gum complex coacervates. *Food Research International*, v. 86, p. 1-8, 2016. ISSN 0963-9969.

KINUPP, V. F. *Plantas alimentícias não convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS*. 2007. 562 f. Tese (doutorado em Fitotecnia) - Faculdade de agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

KINUPP, V. F.; LISBÔA, G. N.; BARROS, I. B. I. *Opuntia elata* (arumbeva). In: (Ed.). *Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul*. Brasília, 2011. p.184-188.

KLAYPRADIT, W.; HUANG, Y.-W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT - Food Science and Technology*, v. 41, n. 6, p. 1133-1139, 2008. ISSN 0023-6438.

KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A. et al. Stability of goji bioactives during extrusion cooking process. *Food Chemistry*, v. 230, p. 250-256, 2017. ISSN 0308-8146.

KULCZYŃSKI, B. et al. The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge. *Journal of Functional Foods*, v. 38, p. 45-65, 2017. ISSN 1756-4646.

LAJOLO, F. M.; HORST, M. A. Biodisponibilidade de compostos bioativos em alimentos. Biodisponibilidade de nutrientes. *MANOLE*. 1: 772-807 p. 2009

LEE, J. Y. et al. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT - Food Science and Technology*, v. 36, n. 3, p. 323-329, 2003. ISSN 0023-6438.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Mixed reproduction systems in *Opuntia monacantha* (Cactaceae) in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, v. 35, p. 49-58, 2012. ISSN 0100-8404.

LERFALL, J. Carotenoids: Occurrence, Properties and Determination. In: (Ed.). *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press, 2016. p.663-669. ISBN 978-0-12-384953-3.

LI, H.; MIN, C.; WENPING, M. Law of Changes of Carotenoids Contents in Fructus Lycii of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum* L.) at Different Mature Periods. *Scientia Agricultura Sinica*, v. 39, n. 03, p. 599-605, 2006.

LI, J.-M.; NIE, S.-P. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids*, v. 53, n. Supplement C, p. 46-61, 2016. ISSN 0268-005X.

LIAKOS, I.L. et al. Consumer's health and regulatory organizations. In: *Handbook of Food Bioengineering*. Elsevier, v.12, 2018.

LIN, K.-Y.; DANIEL, J. R.; WHISTLER, R. L. Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydrate Polymers*, v. 23, n. 1, p. 13-18, 1994. ISSN 0144-8617.

LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 15, p. 1650-1662, 2008. ISSN 0169-409X.

LOBATO, K. B. D. S. et al. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chemistry*, v. 141, n. 4, p. 3906-3912, 2013. ISSN 0308-8146.

LOPEZ-RUBIO, A.; GAVARA, R.; LAGARON, J. M. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, n. 10, p. 567-575, 2006. ISSN 0924-2244.

LV, Y. et al. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, v. 35, p. 305-314, 2014. ISSN 0268-005X.

LÓPEZ, A. D. Review: Use of the fruits and stems of the prickly pear cactus (*Opuntia* spp.) into human food. *Food Science and Technology International*, v. 1, n. 2-3, p. 65-74, 1995. ISSN 1082-0132.

MA, L. et al. Improvement of retinal function in early age-related macular degeneration after lutein and zeaxanthin supplementation: a randomized, double-masked, placebo-controlled trial. *Journal of American Ophthalmology*, v, 154, n.4, p.625-634, 2012.

MA, W.-P. et al. Changes of the Main Carotenoid Pigment Contents During the Drying Processes of the Different Harvest Stage Fruits of *Lycium barbarum* L. *Agricultural Sciences in China*, v. 7, n. 3, p. 363-369, 2008. ISSN 1671-2927.

MAHDAVI, S. A. et al. Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. *Drying Technology*, v. 32, n. 5, p. 509-518, 2014. ISSN 0737-3937.

MARINELI, R. D. S. et al. Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International*, v. 76, p. 666-674, 2015. ISSN 0963-9969.

MARTÍNEZ, A. et al. Polysaccharide-Based Nanoparticles for Controlled Release Formulations. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9789535106159.

MARTÍNEZ-CRUZ, O.; PAREDES-LÓPEZ, O. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1346, p. 43-48, 2014. ISSN 0021-9673.

MARTÍNEZ-DELGADO, A. A.; KHANDUAL, S.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S. J. Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. *Food Chemistry*, v. 225, p. 23-30, 2017. ISSN 0308-8146.

MEDEIROS, A.K. DE O. C. et al. Nanoencapsulation improved water solubility and color stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.) *Food Chemistry*, v. 270, n.1, p. 562-572, 2019.

MEDINA-TORRES, L. et al. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids*, v. 14, n. 5, p. 417-424, 2000. ISSN 0268-005X.

MEDINA-TORRES, L. et al. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 642-650, 2013. ISSN 0023-6438.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOZAFARI, M. R. et al. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, n. 13, p. 2038-2045, 2006. ISSN 1097-0010.

MURRAY, I. J. et al. Lutein supplementation over a one-year period in early AMD might have a mild beneficial effect on visual acuity: the CLEAR study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.54, n.3, p.1781-1788, 2013.

MUÑOZ, L. A. et al. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, v. 108, n. 1, p. 216-224, 2012. ISSN 0260-8774.

MUÑOZ, L.A. et al. Chia Seed (*Salvia hispanica* L.): An Ancient Grain and a New Functional Food. *Food Reviews International*, v. 29, n. 4, p. 394-408, 201. ISSN 8755-9129.

- NAJI-TABASI, S.; RAZAVI, S. M. A.; MEHDITABAR, H. Fabrication of basil seed gum nanoparticles as a novel oral delivery system of glutathione. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 1703-1713, 2017. ISSN 0144-8617.
- NAYAK, A. K.; PAL, D.; SANTRA, K. Screening of polysaccharides from tamarind, fenugreek and jackfruit seeds as pharmaceutical excipients. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 79, p. 756-760, 2015. ISSN 0141-8130.
- NAYAK, A. K.; PAL, D. K. Natural polysaccharides for drug delivery in tissue engineering applications. In: KATIYAR, P. S. S., EVERYMAN'S SCIENCE, 2012, INDIA.
- OH, S. H.; LEE, J. H. Hydrophilization of synthetic biodegradable polymer scaffolds for improved cell/tissue compatibility. *Biomedical Materials*. v.8, n.1, 2013.
- ORSAVOVA, J. et al. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 6, p. 5, 2015. ISSN 1422-0067.
- OTÁLORA, M. C. et al. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chemistry*, v. 187, n. Supplement C, p. 174-181, 2015. ISSN 0308-8146.
- PATEL, A. et al. Application of Nanotechnology in the Food Industry: Present Status and Future Prospects. In: *Handbook of Food Bioengineering*. Elsevier, v.12, 2018.
- PASCOLINI, D.; MARIOTTI, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. *British Journal of Ophthalmology*, v.96, n.5, 2012.
- PENG, G.; LI, Z.; ZHANG, S. Separation and identification of carotenoids in fructus lycii by thin-layer chromatography. [*Ying yang xue bao*] *Acta Nutrimenta Sinica*, v. 20, n. 1, p. 76-78, 1998. ISSN 0512-7955.
- PENG, Y. et al. Quantification of Zeaxanthin Dipalmitate and Total Carotenoids in Lycium Fruits (*Fructus Lycii*). *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 60, n. 4, p. 161-164, 2005. ISSN 1573-9104.
- PERRY, A.; RASMUSSEN, H.; JOHNSON, E. J. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, n. 1, p. 9-15, 2009. ISSN 0889-1575.
- PONCE, A.G. et al. Nanotechnology Trends in the Food Industry: Recent Developments, Risks and Regulation. In: *Handbook of Food Bioengineering*. Elsevier, v.12, 2018.
- PROTTI, M. et al. Analytical profiling of selected antioxidants and total antioxidant capacity of goji (*Lycium spp.*) berries. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 143, n. Supplement C, p. 252-260, 2017. ISSN 0731-7085.

RAMOS, S. C. F. Avaliação das propriedades gelificantes da farinha de chia (*Salvia hispanica* L.): desenvolvimento de novas aplicações culinárias. 2013. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Gastronômicas) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

RAO, A.; RAO, L. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, v. 55, n.3, 2007.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011. ISSN 0079-6700.

RESEARCH, T. M. Global Omega 3 Ingredients Market (EPA/DHA) - Industry Analysis, Market Size, Share, Growth and Forecast, 2010 - 2018. 2013

REYES-CAUDILLO, E.; TECANTE, A.; VALDIVIA-LÓPEZ, M. A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, v. 107, n. 2, p. 656-663, 2008. ISSN 0308-8146.

RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, v. 147, p. 188-200, 2016. ISSN 0144-8617.

ROBERTS, R. L.; GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clinics in Dermatology*, v. 27, n. 2, p. 195-201, 2009. ISSN 0738-081X.

RODRIGUEZ-AMAYA et al. Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; INSTITUTE, I. L. S.; OMNI. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Press, 2001. ISBN 9781578810727.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010. ISSN 1466-8564.

SAENZ, C. Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits and cladodes. *Journal of Arid Environments*, v. 46, n. 3, p. 209-225, 2000. ISSN 0140-1963.

SAINI, R. K.; KEUM, Y.-S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, v. 240, p. 90-103, 2018. ISSN 0308-8146.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, v. 76, p. 735-750, 2015. ISSN 0963-9969.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KAMAT, M. Y. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 7, n. 1, p. 29-49, 2008. ISSN 1541-4337.

SALGADO-CRUZ, M. D. L. P. et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage release characterisation. A microstructural and image analysis study. *Industrial Crops and Products*, v. 51, p. 453-462, 2013. ISSN 0926-6690.

SCHEINVAR, L. Cactáceas. Flora Ilustrada Catarinense, Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí 1985.

SEGURA-CAMPOS, M. R. et al. Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil from Yucatán, México. *Agricultural Sciences*, v. 5, n. 3, p. 220-226, 2014.

SEPÚLVEDA, E. et al. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*, v. 68, n. 4, p. 534-545, 2007. ISSN 0140-1963.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, v. 17, p. 227-236, 2004. ISSN 1415-5273.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 224, n. 1, p. 19-38, 2001. ISSN 0378-5173.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 49, n.2, p. 175-194, 2005.

SÁENZ, C. Cactus pear fruits and cladodes: a source of functional components for foods. *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, Leuven, Belgium. p.253-263, 2002.

SÁENZ, C.; SEPÚLVEDA, E.; MATSUHIRO, B. *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*, v. 57, n. 3, p. 275-290, 2004/05/01/ 2004. ISSN 0140-1963.

TAKAHATA, K. et al. The Benefits and Risks of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 62, n. 11, p. 2079-2085, 1998. ISSN 0916-8451.

TAVARES, L. S. Extração e caracterização da mucilagem e de subprodutos da semente de chia (*Salvia Hispanica* L.). 2016. Universidade Federal de Lavras

TAYLOR, N.; ZAPPI, D. *Cacti of Eastern Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew.2004.

TIMILSENA, Y. P. et al. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolated chia seed gum complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 91, p. 347-357, 2016. ISSN 0141-8130.

TIMILSENA, Y. P. et al. Rheological and microstructural properties of the chia seed polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 991-999, 2015. ISSN 0141-8130.

TIMILSENA, Y. P. et al.. Physicochemical and thermal characteristics of Australian chia seed oil. *Food Chemistry*, v. 228, p. 394-402, 2017. ISSN 0308-8146.

TIMILSENA, Y. P. et al. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. *Food Hydrocolloids*, v. 69, p. 369-381, 2017. ISSN 0268-005X.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 7: 181-204 p. 2005.

TRACHTENBERG, S.; MAYER, A. M. Biophysical properties of *Opuntia ficus-indica* ucilage. *Phytochemistry*, v. 21, n. 12, p. 2835-2843, 1980. ISSN 0031-9422.

VALENTE, L. M. M. et al. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). *Food Chemistry*, v. 123, n. 4, p. 1127-1131, 2010. ISSN 0308-8146.

VALENTE, L.M.M. et al. Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. *Pharmacognosy Magazine*. 3: 167–172 p. 2007.

VAN DUYN, M. A. S.; PIVONKA, E. Overview of the Health Benefits of Fruit and Vegetable Consumption for the Dietetics Professional. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 100, n. 12, p. 1511-1521, 2000. ISSN 0002-8223.

VILLASEÑOR, M. A. A. Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucilago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. 2008. 212 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2008.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e nutrição*, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WOODSIDE, J. V. et al. Carotenoids and health in older people. *Maturitas*, v. 80, n. 1, p. 63-68, 2015. ISSN 0378-5122.

YANG, J. et al. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 123, p. 53-66, 2015. ISSN 0144-8617.

YANG, N. et al. Anti-diabetic effects of polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 9, n. 4, p. 570-574, 2008. ISSN 1466-8564.

ZAMORA-VEGA, R. et al. Effect of incorporating prebiotics in coating materials for the microencapsulation of *Sacharomyces boulardii*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 63, n. 8, p. 930-935, 2012. ISSN 0963-7486.

ZANATTA, T. P. et al. Análise do crescimento da cultura da chia (*Salvia hispanica* L.). *Revista cultivando o saber*. 9: 377-390 p. 2016.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N. *Cactaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2018.

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phytochemicals and Health Benefits of Goji Berries. In: (Ed.). *Dried Fruits*: Blackwell Publishing Ltd., 2013. p.133-144. ISBN 9781118464663.

ZIA, K. M. et al. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017. ISSN 0141-8130.

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

7 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Compostos Bioativos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As análises de diâmetro, potencial zeta e viscosidade das nanopartículas de óleo de chia foram realizadas na Faculdade de Farmácia (UFRGS); as análises de microscopia eletrônica foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) –UFRGS; e as análises no infravermelho (FTIR), foram realizadas no laboratório de multitécnicas do Instituto de Química da UFRGS.

7.1 Materiais

O óleo de chia (Pazze Alimentos[®]) e o *Goji berry* foram adquiridos no mercado local (Porto Alegre, Brasil). As sementes de chia para extração da mucilagem foram obtidas do estado de Jalisco, México. A mucilagem de cacto foi extraída dos cladódios de cacto da espécie *Opuntia monacantha* obtidos da cidade de Viamão, RS, Brasil. O Tween 80[®] e o etanol utilizados no preparo das nanopartículas, foram obtidos da Dinâmica (São Paulo, Brasil) e o ácido acético da Neon (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

O leite integral (Tirol[®]), leite em pó desnatado (CCGL[®]), goma xantana e goma guar (Foco Alternativo[®]) e o fermento para o preparo de iogurte (BioRich[®]) foram obtidos no comércio local (Porto Alegre, Brasil).

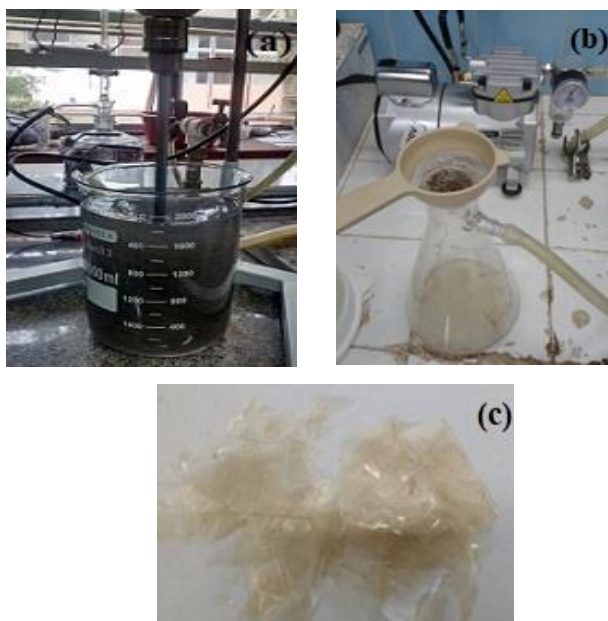
7.2 Extração das mucilagens para uso como material estruturante

7.2.1 Extração da mucilagem de chia

A mucilagem de chia foi obtida através da metodologia proposta por Dick *et al.* (2015), com algumas modificações. As sementes de chia foram imersas em água na proporção de 1:30 (p/v) e mantidas sob agitação em um agitador mecânico com hélice (EduTec, EEQ9008A-2, Curitiba, Brasil) por 2 h em temperatura ambiente (25 °C) (Figura 7a). Logo após a mucilagem foi separada das sementes de chia por centrifugação (HITACHI High-Speed Refrigerated, modelo CR21GIII, Ibaraki, Japão) a 9000 x g por 30 minutos. Após isso, a mucilagem firmemente aderida às sementes foi separada com o auxílio de uma peneira e uma bomba a vácuo (Figura 7b). Ao final, a mucilagem foi filtrada utilizando uma malha fina a fim de

remover pequenas partículas. A mucilagem foi então seca em estufa com circulação forçada de ar (DeLeo, modelo B5AFD, Porto Alegre, Brasil) a 60 °C por 18 h e colocada em sacos plásticos fechados com vácuo até o momento do uso. A Figura 7c mostra a mucilagem de chia após secagem, pronta para uso.

Figura 7- Etapas principais da extração da mucilagem da chia: (a) imersão das sementes em água e agitação; (b) separação da mucilagem da semente com auxílio de peneira e bomba à vácuo; (c) mucilagem de chia após secagem.



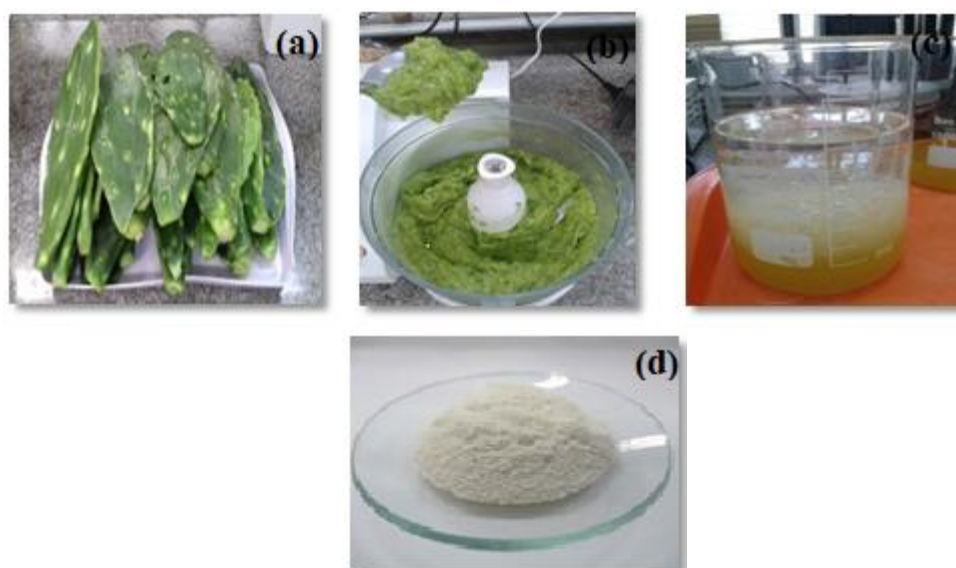
Fonte: o autor.

7.2.2 Extração da mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*)

A mucilagem de cacto foi obtida a partir de cladódios de cacto da espécie *Opuntia monacantha* (Figura 8a). Os cladódios foram cortados e triturados em um processador de alimentos (Philips Walita®, modelo RI7762/91, São Paulo, Brasil) (Figura 8b) e a polpa obtida foi misturada com água na proporção de 1:2 m/v (polpa:água), agitada mecanicamente e aquecida a 80 °C durante 30 minutos, filtrada a fim de remover fragmentos e centrifugada (10000 g, 20 min, 20 °C) (Hitachi, modelo CR 21GIII, Japão). O sobrenadante foi precipitado com etanol 95 % (Figura 8c) na proporção de 1:3 v/v (sobrenadante:álcool) e mantido durante a noite em geladeira a 4 °C. Após precipitação, a mucilagem foi recuperada por filtração a vácuo, lavada duas vezes com etanol 95% e seca a 45 °C por aproximadamente 16 h em uma estufa com circulação forçada de ar (DeLeo, modelo B4AFD, Porto Alegre, Brasil). Para a

obtenção do pó de mucilagem, o material seco foi triturado com gral e pistilo, peneirado com o auxílio de uma peneira de 60 mesh e armazenado protegido da luz e umidade até o uso. A Figura 8d mostra a mucilagem de cladódio de cacto após secagem, pronta para o uso.

Figura 8 - Etapas principais da extração da mucilagem: (a) cladódios higienizados e secos; (b) trituração dos cladódios em processador; (c) precipitação do sobrenadante com etanol 95 %; (d) mucilagem do cladódio de cacto após secagem.



Fonte: o autor.

7.3 Composição centesimal da mucilagem de chia

A composição da mucilagem de chia foi analisada conforme o método da AOAC (2005). O teor de proteína foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl, utilizando fator de correção de 6,25. O teor de cinzas foi determinado em mufla (Elektro Therm Linn, modelo 312.6 SO LM 1729, Eschenfelden, Alemanha) a 550 °C. O conteúdo de umidade foi determinado por gravimetria através de pesagem da amostra antes e após secagem em estufa (De Leo, modelo 48 TLK, Porto Alegre, Brasil) a 105 °C por aproximadamente 24 h. Um extrator Soxhlet (Foss Soxtec, modelo 2055, São Paulo, Brazil) foi utilizado para determinação do conteúdo de lipídios. Para a determinação de fibras totais, fibra dietética solúvel e fibra dietética insolúvel, um método enzimático-gravimétrico foi utilizado, com redução do peso da amostra para 0,1 g devido ao aumento da viscosidade causado pela mucilagem, como citado por Mañas *et al.* (1994). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em g/ 100g em base seca.

7.4 Preparo das soluções de mucilagem

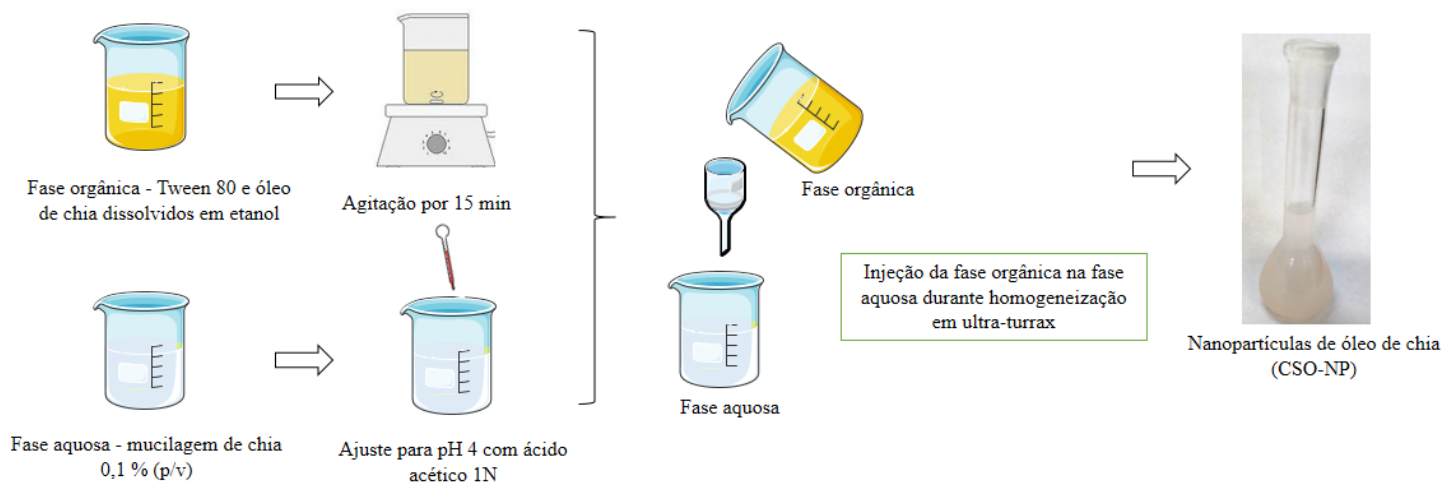
Tanto para o preparo da solução de mucilagem de chia como da mucilagem de cladódio de cacto, as mucilagens secas foram dissolvidas em água (0,1 % m/v) e agitadas em um agitador mecânico com hélice (Eduotec, modelo EEQ9008A-2, Curitiba, Brasil) por 2 h em temperatura ambiente (25 °C) a fim de homogeneizar as soluções. As soluções foram mantidas durante a noite sob refrigeração, para completa hidratação e o pH foi ajustado para 4 com ácido acético 1M para prevenir crescimento microbiano.

7.5 Preparo das nanopartículas de óleo de chia (CSO-NP)

As nanopartículas de óleo de chia foram produzidas de acordo com a metodologia descrita por Herculano *et al.* (2015), com modificações. Inicialmente, testes preliminares foram realizados para estudar a influência da concentração do óleo no tamanho da partícula. Para este fim, formulações foram preparadas utilizando diferentes concentrações de óleo de chia (0,5, 0,75 e 1,25 mg/mL), correspondentes a 10, 15 e 25 mg de óleo, respectivamente. As formulações foram avaliadas imediatamente após o preparo, em relação ao diâmetro da partícula, para definir a formulação ideal (de menor tamanho de partícula e distribuição unimodal), que foi denominada CSO-NP.

Para a produção das CSO-NP, a fase orgânica foi preparada com Tween 80 (13,5 mg) e óleo de chia (25 mg) diluídos em 4 mL de etanol, mantidos sob agitação em um agitador magnético (Fisatom, modelo 752A, São Paulo, Brasil) por 15 minutos; a fase aquosa foi preparada com mucilagem de chia (0,1% m/v). A fase orgânica foi adicionada gota a gota com o auxílio de uma ponteira em 20 mL da fase aquosa durante homogeneização em Ultra-Turrax (IKA Ultra Turrax® digital, modelo T25, Staufen, Alemanha) a 8000 rpm e a solução foi mantida em agitação durante 15 minutos, para formação das nanopartículas. A Figura 9 mostra as etapas de produção das nanopartículas e a formulação final logo após o preparo. Uma emulsão de óleo de chia contendo Tween 80 (13,5 mg) e óleo de chia (25 mg) diluídos em etanol (4 mL) na fase orgânica e água destilada (20 mL) na fase aquosa, também foi preparada utilizando o mesmo método, a fim de ser utilizada para comparação no teste de estabilidade.

Figura 9 - Etapas do preparo das nanopartículas de óleo de chia (CSO-NP).



7.6 Obtenção do extrato de zeaxantina

Para a elaboração do extrato de zeaxantina, utilizou-se a metodologia proposta por Mercadante e Rodriguez-Amaya (1998). Inicialmente, pesou-se 1 g de *Goji berry* em tubos falcon, adicionou-se 25 mL de acetona gelada e homogeneizou-se por 30 segundos em Ultra-Turrax (IKA Ultra Turrax[®] digital, modelo T25, Staufen, Alemanha). A extração dos pigmentos com acetona gelada foi realizada até a completa descoloração da amostra e então o extrato foi transferido para um funil de separação contendo éter etílico e éter de petróleo; após várias etapas de lavagem com água destilada, foi submetido à saponificação com solução de KOH 10 % em metanol a temperatura ambiente (25 °C) durante a noite. O extrato saponificado foi posteriormente lavado com água destilada para remoção dos álcalis e concentrado em rota evaporador (Fisatom, modelo 801/802, São Paulo, Brasil) a 35 °C. A amostra foi transferida para um frasco âmbar, seca em corrente de nitrogênio e armazenada a -18 °C até o uso.

7.7 Determinação da pureza do extrato de zeaxantina

A pureza do extrato de zeaxantina foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um cromatógrafo (Agilent series 1100, Califórnia, EUA) (Figura 10), equipado com um desgaseificador online, bomba quaternária, e injetor automático com coluna C 30 YCM (250 x 4,6 mm d.i. x 3 µm tamanho da partícula) acoplada e ambientada a 33°C.

Figura 10 - CLAE com detector UV e coluna C 30.



Fonte: o autor.

A fase móvel utilizada foi composta por éter metil-terc-butílico/metanol, em uma proporção de 50:50 (v/v) por 5 minutos e o gradiente de eluição utilizado na análise teve um fluxo de 1 mL/min. Os cromatogramas foram processados no comprimento de onda máximo de absorção da zeaxantina (450 nm). O processamento dos dados foi realizado através do software ChemStation®. A zeaxantina foi quantificada através de uma curva de calibração com coeficiente $R^2 = 1,00$. As amostras obtidas foram filtradas antes da injeção (0,45 μm , Millex com membrana modificada de PTFE para solventes aquosos e orgânicos, Millipore, São Paulo, Brasil). Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico e foram filtrados através de uma membrana de filtração de vácuo Millipore de 0,22 μm específica para solventes orgânicos (Millipore, Barueri, São Paulo).

7.8 Determinação da concentração do extrato de zeaxantina para preparo das nanopartículas

Para determinação da concentração do extrato de zeaxantina, o extrato foi diluído em 5 mL de etanol e mantido em ultrassom (Unique, modelo USC 1400A, São Paulo, Brasil) por 5 minutos para completa solubilização. Logo após, o extrato foi centrifugado (3000 x g, 10 min, 20 °C) (Sigma, modelo 4 K15, Osterode am Harz, Alemanha) para remover possíveis partículas remanescentes. Depois disso, uma alíquota de 50 μL foi diluída em 5 mL de etanol, e a

absorbância do extrato foi medida em um espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800, Quioto, Japão) a 450 nm.

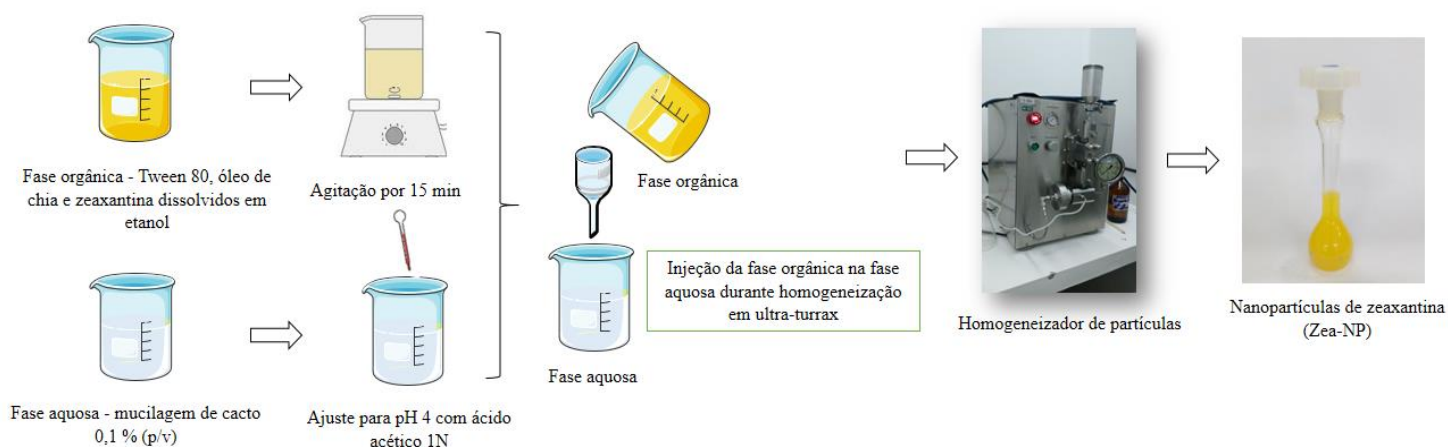
7.9 Preparo das nanopartículas de zeaxantina (Zea-NP)

As nanopartículas de zeaxantina foram produzidas pelo método proposto por de Campo *et al.* (2017), com algumas modificações. A concentração de mucilagem de cladódio de cacto e a quantidade de óleo de chia foram definidas em testes preliminares, que foram realizados a partir de um planejamento experimental 2^2 para avaliar o efeito destas variáveis no diâmetro médio das nanopartículas. Para isto, diferentes concentrações de mucilagem de chia (0,1; 0,2; 0,55; 0,9 ou 1%) e de óleo de chia (20, 26, 40, 54 ou 60 mg) foram testadas. Estas formulações foram submetidas a análise do diâmetro médio da partícula imediatamente após o preparo e a formulação que apresentou maior quantidade de óleo e menor valor em relação ao diâmetro foi utilizada para testar a influência de diferentes concentrações de zeaxantina (10, 20, 30 ou 40 $\mu\text{g/mL}$) sobre o tamanho da partícula. As formulações contendo zeaxantina também foram avaliadas em relação ao diâmetro médio logo após o preparo e a formulação ótima (menor diâmetro e melhor distribuição) foi denominada Zea-NP.

Para o preparo das Zea-NP, a fase orgânica foi constituída por 13,5 mg de Tween 80[®], 40 mg de óleo de chia e zeaxantina na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, que foram dissolvidos em 4 mL de etanol sob agitação em um agitador magnético (Fisatom, modelo 752A, São Paulo, Brasil) durante 15 min. A fase orgânica foi injetada gota a gota em 20 mL da fase aquosa composta por mucilagem de cacto (0,1% p/v) com auxílio de uma ponteira sob homogeneização em Ultra Turrax (IKA Ultra Turrax[®] digital, modelo T25, Staufen, Alemanha) a 8000 rpm por 15 min. Depois disso, as nanopartículas foram submetidas à homogeneização a alta pressão (Avestin, modelo EmulsiFlex-C3[®], Ottawa, Canadá) durante 3 ciclos a 500 bar, a fim de tornar mais homogêneo o perfil de distribuição das partículas. A Figura 11 mostra as etapas de produção das nanopartículas de zeaxantina e a formulação final logo após o preparo.

Uma nanoemulsão de zeaxantina (Zea-NE) contendo Tween 80 (13,5 mg), óleo de chia (40 mg) e zeaxantina (30 $\mu\text{g/mL}$) também foi preparada utilizando o mesmo método, para fins comparativos.

Figura 11 - Etapas do preparo das nanopartículas de zeaxantina (Zea-NP).



7.10 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas de óleo de chia foram avaliadas quanto ao diâmetro médio da partícula, valor de span, potencial zeta, viscosidade, pH, eficiência de encapsulação por cromatografia gasosa, capacidade de carga, propriedades morfológicas, propriedades térmicas (TGA e DSC) e espectroscopia no infravermelho; a estabilidade das nanopartículas e da emulsão de óleo de chia foi avaliada através do teste de oxidação em condições aceleradas.

As nanopartículas de zexantina foram avaliadas quanto ao diâmetro médio da partícula, valor de span, potencial zeta, viscosidade, pH, eficiência de encapsulação por cromatografia líquida de alta eficiência, propriedades morfológicas, propriedades térmicas (TGA), espectroscopia no infravermelho e cor. A nanoemulsão de zeaxantina foi caracterizada em suspensão quanto ao diâmetro médio da partícula, valor de span, potencial zeta, pH, viscosidade, cor e propriedades morfológicas. Tanto as nanopartículas como a nanoemulsão tiveram sua estabilidade avaliada através da exposição a diferentes temperaturas.

Para as análises de propriedades térmicas e espectroscopia no infravermelho ambas as nanopartículas desenvolvidas foram liofilizadas (Freeze Dryer Liotop, modelo L101, São Paulo, Brazil) a $-58\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

7.10.1 Diâmetro médio da partícula

O diâmetro médio da partícula ($D_{4,3}$) e o valor de span foram determinados por difração a laser (LD) (Mastersizer 2000[®], Malvern Instruments, Reino Unido) (Figura 12). O índice de refração utilizado foi de 1,330 para água e 1,335 para a mucilagem de chia e mucilagem de

cacto. As amostras foram dispersas em água e as leituras foram realizadas em triplicata. Os dados foram analisados pelo programa de software Mastersizer 2000[®], versão 5.61 e o valor de span foi obtido de acordo com a equação 1:

$$Span = \frac{d_{0,1} - d_{0,9}}{d_{0,5}} \quad (1)$$

Onde: $d_{0,1}$ é 10%, $d_{0,9}$ 90% e $d_{0,5}$ 50% do tamanho das partículas.

Figura 12 - Equipamento Mastersizer utilizado para medir diâmetro da partícula e valor de span.



7.10.2 Potencial zeta

O potencial zeta das nanopartículas foi obtido por mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento Zetasizer, Nano ZS, Malvern[®], Reino Unido (Figura 13), usando NaCl 0,1 M como dispersante (1:40 v/v). Os resultados foram analisados pelo programa de software Zetasizer 7.11.

Figura 13 - Equipamento Zetasizer, Nano ZS utilizado para medir potencial zeta.



7.10.3 Viscosidade

A viscosidade de CSO-NP foi medida logo após seu preparo utilizando um viscosímetro rotacional (Brookfield®, modelo DV + II Pro spindle LV2, Middleborough, EUA) (Figura 14a) a 25 °C e os resultados foram analisados pelo software Brookfield Rheocalc 32 software. Para determinação da viscosidade de Zea-NP foi utilizado um reômetro (Thermo Scientific, modelo HAAKE Mars III, Waltham, EUA) (Figura 14b) com uma taxa de cisalhamento variando de 10,1 a 800 s⁻¹ e banho termostático (Thermo Scientific, modelo HAAKE A10, Waltham, EUA) a 25 °C. Os resultados foram analisados pelo software HAAKE RheoWin 4.75.0000.

Figura 14 - (a) Viscosímetro rotacional Brookfield; (b) Reômetro HAAKE.



7.10.4 pH

O pH das amostras foi medido em triplicata, diretamente nas suspensões sem diluições prévias, utilizando um pHmetro (Quimis, modelo Q-400A0, São Paulo, Brasil) a 25 °C.

7.10.5 Determinação do teor de óleo de chia das CSO-NP

A composição e o teor de óleo de chia nas CSO-NP foram determinados em um cromatógrafo gasoso (CG-FID, SHIMADZU, modelo GC-2010 Plus, Quioto, Japão) (Figura 15), com uma coluna capilar de sílica fundida SLB-IL 100, Supelco® (30 m x 0,25 mm x 0,2 µm), injetor automático Split (1/50) e detector de ionização de chama acoplado. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 50 °C por 3 min e elevada para 240 °C à taxa de

3 °C/min. O gás de transporte utilizado foi o hidrogênio (20 cm/s) a um um fluxo de 1 mL/min e o volume injetado foi de 1 µL.

Para determinação do teor total de óleo de chia nas nanopartículas, o óleo de chia foi extraído segundo o método proposto por Timilsena *et al.* (2016), com algumas modificações. A fim de romper as nanopartículas, 40 mL de ácido clorídrico 4 N foram adicionados às nanopartículas e agitados em vortex (IKA® vortex, modelo VG 3S32, Carolina do Norte, EUA) por 1 min. Posteriormente, 20 mL de hexano foram adicionados, a fim de reter o óleo liberado e a solução foi colocada em vortex por mais 1 minuto. Logo após, as soluções foram transferidas para erlenmeyer e permaneceram sob agitação em um shaker (CERTOMAT® shaker, modelo MO II, Alemanha) durante 4 h para facilitar a total migração do óleo para o hexano. A fase contendo o solvente e óleo foi separada em um funil de separação, onde foram feitas lavagens com solução saturada de NaCl. As amostras foram transferidas para um tubo, secas em corrente de N₂ e congeladas a – 18 °C até o uso.

Figura 15 - Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama.



Fonte: o autor.

7.10.6 Derivatização dos ácidos graxos

Antes da injeção no cromatógrafo gasoso, os ácidos graxos foram derivatizados em ésteres metílicos, para torná-los voláteis e aumentar sua estabilidade, permitindo sua identificação por cromatografia gasosa. Para este procedimento, a metodologia descrita por Joseph e Ackman (1992) foi utilizada, onde inicialmente o óleo de chia foi saponificado utilizando uma solução metanólica de NaOH 0,5 N. O teor de ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME), foi identificado através de comparação do tempo de retenção com o padrão FAME (FAME MIX Supelco® 37, Sigma- Aldrich, St. Louis, EUA), que foi utilizado como padrão externo. Como

padrão interno, utilizou-se 2,6-dit-butil-p-hidroxitolueno (BHT) a uma concentração de 0,5 mg/mL. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram quantificados através de normalização de área. As injeções foram realizadas em triplicata e o processamento e aquisição dos resultados foram realizados pelo software GC solution.

7.10.7 Eficiência de encapsulação das CSO-NP

A eficiência de encapsulação das CSO-NP foi avaliada por CG-FID, através da determinação do óleo encapsulado e óleo livre (não encapsulado) na superfície das nanopartículas. Para determinação do conteúdo total de óleo encapsulado, o óleo de chia foi extraído conforme mencionado no item 7.10.5.

O conteúdo de óleo livre (não encapsulado), foi determinado segundo metodologia proposta por Timilsena *et al.* (2016), com modificações. Para tal, 20 mL de hexano foram adicionados às nanopartículas e agitados em vortex por 1 minuto para o óleo livre migrar para o solvente. Posteriormente, o solvente contendo o óleo livre foi separado dos demais constituintes em um funil de separação, onde foram feitas lavagens com solução saturada de NaCl até o hexano ficar com aparência límpida. Após, a amostra foi transferida para um tubo e seca em corrente de N₂. Para determinar o teor de ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada a derivatização dos ácidos graxos conforme metodologia citada no item 7.10.6 e a quantificação e identificação foi realizada por CG-FID, onde FAME MIX foi utilizado como padrão externo e BHT como padrão interno. Para determinação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada a comparação do tempo de retenção dos compostos com o FAME MIX. A eficiência de encapsulação foi determinada segundo a equação 2:

$$EE (\%) = \frac{T_f - T_{faq}}{T_f} \times 100 \quad (2)$$

Onde: T_f é o conteúdo total de ésteres de ácidos graxos (mg/100g) no óleo de chia extraído das nanopartículas e T_{faq} é o conteúdo total de ésteres de ácidos graxos (mg/100 g) do óleo de chia livre (não encapsulado).

7.10.8 Determinação do teor de zeaxantina nas nanopartículas e eficiência de encapsulação

O teor de zeaxantina nas nanopartículas foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para quantificação, utilizou-se uma curva padrão de zeaxantina, diluída em éter metil-terc-butílico (MTBE). A curva padrão foi obtida através da representação gráfica das áreas dos picos de cinco diferentes concentrações de zeaxantina (10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL).

Para determinação do teor, a zeaxantina foi extraída de uma alíquota das nanopartículas e nanoemulsão (500 µL) com 2,5 mL de acetonitrila e foi homogeneizada em ultrassom por 30 min, seca em corrente de N₂ e congeladas a -22 °C até o momento do uso. Antes da injeção, as amostras foram diluídas em MTBE (1 mL), filtradas e em seguida, injetadas no cromatógrafo.

A eficiência de encapsulação das Zea-NP foi avaliada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação. Para isso, 500 µL de Zea-NP foram submetidos a ultrafiltração (Ultrafree Microcon 10,000 MW, Merck Millipore, Alemanha) e centrifugação (1690 x g, 15 min) em uma centrífuga de eppendorf (Hexis, modelo Mini Spin, São Paulo, Brasil). O filtrado obtido contendo o carotenoide livre (não encapsulado) foi coletado e injetado em HPLC para determinar o teor de zeaxantina livre. A eficiência de encapsulação foi determinada dividindo-se a diferença entre a concentração total de zeaxantina e o teor de zeaxantina na fase aquosa pela concentração total e multiplicando-se o resultado por 100 (VENTURINI *et al.*, 2011).

7.10.9 Capacidade de carga

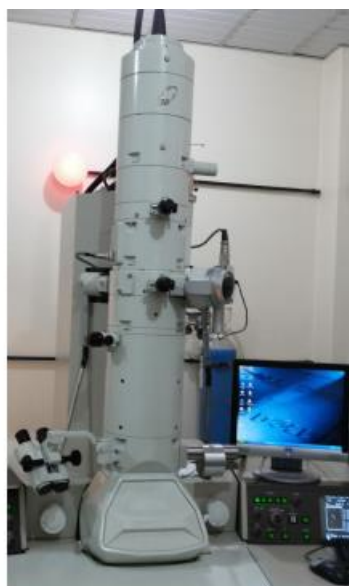
A capacidade de carga mede a relação percentual da quantidade do composto encapsulado em relação a todos os constituintes que compõe a nanopartícula. Para o cálculo da capacidade de carga, a massa total do composto encapsulado (obtida através da eficiência de encapsulação) foi utilizada. A capacidade de carga foi então considerada dividindo-se a massa total do composto encapsulado pela massa total dos constituintes das nanopartículas e multiplicando-se por 100.

7.10.10 Propriedades morfológicas

A morfologia das nanopartículas foi avaliada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. Para avaliar a morfologia, a suspensão de nanopartículas foi diluída em água ultrapura na proporção de

1:10 (v/v) e depositadas em grids de cobre (revestimento de formvar/carbono 400 mesh) por 5 minutos, utilizando como contraste negativo acetato de uranila em solução aquosa (2%). As amostras foram colocadas em dessecador até o momento da análise e posteriormente foram analisadas em microscópio (Jeol, modelo JEM 1200 ExII, Tóquio, Japão) operando a 80 kV com uma magnitude de 200x (Figura 16).

Figura 16 - Microscópio eletrônico de transmissão.

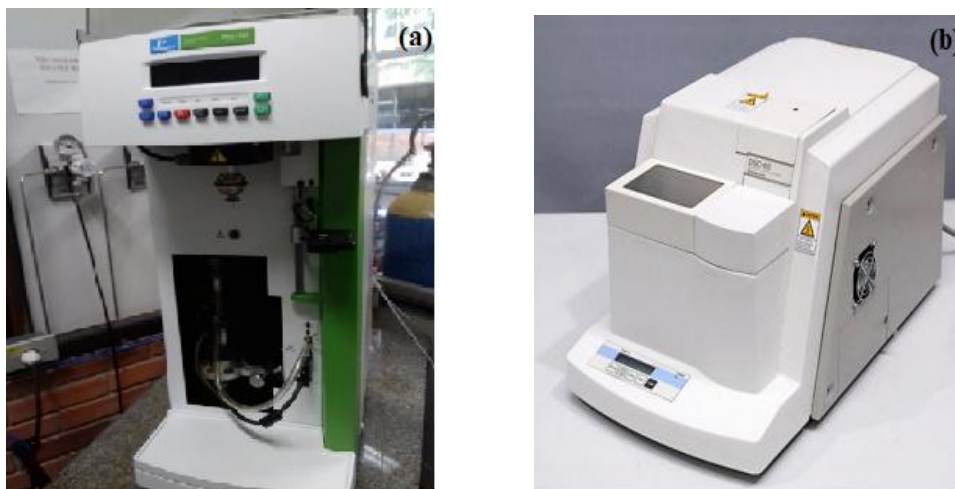


7.10.11 Propriedades térmicas (TGA e DSC)

As propriedades térmicas das nanopartículas de óleo de chia e zeaxantina, nanoemulsão de zeaxantina e das mucilagens de chia e de cladódio de cacto foram determinadas por analisador termogravimétrico (PerkinElmer, modelo Pyris 1, Waltham, EUA) (Figura 17a) sob uma atmosfera de nitrogênio. Em torno de 10-15 mg de amostra foram submetidas a diferentes taxas de aquecimento (25 a 850° C a uma taxa de 10 °C/min⁻¹) e a perda de massa (%) foi avaliada em função da temperatura.

As propriedades térmicas das nanopartículas de óleo de chia e da mucilagem de chia foram avaliadas também por calorimetria de varredura diferencial em um calorímetro (Shimadzu®, modelo DSC 60, Quioto, Japão) (Figura 17b) na faixa de temperatura de 25 a 400 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min⁻¹, onde foram observados os picos endotérmicos e exotérmicos das amostras.

Figura 17 - (a) Analisador termogravimétrico; (b) calorímetro.



7.10.12 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As nanopartículas de óleo de chia e zeaxantina, o óleo de chia e as mucilagens de chia e de cladódio de cacto foram avaliadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, utilizando pastilhas de KBr, em um espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo IRPRESTIGE-21, Quioto, Japão) (Figura 18), no modo transmitância, operando número de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} e 32 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} foram realizadas.

Figura 18 - Espectrofotômetro utilizado para a análise de FT-IR.



7.10.13 Análise colorimétrica

As medições de cor foram realizadas utilizando um colorímetro portátil (Konica Minolta®, modelo CR 400, Tóquio, Japão) (Figura 19). Os parâmetros colorimétricos foram obtidos de acordo com a Commission Internationale de l'Eclairage (Sistema CIELAB) e foram determinados os valores de L (luminosidade), parâmetro que varia de 0 a 100, onde valores mais próximos de zero indicam amostras mais escuras e mais próximos a 100 caracterizam amostras mais claras;

valores da coordenada a^* (intensidade verde-vermelho), onde valores negativos indicam a região verde e valores positivos a região vermelha; valores da coordenada b^* (intensidade azul-amarelo), onde valores negativos indicam a região da cor azul e valores positivos a região amarela.

Figura 19 - Colorímetro utilizado para as medidas de cor.



7.10.14 Estudo de estabilidade das nanopartículas

7.10.14.1 Estabilidade das CSO-NP em condições aceleradas

Para averiguar a estabilidade das nanopartículas e emulsão de óleo de chia, as amostras foram acondicionadas em uma câmara (NewLab, modelo NL-41-01 A, São Paulo, Brasil) (Figura 20) em condições aceleradas (40 ± 1 °C), sem exposição à luz. As amostras permaneceram armazenadas por 28 dias em tubos de ensaio vedados com Parafilm e semanalmente foram avaliadas em relação ao tamanho da partícula, valor de span, potencial zeta, pH e teor de óleo, de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

Figura 20 - Câmara BOD, utilizada no experimento de estabilidade.



7.10.14.2 Estabilidade das Zea-NP e Zea-NE em diferentes temperaturas

As nanopartículas de zeaxantina e nanoemulsão foram armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração (4 °C), temperatura ambiente (25 °C), e em condições aceleradas (40 °C) sem exposição a luz por 28 dias. As amostras foram avaliadas semanalmente durante o período de armazenamento em relação a sua estabilidade química, analisada através de medições de pH, cor e teor de zeaxantina; e em relação a sua estabilidade física através da avaliação do diâmetro da partícula e valor de span, de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

7.11 Produção do iogurte

Para o preparo do iogurte, o leite integral foi aquecido até 40 °C em banho-maria e foi adicionado leite em pó desnatado (10% m/v). Essa mistura foi mantida em agitação em um agitador mecânico (EduTec, modelo EEQ9008A-2, Curitiba, Brasil) por 15 minutos. Para a adição das gomas guar (0,15 % m/v) e xantana (0,05 m/v), a mistura foi aquecida até 80 °C (a fim de facilitar a dissolução) e posteriormente foi mantida sob agitação por 30 minutos. Logo após, foi feito o resfriamento até 45 °C para adição do fermento para preparo de iogurte (0,4 g/L). A mistura foi mantida a 45 °C por 5h em banho-maria para fermentação do leite e produção do iogurte. Decorrido este tempo, o iogurte foi resfriado e mantido sob refrigeração por 24h.

7.12 Aplicação das Zea-NP e Zea-NE no iogurte

As nanopartículas e nanoemulsão de zeaxantina (Zea-NP e Zea-NE) foram adicionadas ao iogurte na concentração de 12,5% (v/v), equivalente à 364,2 e 375 $\mu\text{g/mL}$ de zeaxantina para Zea-NP e Zea-NE, respectivamente. As concentrações foram diferentes, visto que foi considerada a eficiência de encapsulação das Zea-NP para o cálculo da concentração. Para adição, o iogurte foi mantido sob agitação até completa homogeneização das Zea-NP e Zea-NE (aproximadamente 15 minutos). A Figura 21 mostra a aparência dos iogurtes com adição de nanopartículas e nanoemulsão de zeaxantina logo após a produção.

Figura 21. Iogurte contendo nanopartículas e nanoemulsão de zeaxantina.



As amostras (50g) do iogurte controle (CY), iogurte com adição de nanopartículas (Y-NP) e iogurte com adição de nanoemulsão (Y-NE), foram colocadas em potes plásticos com tampa, que foram armazenados em uma câmara BOD (NewLab, modelo NL-41-01 A, Piracicaba, Brasil), expostos à luz, a 4 °C por 28 dias (Figura 22). Para análise de sinérese, as amostras (20g) foram acondicionadas em tubos falcon.

Figura 22. Amostras de iogurte armazenadas em câmara BOD (4 °C) para o teste de estabilidade.



7.13 Caracterização do iogurte

Todas as amostras de iogurte foram caracterizadas em relação ao pH, cor, textura, viscosidade e sinérese ao longo do armazenamento. Os iogurtes contendo nanopartículas e nanoemulsão também foram avaliados em relação à retenção de zeaxantina. As análises foram realizadas em triplicata nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento. Realizou-se também a análise sensorial do CY, Y-NP e Y-NE, logo após produção. O ensaio de digestão *in vitro* foi realizado para avaliar a bioacessibilidade da zeaxantina em Y-NP e Y-NE após o preparo.

A metodologia utilizada para cada análise de caracterização está descrita abaixo. As análises de pH e cor foram realizadas conforme descrito anteriormente nos itens 7.10.4 e 7.10.13.

7.13.1 Acidez total titulável

Para determinação da acidez total titulável, utilizou-se o método descrito pela AOAC (2005). Pesou-se 10 g de iogurte que foram misturadas com 75 mL de água destilada e a partir dessa mistura foi feita a titulação da amostra com NaOH 0,1 N até coloração rosa, indicada pela presença de fenolftaleína. Os resultados foram expressos em % de ácido láctico.

7.13.2 Sinérese

Para determinação da sinérese, os tubos falcon contendo 20 g de iogurte foram submetidos à centrifugação (3000 g, 10 min, 4 °C) (Sigma, modelo 4 K15, Osterode am Harz, Alemanha), de acordo com a metodologia proposta por Robertson *et al.* (2016). O sobrenadante foi coletado, pesado e a sinérese foi determinada de acordo com a equação 3:

$$\text{Sinérese} = \frac{\text{Massa total do líquido separado}}{\text{Massa total do iogurte}} \times 100 \quad (3)$$

7.13.3 Propriedades de textura

Para avaliação das propriedades de textura foram analisadas a firmeza e consistência, através de um texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA.XT2i, Godalming, Reino Unido) (Figura 23). Para o teste, utilizou-se um probe de 35 mm de diâmetro (Backword Extrusion Rig) com taxa e profundidade de penetração de 2 mm/s e 10 mm, respectivamente. Para análise dos resultados foi utilizado o programa Exponent Lite.

Figura 23. Texturômetro utilizado para as análises de textura dos iogurtes.



Fonte: o autor.

7.13.4 Viscosidade

A viscosidade dos iogurtes foi determinada em um reômetro (Thermo Scientific, modelo HAAKE Mars III, Waltham, EUA) a 4 °C. As amostras (aproximadamente 7 mL) foram colocadas em um cilindro concêntrico (26 mm x 34 mm) e foram submetidas à um pré-cisalhamento a 200 s⁻¹ por 1 minuto. Para determinação da viscosidade, aplicou-se uma taxa de cisalhamento de 0,01 a 200 s⁻¹ e de 200 a 0,01 s⁻¹. Os resultados foram expressos como a média dos valores em 200 s⁻¹.

7.13.5 Morfologia dos iogurtes

A morfologia do CY, Y-NP e Y-NE foi observada através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) no laboratório central de microscopia e microanálise (PUCRS, Porto Alegre, Brasil) utilizando um Fei, modelo Tecnai G2 T20 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) com magnificação de 13500 x e 26500 x e voltagem de aceleração de 120 kV.

As amostras foram preparadas através da diluição das amostras de iogurte em água destilada (1:10 v/v) em um Eppendorf. Após a diluição, 1 gota foi depositada em um grid de carbono de 400 mesh (Formvar, Londres, Reino Unido) e duas gotas de acetato de uranila foram depositadas, para contraste negativo.

7.13.6 Determinação da estabilidade da zeaxantina no iogurte

Para determinação da estabilidade, a zeaxantina foi extraída dos iogurtes adicionados de nanopartículas e dos iogurtes adicionados de nanoemulsão. A fim de romper as nanopartículas, uma amostra de 10 g de iogurte foi pesada e colocada em tubos de ensaio de 50 mL e adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico 4 N. A mistura foi agitada em vortex por 2 minutos, conforme descrito por de Campo *et al.* (2017).

Para extração da zeaxantina, adicionou-se 5 mL de acetona e 10 mL de éter de petróleo e as amostras foram agitadas em vortex por 5 minutos. Após, foram adicionados 10 mL de uma solução saturada de NaCl para quebrar a emulsão formada e o tubo foi agitado levemente e mantido em repouso por 30 minutos. Esse processo foi repetido até a ausência de cor nas amostras de iogurte, correspondendo a 2 ou 3 extrações, conforme os dias de armazenamento, considerando que no final do período de armazenamento já havia menor intensidade de cor nos iogurtes, devido à degradação da zeaxantina. Ao final de cada extração, o sobrenadante foi coletado e colocado em um mesmo frasco âmbar. O solvente contendo o carotenoide foi seco em N₂ e as amostras foram armazenadas a - 18 °C até a análise em HPLC.

7.13.7 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada com 50 provadores não treinados após o preparo dos iogurtes. Aproximadamente 20 g das amostras do CY, Y-NP e Y-NE foram servidas em copos de plástico identificados com números aleatórios. As amostras foram avaliadas em relação aos atributos aparência, aroma, cor, textura, consistência, sabor, sabor residual e aceitação global, conforme uma escala hedônica de 9 pontos, onde 1 = desgostei muitíssimo e 9 = gostei muitíssimo.

7.14 Digestão *in vitro*

7.14.1 Preparo das soluções estoque e fluidos simulantes

Para a análise de digestão *in vitro* foram utilizados três fluidos simulantes: oral, gástrico e intestinal, conforme estabelecido por Minekus *et al.*, 2014. Os fluidos foram preparados com diferentes concentrações de sais, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Composição e concentração dos sais utilizados para preparo dos fluidos utilizados na análise de digestão *in vitro*.

Constituinte	[] Solução estoque		Fluido oral		Fluido gástrico		Fluido intestinal	
			Vol. da estoque	[] no fluido	Vol. da estoque	[] no fluido	Vol. da estoque	[] no fluido
	g/100mL	mol/L	mL	mmol/L	mL	mmol/L	mL	mmol/L
KCl	3,73	0,5	3,02	15,1	1,38	6,9	1,36	6,8
KH ₂ PO ₄	6,80	0,5	0,74	3,7	0,18	0,9	0,16	0,8
NaHCO ₃	8,40	1	1,36	13,6	2,5	25	8,5	85
NaCl	11,68	2	-	-	2,36	47,2	1,92	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	3,05	0,15	0,1	0,15	0,067	0,1	0,22	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	4,80	0,5	0,012	0,06	0,1	0,5	-	-

CaCl₂(H₂O)₂ não é adicionado aos fluidos de digestão para evitar precipitação.

Para o preparo dos sais, estes foram solubilizados em água Milli-Q com o auxílio de um agitador magnético. Para o preparo da solução de bicarbonato de sódio, foi feita diluição e filtração em bomba a vácuo, para retirar partículas remanescentes. As soluções estoque de cada sal utilizado foram preparadas no dia anterior à análise e armazenadas sob refrigeração a 4 °C. Os fluidos simulantes foram preparados no dia da análise.

Para o preparo de cada fluido, foram misturados os volumes correspondentes a cada sal, conforme descrito na Tabela 2 e o volume final foi ajustado para 100 mL com água Milli-Q.

7.14.2 *Análise de digestão in vitro*

Para a análise de digestão *in vitro*, os fluidos simulantes foram colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Para simulação da fase oral, as amostras de iogurte (10 g) foram colocadas em béqueres e adicionadas de 7 mL do fluido oral e tiveram seu pH ajustado para $7,00 \pm 0,1$, utilizando HCl ou NaOH 1M. Logo após, adicionou-se 1 mL de uma solução contendo a enzima α -amilase a 1500 U mL^{-1} (preparada no fluido oral), 50 μL de CaCl_2 (0,3 M) e 1,950 mL de água Milli-Q e a mistura foi agitada durante 2 minutos a 37 °C em banho-maria (Novatecnica, modelo NT 232, São Paulo, Brasil).

Para simulação da fase gástrica, 15 mL do fluido gástrico foram adicionados à mistura e o pH foi ajustado para $3 \pm 0,1$. Após foram adicionados 3,2 mL de uma solução com a enzima pepsina a 25000 U mL^{-1} (preparada no fluido gástrico), 10 μL de CaCl_2 e 1,39 mL de água Milli-Q. A mistura foi incubada e agitada por 2h a 37 °C.

Para simular a fase intestinal, 22 mL do fluido intestinal foram adicionados à mistura e o pH ajustado para $7 \pm 0,1$. Após, 10 mL de uma solução de pancreatina a 800 U mL^{-1} (preparada no fluido intestinal), 5 mL de uma solução de bile (160 mM), 80 μL de CaCl_2 e 2,32 mL de água Milli-Q foram adicionadas e a mistura foi incubada e mantida sob agitação a 37 °C por 2h. Após a finalização de cada etapa de simulação da digestão, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por aproximadamente 5 minutos, a fim de parar a atividade da enzima.

7.14.3 *Determinação da bioacessibilidade*

Após a simulação da digestão *in vitro*, determinou-se a bioacessibilidade da zeaxantina em Y-NP e Y-NE, de acordo com a metodologia proposta por Verkempinck *et al.*, 2018, com algumas alterações. A mistura resultante após o término da digestão, foi denominada “digesta”. Ao final da fase intestinal, a digesta foi transferida para tubos de centrifuga e centrifugada (HITACHI, modelo CR21GIII, Ibaraki, Japão) a 6000 g, 4 °C, durante 5 minutos. O sobrenadante (correspondente à fração micelar), foi coletado e foram adicionados 0,5 g de NaCl e 10 mL da solução de extração, composta por hexano, acetona e etanol (2:1:1 v/v). A mistura foi homogeneizada em vortex por 2 minutos e novamente centrifugada a 6000 g, 4 °C, por 5 minutos.

O sobrenadante, contendo a zeaxantina incorporada na fração micelar, foi coletado e transferido para frascos âmbar, seco em N₂ e armazenado a -18 °C até quantificação em HPLC, utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente, no item 7.7.

O experimento foi realizado em triplicata e a bioacessibilidade da zeaxantina no iogurte foi calculada considerando a concentração de zeaxantina na fase micelar em relação à concentração inicial no iogurte.

8 REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis**. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

DE CAMPO, C. et al. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 234, n. Supplement C, p. 1-9, 2017. ISSN 0308-8146.

DICK, M. et al. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 198-205, 2015. ISSN 0144-8617.

HERCULANO, E. D. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated Eucalyptus staigeriana essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 484-491, 2015. ISSN 0023-6438.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 488-506, 1992.

MAÑAS, E.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Sources of error in dietary fibre analysis. **Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 331-342, 1994. ISSN 0308-8146.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 128-130, 1998. ISSN 0021-8561.

MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v.5, n.6, p. 1113-1124, 2014.

TIMILSENA, Y. P. et al. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 347-357, 2016. ISSN 0141-8130. ISSN 0141-8130

ROBERTSON, R. C. et al. An assessment of the techno-functional and sensory properties of yoghurt fortified with a lipid extract from the microalga *Pavlova lutheri*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 37, p. 237-246, 2016. ISSN 1466-8564.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1, p. 200-208, 2011. ISSN 0927-7757.

VERKEMPINCK, S. H. E., SALVIA-TRUJILLO, L., MOENS, L. G., CHARLEER, L., VAN LOEY, A. M., HENDRICKX, M. E., & GRAUWET, T. Emulsion stability during gastrointestinal conditions effects lipid digestion kinetics. **Food Chemistry**, v. 246, p. 179-191, 2018.

CAPÍTULO 3 - ARTIGO 1

Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material:
Characterization and stability evaluation

Artigo publicado na revista 'Food Chemistry'

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.153>

Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: characterization and stability evaluation

Camila de Campo, Priscilla Pereira dos Santos, Tania Maria Haas Costa,
Karina Paese, Silvia Stanisquaski Guterres, Alessandro de Oliveira Rios,
Simone Hickmann Flôres

Abstract

In this study, chia seed oil was nanoencapsulated utilizing chia seed mucilage (CSM) as wall material. The viscosity, encapsulation efficiency, loading capacity, transmission electron microscopy, FT-IR spectroscopy and thermal properties of chia seed oil nanoparticles (CSO-NP) were performed after preparation. Particle size, zeta potential, span value, and pH of CSO-NP and oxidation stability of nanoencapsulated and unencapsulated oil were evaluated during 28 days of storage at accelerated conditions (40 °C). The CSO-NP showed spherical shape, an average size of 205 ± 4.24 nm and zeta potential of -11.58 ± 1.87 mV. The encapsulation efficiency (82.8 %), loading capacity (35.38 %) and FT-IR spectroscopy demonstrated the interaction between oil and mucilage. Furthermore, CSO-NP were thermally stable at temperatures up 300 °C and nanoencapsulated oil showed higher stability against oxidation than unencapsulated oil. The results suggest that chia seed mucilage represents a promising alternative to substitute synthetic polymers in nanoencapsulation.

Keywords: nanoparticles; oxidative stability; gum wall; chia seed.

1 Introduction

In recent years, the interest to develop biodegradable nanoparticles increased, due to the potential as bioactive compounds delivery devices (Hosseini, Zandi, Rezaei, & Farahmandghavi, 2013). Nanoparticles can also enhance bioavailability, improve drug controlled release and solubility of bioactive compounds a greater extent than microparticles (Mozafari et al., 2006).

Nanoparticles are characterized to have a size less than 1 μm and can be produced utilizing natural or synthetic polymers as wall material. Among the natural polymers, gums and mucilages have received attention due to availability, potential biodegradability, and high hydration capacity. These polymers are mostly water-soluble polysaccharides and commonly

found in plants. In addition, natural polymers offer other advantages that compete with synthetic ones, such as low cost, nontoxic and they can be chemically modified to obtain the characteristics of interest (Prajapati, Jani, Moradiya, & Randeria, 2013).

Currently, the demand for natural products in the food industry is increasing, and consequently, gums and mucilages are becoming popular due to use as dietary fiber, thickening, emulsifying, stabilizer agent and drug delivery excipient (Mirhosseini & Amid, 2012). Several researches reported the use of gums to produce nanoparticles, such as tragacanth gum (Ghayempour, Montazer, & Mahmoudi Rad, 2015), cashew gum (Herculano, de Paula, de Figueiredo, Dias, & Pereira, 2015) and gum Arabic in combination with sodium caseinate (Ilyasoglu & El, 2014).

Chia (*Salvia hispanica* L.) is a herbaceous plant from *Lamiaceae* family, originally from southern Mexico and its use may be as whole seeds, flour, seed oil and mucilage (Marineli, Moraes, Lenquiste, Godoy, Eberlin, & Maróstica Jr, 2014). Chia seed mucilage (CSM) is an anionic heteropolysaccharide with high viscosity even at low concentration (Timilsena, Adhikari, Barrow, & Adhikari, 2016), exuded when the seed is in contact with water. Also, CSM is a good source of fiber and has excellent water and oil retention capacity (Segura-Campos, Ciau-Sol, Rosado-Rubio, Chel-Guerrero, & Betancur-Ancona, 2014). Due to its characteristics, CSM is a promising polymer to be used as wall material, as reported by Timilsena, Adhikari et al. (2016), who utilized chia seed mucilage in combination with chia protein isolate to microencapsulate chia oil.

Chia seed oil is a source of polyunsaturated fatty acid (PUFA), mainly linoleic and linolenic acid. The proportion of linolenic acid in chia oil (64.4%) is higher than those reported to walnut oil (11.93%) and flaxseed oil (53.5%) (Calvo, Castaño, Hernández & González-Gómez, 2011; Tonon, Grosso & Hubinger, 2011). However, unsaturated fatty acids are unstable when exposed to light, oxygen, moisture, and heat (Martínez et al., 2015), which results in alterations in quality and shelf life reduction due to the formation of off-flavours and changes in oil sensory characteristics. In this sense, encapsulation of chia seed oil is a promising alternative to protect the oil against lipid oxidation and improve solubility and stability.

Other studies developed and evaluated chia seed oil microcapsules with different wall materials, such as whey protein concentrate, mesquite gum and gum Arabic (Rodea-González, Cruz-Olivares, Román-Guerrero, Rodríguez-Huezo, Vernon-Carter, & Pérez-Alonso, 2012), and blends of soy protein isolate and maltodextrin in different proportions (González, Martínez,

Paredes, León, & Ribotta, 2016). Nevertheless, there are no reports to date of chia seed oil nanoencapsulated.

With the view to explore a natural polymer to substitute synthetic ones in nanoencapsulation, the aim of this study was to evaluate the potential of chia seed mucilage as wall material, to characterize the chia seed oil nanoparticles (CSO-NP) and to determine their stability during storage at accelerated conditions.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Chia seed mucilage (CSM) was extracted from chia seeds (*Salvia hispanica* L.), obtained from local farmers of Jalisco state, Mexico. The seeds were stored in vacuum-sealed bags at -18 °C until further use. Chia seed oil (CSO) was purchased in a local market (Porto Alegre, Brazil). Tween 80 and ethanol were provided by Dinâmica (São Paulo, Brazil), and acetic acid by Neon (São Paulo, Brazil). All the other reagents utilized were of analytical grade.

2.2 Mucilage extraction

The CSM was obtained by the method proposed by Dick, Costa, Gómaa, Subirade, Rios and Flôres (2015) with modifications. Whole chia seeds were immersed in distilled water (1:30 w/v) and stirred by an electric stirrer (Eduotec, EEQ9008A-2, Curitiba, Brazil) for 2 h, at room temperature (25 °C). Then, the mucilage suspension was separated from the chia seeds by centrifugation (HITACHI High-Speed Refrigerated, model CR 21GIII, Ibaraki, Japan) at 9000 x g/30 min and the mucilage firmly bonded to the chia seed coat was removed using a vacuum pump and a sieve. CSM was filtered with cheesecloth to remove small particles, and the resulting solution was dried in an oven with forced air circulation (DeLeo, model B5AFD, Brazil) at 60 °C for 18 h and stored in sealed plastic bags until use.

2.3 Proximate analyses of CSM

The protein, ash, moisture, lipids, total fiber, soluble dietary fiber (SDF) and insoluble dietary fiber (IDF) contents had been performed according to the standard Association of Official Analytical Chemist methods (AOAC, 2005). The Kjeldahl method was used to determine the total protein content, and the correction factor utilized was 6.25. The ash content was determined in a muffle furnace (Elektro Therm Linn, Model 312.6 SO LM 1729, Germany)

set to 550 °C. The moisture content was determined by gravimetry, maintaining the sample at 105 °C in an oven (De Leo, model 48 TLK, Brazil) for approximately 24 h. A Soxhlet extractor (Foss Soxtec, model 2055, Denmark) was utilized to analyze the lipid content. The total fiber, SDF, and IDF were determined according to the enzymatic-gravimetric method, with sample reduction weight to 0.1 g due to the increase in viscosity caused by mucilage, as cited by Mañas, Bravo and Saura-Calixto (1994). All analyses were carried out in triplicate, and the results expressed as g/100 g of dry basis.

2.4 Preparation of CSM solution

To prepare the solution, dried CSM was dissolved in distilled water (0.1 % w/v), and stirred by an electric stirrer (Eduotec, EEQ9008A-2, Curitiba, Brazil) for 2 h at room temperature (25 °C), to ensure the formation of a homogeneous dispersion. The solution was maintained overnight under refrigeration, to full hydration, and the pH was adjusted to 4 with acetic acid 1 N, to prevent microbial growth.

2.5 Preparation of chia seed oil nanoparticles (CSO-NP)

Chia seed oil nanoparticles were produced from the method described by Herculano et al. (2015), with some modifications. The Tween 80[®] (13.5 mg) and CSO (10, 15 and 25 mg) were dissolved in ethanol (4 mL) under stirring on a magnetic stirrer (Fisatom, model 752A, Brazil) for 15 min. Then, this organic phase was added dropwise in 20 mL of CSM aqueous solution (0.1 % w/v) during homogenization in Ultra Turrax (IKA Ultra Turrax[®] digital, model T25, Germany) at a speed of 8000 rpm for 15 min.

In preliminary tests, to study the influence of oil concentration in the particle size distribution of chia seed oil nanoparticles, formulations were prepared using different concentrations of CSO (0.5, 0.75 and 1.25 mg/mL), corresponding to 10, 15 and 25 mg of oil. The amount of Tween 80[®] and CSM were also optimized to provide the best concentration to nanoparticles obtention (data not showed). The formulations were evaluated immediately after preparation to choose the optimal formulation denominated CSO-NP. Furthermore, CSO-NP were prepared in triplicate and characterized to viscosity, encapsulation efficiency, loading capacity, transmission electron microscopy, FT-IR spectroscopy and thermal properties. The CSO-NP stability was also evaluated during storage at accelerated conditions (40° C) for 28 days.

For thermal analysis and FT-IR spectroscopy, the CSO-NP were freeze-dried at - 58 °C for 24 h (Freeze Dryer Liotop, model L101, Brazil).

2.6 Characterization of CSO-NP

2.6.1 Particle size distribution

The mean diameter ($D_{4,3}$) and span value of CSO-NP were evaluated by laser diffraction (LD, Mastersizer 2000[®] 5.61, Malvern Instruments, UK). The sample was dispersed in water and the refractive indexes used for CSM and water were 1.335 and 1.330, respectively. The results were analyzed by Mastersizer 2000[®] 5.61 software program and distribution was expressed using span value, obtained according to Eq. (1):

$$\text{Span} = (d_{0.1} - d_{0.9})/d_{0.5} \quad (1)$$

Where: $d_{0.1}$ is 10%, $d_{0.9}$ 90% and $d_{0.5}$ 50% of the nanoparticles size.

2.6.2 Zeta potential

The zeta potential of CSO-NP was determined by electrophoretic mobility (Zetasizer Nano ZS[®], Malvern, UK), using 0.1 M NaCl as the dispersant (1:40 v/v). The results were analyzed by Zetasizer 7.11 software program.

2.6.3 Viscosity

The viscosity was determined after CSO-NP preparation, in a Brookfield rotational viscometer (model DV+II Pro, spindle LV2, Brookfield Engineering, USA) at 25 °C and the results were analyzed by Brookfield Rheocalc 32 software.

2.6.4 pH

The pH of CSO-NP was determined with a pHmeter (Quimis, model Q-400A0, Brazil) at 25 °C, without prior sample dilution.

2.6.5 Gas chromatography flame ionization detector (GC-FID)

The composition and total content of chia seed oil in CSO-NP during storage were determined by GC-FID (SHIMADZU, model GC- 2010 Plus, Japan), with fused silica capillary column SLB-IL 100, Supelco[®] analytical (30 m x 0.25 mm x 0.2 μ m), automatic injector and flame ionization detector coupled. The initial column temperature was maintained at 50 °C for 3 min and increased to 240 °C at the rate of 3 °C/min. Hydrogen (20 cm/s) was the carrier gas at a flow rate of 1mL/min, split ratio 1:50 and the volume injected was 1 μ L.

To determine the total oil content, CSO was extracted from CSO-NP according to the methodology employed by Timilsena, Adhikari et al. (2016) with some modifications. Briefly, 4 N hydrochloric acid (40 mL) was added in CSO-NP and stirred in a vortex (IKA[®] vortex, model VG 3S32, Germany) for 1 min to nanoparticles disruption. Hexane (20 mL) was added and the solution was placed in vortex once more (1 min), and remained under stirring in a shaker (CERTOMAT[®] shaker, model MO II, Germany) for 4 h to facilitate extraction and oil migration to hexane. The solvent phase was separated in a separation funnel and dried in N₂.

Before injection, the CSO was saponified using a methanolic solution of NaOH 0.5 N. The methodology described by Joseph and Ackman (1992) was utilized to determine the fatty acid methyl esters (FAME) content of the oil samples. They were identified by comparison of the retention time with the FAME (FAME MIX Supelco[®] 37, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) utilized as external standard and quantified through of area normalization. 2,6-di-t-butyl-p-hydroxytoluene (BHT) was utilized as internal standard at concentration of 0.5 mg/mL. The injections were carried out in triplicate and GC solution software program performed processing and results acquisition.

2.6.6 Encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC)

Encapsulation efficiency (EE) was verified by measure the total oil nanoencapsulated and free oil in the surface of nanoparticles by GC-FID. To determine the total oil content, CSO was extracted from CSO-NP, as cited in item 2.6.5.

The free CSO content in the aqueous phase was determined by Timilsena, Adhikari et al. (2016) with modifications. First, hexane (20 mL) was added in CSO-NP and stirred in the vortex (1 min) to remove free oil to solvent phase. Thereafter, the solvent phase was separated in a separation funnel and dried in N₂. The total fatty acid methyl esters content in CSO and free CSO was quantified by GC-FID by comparison of retention time with FAME MIX as

external standard and BHT was utilized as internal standard. EE (%), and LC (%) were calculated according to Eqs. (2) and (3):

$$EE (\%) = \frac{T_f - T_{faq}}{T_f} \times 100 \quad (2)$$

Where: T_f is the fatty acid methyl esters content in CSO extracted from nanoparticles and T_{faq} is the fatty acid methyl esters content (mg/100g) of free CSO in aqueous phase.

$$LC (\%) = \frac{\text{Total amount of loaded CSO}}{\text{Mass of nanoparticles constituents}} \times 100 \quad (3)$$

2.6.7 Transmission electron microscopy (TEM)

A transmission electron microscopy (TEM) was utilized to observe the CSO-NP morphology. The samples were diluted in ultrapure water (1:10 v/v), and one drop of the dilution was placed on a grid (Formvar-carbon support films 400 mesh) for 5 min. After that, a drop of uranyl acetate (2 % w/v) was also disposed. The grid was placed on TEM (Jeol, JEM 1200 Exll, Electron Microscopy Center, UFRGS, Brazil) operated at 80 kV with magnifications of 200x and 300x.

2.6.8 Thermal properties

The thermal characteristics of CSM and CSO-NP were determined by the thermogravimetric analyzer (Shimadzu, model TGA-50, Tokyo, Japan) and by differential scanning calorimeter (Shimadzu, model DSC 60, Tokyo, Japan). TGA analysis was performed under a nitrogen atmosphere, utilizing the heating rate of 10 °C/min⁻¹, from 25 to 850 °C, and DSC with the heating rate of 10 °C/min⁻¹, at the temperature range from 25 to 400 °C.

2.6.9 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

The CSO, CSM, and CSO-NP were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) using KBr pellets in a spectrophotometer (Shimadzu, model IRPRESTIGE-21, Japan), in the transmittance mode, operating with wavenumbers between 400 – 4000 cm⁻¹, and 32 scans with a resolution of 4 cm⁻¹.

2.6.10 Accelerated stability study

The nanoencapsulated and unencapsulated oil oxidation were analyzed. For this purpose, an emulsion was prepared, dissolving Tween 80 (13.5 mg) in distilled water (20 mL) and CSO (25 mg) in ethanol (4 mL), under stirring (Fisatom, model 752A, Brazil) for 15 min. CSO solution was dripped into Tween 80 aqueous mixture during homogenization in Ultra Turrax (IKA Ultra Turrax® digital, model T25, Germany) at a speed of 8000 rpm for 15 min.

For the stability study, CSO-NP and emulsions were stored in open test tubes in a chamber (NewLab, Model NL-41-01 A, Brazil) at accelerated conditions (40 ± 1 °C), without light exposure. The particle size distribution, zeta potential, and pH of the CSO-NP were evaluated weekly during 28 days.

The oil oxidation was investigated by GC-FID in emulsions and CSO-NP also during 28 days of storage. The CSO was extracted from the formulations, as cited in section 2.6.5, and the reduction of the majorities fatty acid methyl esters in CSO was quantified through of comparison of the retention time with FAME MIX and BHT was utilized as internal standard. The results were evaluated by variance analysis (ANOVA) and Tukey's test at a significance level of 0.05 using Statistica 10.0 software (StatsoftInc, Tulsa, USA). These analyses were performed in triplicate.

3 Results and discussion

3.1 Proximate analyses of CSM

CSM was composed on a dry basis of 11.30 ± 0.04 % moisture, 10.02 ± 1.14 % ash, 4.25 ± 0.00 % protein, 0.39 ± 0.04 % lipids, 74.04 ± 0.13 % total fiber, 38.47 ± 4.82 % soluble fiber and 35.57 ± 4.82 % insoluble fiber. Avila-de la Rosa, Alvarez-Ramirez, Vernon-Carter, Carrillo-Navas and Pérez-Alonso (2015) found similar values for moisture (10.60 %) and protein (4.20 %), however, lower values for total carbohydrates (50.20 %) and ash (8.90 %), and higher lipids content (1.70 %). The protein content presents in CSM can help to upgrade its emulsifying properties (Timilsena, Wang, Adhikari, & Adhikari, 2016) and the high fiber content may increase encapsulation efficiency and nanoparticles stability due to its gelling properties (Bustamante, Oomah, Rubilar, & Shene, 2017). Differences in the proximate composition are attributed to the CSM extraction method utilized. The high ash content found in CSM can be related to the mucilage extraction conditions, where may have occurred

solubilization and removal of part of the exterior of chia seeds that contain high mineral content, which increases the ash content in CSM (Timilsena, Wang et al., 2016).

Variations in the proximate composition also may occur due to the chia seed variety used, geographical origin and growth conditions. Furthermore, these chemical differences may result in changes in physical parameters of wall material, such as viscosity and thermal properties (Bustamante et al., 2017).

3.2 Preparation and physicochemical characterization of CSO-NP

3.2.1 Preliminary tests

CSM is a heteropolysaccharide with a high molar mass at approximately 4.9×10^5 Da (Goh, Matia-Merino, Chiang, Quek, Soh, & Lentle, 2016). These characteristics were considered to choose the CSM concentration utilized in this work (0.1 % w/v), to ensure the nanoparticles formation.

The optimum pH was also selected to obtain small particle size. The synthesized nanoparticles with acidified CSM to pH 4, showed mean diameter smaller than those obtained utilizing no-acidified CSM solution with initial pH 6.8 (data not showed). The decrease in pH solution, leads to the reduction in electrostatic repulsion between the particles, reducing groups with a similar charge, which causes particle size reduction (Abdolmaleki, Mohammadifar, Mohammadi, Fadavi, & Meybodi, 2016).

Preliminary tests were carried out to verify the influence of different amounts of CSO in CSO-NP particle size distribution, to achieve an optimal formulation with monomodal distribution and diameter smaller than 1 μ m. For this purpose, three formulations with 0.5, 0.75 and 1.25 mg/mL of CSO were prepared and evaluated immediately after preparation by laser diffraction (LD).

The formulation with 0.5 mg/mL presented a bimodal distribution in particle size, as showed in Fig. 1a, indicating the presence of nanometric and micrometric particles. On the other hand, the formulations with 0.75 and 1.25 mg/mL (Fig. 1b and 1c) exhibited a monomodal distribution with a particle size ($D_{4,3}$) of 163 nm and 212 nm and span values of 1.244 and 1.734. The oil proportion influenced in nanoparticles diameter, whereas the formulation with 1.25 mg/mL showed higher mean diameter than those with 0.75 mg/mL of CSO. These results are in agreement with those reported by Lertsutthiwong, Noomun, Jongaroonngamsang, Rojsitthisak and Nimmannit (2008), who observed an increase in particle size with the addition

of high amounts of turmeric oil in alginate nanocapsules. High amounts of oil in organic phase leads to increase in the viscosity of the solution, resulting in higher nanoparticle size (Esmaeili, Rahnamoun & Sharifnia, 2013). The increase in oil concentration may have influenced the emulsion stability resulting in higher mean diameter (Tonon et al., 2011).

The formulation with 1.25 mg/mL of CSO was chosen as the optimal formulation due to the high amount of oil, still with satisfactory mean diameter and distribution characteristics.

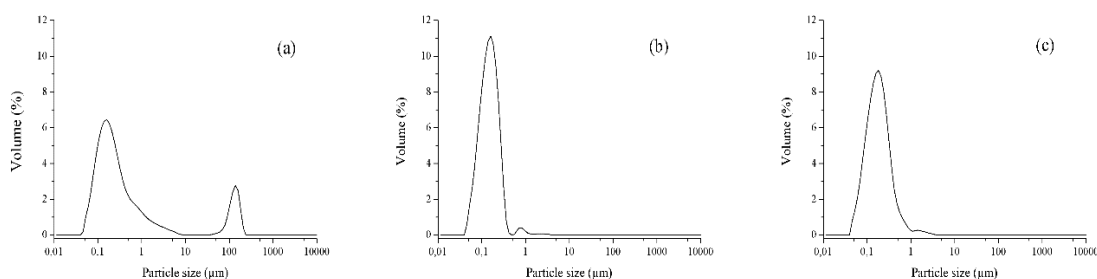


Fig 1. Nanoparticle size distribution (volume) of CSO-NP with different concentrations of CSO (a) 0.5 mg/mL (b) 0.75 mg/mL and (c) 1.25 mg/mL obtained by laser diffraction (LD).

3.2.2 Mean diameter and morphology (TEM)

The optimal formulation was evaluated immediately after preparation and presented an unimodal distribution with a mean diameter ($D_{4,3}$) of 205 ± 4.24 nm. Superior values between 223 and 339 nm were observed in essential oil nanoparticles with alginate/cashew gum as wall material (de Oliveira, Paula, & Paula, 2014), and in eicosapentaenoic acid/ docosahexaenoic acid nanoparticles constituted to sodium caseinate-gum Arabic complex, that presented diameter of 232 nm (Ilyasoglu & El, 2014). These variations in nanoparticles diameter that contain gum as wall material may be influenced by factors as type of wall material, gum concentration, stirring and emulsifier utilized, that can affect the nanoparticle size (Ghayempour & Mortazavi, 2015).

Regarding span, CSO-NP presented a value of 1.76 ± 0.09 , indicating a uniform particle size distribution. Timilsena, Adhikari et al. (2016) synthesized microcapsules of chia seed oil with chia seed mucilage and chia seed protein, and observed superior span values (4.32). Abdolmaleki et al. (2016) also found higher values than reported in this study (~ 9) for oil-in-water emulsions prepared with gum tragacanth, which indicates a wide distribution and less homogeneity.

The morphology of CSO-NP was determined by TEM, and as verified by LD, the suspension of CSO-NP presented regular distribution, small particle diameter, spherical shape, and absence of aggregation (Fig 2). This phenomenon was also observed to nanocapsules prepared using poly- ϵ -caprolactone (dos Santos et al., 2015).

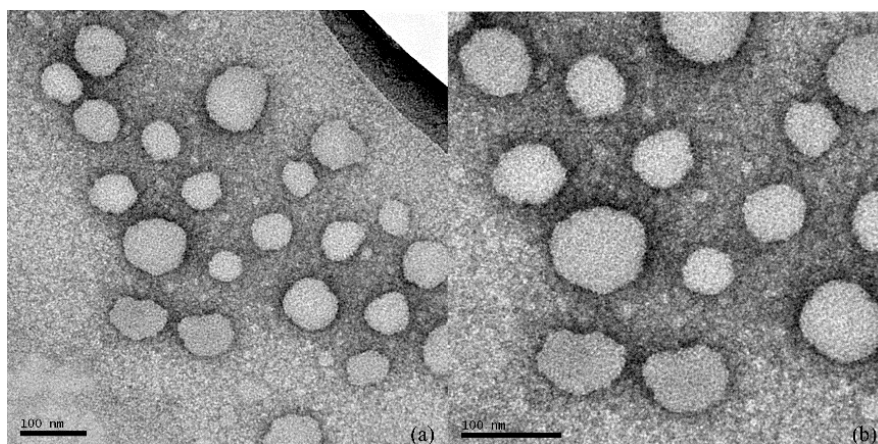


Fig 2. TEM images of CSO-NP at (a) 200 x and (b) 300 x magnifications [bar 100 nm].

The mean diameter obtained by TEM was lower than those achieved by LD, and it may occur due to microscopy provides an image of nanoparticles isolated from the medium, whereas LD allows the determination of nanoparticles mean diameter in suspension.

3.2.3 Zeta potential, pH and Viscosity

Zeta potential corresponds to particle charge and may be influenced by nanoparticles and medium compositions (Wu, Zhang, & Watanabe, 2011). In this study, the CSO-NP showed zeta potential of -11.58 ± 1.87 mV, similar to the result reported by Herculano et al. (2015) who observed zeta potential ranging between -10.45 and -24.5 mV in Eucalyptus essential oil encapsulated using cashew gum. Nanoparticles of anionic gums such as chia seed polysaccharide and cashew gum can present negative zeta potential due to the presence of carboxylic acids groups in the carboxylated form ($-\text{COO}^-$) that generate negative charge (Goh et al., 2016; Herculano et al., 2015). Moreover, the pH of medium also influences in zeta potential; and pH values less than 2 present slightly positively charged, while that above of pH 2, the magnitude of negative charge gradually increases (Timilsena, Wang et al., 2016). In this study, CSO-NP suspension showed an initial pH of 4.16 ± 0.02 , due to initial mucilage acidification.

The viscosity is an important parameter to evaluate stability, process steps, and quality control. The CSO-NP suspension showed viscosity of 3.21 ± 0.15 mPa.s at 25 °C, and the linear correlation between shear stress and shear rate indicated the typical Newtonian behavior.

Researches regarding viscosity in formulations with gums concentrations between 0.25 and 1% (w/v) exhibited non-Newtonian rheology (Abdolmaleki et al., 2016; Guiotto, Capitani, Nolasco, & Tomás, 2016) due to the larger quantity of hydrocolloid molecules in suspension that confer a pseudo-plastic behavior. Goh et al. (2016) and Timilsena, Wang et al. (2016) studied the rheology of CSM and also reported a pseudoplasticity at low concentrations, due to the presence of soft microgel particles which present sensitivity even at low shear and concentration.

Nevertheless, in this study, CSM was utilized in low concentrations to produce CSO-NP, and the interaction of a few hydrocolloid molecules in suspension with the other nanoparticle components might explain the obtained viscosity behavior. Furthermore, nanoparticles are characterized to have Newtonian behavior as described by dos Santos et al. (2015) and Lobato et al. (2013), for bixin and lycopene nanocapsules using poly- ϵ -caprolactone as wall material.

3.2.4 Encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC)

The encapsulation efficiency corresponds to the amount of oil inside the nanoparticles. High EE indicates that the oil is adequately encapsulated into the matrix, which improves the stability against oxidation during storage (Timilsena, Adhikari et al., 2016). The free oil determination in CSO-NP indicated that the EE was 82.80 %. González et al. (2016) utilized different proportions of soy protein and maltodextrin to microencapsulate chia oil and obtained lower values for EE (52.5 – 65.5 %). Timilsena, Adhikari et al. (2016) also reported lower EE values than those obtained in this study, 67.3 % in spray-dried and 57.5 % in freeze-dried chia seed oil microcapsules with chia seed mucilage as wall material. Numerous factors are crucial to determining EE, such as characteristics of the encapsulated compound, wall material composition, particle size distribution and drying conditions to microparticles (González et al., 2016).

In this study CSO-NP showed high EE, demonstrating that almost all the oil was entrapped in nanoparticles, which can enhance the oil stability against oxidation. CSM has high viscosity, even at low concentrations, which minimizes the oil circulation and oscillation inside the nanoparticles, leading to decrease in oil migration to the surface, improving the EE (Jafari,

Assadpoor, He, & Bhandari, 2008). Additionally, the high fiber content present in CSM may have contributed to increasing EE, due to the fibers ability to act as gelling agent.

The loading capacity (LC) corresponds to the final oil concentration in 100 % of the constituent's amount utilized to synthesize the nanoparticles. According to the EE results, the nanoencapsulated oil was 20.70 mg, and nanoparticles showed a LC of 35.38 %. Lower LC values (16.1 – 16.7 %) were obtained in peppermint oil encapsulated with tragacanth gum as wall material (Ghayempour et al., 2015). Lertsutthiwong et al. (2008), prepared turmeric oil nanocapsules using alginate as the wall material and also found lower LC values, varying from 0.78 to 10.38 % depending on oil/wall material ratio. The results suggest that low loading capacity is obtained when the entrapped drug have low affinity with the polymer and may diffuse from the organic phase to the external medium during nanoparticles formation. LC also depends on the encapsulation method utilized (Ghayempour, Montazer, & Mahmoudi Rad, 2016). The obtained results in this study showed a good loading capacity, which indicates the oil affinity with the wall material, and that the method was efficient to obtain CSO-NP.

3.2.5 Thermal Analysis

TGA technique is employed to evaluate the sample weight loss in function of temperature and to evaluate the thermal stability (Hosseini et al., 2013). Fig. 3a and 3b show the thermal degradation behavior and dTG (derivative of TGA curves) of CSM and CSO-NP. The weight loss was associated with three main stages for CSM and five for CSO-NP, from ambient temperature (~25 °C) to 850 °C. The first (~25–150 °C) is related to free water losses, while the other stages with the temperature range of ~ 150 – 770 °C for CSM, and ~ 150 – 790 °C for CSO-NP, are attributed to polysaccharides decomposition that composes the wall material. Water losses of 12.37 % for CSM and 4 % for CSO-NP were observed in the first stage, and total weight loss ratio arising from polysaccharide decomposition for CSM were 75.6 % and 82.4% for CSO-NP. Higher losses for CSO-NP after the first stage may be associated with degradation of other components present in the nanoparticle, such as the oil and Tween 80.

Additionally, at 850 °C, CSM and CSO-NP showed a residual mass of 2.5 % and 9.3 %, respectively, corresponding to the carbon residue, considering that the analysis was performed under inert atmosphere. TGA curves indicated that CSM and CSO-NP were thermally stable at temperatures around 300 °C and at temperatures up to 400 °C, CSO-NP were more thermally stable than CSM, however, less stable in the temperature range of 400 – 750 °C. Herculano et al. (2015), observed that eucalyptus essential oil nanoparticles containing cashew gum as wall

material showed higher stability than cashew gum up to 200 °C and lower stability above 400 °C, similar to the results obtained in this study. It may occur due to the oil present in nanoparticles, which leads to decrease in thermal stability at high temperatures.

Thermal properties obtained by DSC are shown in Fig. 3c. The endothermic peaks, owing to the free water, were identified at approximately 70 °C in CSM and 100 °C in CSO-NP. Exothermic peaks observed at ~ 236 °C in CSM and ~ 300 °C in CSO-NP are corresponding to the polysaccharide structure decomposition. Similar behavior of purified chia mucilage was observed by Timilsena, Wang et al. (2016), who detected an endothermic transition in the temperature range of 84-111 °C and exothermic peak at 244 °C and associated this event with moisture loss and polysaccharide structure degradation, respectively.

TGA and DSC analyses revealed that CSO-NP was more thermally stable than CSM up at 300 °C, and this result suggests that CSM can be utilized as wall material to produce nanoparticles with high thermal stability, conferring protection to CSO against degradation.

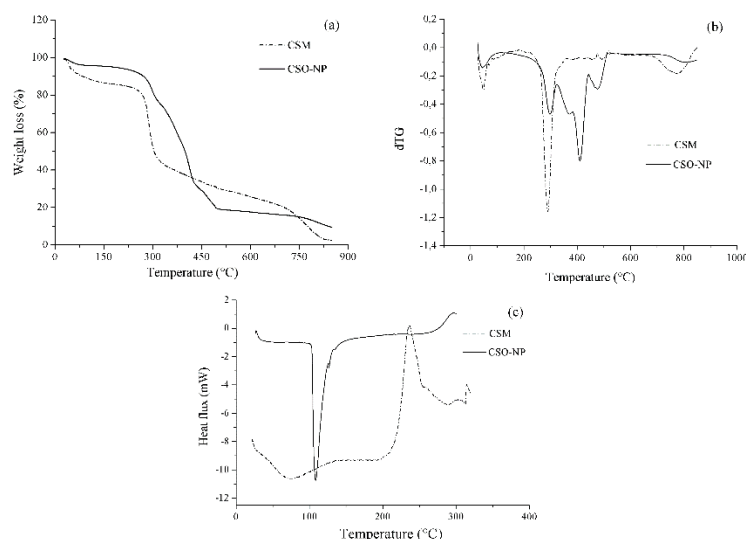


Fig 3. (a) Thermogravimetric analysis (TGA), (b) dTG and (c) Differential Scanning Calorimetry (DSC) of CSM and CSO-NP.

3.2.6 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Fig 4 shows the structural characterization of CSO, CSM, and CSO-NP provided by FT-IR spectroscopy. CSM spectra showed a broad band at approximately 3334 cm^{-1} corresponding to O-H hydroxyl group stretching, and medium bands at 2910 and 1033 cm^{-1} assigned to C-H stretching vibration of the CH_2 groups and C-O-C stretching, respectively. These bands are commonly found in polysaccharides in general (Goh et al., 2016). The band at ~1420 cm^{-1}

represents the stretching of carboxylic group of uronic acid, which are commonly found in gums and confer anionic characteristics to the macromolecule (Timilsena, Wang et al., 2016). The absorption band at $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ is assigned to mannose ring stretching, also observed for guar gum and locust bean gum (Goh et al., 2016).

The CSO spectrum revealed peaks at $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ corresponding to C-H stretching vibration (Alonso-Calderón et al., 2013) and at 2925 and 2853 cm^{-1} assigned to asymmetric and symmetric stretching vibration of C-H methyl groups (Guillen & Cabo, 1997). The bands at 1458 and 1735 cm^{-1} refer to CH_2 groups bending vibration and C=O stretching vibration, respectively (Alonso-Calderón et al., 2013; Guillén & Cabo 1997). The band at 1162 cm^{-1} can be attributed to C-O ester group stretching vibrations and at 721 cm^{-1} corresponding to CH_2 bending vibration of chains with more than seven carbon atoms (Guillén & Cabo 1997).

The CSO-NP spectra exhibited bands that appeared in CSO at the same wavenumber, however in lower intensity due to the encapsulated oil amount (25 mg) and the band at 3334 cm^{-1} that arose in CSO-NP is characteristic of CSM. The results suggest that the oil is entrapped in the nanoparticles, thus, confirming the effectiveness of nanoencapsulation method utilized in this study, as also observed by TEM. Furthermore, FT-IR spectra proved that CSM and CSO have interacted during nanoparticles formation.

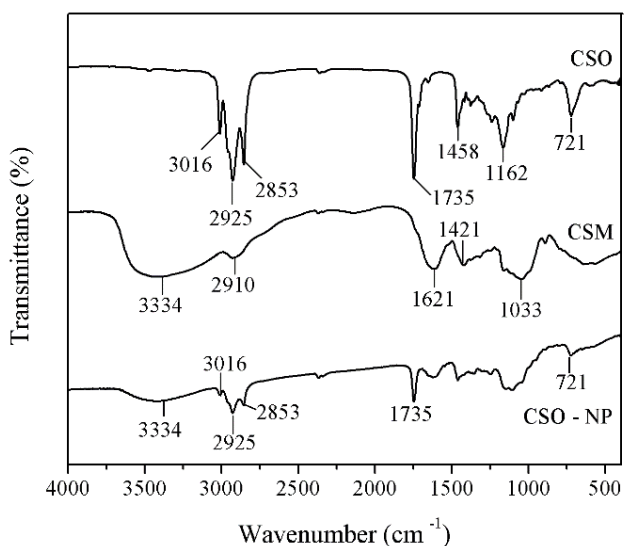


Fig 4. Fourier transform infrared (FT-IR) of chia seed oil (CSO), chia seed mucilage (CSM) and chia seed oil nanoparticles (CSO-NP).

3.3 Accelerated Stability evaluation of CSO-NP

The CSO-NP stability was analyzed under accelerated conditions at 40 °C, and parameters such as mean diameter ($D_{4,3}$), span value, zeta potential, pH, and FAME content were evaluated during 28 days of storage (Table 1).

Table 1. CSO-NP stability during 28 days of storage at 40 °C.

	Storage time (days)				
	0	7	14	21	28
Particle size (nm)	205 ± 4.24 ^b	195 ± 14.14 ^b	197.50 ± 4.95 ^b	208 ± 9.90 ^b	252 ± 7.07 ^a
Span	1.76 ± 0.09 ^a	1.65 ± 0.10 ^a	1.74 ± 0.06 ^a	1.97 ± 0.25 ^a	2.08 ± 0.09 ^a
Zeta potential (mV)	-11.58 ± 1.87 ^a	-11.30 ± 0.70 ^a	-12.53 ± 1.23 ^a	-13.63 ± 0.59 ^a	-12.53 ± 0.42 ^a
pH	4.16 ± 0.02 ^a	3.87 ± 0.02 ^b	3.82 ± 0.03 ^b	3.68 ± 0.01 ^c	3.66 ± 0.02 ^c

The results are represented as the means ± standard deviation (n=3).

Values within each line with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Diameter is an important parameter due to the ability to indicate physical stability and modify the physicochemical behavior of encapsulated compounds (dos Santos, Flôres, de Oliveira Rios, & Chisté, 2016). It was possible to observe that until 21 days of storage, the particle size remained physically stable and at 28 days the diameter increased significantly. However, despite the observed changes, evidence of coalescence or flocculation was not verified during storage time. This stability can be attributed to surfactant, in this study polysorbate 80, which prevents the formation of agglomerates (Dickinson, 2006) and this small increase in diameter may occur due to the nanoparticle structure change (Azevedo, Bourbon, Vicente, & Cerqueira, 2014). Guiotto et al. (2016) evaluated the emulsion stability containing chia mucilage and observed similar behavior to mean diameter ($D_{4,3}$) that showed stability for 30 days of storage and after this time occurred a significant increase in particle size.

Another parameter associated with particle size is span value that can indicate the uniformity of particle size distribution. In this study, no change was observed in span values during 28 days of storage, which demonstrated that CSO-NP presented homogeneity in

granulometric profile of suspension. Similar behavior was reported by Lobato et al. 2013, who nanoencapsulated bixin with poly- ϵ -caprolactone as wall material. However, no have studies regarding span values to nanoparticles with CSM.

The particle size stability also may be associated with zeta potential that presented negative values without significative differences during storage time. The presence of polysorbate 80 in suspension, which corresponds to nonionic amphiphilic stabilizers, also can block aggregation for longer periods of storage by steric stabilization (Wu et al., 2011) and, thus, promote the nanoparticles stability.

In regarding pH, CSO-NP presented changes during storage time, and it was possible to observe that after 28 days, the pH value was lower than the initial value. This reduction may be associated with ionization or dissociation of carboxylic acids groups present on the polymer that are positioned in the particle/water interface (Schaffazick, Guterres, Freitas, & Pohlmann, 2003).

The nanoencapsulation can be utilized to protect the oil against oxidation and reduce the effects of light, heat and oxygen. The corresponding results to the accelerated oxidation at 40 °C of CSO-NP and the control (emulsion), are shown in Table 2.

Table 2. Fatty acid stability (mg/100g) of chia seed oil nanoparticles (CSO-NP) and emulsion containing chia seed oil during 28 days of storage at 40 °C under dark conditions.

Storage time (days)	CSO-NP	Emulsion
Palmitic acid (C16:0)		
0	2.36 ± 0.16 ^{aB}	3.12 ± 0.03 ^{aA}
7	2.82 ± 0.62 ^{aA}	1.84 ± 0.50 ^{bcA}
14	1.72 ± 0.10 ^{bA}	1.45 ± 0.26 ^{bcA}
21	1.98 ± 0.16 ^{bA}	1.71 ± 0.04 ^{bbB}
28	1.46 ± 0.02 ^{cA}	1.38 ± 0.07 ^{cA}
Stearic acid (C18:0)		
0	1.17 ± 0.03 ^{aA}	0.97 ± 0.02 ^{aB}
7	0.79 ± 0.04 ^{bA}	0.61 ± 0.15 ^{bcA}
14	0.58 ± 0.01 ^{cA}	0.58 ± 0.05 ^{bA}
21	0.69 ± 0.02 ^{dA}	0.60 ± 0.04 ^{bbB}
28	0.48 ± 0.03 ^{eA}	0.49 ± 0.03 ^{cA}
Oleic acid (C18:1n9c)		
0	7.75 ± 0.30 ^{aA}	6.62 ± 0.06 ^{aB}
7	5.14 ± 0.38 ^{bA}	3.52 ± 0.09 ^{bbB}
14	3.76 ± 0.32 ^{cA}	3.18 ± 0.14 ^{cB}
21	2.42 ± 0.06 ^{dA}	2.50 ± 0.11 ^{dA}
28	1.74 ± 0.08 ^{eA}	2.28 ± 0.22 ^{dB}
Linoleic acid (C18:2n6c)		
0	7.43 ± 0.89 ^{aA}	6.70 ± 0.09 ^{aA}
7	2.49 ± 0.09 ^{bA}	0.95 ± 0.06 ^{bbB}
14	0.28 ± 0.03 ^{cA}	0.15 ± 0.02 ^{cB}
21	0.05 ± 0.00 ^{dA}	0 ^{dB}
28	0.05 ± 0.02 ^{dA}	0 ^{dB}
Linolenic acid (C18:3n3)		
0	19.30 ± 3.90 ^{aA}	19.37 ± 0.71 ^{aA}
7	3.16 ± 0.06 ^{bA}	0.59 ± 0.05 ^{bbB}
14	0.26 ± 0.07 ^{cA}	0.09 ± 0.03 ^{cB}
21	0.08 ± 0.00 ^{dA}	0 ^{dB}
28	0 ^{eA}	0 ^{dA}

The results are represented as the means ± standard deviation (n=3).

Values within each line with the same uppercase letter and values within each column with the same lowercase are not significantly different ($p > 0.05$).

The major fatty acids found in CSO were the saturated fatty acids such as palmitic acid, stearic acid and unsaturated fatty acids such as oleic acid, linoleic acid, and linolenic acid. This fatty acid profile was similar to those found by Marineli et al. (2014).

During storage, the FAME content in both formulations decreased significantly after 28 days of storage. However, the FAME reduction in nanoparticles was smaller than in emulsions, indicating that the CSM provided protection against oil oxidation. The results showed that the saturated fatty acids (palmitic acid and stearic acid) stability was independent of the wall material presence and the protection exerted by the polysaccharide was most significant in the unsaturated fatty acids, mainly to linoleic and linolenic acid. The pH of CSM may have contributed to oil oxidation stability, due to the relation between low pH and decrease in lipid oxidation rate that can facilitate the transfer of lipid radicals formed during oxidation (Kim, Yi, Lee, Gim, Kim, & Lee, 2016).

Escalona-García, Pedroza-Islas, Natividad, Rodríguez-Huezo, Carrillo-Navas and Pérez-Alonso (2016) also evaluated the oxidation of chia oil microencapsulated in a whey protein matrix, stored at 40 °C under dark conditions and after approximately 8 days, 50 % of total chia oil content was oxidized, similar to the result reported in this study. Chia seed oil microcapsules with chia seed protein isolate as wall material were evaluated regarding stability under 40 °C, and an increase in the oil oxidative stability during storage was observed (Timilsena, Adhikari et al., 2016). However, there are not studies for oxidative stability evaluation by GC-FID for CSO encapsulated.

4 Conclusion

Chia seed oil nanoparticles (CSO-NP) were synthesized to evaluate the protective capacity of the chia seed mucilage as wall material. CSO-NP exhibited physical stability during storage at accelerated conditions and high thermal stability. The nanoparticles were successfully obtained, as confirmed by high encapsulation efficiency and loading capacity achieved, and by FT-IR, through the appearance of characteristic bands of chia seed oil in CSO-NP. The obtained results demonstrated that CSO nanoencapsulation utilizing CSM as wall material improved the oil oxidative stability during storage at accelerated conditions during 28 days, suggesting that CSM can be used as wall material for bioactive oils nanoencapsulation for application in the food area, as a promising alternative to substitute synthetic polymers.

Further studies are required to observe the release behavior of CSO-NP and stability properties in different processing conditions, to choose the best application for the nanoparticles.

Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the financial support. The authors are also thankful to the Electronic Microscopy Center of UFRGS, for the assistance in the use of TEM.

5 References

- Abdolmaleki, K., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, R., Fadavi, G., & Meybodi, N. M. (2016). The effect of pH and salt on the stability and physicochemical properties of oil-in-water emulsions prepared with gum tragacanth. *Carbohydrate Polymers*, *140*, 342-348.
- Alonso-Calderón, A., Chávez-Bravo, E., Rivera, A., Montalvo-Paquini, C., Arroyo-Tapia, R., Monterrosas-Santamaria, M., Jiménez-Salgado, T., & Tapia-Hernández, A. (2013). Characterization of black chia seed (*Salvia hispanica* L) and oil and quantification of β -sitosterol. *International Research Journal of Biological Sciences*, *2*(1), 70-72.
- AOAC. (2005). Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis (16th ed.). Washington, D.C.
- Avila-de la Rosa, G., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J., Carrillo-Navas, H., & Pérez-Alonso, C. (2015). Viscoelasticity of chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage dispersion in the vicinity of an oil-water interface. *Food Hydrocolloids*, *49*, 200-207.
- Azevedo, M. A., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2014). Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules*, *71*, 141-146.
- Bustamante, M., Oomah, B. D., Rubilar, M., & Shene, C. (2017). Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chemistry*, *216*, 97-105.

- Calvo, P., Castaño, A.L., Hernández, M.T., González-Gómez, D. (2011). Effect of microcapsule constitution on the quality of microencapsulated walnut oil. *European Journal Lipid Science and Technology*, 113, 1273-1280.
- de Oliveira, E. F., Paula, H. C. B., & Paula, R. C. M. d. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 146-151.
- Dick, M., Costa, T. M. H., Gomaa, A., Subirade, M., Rios, A. d. O., & Flôres, S. H. (2015). Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 130, 198-205.
- Dickinson, E. (2006). Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 2nd edition, Julian McClements. CRC Press, Boca Raton, FL (2005). *Food Hydrocolloids*, 20(1), 137.
- dos Santos, P. P., Flôres, S. H., de Oliveira Rios, A., & Chisté, R. C. (2016). Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends in Food Science & Technology*, 53, 23-33.
- dos Santos, P. P., Paese, K., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., Costa, T. H., Jablonski, A., Flôres, S. H., & Rios, A. d. O. (2015). Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2), 1-11.
- Escalona-García, L. A., Pedroza-Islas, R., Natividad, R., Rodríguez-Huezo, M. E., Carrillo-Navas, H., & Pérez-Alonso, C. (2016). Oxidation kinetics and thermodynamic analysis of chia oil microencapsulated in a whey protein concentrate-polysaccharide matrix. *Journal of Food Engineering*, 175, 93-103.
- Esmaili, A., Rahnamoun, S., Sharifnia, F. (2013). Effect of O/W process parameters on *Crataegus azarolus* L nanocapsule properties. *Journal of Nanobiotechnology* 11:16.
- Ghayempour, S., Montazer, M., & Mahmoudi Rad, M. (2015). Tragacanth gum as a natural polymeric wall for producing antimicrobial nanocapsules loaded with plant extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 514-520.
- Ghayempour, S., Montazer, M., & Mahmoudi Rad, M. (2016). Encapsulation of Aloe Vera extract into natural Tragacanth Gum as a novel green wound healing product. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, Part A, 344-349.

- Ghayempour, S., & Mortazavi, S. M. (2015). Preparation and investigation of sodium alginate nanocapsules by different microemulsification devices. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(17), n/a-n/a.
- Goh, K. K. T., Matia-Merino, L., Chiang, J. H., Quek, R., Soh, S. J. B., & Lentle, R. G. (2016). The physico-chemical properties of chia seed polysaccharide and its microgel dispersion rheology. *Carbohydrate Polymers*, 149, 297-307.
- González, A., Martínez, M. L., Paredes, A. J., León, A. E., & Ribotta, P. D. (2016). Study of the preparation process and variation of wall components in chia (*Salvia hispanica* L.) oil microencapsulation. *Powder Technology*, 301, 868-875.
- Guillen, M. D., & Cabo, N. (1997). Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), 1-11.
- Guiotto, E. N., Capitani, M. I., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2016). Stability of Oil-in-Water Emulsions with Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and Chia (*Salvia hispanica* L.) By-Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(1), 133-143.
- Herculano, E. D., de Paula, H. C. B., de Figueiredo, E. A. T., Dias, F. G. B., & Pereira, V. d. A. (2015). Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated Eucalyptus staigeriana essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 484-491.
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 50-56.
- Ilyasoglu, H., & El, S. N. (2014). Nanoencapsulation of EPA/DHA with sodium caseinate–gum arabic complex and its usage in the enrichment of fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 461-468.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. *Drying Technology*, 26(7), 816-835.
- Joseph, J. D., & Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75(3), 488-506.
- Kim, J. Y., Yi, B., Lee, C., Gim, S.-Y., Kim, M.-J., & Lee, J. (2016). Effects of pH on the rates of lipid oxidation in oil–water system. *Applied Biological Chemistry*, 59(2), 157-161.

- Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P., & Nimmannit, U. (2008). Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 209-214.
- Lobato, K. B. d. S., Paese, K., Forgearini, J. C., Guterres, S. S., Jablonski, A., & Rios, A. d. O. (2013). Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chemistry*, 141(4), 3906-3912.
- Marineli, R. d. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2, Part 2), 1304-1310.
- Martínez, M. L., Curti, M. I., Rocchia, P., Llabot, J. M., Penci, M. C., Bodoira, R. M., & Ribotta, P. D. (2015). Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology*, 270, Part A, 271-277.
- Mañas, E., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1994). Sources of error in dietary fibre analysis. *Food Chemistry*, 50(4), 331-342.
- Mirhosseini, H., & Amid, B. T. (2012). A review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums. *Food Research International*, 46(1), 387-398.
- Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., & Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., & Randeria, N. P. (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1685-1699.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 102-109.
- Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. d. L., & Pohlmann, A. R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26, 726-737.

- Segura-Campos, M. R., Ciau-Sol, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2014). Chemical and Functional Properties of Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Gum. *International Journal of Food Science*, 2014, 5.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016). Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 347-357.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2016). Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 52, 554-563.
- Tonon, R., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*, 44(1), 282-289.
- Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 456-469.

CAPÍTULO 4 – ARTIGO 2

*Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: characterization and stability evaluation under different temperatures*

Artigo publicado na revista ‘Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects’

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.009>

Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: characterization and stability evaluation under different temperatures

Camila de Campo, Melina Dick, Priscilla Pereira dos Santos, Tania Maria Haas Costa, Karina Paese, Silvia Stanisçuaski Guterres, Alessandro de Oliveira Rios, Simone Hickmann Flôres

Abstract

The use of cactus cladode mucilage (*Opuntia monacantha*) was exploited as a new natural structuring material to zeaxanthin nanoencapsulation. The zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP) were characterized regarding particle size distribution, span value, zeta potential, pH, viscosity, color, morphology, thermal properties, encapsulation efficiency and FTIR spectroscopy after preparation. A nanoemulsion (Zea-NE) was developed and evaluated to compare the physicochemical properties and stability with the nanoencapsulated zeaxanthin. The stability of nanoencapsulated and unencapsulated zeaxanthin was evaluated during 28 days of storage at 4, 25 and 40 °C regarding particle size, span value, pH, color, and zeaxanthin retention (%). Zea-NP presented a mean diameter of 184 ± 3.54 nm and homogeneous distribution, the zeta potential of -14.8 ± 0.42 mV and encapsulation efficiency of 96.57 %. Zea-NP showed spherical shape, and the thermal analyses indicated that the nanoparticles were more stable than the nanoemulsion. After 28 days of storage at 25 °C and 40 °C, the zeaxanthin retention in Zea-NP was higher than in Zea-NE. The obtained results support that cactus cladode mucilage protected zeaxanthin from degradation and have potential to be used as structuring material in nanoencapsulation.

Keywords: Nanoparticles; cactus cladode mucilage; carotenoids; nanoencapsulation; Goji berry.

1 Introduction

Carotenoids are lipid-soluble compounds naturally present in fruits and vegetables, and the intake of a diet rich in these compounds can reduce the risk of incidence of some types of cancer, cardiovascular and age-related diseases. In this regard, the most studied carotenoids are beta-carotene, lycopene, lutein, and zeaxanthin [1]. Zeaxanthin is a xanthophyll carotenoid and lutein isomer characterized by its yellow color. Furthermore, plays an important role in the prevention of eye diseases, such as macular degeneration. Moreover, zeaxanthin may offer

higher protection against oxidative damage in the lipid matrix caused by UV radiation in macular membrane due to its fully conjugated structure [2].

The main dietary sources of zeaxanthin are yellow corn, orange pepper, mango and egg yolk [2]. Parry et al. [3] also found zeaxanthin as major carotenoid in red raspberry and blueberry seed oils. Goji berry (*Lycium spp.*) have been studied as a good source of zeaxanthin [4-6] and in recent years, the consumption of dried goji berries increased due to its positive role in human health, related to its antioxidant properties due to the presence of polyphenols and carotenoids [6]. Goji berry has been utilized to obtain phenolic compounds that can be used in the development of drugs, cosmetics, and some foods. Also, bioactive compounds from this fruit can be utilized to substitute synthetic antioxidants to prevent oxidative deterioration [7].

However, many bioactive compounds, such as zeaxanthin, are lipophilic and have low solubility in water, which limits its application in food. In addition, the stability of these compounds is affected by exposure to light, oxygen, and temperature [8], factors that may contribute to its isomerization and oxidation. Thus, new technologies are needed to improve its solubility and stability. In this field, nanoencapsulation is a technology that comprises the development of particles in nano-scale, where the compound is solubilized in a lipid-core or dispersed in the wall material and entrapped into biodegradable particles. This technique allows the solubilization of bioactive compounds in water-soluble foods, and confer protection against chemical degradation and thermal oxidation [9]. Dos Santos et al. [10] and Brum et al. [11] utilized poly- ϵ -caprolactone (PCL) to nanoencapsulate lycopene and lutein, respectively, and reported that the method used contributed to increased compound stability and solubility in aqueous media.

A variety of materials such as synthetic polymers, proteins, and polysaccharides can be used to prepare nanoparticles for drug delivery [9]. The material used to encapsulate must be food-grade, biodegradable, and able to form a barrier between the core and its surroundings [12]. Moreover, the consumers demand healthy and natural products, boosted the use of natural polymers, such gums and mucilages, which have been utilized in the food sector as thickeners, gelling and foaming agents, emulsifiers and stabilizers [13]. For nanoencapsulation purposes, the use of gums and mucilages as wall materials have been explored [14-16] and its effectiveness in protecting the encapsulated compounds was proven.

Mucilages are plant-based materials, water-soluble polysaccharides in the majority, and constitute an interesting material for use in nanoencapsulation since they are edible, biodegradable and easily found in nature [12]. Furthermore, they are non-toxic and have a low

cost [17]. Also, polysaccharides from plants, such as mucilages, are a promising source to be used in food industry, and many of them, like those obtained from the Cactaceae family, have been utilized to modify rheological properties of products [18].

Opuntia monacantha belongs to the *Opuntia* species, is cultivated in the southern coastal region of Brazil [19], and represents a good source to obtain mucilage. Mucilages obtained from *Opuntia* genus were utilized to microencapsulate bioactive compounds [20, 21]. However, there are no reports about the use of mucilages obtained from the *Opuntia* ssp. in nanoencapsulation.

In an attempt to find a new substitute to synthetic polymers in nanoencapsulation and considering the importance of zeaxanthin to human health, and the increase of solubility and stability that can be achieved through nanoencapsulation, the objective of this study was explore the use of cactus mucilage obtained from *Opuntia monacantha* as a new natural polymer to zeaxanthin encapsulation. Furthermore, physicochemical properties and stability under different temperatures of the encapsulated and unencapsulated zeaxanthin were evaluated.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Cactus mucilage (CM) was extracted from cactus cladode, coming from Águas Claras, Viamão city, Rio Grande do Sul, Brazil, and zeaxanthin from Goji berry fruit obtained in a local market (Porto Alegre, Brazil). Tween 80[®] was provided by Dinamica (São Paulo, Brazil) and ethanol by Êxodo (São Paulo, Brazil). All the other reagents were of analytical grade.

2.2 Cactus mucilage extraction

The cactus mucilage (CM) was obtained from cactus cladodes, which were cut and crushed in a food processor (Philips Walita[®], model RI7762/91, Brazil). The obtained cactus pulp was blended with water 1:2 w/v (pulp: water), mechanically stirred, and heated at 80 °C for 30 min, filtered to remove fragments and centrifuged (10000 g, 20 min, 20 °C) (Hitachi, model CR 21GIII, Japan). The supernatant was precipitated with ethanol 95 % and kept overnight in a refrigerator at 4 °C. After precipitation, the mucilage was recovered by vacuum filtration, washed 2 times with ethanol 95 % and dried at 45 °C for approximately 16 h in an oven with air-flow circulation (DeLeo, model B4AFD, Brazil). The mucilage powder was obtained by grounding the dry material in a mortar and sieved through a 60 mesh screen and stored protected from light and humidity until the use. The CM was composed of 9.65 ± 0.38 % moisture,

15.14 ± 0.14 % ash, 3.55 ± 0.08 % protein, 1.19 ± 0.06 % lipids, 3.47 ± 0.08 % insoluble fiber, 55.33 % soluble fiber, and 80.12 % total carbohydrate, in dry basis, except for moisture.

2.3 Obtention of CM solution

The dried CM was dispersed in distilled water (0.1 % w/v) during agitation in a mechanical stirrer (Edutec, EEQ9008A-2, Curitiba, Brazil) for 2 h at room temperature (25 °C). The CM was kept overnight in a refrigerator to insure the full hydration, and the pH was subsequently adjusted to 4 with acetic acid 1N.

2.4 Zeaxanthin extraction and purity determination

The zeaxanthin extract was obtained using carotenoids extraction method described by Mercadante & Rodriguez-Amaya [22]. The Goji berry fruit was selected as zeaxanthin source due to the high concentration of this compound [6]. Cold acetone was added to Goji berry fruits (1 g), and the zeaxanthin was extracted using an Ultra-Turrax[®] (IKA, model T25, Germany). The extract was transferred to diethyl ether/petroleum ether, and after several steps of washing, it was submitted to overnight saponification with 10 % KOH in methanol. The saponified extract was washed with distilled water, concentrated in a rotary evaporator (Fisatom, model 801/802, São Paulo, Brazil) with thermostatic bath at 35 °C, and stored at – 22 °C until the use. The purity determination of the extract was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

2.5 Determination of zeaxanthin extract concentration

The zeaxanthin concentration was determined by dissolution of the extract in ethanol (5 mL). This solution was maintained in an ultrasound (Unique, model USC 1400A, São Paulo, Brazil) for 5 minutes to solubilization and was centrifugated (3000 x g, 10 min, 20 °C) (Sigma, Model 4 K15, Osterode am Harz, Germany) to remove remaining particles. After that, an aliquot of the extract (50 µL) was diluted in 5 mL of ethanol, and the absorbance was measured in a spectrophotometer (Shimadzu, model UV-1800, Kyoto, Japan) at 450 nm.

2.6 Experimental design to nanoparticles obtention

Eleven experiments were developed using a central composite design with three central and four axial points [23], to evaluate the effect of chia seed oil (CSO) amount and CM concentration on nanoparticles mean diameter. The eleven nanoparticles formulations tested are shown in Table 1. A second order equation Eq. (1) was utilized to fit the system behavior.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 CM + \beta_2 CO + \beta_{11} CM^2 + \beta_{22} CO^2 + \beta_{12} CMCO \quad \text{Eq. (1)}$$

Where: Y_i is the dependent variable, β_n are the constant regression coefficients, and CM and CO are the coded levels of independent variables.

Table 1. Coded levels for independent variables in 2^2 full-factorial design.

Independent variables	Coded level				
	-1.41	-1	0	1	1.41
CM (%)	0.1	0.2	0.55	0.9	1
CSO (mg)	20	26	40	54	60

CM: cactus cladode mucilage (%); CSO: chia seed oil (mg).

All the formulations were evaluated regarding particle size by laser diffraction, immediately after preparation, and the optimal formulation with high oil content and small mean diameter were chosen.

2.7 Preparation of zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP)

The Zea-NP were produced by the method described by de Campo et al. [14] with some modifications. The zeaxanthin concentration was defined in preliminary tests, which were performed to evaluate its effect on nanoparticles mean diameter. The Tween 80[®] (13.5 mg), CSO (40 mg) and zeaxanthin 94 % pure (10, 20, 30 or 30 $\mu\text{g/mL}$) were dissolved in ethanol (4 mL) under stirring in a magnetic stirrer (Fisatom, model 752A, Brazil) for 15 min. The organic phase was injected dropwise into 20 mL of CM aqueous solution (0.1 % w/v) under homogenization in Ultra Turrax (IKA Ultra Turrax[®] digital, model T25, Germany) at 8000 rpm for 15 min. These formulations were evaluated regarding particle size immediately after preparation, and the optimal formulation was denominated Zea-NP and was subjected to high-

pressure homogenization (Avestin, model EmulsiFlex-C3[®], Canada) for 3 cycles at 500 bar to obtain a more homogeneous particle distribution.

Zeaxanthin nanoemulsion (Zea-NE) containing Tween 80[®] (13.5 mg), CSO (40 mg) and zeaxanthin (30 µg/mL) was also prepared using the same method, for comparative purposes.

2.8 Characterization of Zea-NP and Zea-NE

Zea-NP and Zea-NE were evaluated in suspension regarding particle size distribution, span value, zeta potential, pH, viscosity, color, transmission electron microscopy, and stability under different temperatures. The encapsulation efficiency of Zea-NP was also evaluated. For thermal analysis and FT-IR spectroscopy determination, the samples were freeze-dried (Freeze Dryer Liotop, model L101, Brazil) at -58 °C for 24 h.

2.8.1 Particle size distribution and span value

Laser diffraction (LD, Mastersizer 2000[®], Malvern Instruments, UK) was utilized to provide information about mean diameter ($D_{4,3}$) and span value of Zea-NP and Zea-NE. Distilled water was used as a dispersant, and the refractive indexes utilized for CM and water were 1.335 and 1.330, respectively. The data were analyzed by Mastersizer 2000[®] 5.61 software program, and span value was obtained by dividing the difference between $d_{0.9}$ and $d_{0.1}$ by $d_{0.5}$, where $d_{0.9}$, $d_{0.1}$, and $d_{0.5}$ are the diameters at 10 %, 90 %, and 50 % cumulative volumes, respectively.

2.8.2 Zeta potential and pH

The zeta potential of Zea-NP and Zea-NE was determined through of electrophoretic mobility (Zetasizer Nano ZS[®], Malvern, UK), and 0.1 M NaCl was utilized as a dispersant (1:40 v/v). The results were analyzed by the Zetasizer 7.11 software program.

The pH of Zea-NP and Zea-NE suspension was measured using a pHmeter (Hanna instruments, model HI 2221, EUA) at 25 °C, previously calibrated.

2.8.3 Viscosity

The viscosity of CM, Zea-NP, and Zea-NE was measured in a rheometer (Thermo Scientific, model HAAKE Mars III, Massachusetts, EUA) with a shear rate ranging from 10.1 to 800 s⁻¹ and a temperature control bath (Thermo Scientific, model HAAKE A10,

Massachusetts, EUA) at 25 °C. The results were analyzed by HAAKE RheoWin Software 4.75.0000.

2.8.4 Colorimetric analysis

The color of Zea-NP, Zea-NE, and free zeaxanthin were determined with a portable colorimeter (Konica Minolta®, model CR-400, Singapore) according to the parameters of the Commission Internationale de l'Eclairage (CIELAB system), operating with D₆₅ (daylight). The parameters L* (luminosity), a* (green-red intensity) and b* (blue-yellow intensity) were evaluated. The free zeaxanthin was solubilized in ethanol in the same zeaxanthin concentration utilized to the nanoparticles obtention (30 µg/mL).

2.8.5 Morphology

The morphology of Zea-NP and Zea-NE were observed in a transmission electron microscopy (TEM) (Jeol, model JEM 1200 ExII, Electron Microscopy Center, UFRGS, Brazil) operated at 80 kV with a magnification of 200x. The nanoparticles and nanoemulsion were diluted in ultrapure water (1:10 v/v), and one drop of the dilution was deposited on a grid (Formvar-carbon support films 400 mesh). Uranyl acetate (2 % w/v) was utilized as negatively standard, and the samples were maintained in a vacuum desiccator until the microscopic evaluation.

2.8.6 Thermal properties

The thermal stability of CM, Zea-NP and Zea-NE was evaluated by thermogravimetric analysis (TGA) in a PerkinElmer, model Pyris 1 TGA, Massachusetts, EUA, under a nitrogen atmosphere, utilizing the heating rate of 10 °C/min⁻¹ from 25 to 850 °C. The samples were introduced in aluminum pans, weighed and TGA curves were normalized based on starting weight.

2.8.7 High-performance Liquid Chromatography

The purity of zeaxanthin extract, encapsulation efficiency and zeaxanthin retention in Zea-NP and Zea-NE were determined by HPLC (Agilent series 1100, Santa Clara, CA, USA). The instrument was equipped with an online degasser, quaternary pump and automatic injector coupled to a C30 polymeric column YCM (specification 250 × 4.6mm, 3 µm particle size) at

room temperature. The isocratic elution at a flow rate of 1 mL/min consisted of methanol/methyl tertbutyl ether (v/v) in a proportion of 50:50 for 5 min. The chromatograms were processed at the absorption wavelength of zeaxanthin (450 nm), and the injections were performed in triplicate. Data acquisition and processing were performed using the ChemStation® software program. The zeaxanthin was quantified through a calibration curve with coefficient R² greater than 0.99. The obtained samples were filtered before injection (0.45 µm, Millex with modified PTFE membrane for aqueous and organic solvents, Millipore, Barueri, SP, Brazil). All solvents used were of chromatographic grade and were filtered through a Millipore vacuum filtration system 0.22 µm membrane for organic solvents (Millipore, Barueri, SP, Brazil).

2.9 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

The CSO, CM, and Zea-NP were characterized according to its chemical structure by Fourier transform infrared spectroscopy (FT- IR), using KBr pellets in a spectrophotometer (Shimadzu, model IRPRESTIGE-21, Japan), in the transmittance mode, with wavenumbers in the range 400 – 4000 cm⁻¹. FT-IR spectra were determined at a resolution of 4 cm⁻¹ and given as the ratio of 32 scans.

2.10 Encapsulation efficiency of Zea-NP

The encapsulation efficiency of Zea-NP was evaluated by the ultrafiltration/centrifugation technique (Ultrafree Microcon 10,000 MW, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The free zeaxanthin content was determined in HPLC, through of injection of the obtained filtrate after ultrafiltration/centrifugation (1690 x g, 15 min) (Hexis, model Mini Spin, São Paulo, Brazil) of an aliquot of Zea-NP in suspension (500 µL). The encapsulation efficiency was calculated according to Eq. (2) [24].

$$EE (\%) = \frac{C_t - C_f}{C_t} \times 100 \text{ Eq. (2)}$$

Where C_t is the total concentration of zeaxanthin in the formulation and C_f is the concentration of zeaxanthin in the aqueous phase of Zea-NP.

2.11 Determination of Zea-NP and Zea-NE stability

To evaluate the stability of Zea-NP and Zea-NE, the formulations were stored in amber flasks under refrigeration (4 °C), room temperature (25 °C) and accelerated conditions (40 °C) without light exposure. The chemical stability was evaluated through measurements of pH, color and zeaxanthin retention (%) in the formulations; and physical stability through mean diameter, and span value evaluated weekly for 28 days. To determine zeaxanthin retention during storage, zeaxanthin was extracted from an aliquot (500 µL) of nanoparticles and nanoemulsion with 2.5 mL of acetonitrile, homogenized by ultrasonication (30 min), dried in N₂ and resuspended in 1mL of methyl tertbutyl ether (MTBE).

2.12 Statistical analysis

The data were analyzed by one-way analysis of variance, and the mean values by Tukey's test using STATISTICA® 10.0 software. The graphics were plotted utilizing ORIGIN® 8.0.

3 Results and discussion

3.1 Zeaxanthin extract and purity determination

The zeaxanthin extract from Goji berry fruit presented a purity of 94.75 ± 1.29 %. A similar result was reported by Chen, Li, Wong, Ji & Jiang [25], who isolated and purified zeaxanthin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and obtained 96.2 % of purity. Guerra-Santos & Greenbury [26] developed a method to produce zeaxanthin and separate from the liquid broth by centrifugation, obtaining purity ranging from about 75 % to 90 %.

The other carotenoids present in the extract were lutein and β -cryptoxanthin, corresponding to 0.65 ± 0.28 % and 4.58 ± 0.02 %, respectively.

3.2 Experimental design

Table 2 shows the responses of the central composite design, and the effect that independent variables (CM and CSO) caused on mean diameter is illustrated in the response graph (Fig.1).

Table 2. Full-factorial design 2^2 and the response for the dependent variable mean diameter.

Experiment	Coded level		Independent variables			
			Actual level	CM	CSO	Mean diameter (nm)
1	-1	-1	0.2	26	250	
2	-1	1	0.2	54	609	
3	1	-1	0.9	26	600	
4	1	1	0.9	54	957	
5	0	0	0.55	40	790	
6	0	0	0.55	40	688	
7	0	0	0.55	40	681	
8	-1.41	0	0.1	40	297	
9	1.41	0	1	40	953	
10	0	-1.41	0.55	20	415	
11	0	1.41	0.55	60	978	

CM: cactus cladode mucilage (%); CSO: chia seed oil (mg).

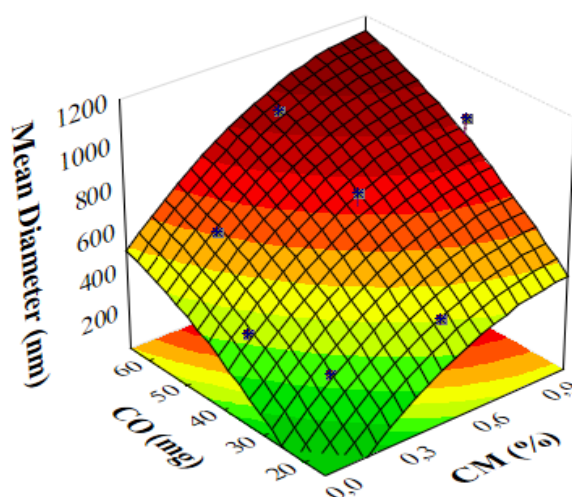


Fig. 1. Response surface for mean diameter (nm) as a function of CM (%) and CO (mg).

The regression coefficients and their corresponding p -value are shown in Table 3. The analysis of variance (ANOVA) at 95 % confidence revealed that mean diameter showed

$F_{\text{Regression}}$ calculated value (29.53) higher than $F_{\text{Regression}}$ tabulated value (5.05), and $F_{\text{lackoffit}}$ calculated value (1.20) lower than $F_{\text{lackoffit}}$ tabulated value (19.16), and presented R^2 of 0.96, which means that the independent variables influenced in mean diameter, and the model was able to explain the quadratic data behavior.

Table 3. Regression coefficients for mean diameter.

	β_0	β_1	β_{11}	β_2	β_{22}	β_{12}
Cf	719.67	197.73	-55.70	189.02	-27.70	-0.50
pv	< 0.05	< 0.05	0.16	<0.05	0.39	0.98

Cf: regression coefficient; pv: p value; β_0 : constant; β_1 : cactus mucilage (linear); β_{11} : cactus mucilage (quadratic); β_2 : chia seed oil (linear); β_{22} : cactus mucilage (quadratic); β_{12} : interaction between cactus mucilage and chia seed oil.

As can be observed, mean diameter increased with higher CM and CSO concentrations. Tonon, Grosso, & Hubinger [27] also observed an increase in mean diameter in flaxseed oil microcapsules with gum arabic as wall material with higher oil concentration. The emulsion viscosity increases with high oil concentration, and it can interfere in the stability, resulting in larger particle size. Similar findings were reported by Hosseini, Zandi, Rezaei, & Farahmandghavi [28], who related an increase in particle size in the presence of high oil amount in oregano essential oil nanoparticles with chitosan as wall material. Also, mucilages from the Cactaceae family, like CM, are polysaccharides with high molecular weight [18] and the increase in mucilage concentration, result in higher viscosity, leading to an increase in nanoparticles mean diameter.

A decrease in particle size was observed in formulation 1 (containing 26 mg of CSO) when compared with formulation 8 (containing 40 mg of CSO). Considering that zeaxanthin is a lipophilic compound, a high oil concentration in nanoparticles core can facilitate its solubilization, and for this reason, the experiment 8 was chosen as the optimal formulation due to the higher oil amount when compared to formulation 1. Moreover, the formulation 8 still maintained the desired mean diameter.

3.3 Preliminary tests of zeaxanthin encapsulation

In the development of Zea-NP, preliminary tests were performed to analyze the optimal concentration of zeaxanthin extract to obtain nanoparticles with more homogeneous size

distribution, diameter in the nano scale and high homogeneity. Thus, formulations were prepared with 10, 20, 30 or 40 $\mu\text{g/mL}$ of the extract, and evaluated regarding particle size and span value by laser diffraction after preparation.

The concentration of the encapsulated compound is dependent on the type of formulation and nanoencapsulation technique [29]. In this study, the solubility limits were considered to establish the mentioned concentrations of zeaxanthin extract.

All the formulations presented nanometric and micrometric particles, as can be seen in Fig.2. The obtained formulations showed the mean diameter of 532, 498, 238 and 437 nm, and a span value of 4.74, 7.02, 1.25, and 4.53, respectively. According to the results, zeaxanthin concentration influenced on particle size distribution and span value. However, the formulation with 30 $\mu\text{g/mL}$ (Fig.2c) showed the better particle size distribution, mean diameter and span value, and was chosen as the optimal formulation for the further analysis. Lobato et al. [30], produced bixin nanocapsules with poly (ϵ -caprolactone) as the wall material and also observed that higher bixin concentrations affected particle size distribution and stability.

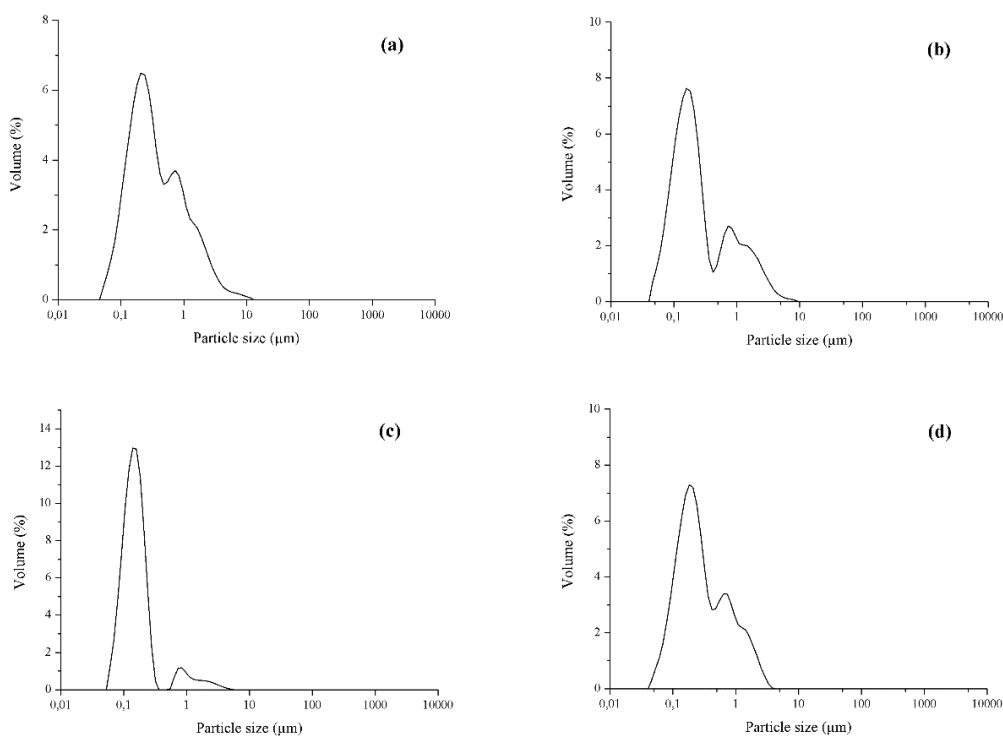


Fig. 2. Particle size distribution (volume) of Zea-NP with different concentrations of zeaxanthin extract (a) 10 $\mu\text{g/mL}$, (b) 20 $\mu\text{g/mL}$, (c) 30 $\mu\text{g/mL}$ and (d) 40 $\mu\text{g/mL}$.

3.4 Characterization of Zea-NP and Zea-NE

3.4.1 Particle size distribution and span value

The nanoparticles formulation with 30 µg/mL of zeaxanthin was homogenized in a high-pressure homogenizer, to obtain a more homogeneous particle distribution. The Zea-NP presented a mean diameter of 184 ± 3.54 nm and homogeneous distribution (Fig 3a) confirmed by the span value. In the homogenization process, the suspension was forced to pass through a valve with a narrow aperture [31], decreasing particle size.

De Campo et al. [14] utilized chia seed mucilage to nanoencapsulate chia seed oil and found higher values for mean diameter (205 ± 4.24 nm). De Oliveira, Paula, & Paula [32] developed essential oil nanocapsules with different proportions of alginate and cashew gum and also found superior values varying from 223 to 339 nm. The viscosity of the wall material and its concentration may influence the particle size. Thus, higher viscosity and concentration of the wall material can lead to larger particle size. Parameters like shear rate utilized in the emulsification process of organic phase into the aqueous phase, the composition of the organic phase, polymer and surfactant concentration and the ratio between oil and polymer can influence particle size [33].

As reported by Tonon et al. [34], the molecular size of the wall material can influence in mean diameter increase. Some studies reported that mucilages extracted from *Opuntia ficus indica* cladode are heteropolysaccharides with molar mass varying from 2.3×10^4 to 3×10^6 g.mol⁻¹ [18, 35]. However, there are no reports of data about the molar mass of *Opuntia monacantha*. In this study, Zea-NE presented lower mean diameter (150 ± 1.15 nm) (Fig 3b) than Zea-NP, and this difference can be attributed to the CM in Zea-NP formulation, that may have increased the nanoparticles mean diameter. Otálora et al. [20], also observed that higher amount of cactus cladode mucilage in betalain microcapsules caused an increase in particle size.

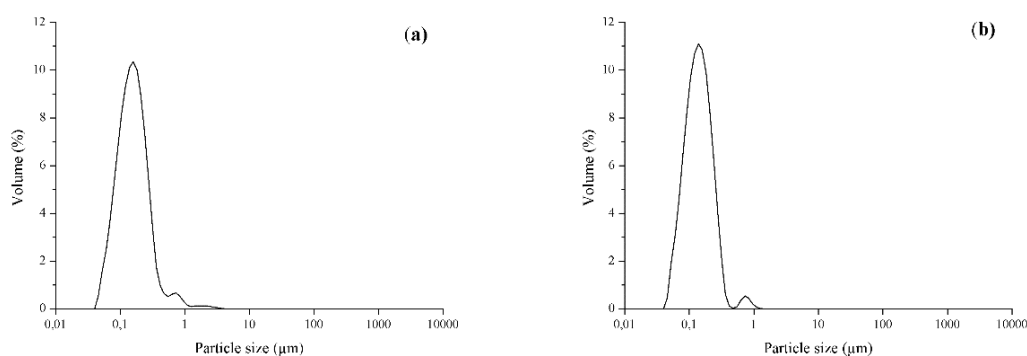


Fig. 3. Particle size distribution (volume) of Zea-NP (a) and Zea-NE (b).

Regarding span, Zea-NP and Zea-NE presented values of 1.18 ± 0.06 and 1.32 ± 0.12 , indicating high homogeneity. The small mean diameter and span value are indicative of the effectiveness of the method employed to nanoparticles obtention [31]. Thus, the obtained results revealed that the nanoencapsulation method utilized was adequate to produce Zea-NP.

3.4.2 Zeta potential and pH

Zeta potential measures the charge attraction and repulsion between particles and adequate values can vary between -30 mV and 30 mV [36]. Zea-NP presented zeta potential of -14.8 ± 0.42 mV, and this result is similar than those obtained by Lobato et al [30]. Zea-NE presented zeta potential of -23.8 ± 1.27 mV. Liu, McClements, Cao, & Xiao [37] obtained more negative values (-40.7 ± 0.7 mV) when compared to Zea-NE, for corn-oil-in water emulsions with astaxanthin.

The characteristics of the components utilized to make nanoparticles can influence the zeta potential values. When nanoparticles are prepared using anionic polymers, negative zeta potential values are obtained [33]. *Opuntia ficus indica* is composed of anionic polysaccharides, like galacturonic acids; and mucilages extracted from them are negatively charged [38]. Valente et al. [39] studied the cladodes of *Opuntia monacantha* and observed similar characteristics to the *Opuntia ficus indica* species.

The pH of the medium also can influence in zeta potential [33] as related by Liu, Low, & Nickerson, [40] who observed that the magnitude of negative charge increased with higher pH values. The authors obtained negative values for zeta potential at $\text{pH} > 3.57$ and positive ones at $\text{pH} < 3.57$. The Zea-NP and Zea-NE presented an initial pH of 4.54 ± 0.16 and 11.19 ± 0.19 , respectively (Table 3). The pH of Zea-NP was significantly lower than Zea-NE due to initial mucilage acidification, and this can explain the decrease in negative magnitude charge of zeta

potential when compared to Zea-NE. In addition, when acidified to pH 4, Zea-NE presented zeta potential of -12 ± 2.23 mV.

3.4.3 Viscosity

Zea-NP and Zea-NE presented viscosity values of 1.90 ± 0.09 and 1.24 ± 0.03 MPa.s, respectively, and both formulations presented typical Newtonian behavior, where the shear stress increase is proportional to the shear rate increase. Zea-NP presented higher viscosity than Zea-NE, and this can be attributed to the presence of CM utilized as structuring material, which exhibited a viscosity of 1.75 ± 0.47 MPa.s and Newtonian behavior. Tonon et al. [27] studied the influence of emulsion composition on the microencapsulation of flaxseed oil using gum arabic as the wall material and related that emulsion viscosity increased as gum arabic concentration increased.

Medina-Torres et al. [18], studied a mucilage extracted from *Opuntia ficus indica* and observed non-Newtonian behavior in different mucilage concentrations (1, 3, 5 and 10 %). Contreras-Padilla et al. [41], also related non-Newtonian behavior for *Opuntia ficus* mucilage at three different concentrations (1, 3 and 5 %). However, in this study CM solution was prepared in a lower concentration (0.1 % w/v) to reduce mucilage viscosity and ensure nanoparticles formation. This low viscosity and the interaction of CM with the other components utilized to make Zea-NP and Zea-NE may explain the Newtonian behavior found. Similar findings were reported by de Campo et al. [14], who observed the same viscosity behavior in chia seed oil nanoparticles with chia seed mucilage (0.1 % w/v) as wall material. Carneiro et al. [42], developed microcapsules of flaxseed oil using different combinations of wall materials and observed Newtonian behavior for flaxseed microcapsules with whey protein concentrate and gum Arabic as wall material.

3.4.4 Sample color

Regarding the color coordinates, Zea-NP presented orange color with CIELAB values: $L^* = 46.10 \pm 3.18$, $a^* = -0.22 \pm 1.67$, $b^* = 17.25 \pm 1.16$ and Zea-NE $L^* = 44.27 \pm 0.69$, $a^* = 4.39 \pm 0.14$, $b^* = 18.18 \pm 0.75$. Liu et al. [37] obtained similar results for L^* (48.42 ± 0.22) and a^* (5.65 ± 0.01) but lower b^* values (1.03 ± 0.01) for corn-oil-in water emulsions with astaxanthin. Statistical difference between Zea-NP and Zea-NE was observed only for coordinate a^* , where Zea-NP presented lower values (Table 3). This difference may be

explained due to the presence of CM utilized as structuring material in Zea-NP, which confers turbidity to the nanoparticles suspension.

According to the results, both formulations exhibited higher luminosity and yellow color, due to the characteristics of the free zeaxanthin, which showed the following CIELAB coordinates: $L^* = 59.46 \pm 0.02$, $a^* = 14.27 \pm 0.20$, $b^* = 52.91 \pm 0.01$, when diluted in ethanol. When compared to the color parameters of zeaxanthin extract, the formulations showed a decrease in color intensity, and this may be explained by the interaction with the other components utilized to make Zea-NP and Zea-NE.

3.4.5 Morphological properties

Zea-NP and Zea-NE morphology are shown in Fig. 4a and 4b, respectively. Both formulations presented approximately the same mean diameter obtained by laser diffraction technique.

According to Tonon et al. [27], particles with a heterogeneous surface can present lack of its flow properties and can have larger contact areas than those with a homogenous surface, making them more susceptible to oxidation. In this work, the absence of aggregation and uniform appearance with a smooth surface were observed for both formulations, suggesting that the method utilized for encapsulation was successful. Moreover, corroborating with span values Zea-NP and Zea-NE exhibited a homogeneous structure.

Otálora et al. [20], related that CM has a spherical morphology, being suitable for use in encapsulation and observed uniform appearance without agglomeration in betalain microcapsules using cactus cladode mucilage (*Opuntia ficus indica*) and maltodextrin as encapsulating agents.

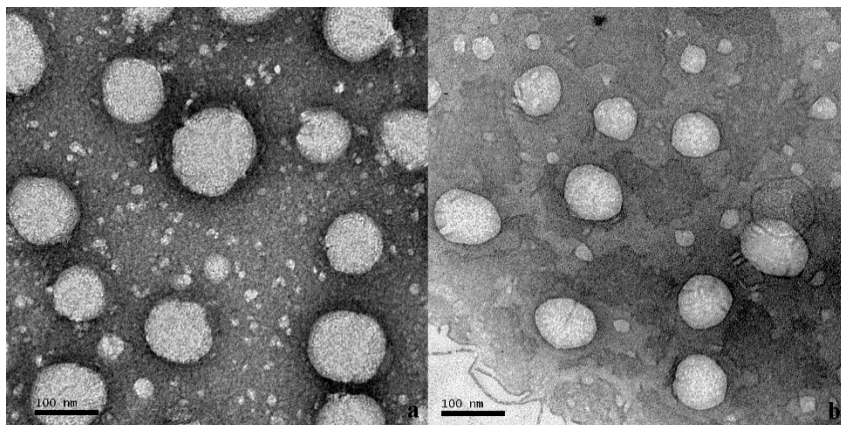


Fig. 4. TEM images of Zea-NP (a) and Zea-NE (b) at 200 x magnification [bar 100 nm].

3.4.6 Thermal properties

The results of thermogravimetric analysis (TGA) and the correspondent derivative curves (dTG) of CM, Zea-NP, and Zea-NE are shown in Fig 5.

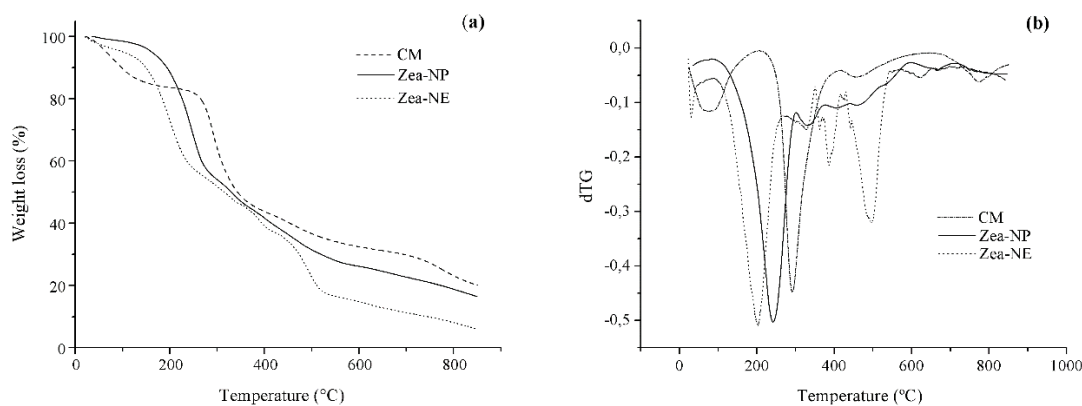


Fig. 5. Thermogravimetric analysis (a) and dTG curves (b) of CM, Zea-NP, and Zea-NE.

Three main stages of weight loss were observed in all the samples. The first one is associated to loss of free water, where the samples presented water evaporation in the temperature range of 25 to 150 °C, corresponding to losses of 14.82 % for CM, 9.96 % for Zea-NE and 3.82 % for Zea-NP. In the second stage between 150 and 600 °C, the total weight loss was 52.67 % for CM, 75.05 % for Zea-NE and 70 % for Zea-NP, concerning to polysaccharides degradation that composes CM, and the other components utilized to obtain Zea-NP and Zea-NE, such as Tween 80[®], CSO, and zeaxanthin extract. As the analysis was performed under an inert atmosphere from 600 to 800 °C, residual losses related to carbon residue were observed in CM, Zea-NE, and Zea-NP, corresponding to 12.39 %, 8.78 %, and 9.68 %, respectively.

The CM had a significant mass loss started around 300 °C, Zea-NE in approximately 200 °C and Zea-NP at ~ 250 °C, indicating that CM was more thermally stable than the formulations and that Zea-NP presented more stability under temperature than Zea-NE. The presence of CM lead to greater nanoparticle stability, and its characteristic is very useful considering industrial applications. De Oliveira et al. [32] also observed that higher concentrations of cashew gum in essential oil encapsulation resulted in high thermal stability.

From the obtained results was possible to conclude that CM have appropriate characteristics to be used as structuring material in zeaxanthin encapsulation, due to its high thermal stability, conferring protection to degradation and oxidation to the nanoencapsulated carotenoid.

3.4.7 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

FT-IR spectrum is one of the most utilized techniques to analyze the structure of the polymer and to determine their main functional groups [43]. The FT-IR spectrum of CSO, CM and Zea-NP are shown in Fig. 6.

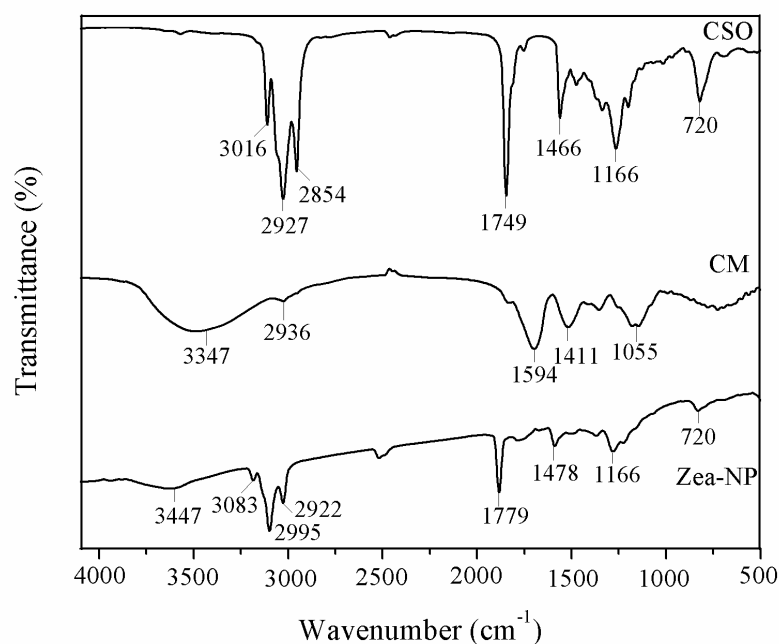


Fig. 6. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) of chia seed oil (CSO), cactus cladode mucilage (CM) and zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP).

Regarding CSO spectra, a C-H stretching vibration was observed at 3016 cm^{-1} , representing the unsaturated fatty acids [44, 45]. For oils that contain a higher degree of unsaturation, this peak appears at a higher wavenumber, as was observed in this study, for chia seed oil. The asymmetric and symmetric stretching vibration of C-H methyl groups were represented by the peaks at 2927 and 2854 cm^{-1} [46]. A prominent peak observed at 1749 cm^{-1} was assigned to C=O stretching vibration of ester functional groups of lipids and fatty acids and provides a measure of total lipids in chia seed oil [47]. The bands observed at 1466 cm^{-1} and 1166 cm^{-1} corresponds to CH_2 bending vibration and to the C-O ester group asymmetric stretching vibration, respectively [45, 46]. The most intense band at the end of the spectra centered at 720 cm^{-1} , is attributed to the combination of CH_2 bending vibration and the out-of-plane deformation of methylene in *cis*-disubstituted olefins [46, 47].

The CM spectra showed a broad band at 3347 cm^{-1} corresponding to the stretching of the hydroxyl group. The band at 2936 cm^{-1} is assigned to stretching vibration of C-H group [48, 49]. A band appearing at 1594 cm^{-1} is attributed to C=O stretching vibration of a carboxyl group [50] and the band located at 1411 cm^{-1} is attributed to H-C-H bending vibrations. The peak at 1055 cm^{-1} is assigned to the C-O-H bonds of D-arabinose [43].

The characteristic bands of CSO appeared in Zea-NP spectrum, and the bands observed in CM spectrum was also found in the nanoparticle spectra, like the band at 3447 cm^{-1} that was observed. In FT-IR spectra of Zea-NP, most peaks appeared on the same wavenumber. However, some differences in the regions of 3083 to 2922 cm^{-1} may indicate the presence of other components with insaturations, like the Tween 80 utilized to nanoparticles obtention. Additionally, at 1779 cm^{-1} a shift of the C=O band to higher frequency was observed, that can be attributed to a decrease in the H bonds of the fatty acids if compared to its pure form. This fact suggests that an increase in the strength of the C=O interaction is caused by the entrapment of the oil core by the structuring material. These findings indicate the efficiency of the nanoencapsulation technique utilized in this study.

3.5 Encapsulation efficiency of Zea-NP

The encapsulation efficiency is an important parameter to evaluate the nanoparticles formation and corresponds to the quantify of bioactive compound encapsulated. The encapsulation efficiency of Zea-NP was 96.57 %, indicating that only $1.03\text{ }\mu\text{g/mL}$ of the total zeaxanthin added ($30\text{ }\mu\text{g/mL}$) in Zea-NP was not encapsulated. This result indicates that $28.97\text{ }\mu\text{g/mL}$ of zeaxanthin was encapsulated, proving the efficacy of the encapsulation technique utilized and the potential of CM as structuring material to nanoencapsulate bioactive compounds.

Brum et al. [11] and dos Santos et al. [10], using PCL as wall material, obtained similar encapsulation efficiencies of 99.51 % to lutein nanocapsules and 95 % to lycopene nanocapsules, respectively. Both carotenoids, lutein, and lycopene, have similar behavior to zeaxanthin due to its high hydrophobicity [2]. Carotenoids have high affinity with oil, which reduces losses to the aqueous phase and contributes to increasing encapsulation efficiency and stability of these compounds [51].

3.6 Determination of Zea-NP and Zea-NE stability under different temperatures

The parameters utilized in nanoparticles obtention combined with the storage conditions may affect the stability of the system [33]. In this study, the Zea-NP and Zea-NE stability were analyzed under different temperatures (4, 25 and 40 °C) without light exposure and parameters such as mean diameter, span value, pH, color, and zeaxanthin retention (%) in Zea-NP and Zea-NE were evaluated during 28 days of storage.

During storage, the nanoparticle size is an important parameter to verify physical stability [52]. In Table 4, is possible to observe that the Zea-NP stored at 4 °C did not present a significant difference in mean diameter during 28 days of storage and at 25 °C and 40 °C showed an increase after the first day of storage that remained constant until the end of the storage. These results indicate that higher temperatures caused changes in nanoparticles structure. However, it was not observed phase separation, sedimentation or flocculation during the storage period. This high stability is conferred by the non-ionic surfactant utilized (Tween 80[®]) that can prevent the formation of agglomerates by steric stabilization [24].

Moreover, the balance between surfactant and oil provides a small and uniform particle size, due to the coverage of surfactant around the nanoparticle, avoiding aggregation [53]

The Zea-NE stored at 4 °C and 25 °C showed a significant increase and decrease in the particle size during storage time. Similar results were reported by Weigel, Weiss, Decker, & McClements [54], who evaluated the stability of lutein-enriched emulsion-based delivery systems and observed increase followed by decrease in the mean particle size of the emulsions, suggesting that the decrease in size can be due to sampling problem associated with droplet coalescence and oiling off. The mean diameter of Zea-NE stored at 40 °C remained stable after 28 days.

Table 4. Stability of mean diameter and span value of Zea-NP and Zea-NE stored at 4 °C, 25 °C and 40 °C during 28 days.

Temperature						
Storage time (days)	4 °C		25 °C		40 °C	
	Zea-NP	Zea-NE	Zea-NP	Zea-NE	Zea-NP	Zea-NE
	Mean Diameter	Mean diameter	Mean diameter	Mean diameter	Mean diameter	Mean diameter
0	156 ± 2 ^{Aa}	147 ± 2 ^{Bb}	184 ± 3 ^{Ab}	150 ± 1 ^{Bc}	148 ± 12 ^{Ac}	149 ± 2 ^{Aa}
7	163 ± 4 ^{Aa}	153 ± 4 ^{Bab}	286 ± 36 ^{Aa}	197 ± 0.7 ^{Ba}	179 ± 4 ^{Ab}	157 ± 1 ^{Ba}
14	163 ± 5 ^{Aa}	153 ± 0.01 ^{Bab}	282 ± 47 ^{Aa}	192 ± 4 ^{Bab}	186 ± 2 ^{Aab}	157 ± 12 ^{Ba}
21	162 ± 4 ^{Aa}	155 ± 4 ^{Ba}	288 ± 41 ^{Aa}	193 ± 0.01 ^{Bab}	186 ± 6 ^{Aab}	146 ± 7 ^{Ba}
28	162 ± 4 ^{Aa}	154 ± 3 ^{Ba}	297 ± 48 ^{Aa}	177 ± 15 ^{Bb}	192 ± 2 ^{Aa}	146 ± 4 ^{Ba}
	Span	Span	Span	Span	Span	Span
0	1.14 ± 0.08 ^{Aa}	1.28 ± 0.09 ^{Aa}	1.61 ± 0.01 ^{Aa}	1.32 ± 0.12 ^{Ba}	1.21 ± 0.01 ^{Ac}	1.24 ± 0.16 ^{Aa}
7	1.17 ± 0.08 ^{Ba}	1.60 ± 0.28 ^{Aa}	1.76 ± 0.31 ^{Aa}	1.74 ± 0.21 ^{Aa}	1.43 ± 0.18 ^{Ab}	1.46 ± 0.02 ^{Aa}
14	1.38 ± 0.14 ^{Aa}	1.59 ± 0.25 ^{Aa}	1.77 ± 0.31 ^{Aa}	1.70 ± 0.16 ^{Aa}	1.64 ± 0.04 ^{Aa}	1.39 ± 0.20 ^{Aa}
21	1.35 ± 0.13 ^{Aa}	1.50 ± 0.31 ^{Aa}	1.83 ± 0.42 ^{Aa}	1.69 ± 0.17 ^{Aa}	1.61 ± 0.06 ^{Aa}	1.27 ± 0.04 ^{Ba}
28	1.30 ± 0.13 ^{Aa}	1.59 ± 0.26 ^{Aa}	1.81 ± 0.42 ^{Aa}	1.60 ± 0.15 ^{Aa}	1.70 ± 0.01 ^{Aa}	1.26 ± 0.04 ^{Ba}

Mean ± standard deviation values followed by the same upper case letter in line and by the same lower case letter in column are not significantly different.

The span value indicates if the particles are uniformly distributed in suspension. In this study, no change in span value was observed during 28 days of storage at 4 °C and 25 °C for Zea-NP and Zea-NE, indicating that this temperature range did not influence in the homogeneity of the granulometric profile of nanoparticles suspension and that no particle aggregation or agglomeration occurred during storage. Similar results were reported by Brum et al. [11] and de Campo et al. [14] that nanoencapsulated lutein with poly-ε-caprolactone and

chia seed oil with chia seed mucilage, respectively. However, at 40 °C an increase in span value was observed for Zea-NP after the first day of storage and remained stable after 7 days of storage.

During the stability evaluation, the pH of Zea-NP (Table 5) remained stable during storage time under different temperatures. However, it was possible to observe a pH reduction in Zea-NE stored at 40 °C after 28 days. This reduction may be associated with accelerated oxidation of chia seed oil induced by the temperature that increases acid value [55] and, consequently, reduced pH values. The Zea-NP stored at 40 °C did not present this behavior due the protection conferred by the structuring material against oil oxidation and the reduction of the effects of light, heat, and oxygen [14].

The color parameters remained stable in Zea-NP stored under the different temperatures evaluated, indicating that the color stability of zeaxanthin, (the pigment that confers color to a nanoparticle) was not affected by temperature due to the protective effect of CM. However, changes in color were observed in Zea-NE, especially at 40 °C, where significative alterations in L, a*, and b* parameters were observed. The nanoemulsions showed an increase in L value in this temperature after 28 days, with initial L of 44.77 ± 0.05 and at the end of the storage time of 55.96 ± 1.91 . This increase in brightness indicated a decrease of carotenoid in suspension and appearance of white light and was also observed at 4 °C after 14 days of storage. For a* and b* parameters changes did not occur in this temperature. At 25 °C the color a* presented a decrease after the first day of storage, and the L and b* parameters did not change.

Table 5. Stability of pH and color (L, a* and b*) of Zea-NP and Zea-NE stored at 4 °C, 25 °C and 40 °C during 28 days.

Storage time (days)	Temperature					
	4 °C		25 °C		40 °C	
	Zea-NP	Zea-NE	Zea-NP	Zea-NE	Zea-NP	Zea-NE
	pH	pH	pH	pH	pH	pH
0	4.51 ± 0.13 ^{Ba}	9.61 ± 0.17 ^{Aa}	4.54 ± 0.16 ^{Ba}	11.19 ± 0.19 ^{Aa}	4.51 ± 0.11 ^{Ba}	11.09 ± 0.24 ^{Aa}
7	4.54 ± 0.10 ^{Ba}	9.57 ± 0.16 ^{Aa}	4.56 ± 0.14 ^{Ba}	11.16 ± 0.09 ^{Aa}	4.57 ± 0.12 ^{Ba}	10.10 ± 0.50 ^{Aa}
14	4.49 ± 0.10 ^{Ba}	9.29 ± 0.17 ^{Aa}	4.50 ± 0.10 ^{Ba}	10.98 ± 0.07 ^{Aa}	4.46 ± 0.13 ^{Ba}	8.01 ± 0.01 ^{Ab}
21	4.36 ± 0.22 ^{Ba}	9.25 ± 0.16 ^{Aa}	4.18 ± 0.17 ^{Ba}	10.57 ± 0.68 ^{Aa}	4.46 ± 0.13 ^{Ba}	6.63 ± 0.07 ^{Ab}
28	4.50 ± 0.09 ^{Ba}	9.50 ± 0.40 ^{Aa}	4.29 ± 0.19 ^{Ba}	9.42 ± 1.34 ^{Aa}	4.48 ± 0.03 ^{Ba}	5.65 ± 0.73 ^{Ac}
	L	L	L	L	L	L
0	45.96 ± 2.49 ^{Aa}	44.24 ± 0.27 ^{Ab}	46.10 ± 3.18 ^{Aa}	44.27 ± 0.69 ^{Aa}	45.42 ± 2.30 ^{Aa}	44.77 ± 0.05 ^{Ab}
7	46.52 ± 2.80 ^{Aa}	44.60 ± 0.54 ^{Ab}	46.21 ± 2.58 ^{Aa}	44.33 ± 0.47 ^{Aa}	44.52 ± 3.21 ^{Aa}	46.77 ± 1.76 ^{Ab}
14	46.90 ± 2.92 ^{Aa}	43.79 ± 0.80 ^{Ab}	47.28 ± 2.11 ^{Aa}	47.31 ± 0.84 ^{Aa}	46.36 ± 2.90 ^{Aa}	51.68 ± 2.39 ^{Aa}
21	48.13 ± 2.47 ^{Aa}	46.92 ± 0.52 ^{Aa}	47.25 ± 2.06 ^{Aa}	48.14 ± 1.79 ^{Aa}	46.99 ± 2.89 ^{Ba}	55.36 ± 1.46 ^{Aa}
28	48.25 ± 2.57 ^{Aa}	46.75 ± 0.38 ^{Aa}	46.86 ± 1.98 ^{Aa}	49.79 ± 4.20 ^{Aa}	46.84 ± 3.26 ^{Ba}	55.96 ± 1.91 ^{Aa}
	a*	a*	a*	a*	a*	a*
0	0.37 ± 1.13 ^{Ba}	4.29 ± 0.02 ^{Aa}	-0.22 ± 1.67 ^{Ba}	4.39 ± 0.14 ^{Aa}	0.11 ± 0.04 ^{Ba}	4.35 ± 0.18 ^{Aa}
7	-0.20 ± 0.57 ^{Ba}	3.49 ± 0.02 ^{Aa}	-0.42 ± 1.33 ^{Ba}	2.13 ± 0.36 ^{Ab}	-0.31 ± 1.47 ^{Ba}	4.41 ± 0.54 ^{Aa}
14	-0.33 ± 0.60 ^{Ba}	4.34 ± 0.35 ^{Aa}	-0.12 ± 1.41 ^{Ba}	3.22 ± 0.67 ^{Ab}	-0.47 ± 1.23 ^{Ba}	4.29 ± 0.72 ^{Ab}
21	0.20 ± 0.52 ^{Ba}	4.09 ± 0.29 ^{Aa}	-0.33 ± 1.38 ^{Ba}	2.68 ± 0.28 ^{Ab}	-0.71 ± 1.95 ^{Ba}	3.52 ± 0.03 ^{Abc}
28	0.16 ± 0.53 ^{Ba}	4.96 ± 1.61 ^{Aa}	-0.51 ± 1.41 ^{Ba}	2.36 ± 1.22 ^{Ab}	0.32 ± 2.56 ^{Aa}	3.21 ± 0.29 ^{Ac}
	b*	b*	b*	b*	b*	b*
0	17.88 ± 0.52 ^{Aa}	18.30 ± 0.89 ^{Aab}	17.25 ± 1.16 ^{Aa}	18.18 ± 0.75 ^{Aa}	18.07 ± 1.93 ^{Aa}	18.29 ± 0.63 ^{Aa}
7	17.81 ± 0.67 ^{Aa}	18.20 ± 0.59 ^{Ab}	16.57 ± 0.68 ^{Aa}	15.90 ± 1.15 ^{Aa}	16.82 ± 1.05 ^{Aa}	10.78 ± 1.49 ^{Bb}
14	18.08 ± 0.84 ^{Aa}	18.10 ± 0.76 ^{Ab}	18.35 ± 1.33 ^{Aa}	19.14 ± 0.96 ^{Aa}	18.81 ± 0.77 ^{Aa}	5.01 ± 2.99 ^{Bc}
21	18.84 ± 0.14 ^{Ba}	20.00 ± 0.67 ^{Aa}	18.14 ± 1.43 ^{Aa}	18.28 ± 1.05 ^{Aa}	17.59 ± 2.06 ^{Aa}	7.17 ± 1.43 ^{Bbc}
28	18.78 ± 0.26 ^{Ba}	19.70 ± 0.69 ^{Aab}	17.96 ± 1.62 ^{Aa}	17.05 ± 1.43 ^{Aa}	14.25 ± 3.65 ^{Aa}	8.23 ± 0.34 ^{Bbc}

Mean ± standard deviation values followed by the same upper case letter in line and by the same lower case letter in column are not significantly different.

During storage, the zeaxanthin retention (%) in all formulations decreased significantly during 28 days of storage. However, the zeaxanthin retention in Zea-NP was higher than in Zea-NE at the end of the storage at 25 °C and 40 °C, indicating that CM protected against degradation

use of refrigeration may contribute to maintaining the stability of zeaxanthin and when combined with the nanoencapsulation technique, the zeaxanthin retention was improved.

4 Conclusion

The results of the present study demonstrated that it was possible to synthesize zeaxanthin nanoparticles using cactus cladode mucilage (*Opuntia monacantha*) as structuring material. The Zea-NP showed high homogeneity and stability during the storage time evaluated. This work also showed that the zeaxanthin content was preserved due to the protection provided by CM, indicating that the nanoencapsulation can improve the zeaxanthin stability. Additionally, the obtained results suggest that zeaxanthin retention is dependent on the storage temperature, and that this parameter associated with nanoencapsulation may improve the protective effect of the structuring material, demonstrating that the using of cactus cladode mucilage (*Opuntia monacantha*) is a promising alternative to substitute synthetic polymers to the application of nanotechnology in the food sector.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) for the financial support provided for this research. The authors are also thankful to the Microscopy and Microanalysis Center of UFRGS, for the assistance in the use of TEM.

5 References

- [1] E. J. Johnson, The Role of Carotenoids in Human Health, *Nutr Clin Car.* 5 (2) (2002) 56-65. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-5408.2002.00004.x>.
- [2] M. G. Sajilata, R. S. Singhal, and M. Y. Kamat, The Carotenoid Pigment Zeaxanthin- A Review, *Compr Rev Food Sci S.* 7 (1) (2008) 29-49. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00028.x>.
- [3] J. Parry M. S. L. Fau - Luther, K. L. M. Fau - Zhou, M. P. Z. K. Fau - Yurawecz, P. Y. M. Fau - Whittaker, L. W. P. Fau - Yu and L. Yu., Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and

- blueberry seed oils, *J. Agric. Food Chem.* 53 (3) (2005) 566-573. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf048615t>.
- [4] H. Amagase and N. R. Farnsworth, "A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji), *Food Res Int.* 44 (7) (2011) 1702-1717. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.027>.
- [5] B. S. Inbaraj, H. Lu, C. F. Hung, W. B. Wu, C. L. Lin, and B. H. Chen, Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–APCI–MS, *J Pharmaceut Biomed.* 47 (4) (2008) 812-818. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.001>.
- [6] M. Protti, I. Gualandi, R. Mandrioli, S. Zappoli, D. Tonelli, and L. Mercolini, Analytical profiling of selected antioxidants and total antioxidant capacity of goji (*Lycium* spp.) berries, *J Pharmaceut Biomed.* 143 (2017) 252-260. 10.1016/j.jpba.2017.05.048.
- [7] A. C. Pedro, J. B. B. Maurer, S. F. Zawadzki-Baggio, S. Ávila, G. M. Maciel, and C. W. I. Haminiuk, Bioactive compounds of organic Goji berry (*Lycium barbarum* L.) prevents oxidative deterioration of soybean oil, *Ind Crop Prod.* 112 (2018) 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.052>.
- [8] C. S. Boon, D. J. McClements, J. Weiss, and E. A. Decker, Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods, *Crit Rev Food Sci.* 50 (6) (2010) 515-532. 10.1080/10408390802565889.
- [9] S. Lata, G. Sharma, M. Joshi, P. Kanwar, and T. Mishra, Role of nanotechnology in drug delivery, *Int J Nanotechnol Nanosci.* 5 (2017) 1-29. <http://dx.doi.org/10.20530/IJNN363>.
- [10] P. P. dos Santos, K. Paese, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, T. H. Costa, A. Jablonski, S. H. Flôres and A. d. O. Rios, Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study, *J Nanopart Res.* 17 (2) (2015) 1-11. 10.1007/s11051-015-2917-5.
- [11] A. A. S. Brum., P. P. d. Santos, M. M. d. Silva, K. Paese, S. S. Guterres, T. M. H. Costa, A. R. Pohlmann, A. Jablonski, S. H. Flôres and A. d. O. Rios, Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and stability evaluation, *Colloid Surface A.* 522 (2017) 477-484. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.03.041>.

- [12] V. Nedovic, A. Kalusevic, V. Manojlovic, S. Levic, and B. Bugarski, An overview of encapsulation technologies for food applications, *Proc Food Sci.* 1 (2011) 1806-1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>.
- [13] J.-M. Li and S.-P. Nie, The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods, *Food Hydrocoll.* 53 (2016) 46-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.035>.
- [14] C. de Campo, P. P. dos Santos, T. M. H. Costa, K. Paese, S. S. Guterres, A. d. O. Rios and S. H. Flôres., Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation, *Food Chem.* 234 (2017) 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.153>.
- [15] E. D. Herculano, H. C. B. de Paula, E. A. T. de Figueiredo, F. G. B. Dias, and V. d. A. Pereira, Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil, *Lebensm Wiss Technol.* 61 (2) (2015) 484-491. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.001>.
- [16] S. Ghayempour, M. Montazer, and M. Mahmoudi Rad, Tragacanth gum as a natural polymeric wall for producing antimicrobial nanocapsules loaded with plant extract, *Int J Biol Macromol.* 81 (2015) 514-520. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.041>.
- [17] V. D. Prajapati, G. K. Jani, N. G. Moradiya, and N. P. Randeria, Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms, *Carbohydr Polym.* 92 (2) (2013) 1685-1699. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.021>.
- [18] L. Medina-Torres, E. Brito-De La Fuente, B. Torrestiana-Sanchez, and R. Katthain, Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*), *Food Hydrocoll.* 14 (5) (2000) 417-424. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00015-1).
- [19] A. M. Carneiro, R. Farias-Singer, R. A. Ramos, and A. D. Nilson, *Cactos do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, RS. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Projeto RS Biodiversidade. http://www.fzb.rs.gov.br/conteudo/6685/?Cactos_do_Rio_Grande_do_Sul, 2016 (accessed 18 May 2018).
- [20] M. C. Otálora, J. G. Carriazo, L. Iturriaga, M. A. Nazareno, and C. Osorio, Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents, *Food Chem.* 187 (2015) 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.090>.
- [21] L. Medina-Torres, L., E. E. García-Cruz, F. Calderas, R. F. González Laredo, G. Sánchez-Olivares, J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán and J. Rodríguez-Ramírez, Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage

- (*Opuntia ficus indica*), *Lebensm Wiss Technol.* 50 (2) (2013) 642-650. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.038>.
- [22] A. Z. Mercadante and D. B. Rodriguez-Amaya, Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango, (in Eng), *J Agric Food Chem.* 46 (1) (1998) 128-130. 10.1021/jf9702860.
- [23] D. C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, 4^a ed., John Wiley & Sons, 2010.
- [24] C. G. Venturini, E. Jäger, C. P. Oliveira, A. Bernardi, A. M. O. Battastini, S. S. Guterres and A. R. Pohlmann, Formulation of lipid core nanocapsules, *Colloid Surface A.* 375 (1–3) (2011) 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.011>.
- [25] F. Chen, H.-B. Li, R. N.-S. Wong, B. Ji, and Y. Jiang, Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography, *J Chromatogr A.* 1064 (2) (2005) 183-186. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.065>.
- [26] L. H. Guerra-Santos and D. K. Greenbury, *Microcrystalline zeaxanthin with high bioavailability in oily carrier formulations*, ed: Google Patents, 2005.
- [27] R. V. Tonon, C. R. F. Grosso, and M. D. Hubinger, Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying, *Food Res Int.* 44 (1) (2011) 282-289, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>.
- [28] S. F. Hosseini, M. Zandi, M. Rezaei, and F. Farahmandghavi, Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study, *Carbohydr Polym.* 95 (1) (2013) 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>.
- [29] Y. Yuan, Y. Gao, J. Zhao, and L. Mao, Characterization and stability evaluation of beta-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions, *Food Res Int.* 41 (1) (2008) 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.09.006>.
- [30] K. B. d. S. Lobato, K. Paese, J. C. Forgearini, S. S. Guterres, A. Jablonski, and A. d. O. Rios, Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules, *Food Chem.* 141 (4) (2013) 3906-3912. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.135>.
- [31] V. R. Patel and Y. K. Agrawal, Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs, *J Adv Pharma Tech Res.* 2 (2) (2011) 81-87. 10.4103/2231-4040.82950.

- [32] E. F. de Oliveira, H. C. B. Paula, and R. C. M. d. Paula, Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation, *Colloid Surface B*. 113 (2014) 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.038>.
- [33] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int J Pharma*. 385 (1–2) (2010) 113-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.
- [34] R. V. Tonon, C. Brabet, and M. D. Hubinger, Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents, *Food Res Int*. 43 (3) (2010) 907-914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.013>.
- [35] C. Sáenz, E. Sepúlveda, and B. Matsuhira, *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives, *J Arid Environ*. 57 (3) (2004) 275-290. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(03\)00106-X](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(03)00106-X).
- [36] S. S. Guterres, F. S. Poletto, L. M. Colomé, R. P. Raffin, and A. R. Pohlmann, Polymeric nanocapsules for drug delivery, *Colloid drug del.* (2010) 71-98.
- [37] X. Liu, D. J. McClements, Y. Cao, and H. Xiao, Chemical and Physical Stability of Astaxanthin-Enriched Emulsion-Based Delivery Systems, *Food Biophys*. 11 (3) (2016) 302-310. 10.1007/s11483-016-9443-6.
- [38] H. Majdoub, S. Roudesli, and A. Deratani, Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: extraction, characterization and polyelectrolyte behaviour, *Polym Int*. 50 (5) (2001) 552-560. <https://doi.org/10.1002/pi.665>.
- [39] L. M. M. Valente, D. da Paixão, A. C. do Nascimento, P. F. P. dos Santos, L. A. Scheinvar, M. R. L. Moura, L. W. Tinoco, L. N. F. Gomes and J. F. M. da Silva, Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae), *Food Chem*. 123 (4) (2010) 1127-1131. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.074>.
- [40] S. Liu, N. H. Low, and M. T. Nickerson, Effect of pH, Salt, and Biopolymer Ratio on the Formation of Pea Protein Isolate–Gum Arabic Complexes, *J Agr Food Chem*. 57 (4) (2009) 1521-1526. 10.1021/jf802643n.
- [41] M. Contreras-Padilla, M. E. Rodríguez-García, E. Gutiérrez-Cortez, M. d. C. Valderrama-Bravo, J. I. Rojas-Molina, and E. M. Rivera-Muñoz, Physicochemical and rheological characterization of *Opuntia ficus* mucilage at three different maturity stages

- of cladode, Eur Polym J. 78 (2016) 226-234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.03.024>.
- [42] H. C. F. Carneiro, R. V. Tonon, C. R. F. Grosso, and M. D. Hubinger, Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials, J Food Eng. 115, (4) (2013) 443-451. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>.
- [43] N. Bayar, M. Kriaa, and R. Kammoun, Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes, Int J Bio Macromol. 92 (2016) 441-450. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.042>.
- [44] A. Alonso-Calderón, E. Chávez-Bravo, A. Rivera, C. Montalvo-Paquini, R. Arroyo-Tapia, M. Monterrosas-Santamaria, T. Jiménez-Salgado and A. Tapia-Hernández, Characterization of black chia seed (*Salvia hispanica* L) and oil and quantification of β -sitosterol, Int Res J Biol Sci. 2 (1) (2013) 70-72.
- [45] J. Vongsvivut, M. R. Miller, D. McNaughton, P. Heraud, and C. J. Barrow, Rapid Discrimination and Determination of Polyunsaturated Fatty Acid Composition in Marine Oils by FTIR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis, Food Bioprocess Tech. 7 (8) (2014) 2410-2422. 10.1007/s11947-013-1251-0
- [46] M. D. Guillen and N. Cabo, Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats, J Sci Food Agr. 75 (1) (1997) 1-11. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199709\)75:1<1::AID-JSFA842>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199709)75:1<1::AID-JSFA842>3.0.CO;2-R).
- [47] Y. P. Timilsena, J. Vongsvivut, R. Adhikari, and B. Adhikari, Physicochemical and thermal characteristics of Australian chia seed oil, Food Chem. 228 (2017) 394-402, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.021>.
- [48] G. Archana, K. Sabina, S. Babuskin, K. Radhakrishnan, M.A. Fayidh, P.A. Babu, M. Sivarajan and M. Sukumar, Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications, Carbohydr Polym. 98 (1) (2013) 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.062>.
- [49] P. Kalegowda, A. S. Chauhan, and S. M. Nanjaraj Urs, *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw cladode mucilage: Physico-chemical, rheological and functional behavior, Carbohydr Polym. 10 (2017) 1057-1064. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.070>.
- [50] M. Jouini, A. Abdelhamid, M.A. Chaouch, D. le Cerf, A. Bouraoui, H. Majdoub and H. Ben Jannet, Physico-chemical characterization and pharmacological activities of

- polysaccharides from *Opuntia microdasys* var. *rufida* cladodes, *Int J Biol Macromol.* 107 (2018) 1330-1338. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.003>.
- [51] M. Gonnet, L. Lethuaut, and F. Boury, New trends in encapsulation of liposoluble vitamins, *J Control Release.* 146 (3) (2010), 276-290. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.037>.
- [52] M. Chaari, I. Theochari, V. Papadimitriou, A. Xenakis, and E. Ammar, Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro- and nano-emulsions, *Colloid Surface B.* 161 (1) (2018) 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.042>.
- [53] J. L. Giongo, R. de Almeida Vaucher, V. P. Fausto, P. M. Quatrin, L. Q. S. Lopes, R. C. V. Santos, A. Gündel, P. Gomes and M. Steppe, Anti-Candida activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies, *Microb pathogenesis.* 100 (2016) 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.013>.
- [54] F. Weigel, J. Weiss, E. A. Decker, and D. J. McClements, Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability, *Food Chem.* 242 (2018) 395-403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.060>.
- [55] G. Dąbrowski, I. Konopka, S. Czaplicki, and M. Tańska, Composition and oxidative stability of oil from *Salvia hispanica* L. seeds in relation to extraction method, *Eur J Lipid Sci Tech.* 119 (5) (2017). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600209>.
- [56] L. Q. Zepka, M. A. A. P. Borsarelli Cd Fau - da Silva, A. Z. da Silva Ma Fau - Mercadante, and A. Z. Mercadante, Thermal degradation kinetics of carotenoids in a cashew apple juice model and its impact on the system color, *Journal of Agricultural and Food Chem.* 57 (17) (2009) 7841-7845. 10.1021/jf900558a.

CAPÍTULO 5 – ARTIGO 3

Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: influence on physicochemical properties,
carotenoid stability and sensory analysis

Artigo formatado de acordo com as normas da revista 'Food Chemistry'

Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis

Camila de Campo, Renato Queiroz Assis, Tania Maria Haas Costa, Karina Paese, Silvia Stanisçuaski Guterres, Alessandro de Oliveira Rios, Simone Hickmann Flôres

Abstract

In this study, zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP) and zeaxanthin nanoemulsion (Zea-NE) were incorporated in yogurt. Control yogurt (CY), yogurt added of nanoparticles (Y-NP) and yogurt added of nanoemulsion (Y-NE) were evaluated weekly regarding pH, titratable acidity, color, textural parameters, viscosity and syneresis during 28 days at 4 °C with light exposure. Zeaxanthin retention in Y-NP and Y-NE was also determined over storage time. Sensory attributes and morphology were evaluated in all yogurt samples and zeaxanthin bioaccessibility after *in vitro* digestion was analyzed in Y-NP and Y-NE after preparation. At the end of storage time, zeaxanthin retention was higher in Y-NP (22.31 %) than in Y-NE (16.84 %). Despite the lower firmness and viscosity observed in Y-NP, these changes are not sensorially perceived. The bioaccessibility after *in vitro* digestion suggested that nanoencapsulation provided a controlled release of the carotenoid. The results indicated that Zea-NP can be incorporated in yogurt, allowing the dispersion of a hydrophobic compound in a hydrophilic matrix and providing high stability.

Keywords: Nanoencapsulation; cactus mucilage; bioaccessibility; sensory evaluation.

1 Introduction

Carotenoids are natural compounds found in fruits and in green leafy vegetables, and its consumption have been associated with health benefits, such the decrease of incidence of heart diseases and some types of cancer (Eggersdorfer & Wyss, 2018). Among the carotenoids, zeaxanthin plays a special role in reducing the risk of age-related macular degeneration and cataract (Milani, Basirnejad, Shahbazi, & Bolhassani, 2017).

Some carotenoids, such as β -carotene, lutein, zeaxanthin, lycopene, and astaxanthin are utilized as supplements, to fortify foods, as dye in food and beverages and in pharmaceutical applications (Eggersdorfer & Wyss, 2018). Despite their beneficial effects, carotenoids are

sensitive to heat, light, and oxygen, which limits its application in food industry (Aguilar, Estevinho, & Santos, 2016). Furthermore, most of the carotenoids have higher hydrophobicity, limiting its utilization in beverages or food with high water content (Toniazzi et al., 2014).

Nanoencapsulation is a promising technology that promotes the dispersion of hydrophobic compounds, like carotenoids, in water-rich food matrices. Moreover, through nanoencapsulation, its possible increase the potential of carotenoids incorporation in food, generating new products with added value (Medeiros et al., 2019).

Yogurt is a food consumed by people of all ages with great acceptance by consumers, and its consumption is linked to healthy habits, conferring benefits to the human health due to their high calcium and protein content (Xavier, Mercadante, Garrido-Fernández, & Pérez-Gálvez, 2014). However, yogurt is low in total antioxidant activity (Taksima, Limpawattana, & Klaypradit, 2015), which makes interesting the addition of bioactive compounds. Furthermore, yogurt added of colors and flavors, that at the same time offer health benefits, have gained space in the market, enhancing the consumer acceptance (Mohammadi-Gouraji, Soleimanian-Zad, & Ghiaci, 2018). Therefore, the addition of natural antioxidants is a promising alternative to improve its nutritional value and confer color.

Ghorbanzade, Jafari, Akhavan, & Hadavi (2017), developed yogurt with fish oil nanoliposomes and observed that yogurt containing nanoliposomes showed higher fatty acids retention than the yogurt with free fish oil. Medeiros et al. (2019) produced yogurts with an encapsulated carotenoid extract from melon and related that encapsulated extract, containing mainly β -carotene, promoted higher yellow color and carotenoid dispersion in yogurt matrix. However, there are no studies regarding the application of zeaxanthin nanoparticles in food. Furthermore, there is a need to know the effect of nanoparticles in food matrices, and the bioaccessibility of the nanoencapsulated compound after *in vitro* digestion also should be investigated.

In our previous studies (de Campo et al., 2018), zeaxanthin nanoparticles were synthesized using cactus mucilage as structuring material, to substitute synthetic polymers in nanoencapsulation. The findings of the study revealed that zeaxanthin nanoparticles presented high stability under different temperatures and showed prolonged shelf-life when compared to zeaxanthin nanoemulsion, demonstrating that the nanoparticles have potential to be applied in food matrices.

Considering the health benefits provided by zeaxanthin, the possibility to apply a hydrophobic compound in a food with high water content through nanoencapsulation, and the few studies about nanoparticles effect in food matrices, this work aimed to incorporate

zeaxanthin nanoparticles in yogurt and evaluate the influence of the nanoparticles and nanoemulsion addition on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis of yogurt. The bioaccessibility of zeaxanthin in yogurt after *in vitro* digestion was also investigated.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Milk (Tirol[®]), skim powdered milk (CCGL[®]), guar gum and xanthan gum (Foco Alternativo[®]) and the freeze-dried bacterial cultures of *L.acidophilus*, *Bifidobacterium* and *S. thermophilus* (BioRich[®]), utilized to yogurt production were obtained in a local market (Porto Alegre, Brazil).

Tween 80[®] (Dinamica, São Paulo, Brazil) and ethanol 99.5 % (Êxodo, São Paulo, Brazil) were utilized in nanoparticles and nanoemulsion obtention. The enzymes utilized to *in vitro* digestion (α -amylase, pepsin, pancreatin, and bile salts) were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). All other chemicals and solvents were of analytical grade.

Zeaxanthin extract from Goji berry fruit and cactus mucilage obtained from cactus cladodes of *Opuntia monacantha* (utilized as structuring material to nanoparticles production) were obtained according to the method described by de Campo et al. (2018).

2.2 Preparation of zeaxanthin nanoparticles (Zea-NP) and zeaxanthin nanoemulsion (Zea-NE)

The Zea-NP and Zea-NE were obtained according to the methodology proposed by de Campo et al. (2018). To Zea-NP obtention, an organic phase composed by Tween 80[®], chia seed oil, and zeaxanthin (30 μ g/mL) diluted in ethanol, was injected dropwise into 20 mL of an aqueous phase composed by cactus mucilage (0.1 %), during homogenization in Ultra-Turrax (IKA Ultra Turrax[®] digital, model T25, Staufen, Germany) (8000 rpm/15 min). Thereafter, the nanoparticles were homogenized in a high pressure homogenizer (Avestin, model EmulsiFlex-C3[®], Ottawa, Canada) for 3 cycles at 500 bar. To Zea-NE obtention, the same procedure was realized, and the aqueous phase was distilled water. Zea-NP and Zea-NE were characterized in our previous work.

2.3 Yogurt manufacture

To yogurt preparation, whole milk was heated to 40 °C in a water bath and skim powdered milk was added (10 % w/v), and the mixture was maintained under stirring in a mechanical stirrer (Edutec, model EEQ9008A-2, Curitiba, Brazil) for 15 min. Thereafter, the milk was heated to 80 °C, and guar gum (0.15 % w/v) and xanthan gum (0.05 % w/v) was added and maintained under stirring for 30 min. The mixture was cooled to 45 °C, and the lyophilized bacterial culture was added (0.4 g/L) and incubated at 45 °C for 5 h in a cheese vat (Armfield, Model FT20Mkll, Ringwood, England). Afterwards, the yogurt was cooled to 4 °C until the analysis.

Zea-NP and Zea-NE (12.5 % v/v, corresponding to 364.20 and 375 µg of zeaxanthin, respectively) were applied under stirring (Fisatom, Model 713D, São Paulo, Brazil) in yogurt until complete homogenization.

Yogurt samples (50 g) of control yogurt (CY), yogurt added of nanoparticles (Y-NP) and yogurt added of nanoemulsion (Y-NE) were packed in closed plastic pots and stored in a chamber (NewLab, Model NL-41-01 A, Piracicaba, Brazil) with light exposure at 4 °C for 28 days. For the syneresis analysis, yogurt samples (20 g) were conditioned in falcon tubes.

2.4 Yogurt analyses

The CY, Y-NP, and Y-NE were evaluated weekly for 28 days, regarding pH, titratable acidity, color, textural parameters, viscosity, and syneresis. The zeaxanthin retention in Y-NP and Y-NE was also evaluated during storage, sensory and morphology were performed in all the yogurt samples after preparation. Bioaccessibility of zeaxanthin in yogurt matrix after *in vitro* digestion was investigated in Y-NP and Y-NE.

The CY was composed of 73.67 ± 0.13 % moisture, 7.51 ± 0.06 % ash, 8.97 ± 0.06 % proteins and 1.91 ± 0.16 % lipids, in dry basis.

2.4.1 pH and titratable acidity

The pH of the yogurt samples was evaluated using a pHmeter (Hanna Instruments, Model H1221, Woonsocket, United States) previously calibrated with pH 4 and pH 7 standard buffers. The titratable acidity was analyzed according to AOAC (2005). For the analysis, 10 g of each yogurt sample was mixed with 75 mL of distilled water and titrated with 0.1 N NaOH using phenolphthalein as indicator. The results were expressed as % of lactic acid.

2.4.2 Syneresis

To determine syneresis, 20 g of yogurt was centrifuged (3000 g, 10 min, 4 °C) (Sigma, Model 4 K15, Osterode am Harz, Neustadt an der Weinstrasse, Germany) as described by Robertson et al. (2016). The supernatant was collected, weighed, and syneresis was expressed according to the equation (Eq. 1):

$$\text{Syneresis} = \frac{\text{Total weight of separated liquid}}{\text{Total weight of yogurt}} \times 100 \quad (1)$$

2.4.3 Color

To determinate color attributes, a portable colorimeter (Konica Minolta, Model CR400, Tokyo, Japan) was utilized. The *L* value (lightness), *a** (red-green intensity) and *b** (yellow-blue intensity) were measured according to the Commission Internationale de l'Eclairage (CIELAB system).

2.4.4 Texture analyses

The texture properties of yogurt (firmness and consistency) were analyzed using a texture analyzer (Stable Micro Systems, model TA.XT2i, Godalming, United Kingdom). The sample compression was performed with a Backward Extrusion Rig probe (35 mm diameter) with a penetration rate of 2 mm/s and penetration depth of 10 mm. The obtained data were analyzed with Exponent Lite program.

2.4.5 Viscosity

The viscosity of yogurt samples was measured in a rheometer (Thermo Scientific, model HAAKE Mars III, Massachusetts, United States) at 4 °C, using a concentric cylinder (26 mm x 34 mm). The samples were submitted to a pre-shear at 200 s⁻¹ for 1 min and subsequently shear rate ranging from 0.01 to 200 s⁻¹ and from 200 to 0.01 s⁻¹. The results are expressed as a mean of the values at 200 s⁻¹.

2.4.6 Determination of Zea-NP and Zea-NE stability in yogurt

To evaluate Zea-NP and Zea-NE stability in yogurt, zeaxanthin was extracted from Y-NP and Y-NE. For this purpose, a yogurt sample (10 g) was weighed and placed in a test tube, 10 mL of 4 N hydrochloric acid was added and the mixture was vortexed for 2 min as described by de Campo et al. (2017), to nanoparticles disruption. The zeaxanthin was exhaustively extracted with acetone (5 mL) and petroleum ether (10 mL) by vortexing for 5 min, until color absence in yogurt samples. Then, 10 mL of saturated NaCl solution was added, the supernatant was collected, dried in N₂ and stored at -18 °C until HPLC analysis.

The zeaxanthin retention (%) in yogurt samples was determined by HPLC (Agilent series 1100, California, United States), equipped with a quaternary pump, online degasser, and automatic injector. Separation was carried out in a C30 polymeric column (250 × 4.6 mm, 3 μm particle size) kept at 25 °C, using as mobile phase MeOH/MTBE (50:50 v/v) for 5 min and flow rate of 1 mL/min. The injections were performed in triplicate, and the absorption wavelength utilized to process the chromatograms was 450 nm. ChemStation[®] software program was utilized for data acquisition and processing. For zeaxanthin quantification, a calibration curve with R² > 0.99 was utilized. Before injection, the samples were resuspended in MTBE and filtered (0.45 μm, Millipore, São Paulo, Brazil).

2.4.7 Yogurt morphology

The morphology of CY, Y-NP and Y-NE was verified through transmission electron microscopy (TEM) in the Central Laboratory of Microscopy and Microanalysis, (PUCRS, Porto Alegre, Brazil), using a Fei, model Tecnai G2 T20, operated at 120 kV with magnification of 13500 x and 26500 x.

To sample preparation, CY, Y-NP and Y-NE were diluted in distilled water (1:10 v/v) in an Eppendorf, and one drop of this dilution was placed on a grid (Formvar-carbon support films

400 mesh). Then, 2 drops of uranyl acetate (2 % w/v), utilized as a negatively standard, was deposited on the grid. The samples were analyzed on the same day of preparation.

2.4.8 Sensory analyses

For the sensory analysis, a commercial yogurt of fruit salad flavor was utilized. The CY, Y-Zea-NP, and Y-Zea-NE were evaluated by 50 untrained panelists after preparation. Sensory evaluation was based on a 9-point hedonic scale, where 1: dislike extremely; and 9: likely extremely. The attributes of appearance, flavor, color, texture, consistency, taste, aftertaste, and overall acceptability were evaluated. The samples were given to the panelists in coded plastic cups (20 mL approximately) (Meilgaard, Carr, & Civille, 2006).

2.4.9 *In vitro* digestion

The Y-NP and Y-NE samples were subjected to *in vitro* digestion, simulating the oral, gastric and intestinal phases, according to the international consensus method described by Minekus et al. (2014). The simulated salivary fluid (SSF), simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) were prepared according to the same authors and were pre-incubated at 37 °C in a water bath (De Leo, Model MHD, Porto Alegre, Brazil) for 30 min.

To simulate the oral phase, Y-NP and Y-NE samples (10 mL) were mixed with 7 mL of pre-warmed SSF stock solution, and the pH of the mixture was adjusted to 7.0 ± 0.1 using 1M HCl or NaOH. Then, 1 mL of α -amylase solution at 1500 U mL^{-1} (prepared in SSF) was added, followed by 50 μL of CaCl_2 (0.3 M) and 1.950 mL of Milli-Q water, and the oral bolus was stirred in a water bath (Novatecnica, model NT 232, São Paulo, Brazil) at 37 °C for 2 min. To simulate the gastric phase, 15 mL of pre-warmed SGF was added to the digested mixture, and the pH was adjusted to 3.0 ± 0.1 . Then, 3.2 mL of pepsin solution at 25000 U mL^{-1} (prepared in SGF), 10 μL of CaCl_2 and 1.39 mL of Milli-Q water were added, and the chyme was stirred at 37 °C for 2 h. After the gastric digestion, to simulate the intestinal phase, 22 mL of pre-warmed SIF was added, and the pH was adjusted to 7.0 ± 0.1 . Then, 10 mL of pancreatin solution at 800 U mL^{-1} (prepared in SIF), 5 mL of bile solution (160 mM), 80 μL of CaCl_2 and 2.32 mL of Milli-Q water were added, and the mixture was maintained under stirring at 37 °C for 2 h. At the end of each digestion phase, the samples were cooled in an ice bath to stop enzyme activity.

2.4.10 Zeaxanthin bioaccessibility after in vitro digestion

The zeaxanthin bioaccessibility of Zea-NP and Zea-NE in yogurt matrix after the digestion was determined according to Verkempinck et al. (2018) with modifications. The digesta at the end of the intestinal phase was taken and centrifugated (6000 g, 4 °C, 5 min) (HITACHI, model CR21GIII, Ibaraki, Japan). The supernatant corresponding to the micellar fraction was collected and mixed with NaCl (0.5 g) and 10 mL of the extraction solution composed by hexane, acetone and ethanol (2:1:1 v/v). The mixture was vortexed during 1 min and centrifugated (6000 g, 4 °C, 5 min) for phase separation and zeaxanthin extraction. The supernatant was collected, dried in N₂ and stored at – 18 °C until quantification in HPLC, using the same parameters described in section 2.4.6.

This experiment was carried out in triplicate, and the bioaccessibility of carotenoid was calculated as the ratio of zeaxanthin concentration in the micellar phase in relation to the initial concentration in the yogurt sample.

2.5 Statistical analysis

The results were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at 0.05 significance level, using the software STATISTICA[®] 10.0 (StatSoft, United States).

3 Results and discussion

3.1 pH, titratable acidity and syneresis

The initial pH of yogurt samples (Fig 1a) was 5.54 ± 0.02 for CY, 5.52 ± 0.02 for Y-NP and 5.52 ± 0.01 for Y-NE. All yogurt samples demonstrated a decrease in pH values after the first week, that remained stable until the end of storage period. According, the acidity (Fig. 1b) increased after the first day of storage time. This decrease in pH and consequently increase in acidity is resulting from the lactose transformation into lactic acid, due to the increase in bacterial metabolic activity (Baba et al., 2018; Ghorbanzade et al., 2017). Similar findings were reported by Ghorbanzade et al. (2017), who developed yogurts with fish oil nano-liposomes and Tan et al. (2018), who produced yogurts with tocotrienols microcapsules.

On days 21 and 28, the CY and Y-NE showed lower pH values than Y-NP, and CY presented higher values for % of lactic acid. These results indicated that the yogurts with

zeaxanthin presented lower acidity than the CY at the end of the storage time, due to the protection exerted by the carotenoid, extending the shelf life.

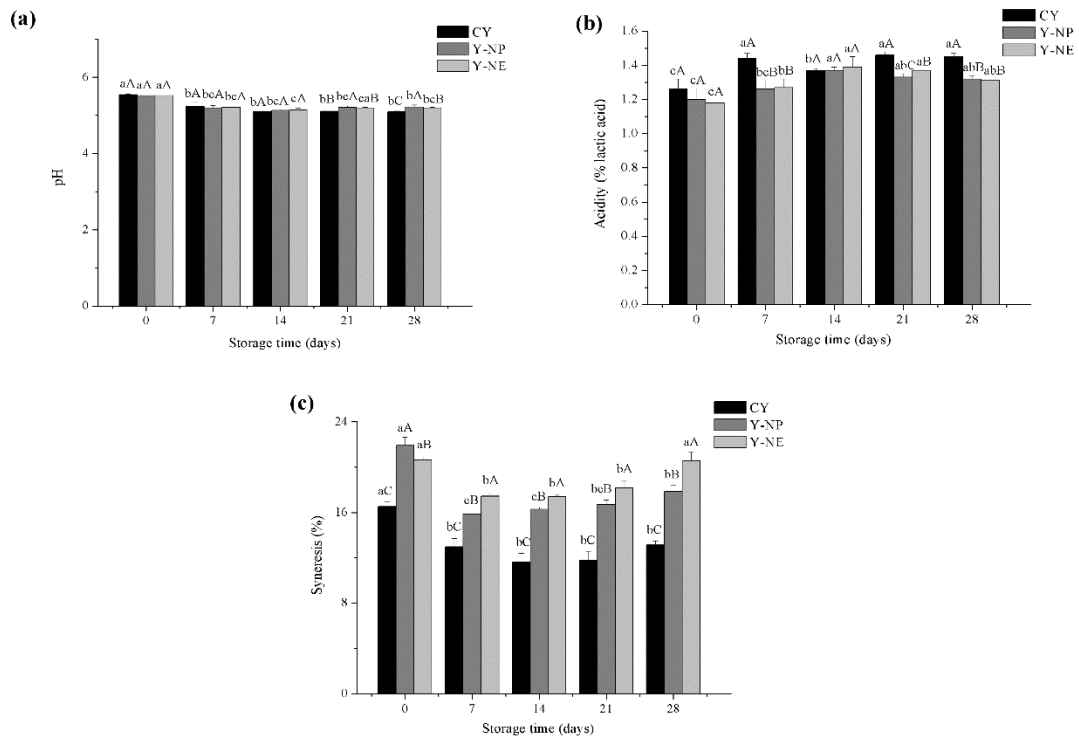


Fig. 1 pH (a), titratable acidity (b) and syneresis (c) of control yogurt (CY), yogurt added of nanoparticles (Y-NP) and yogurt added of nanoemulsion (Y-NE) during 28 days of storage at 4 °C.

The bars with different lowercase letters differ significantly due to storage time for the CY, Y-NP, and Y-NE ($p < 0.05$); the bars with different uppercase letters differ significantly between CY, Y-NP and Y-NE on each day of storage.

The % of syneresis was higher in Y-NP and Y-NE than in CY (Fig. 1c) over the storage time. These result can be attributed to the lower water content in CY, which decreased the whey separation.

However, Y-NP showed lower whey separation than Y-NE, indicating that the cactus mucilage present in nanoparticles formulation was capable to retain more water, decreasing the extent of syneresis. The negative charges of anionic polysaccharides, like cactus mucilage may interact with the positive charges of casein micelles, strenghtening the casein network and reducing syneresis (Everett & McLeod, 2005). Baba et al. (2018), also observed an increase of 8.2 % and 6.4 % in syneresis in yogurts with flaxseed oil and walnut oil, respectively. The same authors reported that the incorporation of guar gum (0.025 %) significantly decreased syneresis.

A decrease in syneresis was observed in all the yogurt samples after the first week of storage. Similar behaviour was observed by Ghorbanzade et al. (2017), who found lower whey separation in the last week of storage for the control yogurt, yogurt with fish oil nanoliposomes and yogurt with free fish oil. This result can be explained by the decrease in pH during the storage period, that caused a contraction on the casein matrix, decreasing the serum release. Moreover, the increase in viscosity has significant effect on yogurt firmness, which may also promote a decrease in syneresis (Ghorbanzade et al. 2017).

Despite these changes, there are not visual differences in whey separation between the samples during storage time, which is an advantage, considering that lack of visual perception of whey separation is fundamental to determine the quality and consumer acceptance of yogurts (W. J. Lee, Lucey, J.A., 2010).

3.2 Color measurements

The color changes of CY, Y-NP, and Y-NE are illustrated in Fig.2. Regarding L values, a decrease was observed on day 7, remaining stable until day 21, followed by an increase on day 28. However, these changes occurred in all the samples, indicating that the addition of Zea-NP in yogurt did not influence on this parameter. The slightly decrease in L values can be related with the casein present in the milk. The protein interacts with proteases of the bacterial culture, and the proteolysis reaction can reduce the L intensity over storage (Aryana, Barnes, Emmick, McGrew, & Moser, 2006). At the end of storage, increase in lightness indicates that there was less carotenoid in suspension in Y-NP and Y-NE. Moreover, fat globules and casein micelles contribute to the white appearance due to their capacity to scatter light, which also can explain the increase in L values at the end of the storage period (Tan et al., 2018).

All the yogurts demonstrated a decrease in the yellowness and increase in redness over storage, and Y-NP and Y-NE presented higher intensity in color b^* than CY, due to the zeaxanthin color. Additionally, acidity changes during storage can contribute to carotenoids release to yogurt matrix, which also may have increased a^* values (Estrada, Boeneke C Fau - Bechtel, Bechtel P Fau - Sathivel, & Sathivel, 2011). Considering the coloring capacity of zeaxanthin, the nanoparticles can be incorporated as a natural dye in yogurt.

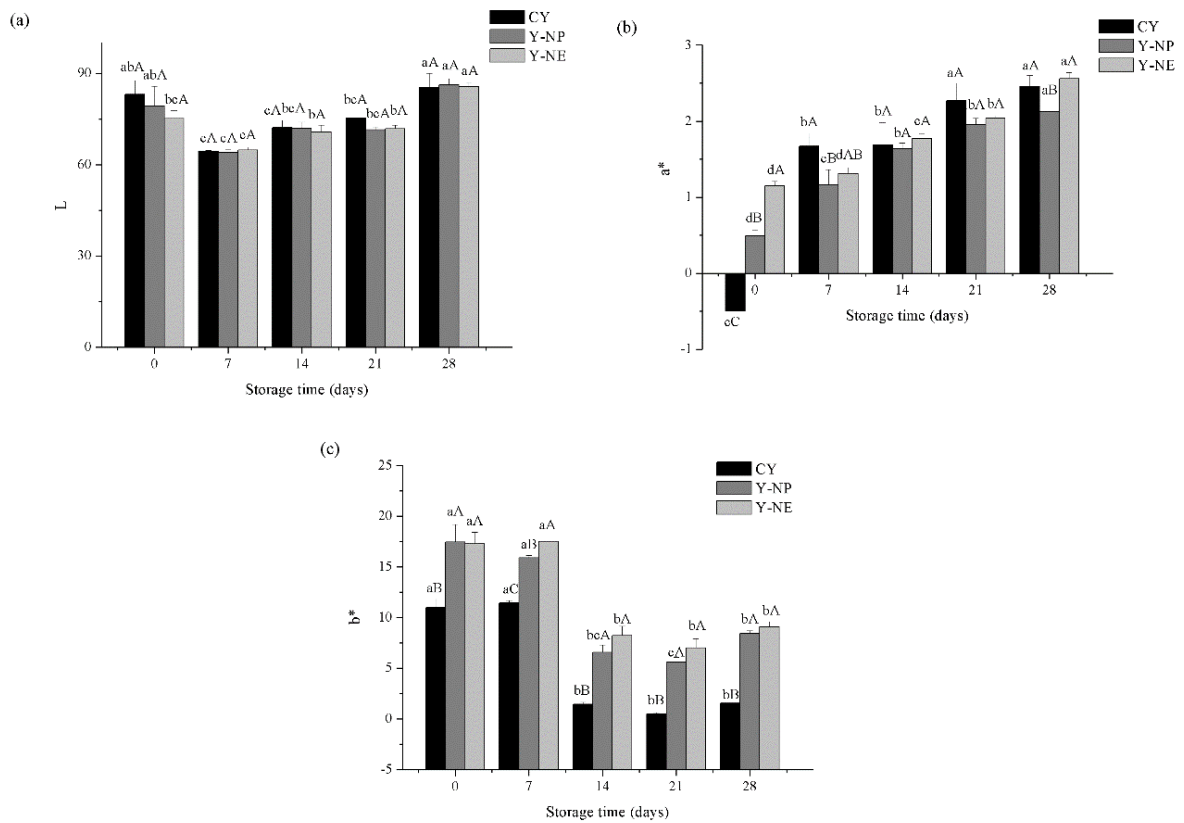


Fig. 2 Color parameters of CY, Y-NE, and Y-NP during 28 days of storage at 4 °C. (a) L values (lightness), (b) a* (red-green intensity), (c) b* (yellow-blue intensity).

The bars with different lowercase letters differ significantly due to storage time for the CY, Y-NP, and Y-NE ($p < 0.05$); the bars with different uppercase letters differ significantly between CY, Y-NP and Y-NE on each day of storage.

3.3 Texture analyses

The CY showed high firmness and consistency than Y-NP and Y-NE (Table 1). The addition of Zea-NP and Zea-NE in yogurt promoted a decrease in firmness and consistency due to the water content and zeaxanthin extract present in the nanoparticles and nanoemulsion formulation. Andino (2011) also observed a decrease in firmness in yogurts fortified with ω -3 microcapsules.

An increase in these parameters over storage time was observed for all the samples, and may be attributed to the decrease in whey separation, resulting from the rearrangement of the yogurt structure during storage (Tan et al., 2018). In this study, as discussed previously in section 3.1, the extent of syneresis decreased over storage time, which may have contributed to the increase in firmness and consistency.

Table 1. Texture parameters for control yogurt (CY), yogurt with nanoparticles (Y-NP) and yogurt with nanoemulsion (Y-NE), during 28 days of storage at 4 °C.

Parameters	Storage			
	time (days)	CY	Y-NP	Y-NE
Firmness (g)	0	96.29 ± 5.94 ^{ca}	38.83 ± 0.35 ^{cb}	37.58 ± 0.99 ^{cb}
	7	105.92 ± 6.13 ^{bcA}	49.74 ± 2.99 ^{bb}	44.91 ± 3.45 ^{bcB}
	14	112.80 ± 0.41 ^{bcA}	50.56 ± 2.11 ^{bb}	46.43 ± 2.91 ^{bb}
	21	128.06 ± 5.21 ^{aa}	58.75 ± 3.76 ^{ab}	52.16 ± 2.94 ^{bb}
	28	132.15 ± 4.47 ^{aa}	61.32 ± 1.33 ^{ab}	61.81 ± 4.38 ^{ab}
Consistency (g.s)	0	142.26 ± 10.81 ^{ca}	68.95 ± 0.97 ^{cb}	70.20 ± 0.29 ^{db}
	7	168.72 ± 5.11 ^{ba}	87.51 ± 4.35 ^{abB}	80.38 ± 5.17 ^{bcB}
	14	129.05 ± 6.91 ^{ca}	78.63 ± 5.15 ^{bcB}	71.53 ± 2.79 ^{cdB}
	21	187.30 ± 5.31 ^{aa}	94.61 ± 3.38 ^{ab}	86.72 ± 3.03 ^{abB}
	28	180.10 ± 10.91 ^{abA}	91.49 ± 2.99 ^{ab}	93.79 ± 5.13 ^{ab}

The results are represented as the means ± standard deviation (n=3).

Values within each line with the same uppercase letter and values within each column with the same lowercase are not significantly different ($p > 0.05$).

3.4 Viscosity

The viscosity of yogurts is dependent of starter inoculation and its concentration, handling, and storage (Robertson et al., 2016). The developed yogurts showed non-Newtonian behavior and the addition of Zea-NP and Zea-NE significantly reduced the viscosity (Fig. 3). Considering that the nanoparticles and nanoemulsion were incorporated under stirring, the increase in shear stress may have caused a decrease in viscosity of Y-NP and Y-NE. This result corroborates with those obtained by Mohammadi-Gouraji et al. (2018), who observed an decrease in viscosity of yogurts containing phycocyanin extract.

However, the viscosity of CY and Y-NE yogurt increased over storage and decrease on day 28, while the Y-NP presented an increase in viscosity after the first day of storage, that remained constantly until the end of storage period. This results corroborate with the findings reported by Robertson et al. (2016), who developed yogurt containing lipid extract from microalga and observed that the control yogurt presented a decrease in viscosity at the end of storage time, while yogurt with 0.5 % of microalga extract presented an increase on day 28.

The viscosity depends on the gel structure of the yogurt matrix, that can be rearranged throughout storage (Tan et al., 2018), which can explain the higher viscosity of yogurt samples. Furthermore, the increase in viscosity may prevent damages in the structure and texture of the yogurt matrix. In this way, the Zea-NP addition in yogurt promoted better viscosity behavior than Zea-NE, due to its ability to maintain viscosity throughout storage, suggesting a promising application in food.

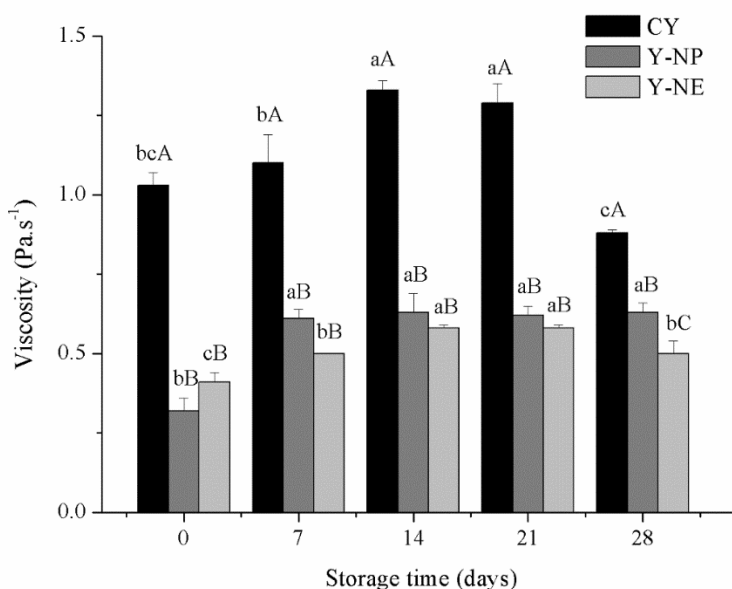


Fig. 3 Viscosity (Pa.s⁻¹) of CY, Y-NE, and Y-NP during 28 days of storage at 4 °C.

The bars with different lowercase letters differ significantly due to storage time for the CY, Y-NP, and Y-NE ($p < 0.05$); the bars with different uppercase letters differ significantly between CY, Y-NP and Y-NE on each day of storage.

3.5 Zeaxanthin retention

The zeaxanthin retention (%) in yogurt samples decreased over 28 days of storage (Fig. 4). However, Y-NP showed higher carotenoid retention than Y-NE in all days of storage, and at the end of the four-week storage, the zeaxanthin retention in Y-NP was 22.31 % and 16.84 % in Y-NE. These results are in accordance with Ghorbanzade et al. (2017), who studied the stability of free fish oil and nanoencapsulated fish oil in yogurt and verified that the yogurt with nanoencapsulated fish oil had higher retention of C ω -3 fatty acids. Tan et al. (2018), applied tocotrienol microcapsules in yogurt and compared its stability with tocotrienol in bulk oil, and observed that the microencapsulated compound was more stable during four-week storage.

De Campo et al. (2018) studied Zea-NP stability under different temperatures (4, 25 and 40 °C) for 28 days, and observed that at 4 °C, Zea-NP showed high carotenoid stability and its physicochemical properties did not change during storage, which indicated its high potential to be applied in food stored at this temperature.

From the results of this study it was possible to observe that Zea-NP maintained its capacity to protect zeaxanthin from degradation when applied in yogurt during storage at 4 °C in the presence of light. Thus, Zea-NP is a promising alternative to allow the incorporation of zeaxanthin in yogurt and maintain higher carotenoid concentration during storage, enhancing its nutritional value.

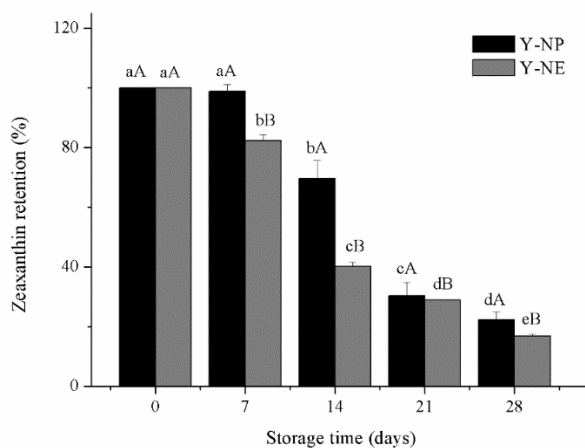


Fig 4. Zeaxanthin retention (%) in Y-NP and Y-NE during 28 days of storage at 4 °C.

The bars with different lowercase letters differ significantly due to storage time for the CY, Y-NP, and Y-NE ($p < 0.05$); the bars with different uppercase letters differ significantly between CY, Y-NP and Y-NE on each day of storage.

3.6 Yogurt morphology

The morphology of CY, Y-NP and Y-NE was shown in Fig. 5a, 5b and 5c, respectively. As can be observed, the TEM analysis confirmed the presence of Zea-NP and Zea-NE in yogurt samples.

Yogurt generally presents dense protein aggregates, generated by the collisions and shearing during the mixing process (W. J. Lee & Lucey, 2006), where fat globules merge with casein into large aggregates. The dark areas observed in TEM image of CY correspond to the

protein structure of yogurt and the small size structures observed in yogurt samples are related to fat globules, that are characteristic of dairy products, like yogurt (Tamime, Hassan, Farnworth & Toba, 2007).

Andino (2011), microencapsulated fish oil with gum arabic and maltodextrin as wall material, applied the obtained microcapsules in yogurt and subsequently verified the presence of microparticles. The TEM images revealed the presence of dark areas in yogurt, fat globules and the microparticles were also visualized in yogurt matrix, like the results found in this study.

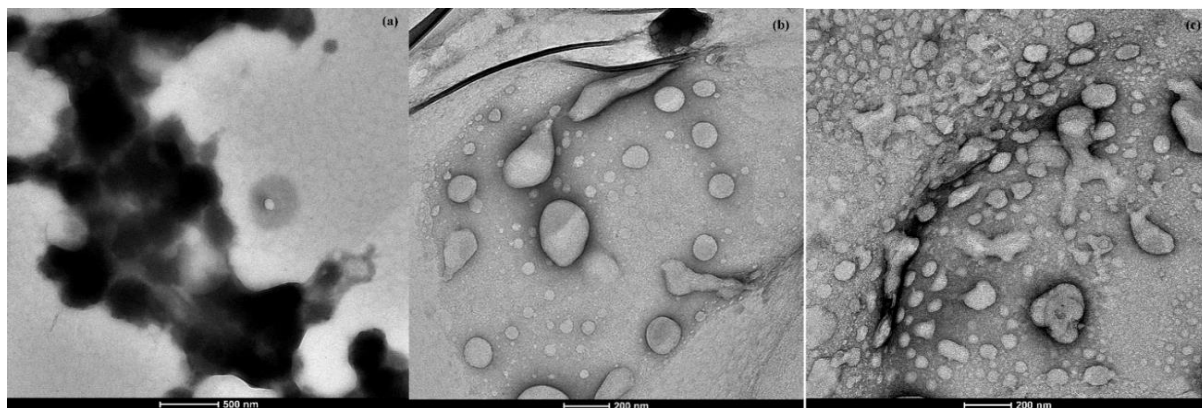


Fig. 5 TEM images of CY (a), Y-NP (b) and Y-NE (c) at 13500 x (a) and 26500 x (b,c) magnification [bar 500 nm (Fig 5a) and 200 nm (Fig 5b and 5c)].

As can be observed, the Zea-NP presented well defined spherical form and homogeneous structure even incorporated in yogurt matrix. Moreover, the estimated particle size was close to 200 nm, evidencing that Zea-NP can be incorporated in yogurt, without affecting its mean diameter. For Zea-NE, the TEM images showed a heterogeneous distribution in yogurt matrix and some agglomerations with yogurt constituents.

3.7 Sensory analyses

The scores obtained from sensory analyses are shown in Fig. 6. The addition of Zea-NP did not affected the appearance, color, flavor, consistency and texture. For taste, aftertaste and overall acceptability of Y-NP were given notes “neither liked nor disliked”, which is considered a satisfactory evaluation, considering that is the first time that Zea-NP is added in a food matrix, and if some healthy foods, generally are poor in taste. Furthermore, there is no difference for Y-NP and Y-NE regarding these attributes.

Habibi, Keramat, Hojjatoleslami, & Tamjidi (2017), prepared fish oil microcapsules and used them in pomegranate juice fortification and related that the addition of microcapsules

resulted in decrease of overall acceptability regarding odor and flavor. Similarly, Baba et al. (2018), developed yogurts fortified with walnut and flaxseed oil emulsions in guar gum, and observed that the addition of these oils reduced color, appearance, thickness, flavor, taste and overall acceptability of yogurt samples.

The optimization of Y-NP is feasible to improve the taste and aftertaste, and an alternative for this purpose is the drying of Zea-NP by spray dryer. Ilyasoglu & El (2014) developed freeze-dried nanoparticles of EPA + DHA and applied in fruit juice and observed that the juices containing different concentrations of nanoparticles showed good sensory acceptance.

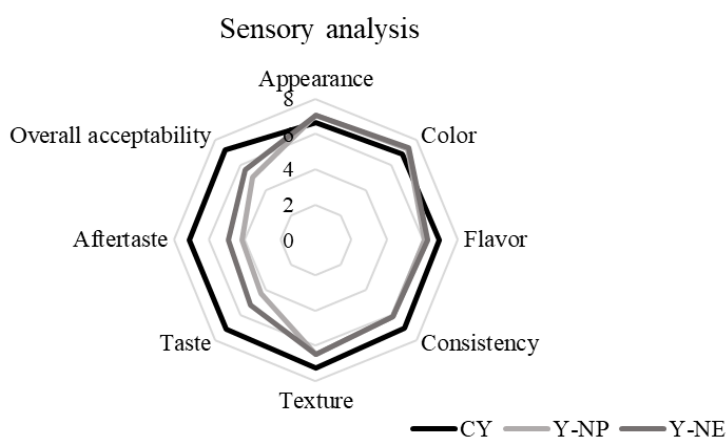


Fig. 6 Sensory analyses scores for appearance, color, flavor, consistency, texture, taste, aftertaste and overall acceptability of CY, Y-NP and Y-NE.

3.8 Zeaxanthin bioaccessibility after *in vitro* digestion

The zeaxanthin concentration incorporated into the micellar phase was 1.33 ± 0.03 and 1.67 ± 0.09 $\mu\text{g/mL}$ for Y-NP and Y-NE, respectively, and bioaccessibility after *in vitro* digestion was 3.66 ± 0.07 % for Y-NP and 4.46 ± 0.25 % for Y-NE. According to the results, at the end of the digestion, zeaxanthin concentration into micelles and bioaccessibility was significantly higher in Y-NE than in Y-NP. Similar findings were reported by Donhowe, Flores, Kerr, Wicker, & Kong (2014) who evaluated the influence of microencapsulation on the *in vitro* release of β -carotene. The authors reported that microencapsulated β -carotene showed significantly lower bioaccessibility than free β -carotene and attributed this result to the soluble fibers present in gelatin (utilized as wall material in microencapsulation) which formed bonds with bile salts, reducing the carotenoid release and micelle formation.

The lower zeaxanthin concentration and bioaccessibility in Y-NP suggest that cactus mucilage was not totally hydrolyzed by the enzymes over the digestion process. The lowest amount of zeaxanthin from Y-NP incorporated into micelles, suggest that cactus mucilage, utilized as structuring material in nanoparticles obtention, was resistant to changes in pH and enzymatic degradation, which occurs in the digestion and may have promoted a controlled release of zeaxanthin. Similar findings were obtained by Timilsena, Adhikari, Barrow, & Adhikari (2017), for chia seed oil microencapsulated in chia seed mucilage-chia protein complex coacervates. The authors related that lowest amount of chia oil was released from the microcapsules with chia mucilage and chia protein as wall material than from the unencapsulated chia oil and microcapsules with chia protein as wall material.

According to Zhang et al. (2016), dietary fibers are digested by bacteria in the colon and not in the upper gastrointestinal tract. Thus, dietary fibers present in cactus mucilage can contribute to decreasing the bioaccessibility after digestion. Amyoony (2013), studied the bioaccessibility of free β -carotene and β -carotene emulsions with guar gum and concluded that the emulsions with guar gum retarded the diffusion, decreasing lipolysis and bioaccessibility. Gómez-Mascaraque, Perez-Masiá, González-Barrio, Periago, & López-Rubio (2017), evaluated the micellar phase after *in vitro* digestion of β -carotene microcapsules and obtained lower carotenoid bioaccessibility (0.03 – 0.05 %) than those found in this study.

Several factors can influence the effectiveness of carotenoids micellarization in the intestinal phase, including physicochemical properties, composition and interaction with other compounds of food matrix, such as proteins, lipids and fibers (Xavier, Carvajal-Lérida, Garrido-Fernández, & Pérez-Gálvez, 2018), which can affect the digestion behavior and reduce the carotenoids release from food, and consequently, its bioaccessibility (Donhowe et al., 2014).

As carotenoids are hydrophobic compounds, its dispersion in an oil phase is necessary. The chain length and saturation degree of fatty acids can influence on its incorporation into micelles, which impact on bioaccessibility (Gómez-Mascaraque et al., 2017). In addition, the wall material utilized in encapsulation also have influence on bioaccessibility (Comunian et al., 2017; Lin, Liang, Williams, & Zhong, 2018).

Donhowe et al. (2014) evaluated the bioaccessibility of microencapsulated and free β -carotene in yogurt and pudding. The authors reported that the incorporation of microencapsulated and free β -carotene into micelles was lower in yogurt (0.8 and 5.5 %) than in pudding (13.1 and 17 %), which implies that food matrix significantly influenced on decrease the carotenoid content in micellar phase.

Soluble proteins can decrease carotenoid incorporation in oil, decreasing release from the food matrix (Rich et al., 2003). In this study, the high soluble proteins content in yogurt, attributed to the proteins present in milk and skim powdered milk, may have formed bonds with bile salts during *in vitro* digestion, what makes difficult the carotenoid transference to the oil phase and micelle formation, decreasing bioaccessibility.

Roman, Burri Bj Fau - Singh, & Singh (2012), incorporated β -carotene microcapsules in almond butter and determined the β -carotene incorporation into micelles after release. The obtained result was lower than those obtained in this study (0.35 ± 0.1 %).

4 Conclusion

The results from this study demonstrated that nanoparticles addition in yogurt matrix decreased pH and increased acidity at the end of storage time. Moreover, Zea-NP incorporation in yogurt decreased texture and viscosity and increased syneresis, when compared to the CY. However, these modifications are not visually perceived during storage and in sensory analysis. Furthermore, the high zeaxanthin retention in Y-NP is indicative of nanoparticles efficiency to protect the carotenoid from degradation and guarantee its stability during storage time, when incorporated in yogurt matrix. Despite the lower bioaccessibility of zeaxanthin in Y-NP in comparison with Y-NE, the use of Zea-NP still present advantages, due to the greater stability conferred to the carotenoid. Moreover, the zeaxanthin bioaccessibility in Y-NP suggest that Zea-NP promoted a controlled release of the carotenoid in yogurt.

The results from this study could be useful to the development of enriched food with nanoparticles. However, further studies are required to improve the taste and aftertaste of Y-NP, to increase its acceptability.

Acknowledgements

The authors are thankful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) for the financial support provided for this research. The authors are also grateful to Letícia Scherer Koester and Tainá Kreutz for the assistance in the use of the high pressure homogenizer.

5 References

- Aguiar, J., Estevinho, B. N., & Santos, L. (2016). Microencapsulation of natural antioxidants for food application – The specific case of coffee antioxidants – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 21-39. doi: [10.1016/j.tifs.2016.10.012](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.012).
- Amyoony, J. (2013). *The Influence of Guar Gum on Lipid Emulsion Digestion and Beta-Carotene Bioaccessibility*. The University of Guelph, Canada.
- Andino, J. D. E. (2011). *Production and processing of a functional yogurt fortified with microencapsulated omega-3 and vitamin E*. (Master of Science), Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- AOAC. (2005). **Official methods of analysis**. In. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Aryana, K. J., Barnes, H. T., Emmick, T. K., McGrew, P., & Moser, B. (2006). Lutein Is Stable in Strawberry Yogurt and Does Not Affect its Characteristics. *Journal of Food Science*, 71 (6), S467-S472. doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00080.x.
- Baba, W. N., Jan, K., Punoo, H. A., Wani, T. A., Dar, M. M., & Masoodi, F. A. (2018). Techno-functional properties of yoghurts fortified with walnut and flaxseed oil emulsions in guar gum. *LWT*, 92, 242-249. doi:[10.1016/j.lwt.2018.02.007](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.007).
- Comunian, T. A., Chaves, I. E., Thomazini, M., Moraes, I. C. F., Ferro-Furtado, R., de Castro, I. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2017). Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. *Food Chemistry*, 237, 948-956. doi: [10.1016/j.foodchem.2017.06.071](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.071).
- de Campo, C., Dick, M., Pereira dos Santos, P., Haas Costa, T. M., Paese, K., Stanisçuaski Guterres, S., Hickmann Flôres, S. (2018). Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: Characterization and stability evaluation under different temperatures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 558, 410-421. doi:[10.1016/j.colsurfa.2018.09.009](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.009).
- de Campo, C., dos Santos, P. P., Costa, T. M. H., Paese, K., Guterres, S. S., Rios, A. d. O., & Flôres, S. H. (2017). Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 234, 1-9. doi:[10.1016/j.foodchem.2017.04.153](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.153).
- Donhowe, E. G., Flores, F. P., Kerr, W. L., Wicker, L., & Kong, F. (2014). Characterization and in vitro bioavailability of β -carotene: Effects of microencapsulation method and

- food matrix. *LWT - Food Science and Technology*, 57 (1), 42-48. doi:[10.1016/j.lwt.2013.12.037](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.037).
- Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 652, 18-26. doi:[10.1016/j.abb.2018.06.001](https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001).
- Estrada, J. D., Boeneke C Fau - Bechtel, P., Bechtel P Fau - Sathivel, S., & Sathivel, S. (2011). Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. *Journal of Dairy Science*, 94 (12), 5760-5769. doi: [10.3168/jds.2011-4226](https://doi.org/10.3168/jds.2011-4226).
- Everett, D. W., & McLeod, R. E. (2005). Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 15(11), 1175-1183. doi:[10.1016/j.idairyj.2004.12.004](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.12.004).
- Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146-152. doi:[10.1016/j.foodchem.2016.08.022](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.022).
- Goyal, A., Sharma, V., Sihag, M. K., Singh, A. K., Arora, S., & Sabikhi, L. (2016). Fortification of dahi (Indian yoghurt) with omega-3 fatty acids using microencapsulated flaxseed oil microcapsules. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (5), 2422-2433. doi: 10.1007/s13197-016-2220-1.
- Gómez-Mascaraque, L. G., Perez-Masiá, R., González-Barrio, R., Periago, M. J., & López-Rubio, A. (2017). Potential of microencapsulation through emulsion-electrospraying to improve the bioaccessibility of β -carotene. *Food Hydrocolloids*, 73, 1-12. doi:[10.1016/j.foodhyd.2017.06.019](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.019).
- Habibi, A., Keramat, J., Hojjatoleslami, M., & Tamjidi, F. (2017). Preparation of Fish Oil Microcapsules by Complex Coacervation of Gelatin–Gum Arabic and their Utilization for Fortification of Pomegranate Juice. *Journal of Food Process Engineering*, 40 (2), e12385. doi:10.1111/jfpe.12385
- Ilyasoglu, H., & El, S. N. (2014). Nanoencapsulation of EPA/DHA with sodium caseinate–gum arabic complex and its usage in the enrichment of fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 56 (2), 461-468. doi:[10.1016/j.lwt.2013.12.002](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.002).
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2006). Impact of Gelation Conditions and Structural Breakdown on the Physical and Sensory Properties of Stirred Yogurts. *Journal of Dairy Science*, 89 (7), 2374-2385. doi:[10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72310-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72310-4).
- Lee, W. J., Lucey, J.A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian Australasian Association of Animal Production Societies*, 23 (9), 1127-1136. doi:10.5713/ajas.2010.r.05.

- Lin, Q., Liang, R., Williams, P. A., & Zhong, F. (2018). Factors affecting the bioaccessibility of β -carotene in lipid-based microcapsules: Digestive conditions, the composition, structure and physical state of microcapsules. *Food Hydrocolloids*, 77, 187-203. doi:[10.1016/j.foodhyd.2017.09.034](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.034).
- Medeiros, A. K. d. O. C., Gomes, C. d. C., Amaral, M. L. Q. d. A., Medeiros, L. D. G. d., Medeiros, I., Porto, D. L., Passos, T. S. (2019). Nanoencapsulation improved water solubility and color stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.). *Food Chemistry*, 270, 562-572. doi:[10.1016/j.foodchem.2018.07.099](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.099).
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (2006). *Sensory Evaluation Techniques, Fourth Edition*: Taylor & Francis.
- Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2017). Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 174 (11), 1290-1324. doi: 10.1111/bph.13625.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5 (6), 1113-1124. doi:10.1039/C3FO60702J.
- Mohammadi-Gouraji, E., Soleimani-Zad, S., & Ghiaci, M. (2018). Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. *LWT*. doi:[10.1016/j.lwt.2018.09.057](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.057).
- Rich, G. T., Bailey Al Fau - Faulks, R. M., Faulks Rm Fau - Parker, M. L., Parker ML Fau - Wickham, M. S. J., Wickham Ms Fau - Fillery-Travis, A., & Fillery-Travis, A. (2003). Solubilization of carotenoids from carrot juice and spinach in lipid phases: I. Modeling the gastric lumen. *Lipids*, 38 (9), 933-945. doi:10.1007/s11745-003-1147-0.
- Robertson, R. C., Gracia Mateo, M. R., O'Grady, M. N., Guihéneuf, F., Stengel, D. B., Ross, R. P., Stanton, C. (2016). An assessment of the techno-functional and sensory properties of yoghurt fortified with a lipid extract from the microalga *Pavlova lutheri*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 237-246. doi:[10.1016/j.ifset.2016.03.017](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.017).
- Roman, M. J., Burri Bj Fau - Singh, R. P., & Singh, R. P. (2012). Release and bioaccessibility of beta-carotene from fortified almond butter during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (38), 9659-9666. doi: 10.1021/jf302843w.
- Taksima, T., Limpawattana, M., & Klaypradit, W. (2015). Astaxanthin encapsulated in beads using ultrasonic atomizer and application in yogurt as evaluated by consumer sensory

- profile. *LWT - Food Science and Technology*, 62 (1, Part 2), 431-437. doi:[10.1016/j.lwt.2015.01.011](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.011).
- Tamime, A., Y., Hassan, A., Farnworth, E., Toba, T. (2007). Structure of Fermented Milks. In A. Tamime (Ed.), *Structure of Dairy Products* (pp. 134-164). Oxford: Blackwell Publishing.
- Tan, P. Y., Tan, T. B., Chang, H. W., Tey, B. T., Chan, E. S., Lai, O. M., Tan, C. P. (2018). Effects of storage and yogurt matrix on the stability of tocotrienols encapsulated in chitosan-alginate microcapsules. *Food Chemistry*, 241, 79-85. doi: [10.1016/j.foodchem.2017.08.075](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.075).
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2017). Digestion behaviour of chia seed oil encapsulated in chia seed protein-gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 66, 71-81. doi:[10.1016/j.foodhyd.2016.12.017](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.017).
- Toniazzo, T., Berbel, I. F., Cho, S., Fávares-Trindade, C. S., Moraes, I. C. F., & Pinho, S. C. (2014). β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 59 (2, Part 2), 1265-1273. doi:[10.1016/j.lwt.2014.05.021](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.021).
- Verkempinck, S. H. E., Salvia-Trujillo, L., Moens, L. G., Charleer, L., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E., & Grauwet, T. (2018). Emulsion stability during gastrointestinal conditions effects lipid digestion kinetics. *Food Chemistry*, 246, 179-191. doi:[10.1016/j.foodchem.2017.11.001](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.001).
- Xavier, A. A. O., Carvajal-Lérída, I., Garrido-Fernández, J., & Pérez-Gálvez, A. (2018). In vitro bioaccessibility of lutein from cupcakes fortified with a water-soluble lutein esters formulation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 60-64. doi:[10.1016/j.jfca.2017.01.015](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.015).
- Xavier, A. A. O., Mercadante, A. Z., Garrido-Fernández, J., & Pérez-Gálvez, A. (2014). Fat content affects bioaccessibility and efficiency of enzymatic hydrolysis of lutein esters added to milk and yogurt. *Food Research International*, 65, 171-176. doi:[10.1016/j.foodres.2014.06.016](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.016).
- Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., Chen, L., Ahmed, Y., Al Bishri, W., McClements, D. J. (2016). Encapsulation of curcumin in polysaccharide-based hydrogel beads: Impact of bead type on lipid digestion and curcumin bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, 58, 160-170. doi:[10.1016/j.foodhyd.2016.02.036](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.036).

CAPÍTULO 6- DISCUSSÃO GERAL

Ácidos graxos poli-insaturados e compostos bioativos têm sido cada vez mais explorados devido aos benefícios que conferem à saúde humana. Esses compostos são conhecidos por possuir atividade antioxidante e reduzir o risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer, atuando na manutenção da saúde. Devido a isso, a busca por alimentos ricos nesses compostos tem aumentado significativamente.

Porém, a incorporação destes compostos em alimentos possui alguns fatores limitantes, visto que devido às características de sua própria natureza, apresentam sensibilidade à degradação/oxidação quando expostos à luz, calor e oxigênio, além de sua maioria ser insolúvel ou pouco solúvel em água, o que muitas vezes inviabiliza sua incorporação/dispersão em alimentos.

Sendo assim, novas tecnologias devem ser empregadas e investigadas a fim de solucionar ou minimizar tais limitações. Nesse contexto, a nanotecnologia tem sido explorada como uma alternativa para aumentar a estabilidade de compostos bioativos frente ao processamento e armazenamento de alimentos, a fim de possibilitar o enriquecimento de produtos alimentícios, aumentando o seu valor agregado. Além disso, outra vantagem do nanoencapsulamento é de que a tecnologia pode conferir liberação controlada de compostos bioativos no trato gastrointestinal.

No intuito de oferecer produtos mais naturais e mais seguros para os consumidores, estudos recentes demonstraram que os polímeros sintéticos comumente utilizados no nanoencapsulamento têm sido substituídos por polímeros naturais. Dentre esses, as mucilagens se destacam por serem polissacarídeos encontrados na natureza, em sua maioria de fácil obtenção e baixo custo. Além disso, por serem biopolímeros naturais, não apresentam riscos para a saúde humana. Alguns estudos já relataram o uso da mucilagem da chia e da mucilagem de cladódio de cacto como material de parede no microencapsulamento (Timilsena *et al.*, 2016; Bustamante *et al.*, 2017; Otálora *et al.*, 2015). No entanto, até então não haviam estudos que relatassem seu uso no nanoencapsulamento, o que justifica o objetivo principal deste trabalho.

Nesse sentido, a fim de explorar o uso de mucilagens como material estruturante e avaliar sua eficácia no nanoencapsulamento de óleos e carotenoides, nanopartículas de óleo de chia e nanopartículas de zeaxantina foram obtidas utilizando mucilagem de chia e mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*) como material estruturante, respectivamente.

A influência de diferentes concentrações do óleo e da mucilagem de chia foram investigadas em testes preliminares e as concentrações de mucilagem de cacto e óleo de chia através de planejamento experimental, no intuito de definir a melhor proporção entre os constituintes das nanopartículas, a fim de formar um sistema nanométrico estável e com a proporção ideal entre material de parede e composto encapsulado.

A partir dos estudos realizados, verificou-se que ambas as nanopartículas desenvolvidas apresentaram tamanho de partícula na escala nanométrica, com distribuição homogênea, que foi confirmada pelo valor de span e microscopia eletrônica de transmissão, onde foi possível visualizar o formato esférico e ausência de agregação entre as partículas em suspensão. Além disso, as nanopartículas apresentaram comportamento Newtoniano e alta eficiência de encapsulação, características positivas para aplicação tecnológica. As análises térmicas indicaram que as nanopartículas apresentaram resistência térmica em torno de 300 °C e a interação entre a mucilagem e o composto encapsulado foi evidenciada pela análise de FT-IR em ambos os estudos. Esses resultados sugerem que as mucilagens utilizadas nesse estudo foram capazes de formar sistemas nanométricos com características satisfatórias, conferindo potencial para as nanopartículas serem aplicadas em alimentos. Sendo assim, as mucilagens estudadas podem ser utilizadas para substituir polímeros sintéticos.

Além disso, os sistemas nanométricos obtidos foram eficazes em proteger os compostos contra a degradação durante o armazenamento, conforme comprovado através das análises de estabilidade. Para as nanopartículas de óleo de chia, após 28 dias de armazenamento em condições aceleradas, foi verificado que o valor de span e potencial zeta não se alteraram, enquanto que o diâmetro da partícula apresentou um aumento somente ao final do período de armazenamento. Apesar de ter ocorrido diminuição do pH ao longo do armazenamento, as nanopartículas apresentaram maior estabilidade do que a emulsão. A estabilidade ficou evidenciada pelo maior conteúdo de ácidos graxos presente nas nanopartículas durante os 28 dias de armazenamento em condições aceleradas (40 °C). Desta maneira, a mucilagem da chia exerceu efeito protetor sobre o óleo de chia, diminuindo sua oxidação, o que indica seu potencial uso no nanoencapsulamento.

Quanto à estabilidade das nanopartículas de zeaxantina em diferentes temperaturas, foi observado que nas temperaturas de 25 e 40 °C, houve um aumento no diâmetro após o primeiro dia de armazenamento, que permaneceu inalterado até o fim do período. Já o valor de span, pH e parâmetros de cor permaneceram constantes ao longo dos 28 dias para as nanopartículas, porém para a nanoemulsão foram observadas alterações, o que indica que o carotenoide ficou mais suscetível aos efeitos da luz, calor e oxigênio. Além disso, os resultados também

demonstraram que as nanopartículas apresentaram maior retenção de zeaxantina do que a nanoemulsão nas diferentes temperaturas de armazenamento avaliadas. Ainda, na temperatura de 4 °C a retenção do carotenoide foi maior e não houve modificação no diâmetro das nanopartículas. Assim, estes resultados estão relacionados ao efeito protetor da mucilagem de cacto, que protegeu o carotenoide ao longo do armazenamento, diminuindo sua degradação em diferentes temperaturas.

No intuito de avaliar o comportamento das nanopartículas quando incorporadas a uma matriz alimentar e considerando o potencial de aplicação da zeaxantina em alimentos, por ser um carotenoide que auxilia na redução do risco de desenvolvimento de doenças oculares e possui cor alaranjada intensa, podendo atuar também como corante natural, as nanopartículas de zeaxantina foram selecionadas para aplicação em um alimento rico em água. Sendo assim, o iogurte foi a matriz alimentícia escolhida para aplicação, por ser um produto que geralmente é bem aceito e amplamente consumido por pessoas de diferentes idades. Nesse contexto, três formulações de iogurte foram desenvolvidas: iogurte controle (CY), iogurte com adição de nanopartículas (Y-NP) e iogurte com adição de nanoemulsão (Y-NE).

A partir das análises físico-químicas, os resultados demonstraram que a adição de nanopartículas no iogurte resultou em um aumento da sinérese e diminuição da viscosidade, porém tais alterações não foram perceptíveis sensorialmente, conforme os dados obtidos na análise sensorial, que demonstrou que não houve diferença entre as amostras em relação aos parâmetros aparência, cor, aroma, consistência e textura. No entanto, em relação aos atributos sabor, sabor residual e aceitação global Y-NP e Y-NE receberam notas como “gostei levemente”. Quanto à retenção de zeaxantina, Y-NP apresentou maior concentração do carotenoide ao longo do armazenamento. Em relação a bioacessibilidade da zeaxantina após a digestão *in vitro*, verificou-se que Y-NP apresentou menores valores do que Y-NE, o que indica que as nanopartículas possivelmente promoveram uma liberação controlada do composto.

A partir deste estudo foi possível perceber que a adição das nanopartículas não causou alterações visuais no iogurte, e além disso conferiram uma maior proteção ao carotenoide zeaxantina ao longo dos 28 dias de armazenamento. Desta maneira, apesar da bioacessibilidade do carotenoide ter sido menor em Y-NP, a incorporação de Zea-NP em alimentos ainda apresenta vantagem por conferir maior proteção ao composto encapsulado, o que garante maior vida útil.

CAPÍTULO 7 - CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram que tanto a mucilagem de chia (*Salvia hispanica* L.) como a mucilagem do cladódio de cacto (*Opuntia monacantha*), representam grande potencial para substituir polímeros sintéticos no nanoencapsulamento. A eficácia das mucilagens como material estruturante foi comprovada, devido às características satisfatórias obtidas na caracterização das nanopartículas, como tamanho nanométrico, alta eficiência de encapsulação e maior estabilidade frente a fatores externos como luz, oxigênio e temperatura. Tais resultados indicam que as mucilagens estudadas são capazes de proteger óleos e carotenoides contra degradação e oxidação, o que proporciona aumento de sua vida útil.

Além disso, através do nanoencapsulamento, foi possível aplicar um composto hidrofóbico em uma matriz alimentícia rica em água (iogurte), o que comprova a aplicação tecnológica das nanopartículas de zeaxantina. Entretanto, a fim de melhorar os atributos sensoriais e diminuir a influência nas propriedades de textura e viscosidade, sugere-se a secagem das nanopartículas por spray-dryer. Além disso, novos ensaios da digestão *in vitro* devem ser realizados, a fim de averiguar com maior clareza o seu comportamento no trato gastrointestinal e de determinar se as nanopartículas fornecem liberação controlada ao composto em todas as etapas da digestão.

De um modo geral, conforme os resultados obtidos, evidenciou-se que a nanoencapsulamento utilizando mucilagens como material estruturante representa potencial para proteger compostos suscetíveis a degradação, além de viabilizar a incorporação de compostos insolúveis em água em alimentos. Além disso, através do nanoencapsulamento com polímeros naturais, é possível expandir a aplicação tecnológica desses compostos e aumentar sua gama de aplicação em diferentes alimentos.

CAPÍTULO 8 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras podemos considerar:

- Aplicação das nanopartículas de óleo de chia em alimentos;
- Secagem das nanopartículas de óleo de chia e zeaxantina por *spray-dryer*, a fim de verificar suas características;
- Aplicação das nanopartículas secas por *spray-dryer* em outros tipos de alimentos;
- Avaliação da liberação das nanopartículas em todas as etapas da digestão e em tempos pré-determinados;
- Avaliação da toxicidade das nanopartículas *in vivo*, através do uso do nematoide *C.elegans*;
- Avaliação do comportamento das nanopartículas quando aplicadas em alimentos que passarão por processos, simulando as condições da indústria.