



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**NÁGELA MARTINS OLIVEIRA AGUIAR**

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE  
EXTRATO DO URUCUM NANOENCAPSULADO EM GOMA DO CAJUEIRO**

**FORTALEZA**

**2013**

**NÁGELA MARTINS OLIVEIRA AGUIAR**

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE  
EXTRATO DO URUCUM NANOENCAPSULADO EM GOMA DO CAJUEIRO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de atuação: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- A227o Aguiar, Nágela Martins Oliveira.  
Obtenção, caracterização e avaliação da estabilidade de extrato do urucum nanoencapsulado em goma do cajueiro / Nágela Martins Oliveira Aguiar. – 2013.  
77 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
Orientação: Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo.
1. Urucum. 2. Nanotecnologia. 3. Goma do cajueiro. I. Título.

**NÁGELA MARTINS OLIVEIRA AGUIAR**

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE  
EXTRATO DO URUCUM NANOENCAPSULADO EM GOMA DO CAJUEIRO**

Dissertação de Mestrado apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Dissertação aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Haroldo César Beserra de Paula  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Dra. Maria Leônia da Costa Gonzaga  
Universidade Federal do Ceará- UFC

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Lucicléia B. de Vasconcelos Torres  
Universidade Federal do Ceará- UFC

A Deus, sem o qual nada seria possível!

Aos meus pais Carlos e Fátima; aos meus irmãos Alex e Emanuel, pelo apoio e amor  
incondicional!

Ao meu esposo Sérgio, por todo amor, incentivo, carinho, paciência e toda  
ajuda quanto precisei!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força, por não me deixar ser abatida pelas dificuldades e por ter permitido que eu alcançasse o meu objetivo.

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado e deste trabalho.

À CAPES pela bolsa e pelo apoio financeiro concedido.

Ao meu orientador Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo pela orientação, confiança, paciência e preocupação que foram importantes para a realização e concretização deste trabalho e para minha formação profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Beltrão Lessa Constant pela orientação, dedicação, ensinamentos e apoio durante todo este trabalho.

À banca pelas correções, sugestões e críticas importantes para a melhoria desse trabalho.

Ao meu esposo Sérgio, companheiro e amigo, pelo apoio, amor, paciência e incentivo.

À minha família pela força e pela torcida durante todos os momentos de minha vida, em especial aos meus pais (Carlos e Fátima) e irmãos (Alex e Emanuel).

À Minnie por ser minha alegria e distração nos momentos de extremo cansaço.

Às queridas Danielle Alves, Larissa Fiúza e Vitória Oliveira pelo companheirismo, carinho, torcida e ajuda para finalização da dissertação.

A Dra. Maria Leônia da Costa Gonzaga pela orientação, pela ajuda e por todos os conselhos profissionais e pessoais.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa pelos conselhos e pelo auxílio durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. Haroldo César Beserra de Paula e à equipe do Laboratório de Química de Biopolímeros por terem sido parte fundamental na condução do experimento.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucicléia Barros de Vasconcelos Torres pelos valorosos ensinamentos.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Miranda Martins e à equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental pela ajuda e receptividade.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Paulo Mendes, secretário da Pós-Graduação, pela grande dose *de* paciência e pela colaboração indispensável para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Frutos Tropicais pelos momentos de divertimento e em especial à Luana com quem passei por várias dificuldades para desenvolver a metodologia que foi utilizada nesse trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela convivência e companheirismo.

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desse trabalho,  
OBRIGADA !!!

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

Martin Luther King

## RESUMO

As exigências dos consumidores por uma alimentação mais saudável são cada vez maiores, o que tem levado a indústria a investir de forma mais persistente no uso de produtos naturais. Um dos segmentos de investimento de destacada importância, é o de substâncias naturais que atuam como pigmentos, em substituição aos corantes artificiais. Devido à alta instabilidade destas substâncias, diversas pesquisas têm buscado determinar condições favoráveis para seu uso. Dentre as substâncias estudadas tem-se a bixina, um pigmento natural, carotenoide, lipossolúvel, extraído da semente do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.). A maioria dos carotenóides é sensível a fatores como alta temperatura, luz, oxigênio e baixo pH, o que restringe o seu emprego como pigmento em alguns produtos alimentícios. O uso da nanoencapsulação tem sido uma alternativa para melhorar a estabilidade de pigmentos como a bixina, tornando possível sua incorporação em sistemas alimentícios sem a perda de suas propriedades. Considerando o exposto, o presente trabalho teve por objetivo obter, caracterizar e avaliar a estabilidade de nanocápsulas contendo extrato do urucum, empregando a goma do cajueiro como material de parede. Para a obtenção das nanocápsulas foram realizadas as etapas de preparo da emulsão e atomização. As nanocápsulas obtidas foram caracterizadas e apresentaram tamanho médio de  $24,17 \text{ nm} \pm 3,71$ , com distribuição por volume de  $97,33\% \pm 2,08$ , o que demonstrou considerado grau de homogeneidade de tamanho. A solubilidade das nanocápsulas foi de  $74,13\% \pm 3,68$  e a eficiência alcançada no processo de nanoencapsulação foi de  $44,74\% \pm 4,38$ . Os testes de estabilidade das nanocápsulas foram feitos armazenando-as em condições de ausência e presença de luz. A cada dez dias, durante quarenta dias, fez-se a determinação das coordenadas colorimétricas  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $C^*$  e ângulo Hue e as determinações dos teores de bixina total e bixina superficial. A bixina total teve uma redução de 78,48% para as nanocápsulas expostas à luz, enquanto que na condição de ausência de luz essa redução foi de apenas 41,88%. Os valores de bixina superficial, ou não encapsulada, oscilaram de 27,64 mg/100g a 8,65 mg/100g, para amostras submetidas à luz, e de  $27,64 \text{ mg/100g} \pm 2,13$  a  $16,45 \text{ mg/100g} \pm 0,80$  para amostras armazenadas na ausência de luz. As nanocápsulas mostraram maior estabilidade quando armazenadas ao abrigo da luz, comprovando o efeito deletério da luz ao extrato de urucum e, portanto, a não total proteção da goma de cajueiro como material de parede. Também foram verificadas nesta pesquisa as atividades antioxidante (utilizando-se o sistema  $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico) e antimicrobiana (pelo método de disco-difusão) das nanocápsulas contendo extrato do urucum. Em relação à atividade antioxidante, obteve-se percentual médio

de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno correspondente a 61,90%, 54,576% e 51,73%, para os extratos contendo concentrações de nanocápsulas de 40 mg/L, 30 mg/L e 20 mg/L. Os resultados obtidos sugerem atividade antimicrobiana das nanocápsulas, com formação de halo de inibição frente ao *Staphylococcus aureus* utilizando-se as concentrações de 1 mg/L, 2 mg/L e 10 mg/L, porém não foi observada a formação de halos de inibição para os microrganismos *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*. Neste estudo as nanocápsulas contendo o extrato do urucum foram aplicadas em sistema modelo (solução-tampão) e em um sistema alimentício (iogurte). A estabilidade desses sistemas foi medida através dos parâmetros colorimétricos, a cada cinco dias, durante 40 dias. Observou-se que o sistema modelo pode ter promovido estabilidade às nanocápsulas, conservando seus núcleos. Quando aplicadas em iogurte as nanocápsulas conferiram a este alimento uma coloração amarelo/alaranjado e durante o período de armazenamento houve redução dos valores de  $a^*$  e aumento dos parâmetros  $b^*$  e  $C^*$ .

**Palavras-chave:** Nanoencapsulação. Extrato do urucum. Goma do cajueiro. Caracterização. Estabilidade

## ABSTRACT

Consumers demands for healthier eating are increasing, which has led the industry to invest more persistent in the use of natural products. One of more relevant segment is natural substances acting as pigments, replacing the artificial coloring. Due his high instability, several researches have been directed to determine favorable conditions of use of these substances. Among the compounds studied we have bixin, a natural pigment, carotenoid, lipid-soluble annatto seed extract (*Bixa orellana L.*). Most carotenoids are sensitive to factors such as high temperature, light, oxygen and low pH, which restricts its use as a pigment in some food products. The use of nanoencapsulation has been an alternative for improving the stability of pigments such as bixin, making possible its incorporation into food systems without loss of its qualities. Considering that, the present study aimed to obtain, characterize and assess the stability of nanocapsules containing annatto extract, employing the cashew gum as wall material. To obtain these nanocapsules were performed steps of preparation of the emulsion and spray drying. The nanocapsules were characterized and showed a average size of  $24.17\text{nm} \pm 3.71$  with distribution by volume of  $97.33\% \pm 2.08$ , demonstrating high degree of homogeneity in size. The solubility of the nanocapsules was  $74.13\% \pm 3.68$  and the efficiency achieved in the process of nanoencapsulation was  $44.74\% \pm 4.38$ . Stability tests were made with nanocapsules storing them in conditions of absence and presence of light. During ten days, for forty days, was made the determination of colorimetric coordinates  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $C^*$ , Hue angle and the determinations of the levels of total bixin and superficial bixin. The total bixin had a reduction of 78,48% for the nanocapsules exposed to light, while in condition of absence of light the reduction was only 41.88%. The values of surperficial bixin or unencapsulated, ranged from 27.64 mg/100g to 8.65 mg/100g, for samples subjected to light, and from  $27,64 \text{ mg/100g} \pm 2,13$  a  $16,45 \text{ mg/100g} \pm 0,80$  for samples stored in absense of light. The nanocapsules showed greater stability when stored away from light, confirming the deleterious light effect in annatto extract and therefore not full protection of cashew gum as wall material. Were also found in this study the antioxidant activities (using the system  $\beta$ -caroteno/ acid linoleic) and antimicrobial (by disk diffusion) of nanocapsules containing annatto extract. In relation to the antioxidant activity (inhibition of the oxidation of  $\beta$ -carotene) was obtained average perceptual corresponding to 61.90%, 54.576%, and 51.73% for containing extracts of nanocapsule concentration of 40 mg/L, 30 mg/L and 20 mg/L. The results suggests antimicrobial activity of the nanocapsules, making an inhibition zone against *Staphylococcus aureus* using concentrations of 1 mg/L, 2 mg/L and 10 mg/L, however there

was observed the formation of inhibition zones for *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis*. In this study, nanocapsules containing annatto extract were applied to the model system (buffer) and food system (yogurt). The stability of these systems was measured using the colorimetric parameters, during five days, for 40 days. It was observed that the system model may have promoted the nanocapsule stability, retaining their nucleus. When applied in yoghurt gave the nanocapsules to this food yellow / orange coloration and during the storage period was reduced values of a\* and increased b\* and C\* parameters.

**Key-words:** Nanoencapsulation. Annatto extract. Cashew gum. Characterization. Stability

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Urucum: A: cachopa com frutos maduros; B: fruto aberto com sementes expostas .....	21
FIGURA 2 - Estrutura da bixina e da norbixina .....	22
FIGURA 3 - Inter-relação entre os diferentes pigmentos do urucum .....	23
FIGURA 4 - Ilustração da classificação de nanopartículas: nanoesferas (A), nanocápsulas contendo óleo (B) e água (C).....	25
FIGURA 5 - Diagrama esquemático do processo de secagem de uma gotícula em <i>spray dryer</i> .....	27
FIGURA 6 - Desenho esquemático de um sistema de spray-drier, incluindo: (1) bocal para dois fluídos; (2) câmara de secagem; (3) ciclone para separação de partículas; (4) filtro de remoção das partículas finas; (5) aspirador para geração de fluxo; (6) reservatório do produto .....	28
FIGURA 7 - Exsudado do cajueiro ( <i>Anacardium occidentale</i> L.) (A) fragmento e (B) triturado .....	30
FIGURA 8 - Representação da estrutura da goma de cajueiro (R = ramnose, arabinose ou ácido glucurônico) .....	31
FIGURA 9 - Coordenadas do sistema CIELAB de cor .....	38
FIGURA 10 - Distribuição do tamanho das nanocápsulas obtidas: repetições R1 (a), R2 (b) e R3 (c) .....	45
FIGURA 11 - Atividade antioxidante dos extratos contendo 40 mg/L, 30 mg/L e 20 mg/L das nanocápsulas, em função do tempo de armazenamento .....	48
FIGURA 12 - Teores de bixina total e superficial das nanocápsulas contendo extrato de urucum, em função do tempo, na presença de luz .....	52
FIGURA 13 - Teores de bixina total e superficial das nanocápsulas contendo extrato de urucum, em função do tempo, na ausência luz .....	53
FIGURA 14 - Luminosidade das nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C .....	55
FIGURA 15 - Coordenada a* das nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C .....	56

FIGURA 16 - Coordenada $b^*$ das nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na ausência e presença de luz, a 25°C .....	57
FIGURA 17 - Saturação da cor ( $C^*$ ) das nanocápsulas em função do tempo para as amostras armazenadas na ausência de luz .....	58
FIGURA 18 - Ângulo Hue das nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na ausência e presença de luz, a 25°C .....	59
FIGURA 19 - Luminosidade ( $L^*$ ) em função do tempo nos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum na presença e ausência de luz .....	61
FIGURA 20 - Comportamento da coordenada $a^*$ dos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C .....	62
FIGURA 21 - Comportamento da coordenada $b^*$ em função do tempo, nos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum na presença e ausência de luz .....	63
FIGURA 22 - Croma ( $C^*$ ) dos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C .....	63
FIGURA 23 - Ângulo Hue dos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C .....	64
FIGURA 24 - Iogurtes sem a adição de nanocápsulas contendo extrato do urucum (A) e com a adição de nanocápsulas contendo extrato do urucum (B) .....	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Medidas dos halos de inibição formados, utilizando concentrações de 1 mg/L, 2 mg/L e 10 mg/L de nanocápsulas contendo extrato do urucum .....	49
TABELA 2 - Valores de bixina total e superficial nas nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na ausência e presença de luz .....	51
TABELA 3 - Coordenadas colorimétricas das nanocápsulas contendo extrato do urucum, na presença e ausência de luz, em função do tempo de armazenamento, a 25°C .....	55
TABELA 4 - Coordenadas colorimétricas do sistema modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na ausência e presença de luz, a 25°C .....	60
TABELA 5 - Coordenadas colorimétricas do iogurte com e sem a adição de nanocápsulas contendo extrato de urucum, em função do tempo de armazenamento, a 25°C .....	66

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Quadrado médio (QM) dos parâmetros colorimétricos $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , croma e Hue, e dos teores de bixina total e superficial para as nanocápsulas contendo extrato do urucum armazenados na presença e ausência de luz .....	76
APÊNDICE B - Quadrado médio (QM) dos parâmetros colorimétricos $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , croma e Hue para sistema modelo (solução-tampão) adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, armazenados na presença e ausência de luz .....	77
APÊNDICE C - Quadrado médio (QM) dos parâmetros colorimétricos $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , croma e Hue para o sistema alimentício (iogurte) com e sem adição de nanocápsulas contendo extrato do urucum .....	78

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE APÊNDICES

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1 Corante natural do urucum .....	20
2.2 Nanoencapsulação .....	24
2.2.1 A técnica de <i>spray-drying</i> .....	27
2.3 Material de Parede .....	29
2.3.1 Goma do cajueiro .....	29
2.4 Atividade biológica dos corantes naturais .....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1 Matéria-prima .....	35
3.2 Instalações .....	35
3.3 Purificação da goma do cajueiro .....	35
3.4 Determinação do teor de bixina do extrato do urucum .....	36
3.5 Obtenção das nanocápsulas .....	36
3.6 Caracterização das nanocápsulas .....	37
3.6.1 Tamanho e distribuição .....	37
3.6.2 Solubilidade em água .....	37
3.6.3 Cor .....	37
3.6.4 Determinação da bixina total .....	38
3.6.5 Determinação da bixina superficial .....	39
3.6.6 Eficiência da nanoencapsulação .....	40
3.6.7 Atividade antioxidante .....	40
3.6.8 Atividade antimicrobiana .....	41
3.7 Testes de estabilidade .....	42
3.7.1 Estabilidade das nanocápsulas na ausência e presença de luz, através dos teores de bixina total e superficial.....	42

3.7.2 Estabilidade do sistema modelo adicionado das nanocápsulas, na ausência e presença de luz, através de parâmetros colorimétricos.....	42
3.7.3 Estabilidade de iogurte natural acrescido das nanocápsulas, através de parâmetros colorimétricos.....	43
3.8 Análises estatísticas .....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4.1 Teor de bixina no extrato do urucum .....	45
4.2 Caracterização das nanocápsulas .....	45
4.2.1 Tamanho e distribuição .....	45
4.2.2 Solubilidade em água .....	47
4.2.3 Eficiência da nanoencapsulação .....	47
4.2.4 Atividade antioxidante .....	48
4.2.4.1 Inibição da Oxidação (% I.O.) .....	49
4.2.5 Atividade antimicrobiana .....	49
4.3 Testes de estabilidade .....	51
4.3.1 Estabilidade das nanocápsulas na ausência e presença de luz, através dos teores de bixina total e superficial .....	51
4.3.1.1 Quantificação do teor de bixina total e superficial na presença de luz .....	52
4.3.1.2 Quantificação do teor de bixina total e superficial na ausência de luz .....	53
4.3.2 Estabilidade das nanocápsulas na ausência e presença de luz, através de parâmetros colorimétricos.....	54
4.3.3 Estabilidade do sistema modelo (solução tampão) adicionado das nanocápsulas, na ausência e presença de luz, através de parâmetros colorimétricos .....	59
4.3.4 Estabilidade do iogurte adicionado de nanocápsulas .....	65
5 CONCLUSÕES .....	67
REFERÊNCIAS .....	68
APÊNDICES .....	76

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de corantes como aditivos alimentícios tem sido altamente explorado com a função de torná-los mais atrativos e, em virtude de observações, tem aumentado a preocupação quanto aos riscos toxicológicos desses produtos e/ou seus metabólitos no organismo humano (KAPOR *et al.*, 2001).

A valorização de uma alimentação mais saudável pelo mercado consumidor, fez com que crescesse a utilização dos corantes naturais, dentre os quais, o urucum é o mais usado pela indústria brasileira, representando cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001).

As sementes do urucuzeiro (*Bixa orellana L.*) são recobertas por uma resina vermelha que contém o carotenóide bixina, e em menor quantidade o carotenóide norbixina. A bixina possui a característica de ser lipossolúvel e sua saponificação resulta em norbixina que é um composto hidrossolúvel (MERCADANTE e PFANDER, 1998; LIMA *et al.*, 2001).

A bixina, assim como a maioria dos carotenóides, é sensível a fatores como alta temperatura, luz, oxigênio e baixo pH, o que restringe o seu emprego em alguns produtos alimentícios (BARBOSA, 2009). A hidrofobicidade faz com que os carotenóides apresentem dificuldades para serem incorporados em formulações alimentícias aquosas, além de serem, dependendo da matriz alimentícia na qual estão inseridos, dificilmente absorvidos no trato gastrointestinal. Tais problemas podem ser contornados através da nanoencapsulação (GOMES, 2011).

O processo de encapsulação vem sendo estudado como uma alternativa para preservação das propriedades físico-químicas dos bioativos. As partículas formadas através da encapsulação podem ser classificadas em três classes: macro (>5000  $\mu\text{m}$ ); micro (1,0-5000  $\mu\text{m}$ ) e nano (<1,0  $\mu\text{m}$ ), sendo que as partículas podem apresentar diferentes formas, dependendo dos processos usados para prepará-las (JAFARI, 2008; DESAI e PARK 2005).

O material de parede, ou agente encapsulante, utilizado no processo de encapsulação deve possuir características tais como apresentar propriedade emulsificante e de formação de filme, possuir baixa viscosidade em soluções com alta concentração de sólidos, oferecer capacidade de estabilização da solução do material de parede, apresentar baixa higroscopicidade, ser de baixo custo e ser capaz de proteger o ingrediente das condições adversas (BARBOSA, 2009).

Dentre os agentes encapsulantes, as gomas naturais, tais como a goma do cajueiro, vêm sendo estudadas, pois são produtos de fácil obtenção e de baixo custo (RODRIGUES, 2004).

Várias técnicas são utilizadas para a encapsulação na área de alimentos, e sua escolha depende de uma série de fatores: o tamanho de partícula requerido, as propriedades físicas e químicas do material encapsulante e do bioativo, os mecanismos desejados de liberação, a escala de produção e o custo (GOMES, 2011).

O uso do método de secagem por atomização como técnica de encapsulação é considerado um processo eficiente e econômico, além de possibilitar o emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes, com produto final apresentando boa retenção e estabilidade dos compostos (MENDES, 2012).

Tendo em vista a importância dos corantes naturais para a indústria de alimentos e a escassez de trabalhos abordando corantes nanoencapsulados, principalmente utilizando a goma do cajueiro como agente encapsulante, este trabalho teve por objetivo obter, caracterizar e avaliar a estabilidade de nanocápsulas contendo extrato do urucum, empregando a goma do cajueiro como material de parede. Também foram verificadas nesta pesquisa o comportamento das nanocápsulas em sistemas modelo e alimentício e as atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato do urucum nanoencapsulado.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Corante natural do urucum

O urucum (*Bixa orellana L.*) é uma importante matéria-prima empregada na indústria brasileira de alimentos. Esse fruto vem sendo amplamente utilizado na produção de embutidos, massas, queijos, sorvetes e confeitarias (LEMOS *et al.*, 2011).

São fabricados a partir do urucum os corantes naturais mais difundidos na indústria de alimentos, com tonalidades que vão do amarelo ao castanho, passando pelo vermelho (SILVA, 2007).

O consumo de urucum tem aumentado muito nas últimas décadas devido ao uso dos seus corantes naturais em substituição aos corantes sintéticos, considerados cancerígenos. A proibição dos corantes sintéticos em muitos países impulsiona o crescimento do urucum no mercado internacional e faz com que o urucuzeiro ganhe importância nas regiões produtoras (OLIVEIRA, 2005).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2010 foram produzidos 13.309 toneladas de sementes de urucum no Brasil, em uma área de 12.540 hectares plantados, com um crescimento de 6,7% em relação ao ano anterior.

A região Sudeste lidera o ranking nacional, com uma produção de 4585 toneladas, seguida das regiões Norte e Nordeste. O Estado de São Paulo tem a maior participação na produção de sementes de urucum (22,03% da produção nacional), mas os estados de Rondônia (17,60%) e Minas Gerais (11,16%) também se destacam, colhendo anualmente mais de 1,4 toneladas de urucum por hectare (IBGE, 2010).

A planta do urucum, pertencente à família das Bixáceas, é uma árvore pequena, geralmente inferior a 6 metros, podendo atingir até 8 metros, originária da região amazônica e cultivada em quase todos os estados brasileiros (SILVA, 2007; BARCELOS, 2010).

As sementes podem ser numerosas por fruto. São angulares, com 3 a 4 mm de comprimento, cobertas com uma substância resinosa de coloração vermelho-alaranjada a qual torna-se seca, dura e de coloração escura com o amadurecimento (FRANCO *et al.*, 2002). A partir dessas sementes obtêm-se vários tipos de corantes, diferentes entre si na solubilidade e pigmentação (LIMA *et al.*, 2010). A Figura 1 mostra frutos e sementes de urucum.

**Figura 1:** Urucum: A: cachopa com frutos maduros;  
B: fruto aberto com sementes expostas



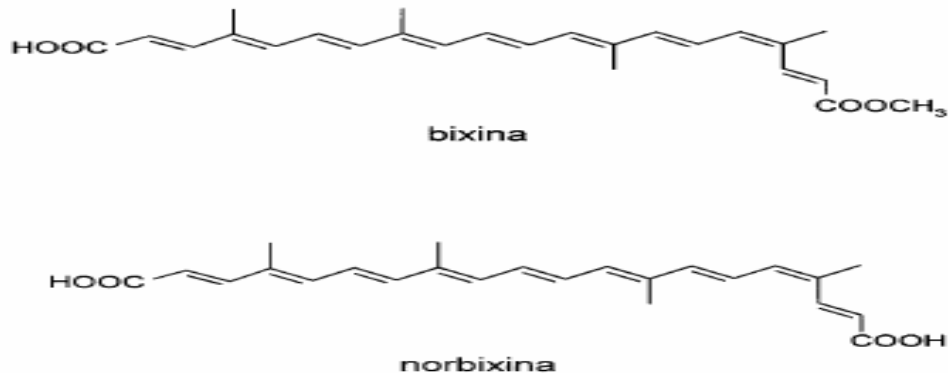
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2005

A bixina é o pigmento presente em maior concentração nas sementes de urucum, representando mais de 80% dos carotenóides totais. Observa-se na superfície das sementes um arilo que possui várias substâncias além do pigmento vermelho característico. Este arilo representa cerca de 5% a 10% do peso da semente, dos quais 30% são representados pelo carotenóide bixina (CARVALHO *et al.*, 2010).

Os corantes naturais são empregados em uma infinidade de alimentos e bebidas com o intuito de compensar a perda de cor durante o processamento industrial e estocagem, uniformizar a cor dos alimentos e dar cor a alimentos originalmente incolores, tornando-os mais atrativos ao consumidor. As preparações de urucum são usadas para colorir manteiga, queijos, produtos de panificação, óleos, sorvetes, cereais e embutidos (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001).

O corante do urucum é o mais usado pela indústria brasileira, representando cerca de 70% dos corantes naturais usados e 50% de todos os ingredientes naturais que exercem essa função, sendo utilizado em suas várias formas, na indústria de alimentos, para tonalidades amarelas a vermelhas (GHIRALDINI, 1989; SILVA; NACHTIGALL e STRINGHETA, 2009). O baixo custo de produção e a baixa toxicidade fazem deste um pigmento muito atrativo e conveniente, em substituição a muitos corantes sintéticos (AGNER *et al.*, 2004).

Como já citado, os pigmentos do urucum são extraídos da camada externa das sementes (arilo), sendo os mais importantes a bixina e norbixina, cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 2. A coloração vermelha da semente está diretamente relacionada ao percentual de bixina. Quanto maior a concentração de norbixina, maior a tendência para o amarelo. Tanto as sementes, quanto os extratos processados são comercializados com base no teor de bixina ou norbixina (OLIVEIRA, 2005).

**Figura 2:** Estruturas da bixina e da norbixina

Fonte: TOCCHINI e MERCADANTE (2001)

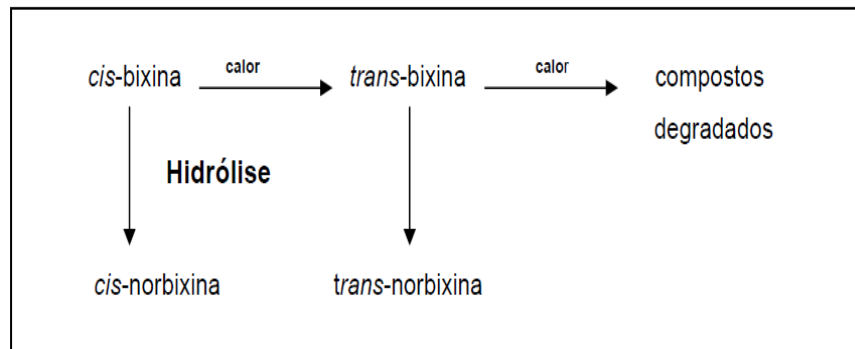
A partir da bixina são obtidos os demais pigmentos do urucum, como a norbixina (lipossolúvel), o sal da norbixina (hidrossolúvel) e os produtos de degradação térmica (lipossolúveis e de coloração amarela mais estável) (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001; CONSTANT; STRINGHETA e SANDI, 2002; NACHTIGALL *et al.*, 2009).

A saponificação da bixina dá origem a um corante hidrossolúvel constituído pelo sal de norbixina (LIMA *et al.*, 2001). O sal de norbixina, anteriormente citado, pode ser convertido em norbixina por precipitação ácida, tornando o pigmento lipossolúvel (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002).

Tanto a bixina como a norbixina apresentam duas configurações estereoquímicas (*cis* e *trans*). Nos extratos, em condições normais, pode predominar a *cis*-bixina ou a *cis*-norbixina, mais instáveis. A *cis*-bixina ou a *cis*-norbixina em solução sob aquecimento são parcialmente transformadas para a configuração *trans*, mais estável, conhecidas como isobixina e isonorbixina (PIMENTEL, 1995).

Na natureza a maioria dos carotenóides ocorre na configuração *trans*. A bixina é uma exceção, pois é encontrada naturalmente na forma *cis*. Além disso, sua molécula possui dois grupos carboxílicos, um deles sendo um éster metílico, o que dá à molécula certa lipossolubilidade. Pela hidrólise alcalina do seu grupamento éster metílico, pode-se preparar o sal hidrossolúvel do ácido dicarboxílico norbixina (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) (SILVA, 2007).

O aquecimento da *cis*-bixina a converte em *trans*-bixina, uma forma mais estável e mais solúvel (HENRY, 1996). Na Figura 3 está representada a relação entre os tipos de pigmentos do urucum.

**Figura 3:** Inter-relação entre os diferentes pigmentos do urucum

Fonte: HENRY (1996)

Os corantes de urucum podem ser encontrados no mercado em diferentes formas: em solução aquosa, solúvel em óleo ou ainda, na forma de emulsão ou em suspensão (SANDI *et al.*, 2003). Existem vários processos para obtenção do pigmento. Para a extração do pigmento das sementes, são normalmente utilizados três diferentes métodos: a extração com óleo refinado, a extração com solventes orgânicos e a extração com solução alcalina (COLLINS, 1992). Dentre estes processos o mais simples e mais utilizado comercialmente para a produção de corantes de urucum é o que utiliza soluções alcalinas para extrair o pigmento. O uso frequente deste processo baseia-se no fato de que a bixina não é solúvel em água, exceto em uma solução alcalina, onde pode ser saponificada. Como álcalis, são utilizados hidróxido de sódio, de potássio ou de amônio e o carbonato de sódio (SILVA, 2007).

Na extração com óleo refinado o pigmento é obtido por abrasão do pericarpo submerso em óleo vegetal aquecido a 70°C (ARAÚJO, 2004). De acordo com Silva (2007), o pigmento principal obtido neste método de extração é a bixina, mas existe a formação de compostos de degradação térmica, devido ao uso de calor durante o processo.

Quando extraído com solventes orgânicos, como acetona e metanol, pode-se obter um produto com concentrações mais elevadas de pigmento, alcançando teores entre 3,5 a 5,2% de bixina. Nesse caso, após a extração o solvente é removido e o pigmento na forma de pó é ressuspensionado em óleo (ARAÚJO, 2004).

O uso da extração com solventes para a aplicação do corante em produtos alimentícios é limitado, uma vez que o corante estará sujeito a sérias restrições técnicas, pela toxicidade potencial de resíduos de solventes neles presentes (SILVA, 2007).

Nas indústrias brasileiras processadoras de urucum o etanol é um solvente orgânico bastante utilizado devido à facilidade de sua obtenção e baixo custo, quando comparado a outros solventes. Outras características favoráveis a este solvente são: disponibilidade, baixa toxicidade, baixo ponto de ebulição e propriedades bactericidas (PRENTICE-HERNANDEZ e RUSIG, 1992).

Os pigmentos naturais estão relacionados com importantes atividades biológicas. Seus efeitos benéficos em relação à saúde estão relacionados com suas propriedades antioxidantes, proteção contra danos oxidativos a componentes celulares, efeitos anti-inflamatórios e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (VOLP; RENHE e STRINGUETA, 2009).

Com aplicação em múltiplos ramos industriais, o pigmento extraído do urucum é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como um corante de nula toxicidade tanto para o consumo humano como para sua aplicação na pele. O produto é registrado pela União Européia sob a denominação de “E160b” (OLIVEIRA, 2005).

O corante do urucum tem sido mais utilizado pela indústria na forma de extrato seco de urucum hidrossolúvel em vez do corante líquido. Isto se deve ao fato de que os pigmentos em pó apresentam alta intensidade de cor, fácil manuseio e transporte e maior estabilidade durante a estocagem, além de serem úteis em produtos secos como sopas desidratadas e misturas em pó (PIMENTEL, 1995).

As exigências do mercado interno e externo enfatizam a importância da pesquisa por novas tecnologias de produção de corantes de urucum. Um processamento mais eficaz e um maior conhecimento na química e bioquímica dos pigmentos do urucum, e de seu comportamento em diferentes meios, poderiam contribuir significativamente na produção de corantes com melhor qualidade final (SILVA, 2007).

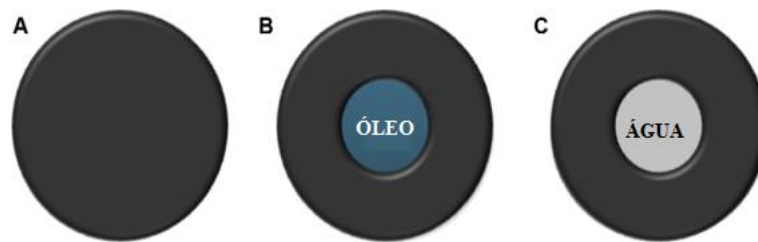
## **2.2 Nanoencapsulação**

A nanotecnologia tem como objetivo a caracterização, fabricação e manipulação de estruturas, biológicas e não-biológicas, que possuam tamanhos inferiores a 100nm (WEISS; TAKHISTOV e MCCLEMENTS, 2006). O prefixo *nano* (do grego: “anão”) é usado nas ciências para designar uma parte em um bilhão, sendo assim, um nanômetro (1nm) corresponde a um bilionésimo de um metro (MELO e PIMENTA, 2004). Partículas com este tamanho, ou nanopartículas, apresentam uma grande área superficial e, frequentemente,

exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas distintas de partículas macroscópicas (QUINA, 2004).

O termo nanopartícula é utilizado tanto para nanoesferas quanto para nanocápsulas (Figura 4). As nanoesferas são formadas por uma matriz homogênea, ou seja, são partículas cuja massa inteira é sólida e as moléculas podem ser adsorvidas na superfície esférica ou encapsuladas dentro da partícula. Já as nanocápsulas são sistemas vesiculares, que atuam como uma espécie de reservatório, em que as substâncias englobadas estão confinadas a uma cavidade, constituindo em um núcleo líquido (óleo ou água) cercado por um material sólido (RAO e GECKELER, 2011).

**Figura 4:** Ilustração da classificação de nanopartículas: nanoesferas (A), nanocápsulas contendo óleo (B) e água (C)



Fonte: Adaptado de RAO e GECKELER, 2011

A nanoencapsulação envolve incorporação, absorção ou dispersão de combinações de bioativos sólidos, líquidos ou gasosos em vesículas pequenas, com diâmetro na escala nanométrica. As combinações de bioativos incorporados podem ser protegidas contra degradação e melhorar a estabilidade e a solubilidade dos compostos (ASSIS *et al.*, 2012; KLAYPRADIT e HUANG, 2008; JAFARI *et al.*, 2008).

Segundo Turchiuli *et al.* (2005), muitas das substâncias sensíveis contidas nos alimentos, como pigmentos e antioxidantes, são compostos a base de lipídeos, que existem na forma líquida à temperatura ambiente. Para estas substâncias lipofílicas o meio mais simples de encapsulamento consiste em emulsificar ou dispersar o componente em uma solução aquosa.

Segundo Gharsallaoui *et al.* (2007), o principal objetivo da encapsulação é proteger uma substância sensível na cápsula ou na parede, isolando fisicamente o ingrediente do meio ambiente. Atualmente, os interesses essenciais são atribuídos ao encapsulamento de *flavors*, lipídeos e carotenoides, entre outros ingredientes; ressaltando-se que, em função de

um único agente encapsulante não possuir todas as propriedades do material de parede ideal, pesquisas recentes têm focado em misturas de carboidratos, gomas e proteínas.

Os benefícios da nanotecnologia vêm sendo reconhecidos por diversos setores da indústria. Nesse contexto, a indústria de alimentos necessita ir além da observação das propriedades macroscópicas e partir para a meso e a nano escalas, com o posterior controle das estruturas hierárquicas no alimento e na sua funcionalidade. Assim, são crescentes os estudos sobre as relações entre as estruturas nano e supramoleculares, bem como da funcionalidade nos níveis físico, nutricional e fisiológico desses materiais (SANGUANSRI e AUGUSTIN, 2006).

A aplicação da nanotecnologia em alimentos é considerada nova, quando comparamos com sua utilização na biomedicina e nas indústrias de tecnologia de informação, onde essa técnica já é aplicada na fabricação de materiais, existindo, portanto, diversas áreas que podem ser exploradas, tais como a elaboração de produtos com características funcionais e nutracêuticas (ASSIS *et al.*, 2012).

Segundo Heyang *et al.* (2009) e Fathi, Mozafari e Mohebbi (2011), a nanoencapsulação na área de alimentos proporciona para compostos, tais como vitaminas, antimicrobianos, antioxidantes, aromatizantes, corantes e conservantes, proteção contra condições ambientais desfavoráveis, melhoria da solubilidade, redução da deterioração, redução da perda de matérias voláteis e a remoção de sabores e odores indesejáveis.

A nanoencapsulação age como uma barreira que pode conferir proteção contra a água, oxigênio e/ou luz, além de permitir uma liberação controlada do ingrediente retido e evitar interação entre substâncias (TURCHIULI *et al.*, 2005).

Existem diversas técnicas utilizadas para a encapsulação na área de alimentos. Os processos mais utilizados podem ser divididos em métodos físicos (extrusão, bocais, atomização, discos rotativos, *pan coating*, leite fluidizado, liofilização, *spray cooling* e *spray chilling*, por exemplo), métodos químicos (polimerização interfacial, inclusão molecular, por exemplo) e métodos físico-químicos (coacervação simples, coacervação complexa, lipossomas, partículas lipídicas sólidas, por exemplo) (FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

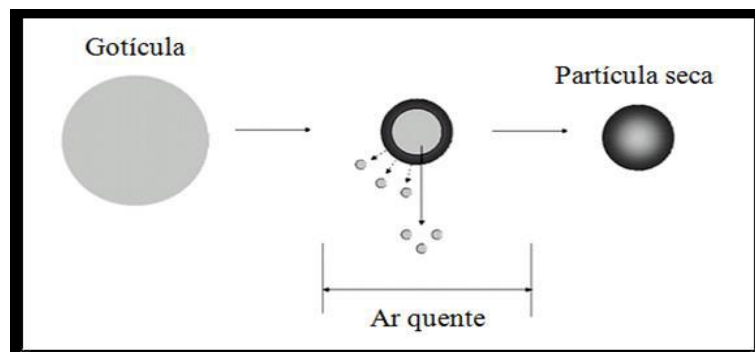
Em comparação com compostos microencapsulados, a nanoencapsulação oferece uma maior área de superfície, como já comentado, e tem a capacidade de aumentar a solubilidade, além de apresentar melhor biodisponibilidade e uma liberação mais controlada, o que permite uma maior precisão na utilização de materiais encapsulados nesta condição (MOZAFARI *et al.*, 2008).

### 2.2.1 A técnica de *spray-drying*

Uma variedade de técnicas são utilizadas para a secagem de nanocápsulas, entre elas está o *spray-drying* ou atomização. Este processo tem sido utilizado na indústria de alimentos desde o ano de 1950 (FANG e BHANDARI, 2010).

A secagem por *spray-drying* é um método que inicia pela atomização ou pulverização gerando gotículas em suspensão, seguida por um processo de secagem, o que resulta na produção de partículas sólidas (Figura 5). É um método eficiente de secagem, devido à grande área de superfície disponível para transferência de calor e massa (OKUYAMA *et al.*, 2006). O tempo de exposição das partículas ao calor é curto e a temperatura do núcleo não ultrapassa os 100°C, o que reduz a ocorrência de alterações indesejáveis em compostos termossensíveis. Outra vantagem é que as partículas atomizadas são altamente solúveis, devido ao seu pequeno tamanho, geralmente inferior a 100 µm (OLIVEIRA, 2008).

**Figura 5:** Diagrama esquemático do processo de secagem de uma gotícula por *spray dryer*.



Fonte: ALVES, 2012

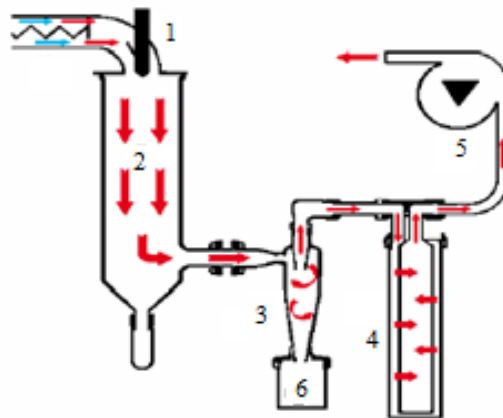
Por ser um método econômico, flexível, contínuo e produzir partículas de boa qualidade, a atomização é uma técnica vastamente utilizada na indústria para a produção de aditivos alimentares secos e estáveis (DESAI e PARK, 2005).

De acordo com Assis *et al.* (2012), o processo de encapsulação envolve quatro estágios: preparação da dispersão ou da emulsão; homogeneização da dispersão; atomização da emulsão e desidratação das partículas atomizadas. É importante ressaltar que apenas as

duas últimas etapas ocorrem especificamente no equipamento atomizador, sendo as duas primeiras etapas onde, efetivamente, ocorre a encapsulação.

O preparo da emulsão consiste no preparo da mistura a ser atomizada, dispersando-se o núcleo (que normalmente é de natureza hidrofóbica), numa solução do agente de revestimento com o qual é imiscível (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Às vezes, a adição de um emulsificante é necessária e a dispersão é então homogeneizada antes do *spray-drying* (ASSIS *et al.*, 2012). Em seguida o material núcleo deve ser homogeneizado com o material de parede. A mistura é então introduzida no *spray-drier* e atomizada com um bico ou roda a girar. A água é evaporada pelo ar quente em contato com o material atomizado. As cápsulas são recolhidas depois de caírem no fundo do secador (FANG e BHANDARI, 2010). Um sistema de *spray-drier* pode ser explicado seguindo o desenho esquemático representado na Figura 6.

**Figura 6:** Desenho esquemático de um sistema de *spray-drier*, incluindo: (1) bocal para dois fluídos; (2) câmara de secagem; (3) ciclone para separação de partículas; (4) filtro de remoção das partículas finas; (5) aspirador para geração de fluxo; (6) reservatório do produto



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2008

Este processo pode ser aplicado em substâncias sensíveis ao calor, pois, embora as gotículas sejam submetidas a altas temperaturas, o risco de superaquecimento destas é mínimo, devido à secagem quase instantânea (ALVES, 2012).

As propriedades do material de parede, bem como as características de emulsão e parâmetros de secagem, são fatores que podem afetar a eficiência de encapsulamento pelo método de *spray-drying* (JAFARI *et al.*, 2008), considerando, especificamente, a secagem da emulsão, preparo no qual as cápsulas já estão estruturadas.

## 2.3 Material de Parede

As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, podendo o componente ativo de interesse estar dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (material de parede). A retenção desses núcleos é regida por sua funcionalidade química, solubilidade, polaridade e volatilidade. O material de parede consiste, portanto, na barreira externa e geralmente é feito de compostos que formam uma rede com sua estrutura (ASSIS *et al.*, 2012).

O material da parede é feito, normalmente, de compostos como amidos, gomas, gelatinas, polímeros, etc., e geralmente abrigam grupos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos (TURCHIULI *et al.*, 2005).

Propriedades como baixa viscosidade, fácil manipulação, ser inerte ao material encapsulado, baixa higroscopicidade, capacidade de liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação, proporcionar máxima proteção ao material ativo, ser solúvel em solventes comumente usados, possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo e o baixo custo, são ideais em um material encapsulante (SANTOS; FERREIRA e GROSSO, 2000).

Por possuírem boas características as gomas vêm sendo bastante utilizadas nos últimos anos como agente encapsulante (MENDES, 2012).

### 2.3.1 Goma do cajueiro

As gomas industriais podem ser definidas como polissacarídeos solúveis em água e que formam soluções viscosas a baixas concentrações, sendo substâncias incolores, inodoras, insípidas e não tóxicas (MOURA NETO, 2008). Elas podem ser classificadas em naturais e modificadas, sendo as gomas naturais obtidas de exsudados de árvores, de sementes, de algas ou por fermentação microbiana (RODRIGUES; DE PAULA e COSTA, 1993).

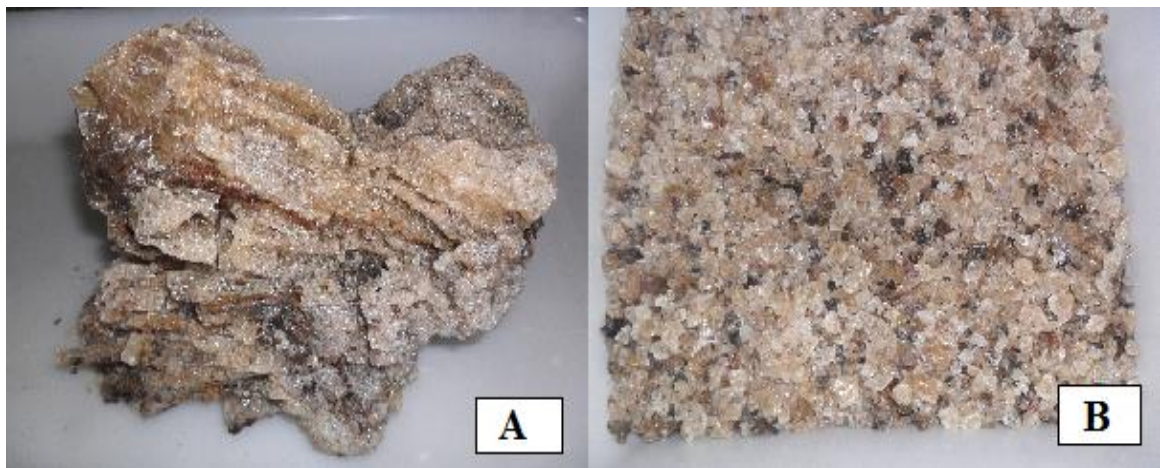
Os polissacarídeos de exsudados são produzidos como mecanismo de defesa das plantas contra o estresse causado por injúrias físicas ou ataque microbiano (CUNHA; PAULA e FEITOSA, 2009).

O uso de gomas naturais, provenientes dos exsudados e extratos de plantas, vêm tomando grande impulso por suas múltiplas e lucrativas possibilidades de industrialização (SARUBBO *et al.*, 2007).

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), planta fonte do exsudado, pertence à família Anacardiaceae, havendo mais de 21 espécies relacionadas no gênero *Anacardium*, todas de ocorrência tipicamente tropical (LIMA *et al.*, 2007). É uma árvore de múltiplo uso, que se desenvolve, geralmente, em solos arenosos secos, nas planícies centrais do Brasil, ocupando lugar de destaque entre as plantas frutíferas tropicais, em decorrência da crescente comercialização de seus produtos (SARUBBO *et al.*, 2007).

O exsudado do cajueiro (Figura 7) é produzido nas células epiteliais da planta. Quando esse exsudado, ainda líquido, atinge as imediações externas, através de um corte (feito de forma natural ou não), seca por evaporação da água, tornando-se uma resina mais firme, que quando purificada dá origem a goma (TORQUATO *et al.*, 2004).

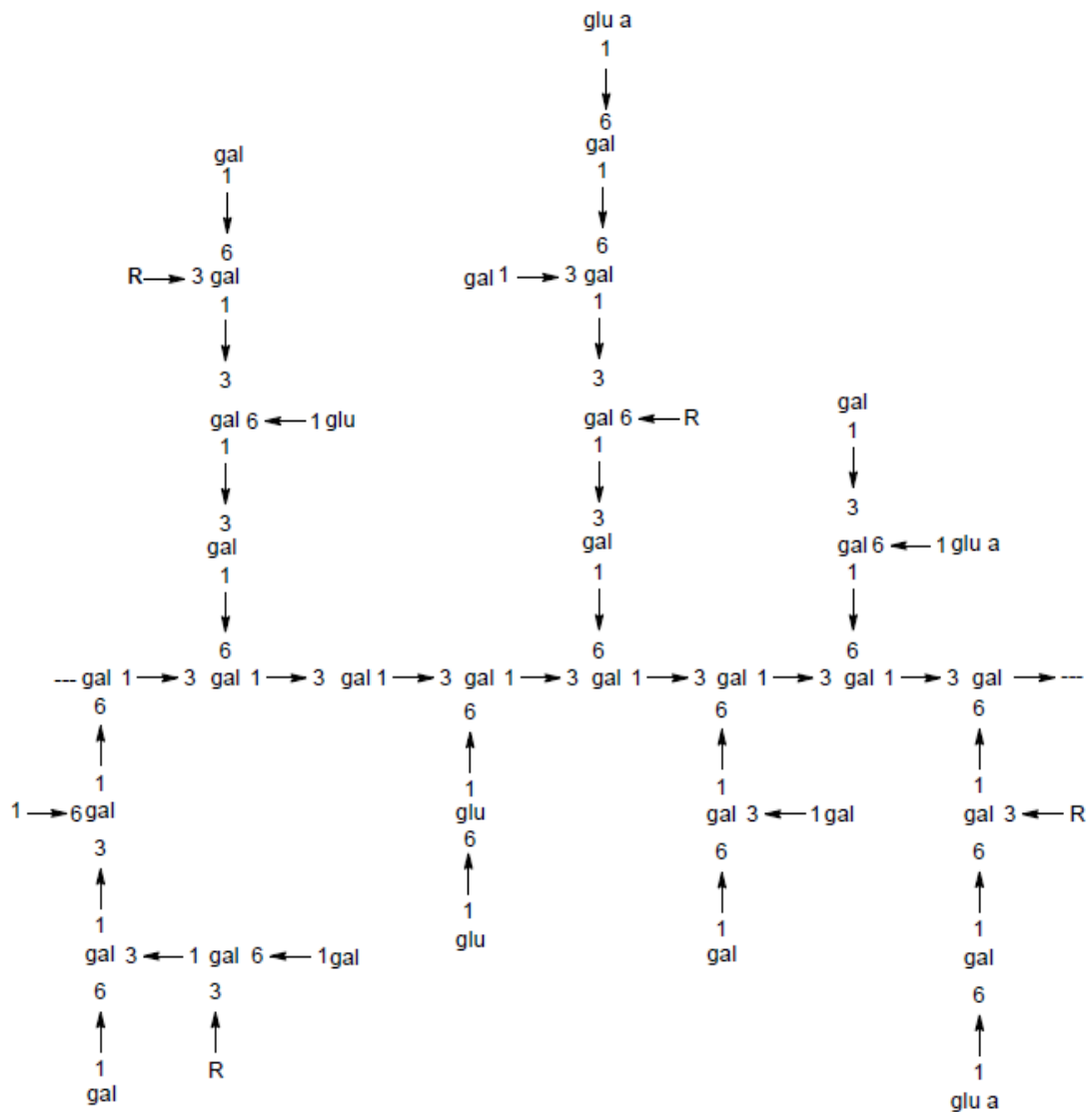
**Figura 7:** Exsudado do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)  
(A) fragmento e (B) triturado



Fonte: Autora

A goma do cajueiro é um heteropolissacarídeo complexo, exsudado de cajueiros, especialmente dos troncos. Sua composição consiste em galactose (72%), glicose (14%), arabinose (4,6%), ramnose (3,2%) e ácido glucurônico (4,5%) (DE PAULA *et al.*, 1998). A Figura 8 apresenta um fragmento da estrutura química da goma do cajueiro.

**Figura 8:** Representação da estrutura química da goma do cajueiro (R = ramnose, arabinose ou ácido glucurônico)



Fonte: CUNHA *et al.* (2007)

Torquato *et al.* (2004), classificaram as cadeias principais do polissacarídeo da goma do cajueiro como arabinogalactanas com uma variedade de cadeias laterais, incluindo ácido glucurônico e resíduos de ácido galacturônico. De acordo com este autor a, a hidrólise da goma do cajueiro resultou em: 70% de galactose, 11% de glucose, 6% de ácido glucurônico, 5% de arabinose, 4% de ramnose e 1% de manose .

Na indústria a goma do cajueiro é utilizada como espessantes para sucos e refrescos, emulsificante para molhos e saladas, suporte para microcapsulas e ainda como agente depressor de minério (MOTHE, 2000).

As características da goma de cajueiro são semelhantes as da goma arábica, podendo substituí-la como cola líquida para papel, na indústria farmacêutica, em cosméticos, como aglutinante de cápsulas e comprimidos e na indústria alimentícia como estabilizante de sucos, cervejas e sorvetes. Dessa forma, o polissacarídeo do cajueiro representa uso alternativo, não-convencional, podendo ser utilizado para diferentes finalidades (SILVA, 2006).

Por ser um polissacarídeo de exsudado de árvores brasileiras, em especial nativas do Nordeste, a goma do cajueiro vem sendo estudada, apresentando uma grande possibilidade de produção comercial. A exsudação da goma é simples e muitas vezes espontânea. A produção média de goma/planta/ano é de 700 g o que gera a possibilidade de produção da goma/ano muito superior à importada de goma arábica (CUNHA; PAULA e FEITOSA, 2009).

Segundo Oliveira (2008), a exploração da goma do cajueiro para fins de industrialização representaria uma grande vantagem já que o exsudado do cajueiro é altamente disponível na região Nordeste, devido à abundância de cajueiros presentes. Outro aspecto a destacar é que a extração da goma do cajueiro representa mais uma fonte de lucros para o produtor, que utilizaria não só a castanha e o pedúnculo, mas também o exsudado, inclusive dos cajueiros improdutivos, em fase de declínio e senescência, sendo uma alternativa lucrativa para o aproveitamento dos mesmos.

Estudos que gerem novos mercados para a utilização da goma do cajueiro nos diversos segmentos da indústria, principalmente na indústria de alimentos, são uma forma de agregar valor à cajucultura (CUNHA; PAULA e FEITOSA, 2009).

#### **2.4 Atividade biológica dos corantes naturais**

Muitos pigmentos naturais em alimentos servem primariamente para propósitos de cor, mas também estão associados com importantes atividades biológicas, pois promovem saúde e bem estar por prevenir e às vezes até auxiliar na cura de doenças (VOLP; RENHE e STRINGUETA, 2009).

Vários estudos têm confirmado as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas dos pigmentos naturais (GUL *et al.*, 2004; ALMEIDA, 2006).

Os carotenóides já há alguns anos vêm sendo utilizados como corantes e antioxidantes. Outros pigmentos como antoxantinas e antocianinas demonstram a capacidade de captar radicais livres (atividade antioxidante) e efeitos na prevenção de enfermidades cardiovasculares e circulatórias (KUSKOSKI *et al.*, 2006). A clorofila, também usada como aditivo para produtos alimentícios, pode ser utilizada tanto como pigmento quanto como antioxidante (STREIT, 2005).

O efeito antioxidante dos derivados do urucum, da bixina e outras substâncias naturais (luteína, licopeno,  $\beta$ -caroteno e  $\gamma$ -tocoferol) vêm sendo estudados quanto a sua capacidade antioxidante (GARCIA *et al.*, 2012). Kiokias e Oreopoulou (2006) verificaram que o extrato de urucum apresentou destacado efeito antioxidante, inibindo a formação de hidroperóxidos em uma emulsão aquosa, cuja oxidação foi estimulada pelo uso do 2,2'-azobis-amidinopropano (AAPH), e superou outras substâncias naturais como  $\beta$ -caroteno, luteína e licopeno, apresentando a maior atividade antioxidante.

Pesquisas relacionadas à atividade antimicrobiana de compostos naturais, sobre a multiplicação bacteriana, podem levar à sua utilização em novas tecnologias, melhorando a qualidade e a segurança alimentar (MAU *et al.*, 2001).

Extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana são de extrema importância devido ao fato de muitos microrganismos apresentarem resistência, causando sérios problemas de saúde pública (FABRI *et al.*, 2011). Diversos estudos relatam a atividade antimicrobiana de pigmentos como a cúrcuma (ALMEIDA, 2006; BHAVANISHANKAR *et al.*, 1979).

Estudos com *Bixa orellana L.* (urucum) relatam sua atividade antimicrobiana, demonstrando a capacidade preservativa desta planta na conservação e agregação de qualidade aos alimentos (MAJOLO, 2009; BRAGA *et al.*, 2007; ROJAS *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2005; NALIMOVA *et al.*, 2005; FLEISCHER *et al.*, 2003).

Pesquisas para avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes componentes frente a diversos microrganismos podem ser realizadas por meio de estudos comparativos, com microrganismos de interesse na área alimentícia. (ALMEIDA, 2006).

Sistemas de liberação controlada, como a nanoencapsulação, podem melhorar o efeito biológico promovido pelos corantes naturais, pois são caracterizados por apresentar a

capacidade de prolongar e controlar a liberação de substâncias ativas, proteger as moléculas frente à degradação no meio biológico, veicular substâncias hidrofóbicas e reduzir os efeitos colaterais indesejáveis (GRANADA *et al.*, 2007).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Matéria-prima**

As matérias primas utilizadas foram o corante natural de urucum (*Bixa orellana* L.) e a goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). O corante de urucum foi fornecido por uma empresa localizada em Aracajú, Sergipe, o qual foi enviado devidamente acondicionado em frasco de cor âmbar, hermeticamente fechado e sob temperatura de refrigeração. O corante foi mantido sob refrigeração, efetuando-se rápidos manuseios para as análises e preparação dos materiais. A goma do cajueiro foi obtida pela purificação do exsudado do cajueiro, coletado em cajueiros de uma empresa localizada em Pacajus, Ceará.

#### **3.2 Instalações**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Frutos Tropicais do Departamento de Tecnologia de Alimentos, no Laboratório de Química de Biopolímeros do Departamento de Química Analítica e Físico-Química e no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Biologia, todos da Universidade Federal do Ceará.

#### **3.3 Purificação da goma do cajueiro**

A purificação da goma do cajueiro foi feita segundo metodologia descrita por Rodrigues, Paula e Costa (1993), com algumas modificações. Para o preparo da goma, o exsudado foi fragmentado com o auxílio de um martelo e, em seguida, 50 g da amostra triturada foram transferidas para um béquer contendo 500 mL de água destilada, onde permaneceu sob agitação por 2h. A solução obtida foi então filtrada para remoção de fragmentos de madeira e/ ou outras impurezas macroscópicas presentes. O filtrado obtido foi adicionado em etanol, na proporção 1:4 v/v (filtrado/etanol), para precipitação da goma. O sistema foi deixado sob refrigeração por aproximadamente 12 h, para promover eficiente precipitação. Após este período, parte do álcool sobrenadante foi removido e o precipitado foi separado por filtração a vácuo, em funil de vidro de placa sinterizada. No sistema a vácuo o precipitado foi lavado com duas porções de 100 mL de etanol para remoção de possíveis traços de gorduras, ou outras impurezas solúveis neste solvente. A goma purificada foi

transferida para almofariz e seca com o auxílio de um secador manual. A goma seca foi armazenada em frasco fechado, à temperatura ambiente.

### 3.4 Determinação do teor de bixina no extrato do urucum

O teor de bixina no extrato do urucum foi determinado de acordo com a metodologia de Barbosa, Borsarelli e Mercadante (2005), onde retirou-se 0,2 mL do extrato e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, aferindo o balão com clorofórmio. Após 2h, fez-se a leitura em espectrofotômetro da marca SCHIMADZU, modelo UV- 1800 (Kyoto, Japão), em comprimento de onda 470nm (máxima absorção). O teor de bixina foi calculado utilizando a Equação 1.

$$C = \frac{A}{E^{1\%}_{1\text{cm}}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: A= valor da absorbância

$E^{1\%}_{1\text{cm}}$  = coeficiente de absorvidade do clorofórmio, com valor de 2826

### 3.5 Obtenção das nanocápsulas

A obtenção das nanocápsulas consistiu, em princípio, na formação de uma emulsão estável do material do núcleo (extrato do urucum), com a solução do material de parede (goma do cajueiro). Para isto foi preparada uma formulação utilizando-se solução de goma do cajueiro a 10% e extrato de urucum na proporção 10:1 (material de parede:núcleo). Para melhor estabilidade da solução foi necessária a adição de um agente emulsificante (Tween 20), na proporção de 1:1 (núcleo:emulsificante). A dispersão foi então homogeneizada por 2 minutos a 14000 rpm em homogeneizador Turratec (marca TECNAL, modelo TE-102) e submetida ao processo de atomização em mini spray dryer marca BÜCHI, modelo B-290 (Suíça). Imediatamente após a atomização, o produto obtido foi acondicionado em embalagens metálicas que foram seladas a vácuo e armazenadas em dessecador para evitar a exposição à luz e umidade. A formulação foi preparada em três repetições.

## **3.6 Caracterização das nanocápsulas**

### **3.6.1 Tamanho e distribuição**

O tamanho das nanocápsulas, bem como a sua distribuição de tamanho, foram verificados utilizando um analisador de tamanho de partículas Zetasizer Nano, modelo ZS 3600, Malvern. Os resultados obtidos no analisador de tamanho de partícula são mostrados em forma de gráficos de volume como função do tamanho das partículas produzidas em cada amostra.

### **3.6.2 Solubilidade em água**

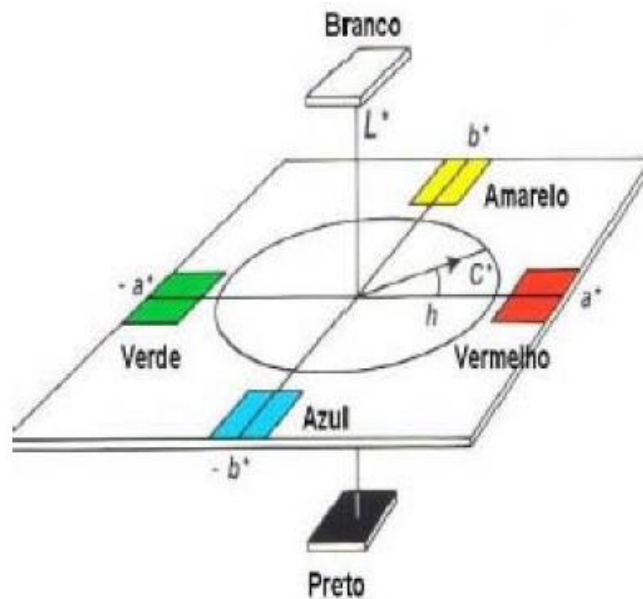
A solubilidade das amostras foi determinada segundo a metodologia descrita por Cano-Chauca *et al.* (2005), com algumas modificações. Para as análise foi pesado 0,25g de cada amostra e adicionados 25 mL de água destilada, obtendo-se uma solução, a qual foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. Em seguida colocou-se 20 mL do sobrenadante em placa de Petri seca e vazia, com massa computada anteriormente, a qual foi levada à estufa de circulação de ar a 105°C por 5 h. Calculou-se a solubilidade pela diferença de massa e os resultados foram expressos em percentual de solubilidade.

### **3.6.3 Cor**

As leituras colorimétricas foram realizadas utilizando-se um colorímetro Minolta (modelo CR 400, Konica Minolta Sensing, Japão) calibrado com um padrão branco. As amostras foram colocadas em placas de petri de 16cm de diâmetro, em quantidade suficiente para cobrir a base da placa, e em seguida foi efetuada a leitura. Em seguida, as porções analisadas foram descartadas.

O resultado foi expresso de acordo com as coordenadas do sistema CIELAB (Figura 9) que inclui as variáveis L\* (luminosidade, numa escala de 0 a 100, indicando pouco brilho e muito brilho, respectivamente), a\* (intensidade de vermelho e verde), b\* (intensidade de amarelo e azul), C\* (Chroma , que representa a saturação de cor) e ângulo Hue (ângulo de tonalidade).

**Figura 9:** Coordenadas do sistema CIELAB de cor



Fonte: HUNTERLAB (1978)

Os valores de croma ( $C^*$ ) e do ângulo Hue ( $H^*$ ) foram calculados a partir dos dados de  $a^*$  e  $b^*$ , de acordo com as Equações 2 e 3 (NACHTIGALL *et al.*, 2009).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$H^* = \arctan(b^*/a^*) \quad (\text{Equação 3})$$

### 3.6.4 Determinação da bixina total

A bixina total (BT) das nanocápsulas foi extraída com clorofórmio, metanol e água, pelo método de Bligh-Dyer, com modificações (CECCHI, 2003). Para o experimento pesou-se 0,20g de nanoencápsulas, adicionou-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol, 8 mL de água destilada e agitou-se a mistura em agitador magnético, por 30 minutos. Após agitação adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. Em seguida, transferiu-se a mistura para um funil de separação âmbar e agitou-se vigorosamente por 1 minuto, deixando o sistema em repouso até completa separação das

fases. Após a separação, a fase orgânica contendo o corante solubilizado foi recolhida em béquer.

A quantificação do teor de bixina total (BT) foi feita segundo metodologia de Barbosa, Borsarelli e Mercadante (2005), com modificações, onde tomou-se um alíquota de 1 mL da fase orgânica e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, aferindo-se o balão com diclorometano. Para o branco tomou-se uma alíquota de 1 mL de clorofórmio e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, aferindo-se o balão com diclorometano.

A bixina total (BT) presente no extrato do urucum nanoencapsulado foi quantificada, por espectrofotometria no  $\gamma^{\text{máx}}$  em diclorometano, utilizando absorvidade de 2826, e absorbância obtida em espectrofotômetro a 470 nm (LARA, 1987),

Os valores de bixina total (BT) foram determinados através da Equação 4. Os resultados foram expressos em mg de bixina por 100g de nanocápsulas.

$$BT = \frac{\text{Abs} \times 10 \times 20 \times 100}{2826 \times m} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: BT = teor de bixina total

Abs = absorbância obtida em espectrofotômetro a 470 nm

m = peso da amostra

### 3.6.5 Determinação da bixina superficial

A quantificação da bixina superficial (BS), ou bixina não encapsulada, foi feita segundo metodologia de Barbosa, Borsarelli e Mercadante (2005), com modificações.

A bixina superficial (BS) foi extraída das nanocápsulas somente com clorofórmio, onde pesou-se 0,20g de nanocápsulas, adicionou-se 58 mL de clorofórmio e centrifugou-se a 3.000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, filtrou-se a amostra, tomou-se 1 mL do filtrado transferindo-se para um balão volumétrico de 10 mL e aferiu-se o balão com diclorometano. Em seguida quantificou-se a bixina superficial, ou não encapsulada, através de espectrofotometria no  $\gamma^{\text{máx}}$ , em diclorometano, utilizando absorvidade de 2826 e absorbância de 470 nm (LARA, 1987).

Os valores de bixina superficial (BS) foram determinados através da Equação 5 e os resultados foram expressos em mg de bixina por 100g de nanocápsulas.

$$BS = \frac{Abs \times 10 \times 58 \times 100}{2826 \times m} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: BS = teor de bixina superficial

Abs = absorvância obtida em espectrofotômetro a 470 nm

m = peso da amostra

### 3.6.6 Eficiência da nanoencapsulação

A eficiência da encapsulação (EE) foi determinada segundo McNamee, O`Riordan e O`Sullivan (2001), pela Equação 6:

$$\% EE = \frac{(BT - BS) * 100}{BT} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: BT = teor de bixina total

BS = teor de bixina superficial

### 3.6.7 Atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante do corante de urucum nanoencapsulado utilizou-se o sistema  $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico, de acordo com metodologia descrita por Miller (1971), com algumas modificações.

Primeiramente obteve-se o extrato do corante nanoencapsulado, onde pesou-se 1g das nanocápsulas em um béquer de 100 mL, adicionou-se 10 mL de metanol 50%, homogeneizou-se e deixou-se o sistema em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 15.000 rpm durante 15 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 25 mL. Ao resíduo da primeira extração, adicionou-se 10 mL de acetona 70%, homogeneizou-se e deixou-se o sistema em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Prosseguindo, centrifugou-se novamente a 15.000 rpm durante 15

minutos, transferiu-se o sobrenadante para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e aferiu-se o balão com água destilada.

A partir do extrato obtido, preparou-se em tubos de ensaio, três diluições diferentes (40, 30 e 20 mg/L), em triplicata. Misturou-se 0,4 mL de cada diluição do extrato com 5 mL da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Utilizou-se para fins de comparação 0,4 mL da solução de trolox (200mg/L) com 5 mL da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e como controle 5,4 mL da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico sem adição do antioxidante sintético (trolox). Homogeneizou-se os tubos de ensaio em agitador e manteve-os em banho-maria a 40°C. Realizou-se a primeira leitura, a 470 nm, após 2 minutos de efetuada a mistura e depois, em intervalos de quinze minutos até 120 minutos. O espectrofotômetro foi calibrado com água. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação (%I.O.) e foi calculado em relação ao decaimento da absorbância do controle (Ac) que foi correlacionado com a queda da absorbância das amostras (Aam), através da Equação 7 :

$$\% \text{ I.O.} = \frac{A_c - A_{am}}{A_c} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:  $A_c = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$

$A_{am} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$

Abs = absorbância

### 3.6.8 Atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foi utilizado o método de disco-difusão de Bauer *et al.* (1966), com algumas modificações. Neste método a atividade antimicrobiana está associada à formação de halos de inibição.

As cepas utilizadas são de padrão American Type Culture Collection (ATCC), incluindo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Salmonella choelerasius* (ATCC 14028).

O experimento consistiu, primeiramente, no preparo de soluções contendo 1 mg/mL, 2 mg/mL e 10 mg/mL das nanocápsulas. Em seguida, as soluções foram impregnadas em discos de papel filtro estéreis (6 mm). O inóculo foi transferido para ágar Müller Hinton, onde os discos foram aplicados sobre o ágar e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, o halo de inibição foi medido. O ensaio foi realizado em triplicata.

### **3.7 Testes de estabilidade**

#### **3.7.1 Estabilidade das nanocápsulas na ausência e presença de luz, através dos teores de bixina total e superficial**

A estabilidade das nanocápsulas foi determinada armazenando-se porções em ausência e presença de luz. As amostras foram acondicionadas em placas de petri e armazenadas em ambiente com temperatura média de 25°C. A condição de ausência de luz foi estabelecida pela acomodação das placas contendo as amostras em caixas de papelão reforçado, totalmente vedadas, mantidas em ambiente sem iluminação. Para a condição de luminosidade as placas foram colocadas em uma câmera de luz (Data Color TRUVUER), monitorada para incidir 2.500 lux, correspondente à luz do dia.

A cada dez dias, durante quarenta dias, fez-se a determinação das coordenadas colorimétricas das amostras e as determinações dos teores de bixina total e bixina superficial nas nanocápsulas, aplicando as metodologias descritas nos itens 3.6.4 e 3.6.5.

#### **3.7.2 Estabilidade do sistema modelo adicionado das nanocápsulas, na ausência e presença de luz, através de parâmetros colorimétricos**

Devido à complexidade das reações químicas que afetam a estabilidade das nanocápsulas durante o processamento de alimentos, torna-se difícil isolar fatores que expliquem as mudanças que ocorrem com a cor dos alimentos adicionados deste composto. Conseqüentemente, essa avaliação requer a utilização de um sistema modelo para a obtenção de informações mais precisas em relação à estabilidade das nanocápsulas.

Neste estudo utilizou-se como sistema modelo a solução-tampão de McIlvaine, conforme metodologia adaptada de Stringheta (1991).

Para a realização dos ensaios de estabilidade, primeiramente, preparou-se uma solução-tampão de McIlvaine com pH 4,0. O preparo dessa solução foi realizado pela mistura de solução de fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,2 M, preparada dissolvendo-se 28,4 de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em 1 L de água destilada, com solução de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) 0,1 M, pela

dissolução de 19,2 do ácido cítrico em 1 L de água destilada. A adição da solução de ácido cítrico 0,1M à solução de fosfato dissódico 0,2 M foi finalizada quando se obteve pH 4,0. À solução final obtida foi adicionado 500 mg/L de sorbato de potássio com intuito de evitar o desenvolvimento de fungos.

Em seguida usou-se 0,20g de cada uma das três amostras de nanocápsulas (repetições), individualmente, para 200 mL de solução tampão de McIlvaine, a fim de distribuir em 18 frascos de vidro com capacidade de 15 mL cada. Para cada amostra (repetição), esse procedimento foi realizado em triplicata. Os frascos contendo as amostras foram hermeticamente fechados, de modo a não permitir a entrada de ar.

No teste de estabilidade na presença de luz, os frascos foram colocados em uma câmara de luz (Data Color TRUVUER), monitorada para incidir 2.500 lux, correspondente à luz do dia, com temperatura média de 25°C. Nos testes realizados na ausência de luz, as amostras foram armazenadas em frascos âmbar, devidamente fechados, os quais foram acomodados em caixas de papelão reforçado, totalmente vedadas, mantidas em ambiente com pouca iluminação, com temperatura média de 25°C.

A cada cinco dias, durante quarenta dias, fez-se a determinação das coordenadas colorimétricas L, a\*, b\*, C\* e H\* para todas as amostras dos tratamentos na ausência e presença de luz. As determinações foram feitas de acordo com a metodologia descrita no item 3.6.3.

### **3.7.3 Estabilidade de iogurte natural acrescido das nanocápsulas, através de parâmetros colorimétricos**

A formulação de corante nanoencapsulado foi empregada em iogurte. Na prática tomou-se 0,20g de cada amostra de nanocápsulas (três repetições), e homogeneizou-se, individualmente, em 200 mL de iogurte natural de marca comercial, sem adição de corante, e distribuiu-se em 9 frascos de vidro âmbar com capacidade de 15 mL cada. Os frascos contendo as amostras foram hermeticamente fechados, de modo a não permitir a entrada de ar e armazenados, durante 40 dias, em incubadora BOD marca TECNAL, modelo TE - 371, a temperatura de  $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ , simulando a forma como é comercializado.

Foram preparados 9 frascos contendo iogurte sem adição de corante nanoencapsulado e submeteu-se as amostras às mesmas condições de armazenamento para serem utilizados como padrão.

A cada cinco dias fez-se a determinação das coordenadas colorimétricas L, a\*, b\*, C\* e H\* para todas as amostras de iogurte (com e sem a adição de nanocápsulas), de acordo com a metodologia descrita no item 3.6.3.

### **3.8 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram desenvolvidas utilizando-se o programa SAS versão 8.1(2006). O experimento foi realizado em três repetições e, em cada repetição foram realizadas as análises em triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de interação entre os processos, as formulações e o tempo de armazenamento. Em seguida, realizou-se análise de regressão até o modelo cúbico, e quando conveniente, foi realizado teste de Tukey para comparação de médias, ao nível de 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teor de bixina no extrato do urucum

O teor de bixina encontrado no extrato do urucum utilizado foi de  $237,56 \pm 2,92$  mg/100 mL. Este resultado é superior ao relatado por outros autores que utilizaram a mesma metodologia. Ao quantificarem bixina no extrato do urucum, Mendes (2012) obteve valor igual a 141,5 mg/ 100 mL e Landim (2008) obteve valor igual a 146 mg/100 mL. O maior teor de bixina obtido no atual trabalho deve-se, provavelmente, a fatores tais como tempo de armazenamento do extrato do urucum e condições de estocagem.

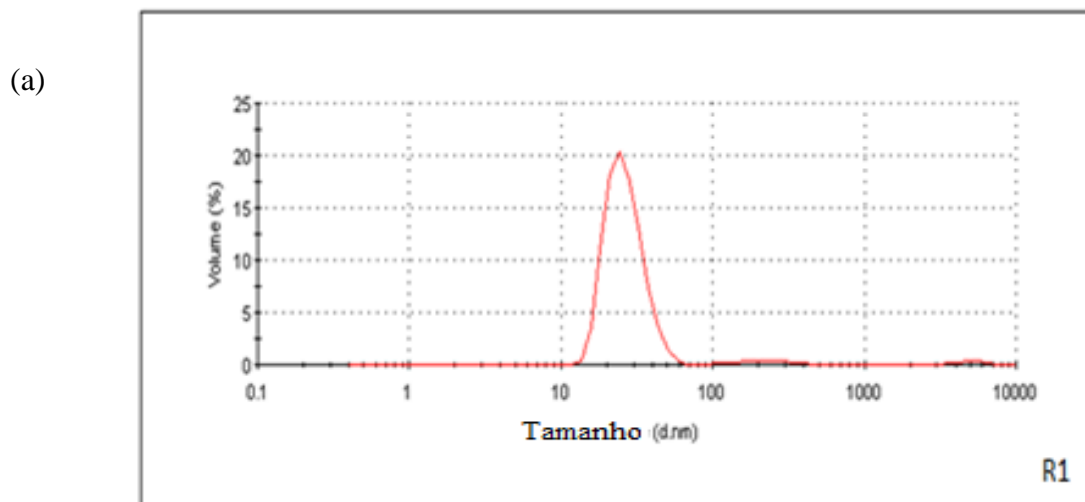
### 4.2 Caracterização das nanocápsulas

#### 4.2.1 Tamanho e distribuição

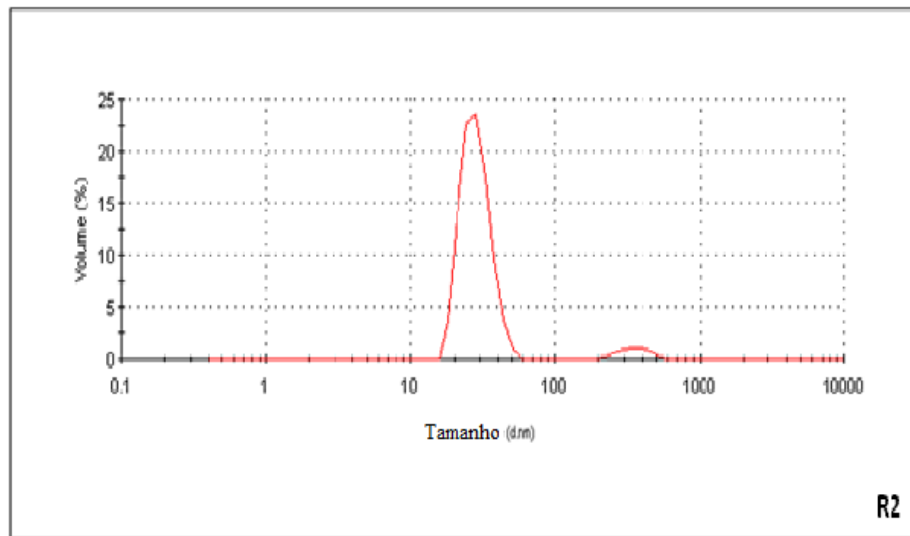
O tamanho médio das nanocápsulas obtidas foi de  $24,17 \pm 3,71$  nm, possuindo uma distribuição por volume de  $97,33 \pm 2,08\%$ , o que demonstra considerado grau de homogeneidade de tamanho.

Os gráficos de distribuição de tamanho de partículas (Figura10) obtidos para as nanocápsulas apresentaram distribuição estreita de tamanho com faixa compreendida entre 10 e 60 nm, característica de nanopartícula.

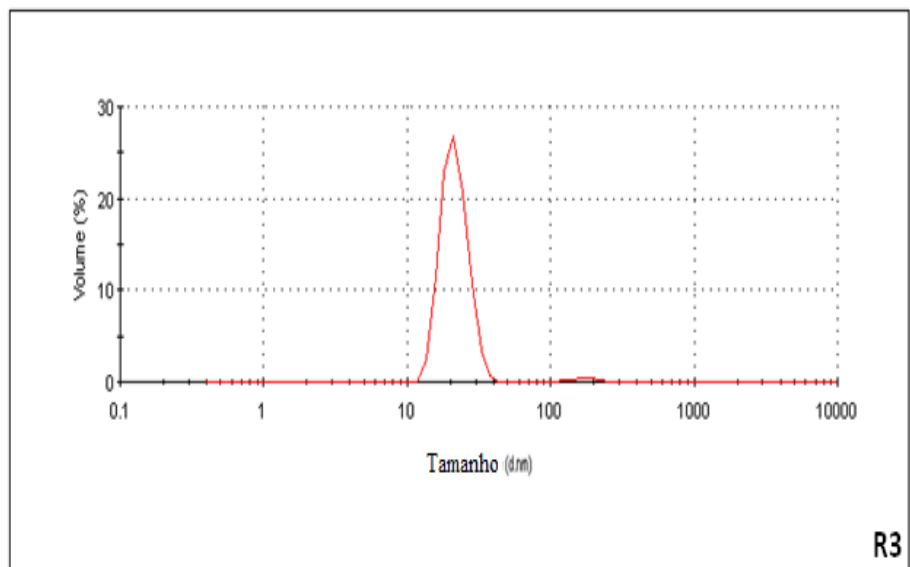
**Figura 10:** Distribuição do tamanho das nanocápsulas obtidas: repetições R1 (a), R2 (b) e R3 (c)



(b)



(c)



Em todos os casos, foram observados pequenos percentuais de volumes de partículas maiores, com diâmetros na faixa de 100nm a 1000nm. Devido aos pequenos registros, tais partículas não conferem polidispersividade às amostras.

Paula et al. (2009) encontraram um tamanho de partícula médio variando de 10 a 60 nm em nanopartículas de goma de angico e quitosana contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. O método de encapsulação utilizado por estes autores também foi a homogeneização seguida da secagem em *spray-drying*, o que demonstra que este método é eficiente na produção de compostos de dimensões nanométricas.

#### 4.2.2 Solubilidade em água

As nanocápsulas obtidas apresentaram solubilidade média de  $74,13\% \pm 3,68$ . Pesquisa desenvolvida por Mendes (2012) encontrou valores semelhantes aos deste estudo, em torno de 75%, para microcápsulas constituída de goma de cajueiro como material de parede e extrato do urucum como núcleo, por processos de liofilização e atomização. Landim (2008) obteve valores de 64% para microcápsulas compostas de maltodextrina e goma de cajueiro como material de parede e extrato do urucum como núcleo e de 68% para microcápsulas compostas de maltodextrina e goma arábica como material de parede e extrato do urucum como núcleo. Estes valores inferiores aos encontrados neste estudo estão provavelmente relacionados às diferentes propriedades dos materiais de parede empregados.

Em experimento desenvolvido por Oliveira (2008) foram observados valores de solubilidade que variaram entre 91,27% e 96,41% para cápsulas compostas de maltodextrina e goma de cajueiro como material de parede e suco de caju como núcleo. Uma vez que a goma de cajueiro e a maltodextrina são solúveis em água, a menor solubilidade encontrada no presente trabalho pode estar associada à alta hidrofobicidade do extrato de urucum.

#### 4.2.3 Eficiência da nanoencapsulação

De acordo com Jafari (2008) a eficiência da encapsulação pode ser definida como a quantidade de material núcleo encapsulado dentro das partículas obtidas.

No presente trabalho a eficiência da nanoencapsulação do extrato do urucum utilizando-se a goma de cajueiro como material de parede foi de  $44,74\% \pm 4,38$ . Moreira (2007) ao encapsular resíduo de acerola utilizando goma de cajueiro e maltodextrina como materiais de parede, indicou um melhor desempenho da goma de cajueiro sobre a maltodextrina em termos de retenção do composto encapsulado.

Em pesquisa realizada com óleo essencial de *Citrus sinensis* encapsulado em quitosana, Gonsalves *et al.* (2009) obtiveram eficiência de 31,16%. Mendes (2012) obteve eficiência de 26,93% e 31,21% para extrato do urucum microencapsulado em goma de cajueiro e goma arábica associada à goma de cajueiro, respectivamente.

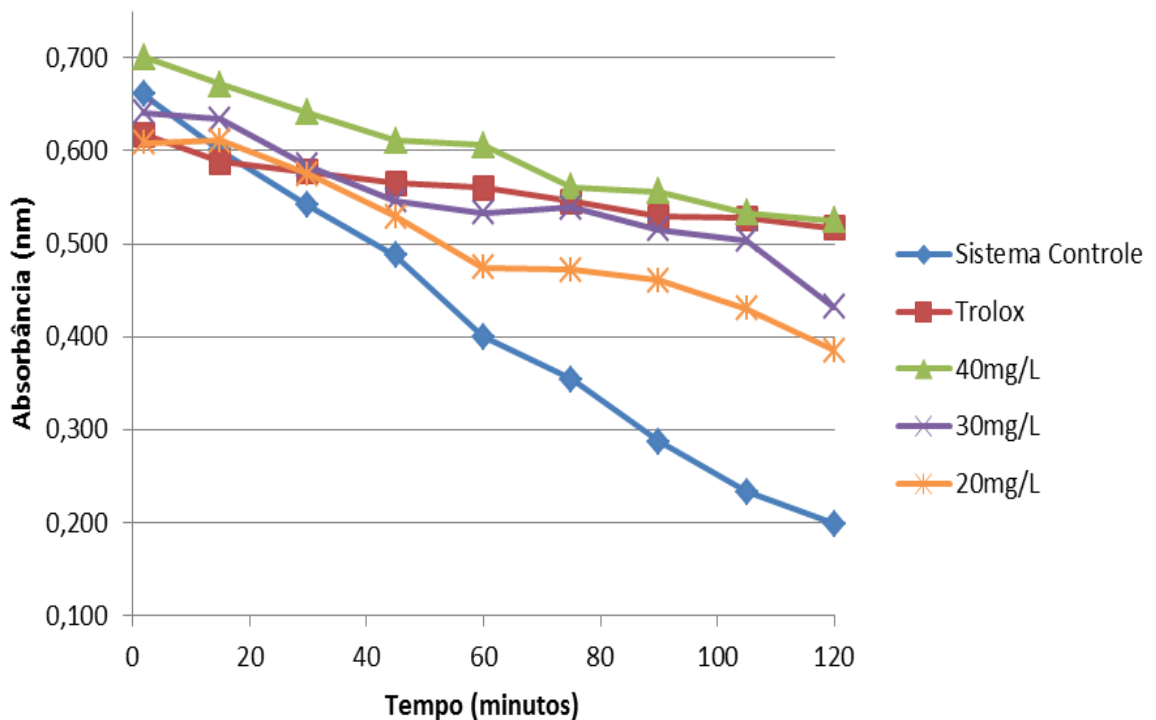
A maior eficiência de encapsulação observada neste estudo, em relação às referências citadas, pode estar associada a um processo de homogeneização mais eficiente,

durante o preparo da emulsão, o que resulta em uma melhor interação entre o material núcleo e o agente encapsulante, favorecendo o processo de nanoencapsulação.

#### 4.2.4 Atividade antioxidante

A Figura 11 mostra a curva cinética obtida através da diminuição da absorbância a 470 nm, medida durante 120 minutos, proveniente da descoloração do  $\beta$ -caroteno, devido à oxidação do  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico na presença do extrato obtido das nanocápsulas (concentrações de 40mg/L, 30mg/L e 20mg/L), sem a adição do extrato (sistema controle) e com a adição de um antioxidante sintético (trolox).

**Figura 11:** Atividade antioxidante dos extratos contendo 40 mg/L, 30 mg/L e 20 mg/L das nanocápsulas, em função do tempo de armazenamento



Observa-se rápida oxidação do sistema controle, comportamento este diferente das amostras adicionadas do antioxidante sintético Trolox ou das nanocápsulas, o que indica capacidade antioxidante das nanocápsulas contendo extrato do urucum. Diversos estudos têm observado o efeito antioxidante do urucum e seus derivados (GARCIA *et al.*, 2012; KIOKIAS e OREOPOULOU, 2006; MARTÍNEZ-TOMÉ *et al.*, 2001).

#### 4.2.4.1 Inibição da Oxidação (% I.O.)

Os extratos obtidos das nanocápsulas apresentaram percentuais médios de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno correspondente a 61,90%, 54,576% e 51,73%, para as concentrações de 40mg/L, 30mg/L e 20mg/L, respectivamente, sendo esse valor inferior ao obtido com o antioxidante sintético Trolox, que apresentou valor de 78,36%. Contudo, estes resultados sugerem que as nanocápsulas contendo extrato do urucum podem ser utilizadas com a finalidade de fornecer, além da cor, estabilidade oxidativa.

Verifica-se através dos resultados que a concentração dos extratos influencia no percentual de inibição da oxidação (% IO), ou seja, quanto mais elevada a concentração maior o percentual de proteção.

Em estudo da atividade antioxidante em diferentes genótipos de urucum Lemos *et al.* (2007) encontraram em extrato hidroetanólico, oriundo de sementes secas de urucum da variedade CPATU 0060, um percentual de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno correspondente a 70,10%. Vale ressaltar que no presente estudo foram avaliados apenas os pigmentos do extrato do urucum nanoencapsulado, portanto, o processo de extração pode ter colaborado para o reduzido percentual de inibição da oxidação, por restringir os compostos presentes aos pigmentos.

#### 4.2.5 Atividade antimicrobiana

A Tabela 1 mostra os tamanhos dos halos de inibição formados para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, utilizando concentrações de 1 mg/L, 2 mg/L e 10 mg/L de nanocápsulas contendo extrato do urucum.

**Tabela 1:** Medidas dos halos de inibição formados, utilizando concentrações de 1 mg/L, 2 mg/L e 10 mg/L de nanocápsulas contendo extrato do urucum

Concentração das nanocápsulas	Halo de inibição (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775)	<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC 14028)
1mg/L	8,0 $\pm$ 2,0	*	*
2mg/L	5,0 $\pm$ 0,0	*	*
10mg/L	5,0 $\pm$ 1,0	*	*

\* Não houve formação de halo de inibição.

Dentre os microrganismos testados, as nanocápsulas contendo extrato do urucum apresentaram formação de halos de inibição frente ao *Staphylococcus aureus*, em todas as concentrações analisadas, indicando presença de atividade antimicrobiana.

Segundo Gul *et al.* (2004) a atividade antimicrobiana observada para bactérias gram positivas, como o *Staphylococcus aureus*, pode estar associada ao fato destas não possuírem uma membrana externa capaz de restringir a penetração de substâncias. Em estudo do efeito antibacteriano de diferentes porções da *Curcuma longa*, este mesmo autor observou que a cúrcuma inibiu o crescimento de algumas bactérias, como *Staphylococcus aureus*, mas não inibiu a *Escherichia coli*, que é gram negativa.

Majolo (2009) em pesquisa da atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes acessos de *Bixa orellana L.* (urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes, verificou que a atividade antibacteriana de extratos de sementes secas de *Bixa orellana* apresentou-se seletiva, sendo que as bactérias gram positivas foram mais sensíveis.

Os halos de inibição para *Staphylococcus aureus* apresentaram diâmetro médio de 5mm para as concentrações de 10 mg/mL e 2mg/mL, e de 8mm para a concentração de 1mg/mL (Tabela 1).

Verificou-se durante o experimento que o corante nanoencapsulado exibiu dificuldade de dispersão no meio de cultura, principalmente para as soluções com maior concentração do composto. Esta dificuldade de dispersão pode justificar o fato de os maiores halos terem sido formados naqueles discos imersos em soluções menos concentradas.

Nascimento *et al.* (2007), em estudo sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, afirmaram que o volume e a concentração dos óleos são parâmetros que também devem ser observados na avaliação do efeito antimicrobiano, pois podem afetar os resultados do sistema-teste. Deve-se ressaltar que o corante de urucum é um extrato oleoso e, mesmo nanoencapsulado, ainda pode apresentar certa hidrofobicidade.

Neste experimento o corante de urucum nanoencapsulado não apresentou formação de halo frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*. Almeida (2006), em estudo de verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* da cúrcuma e derivados, não obteve formação de halo de inibição contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli*, utilizando extratos etanólicos da cúrcuma, da curcumina e da desmetoxicurcumina.

Gonçalves (2005), em estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas observou que o extrato hidro-alcoólico de urucum apresentou

atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*. Coelho *et al.* (2003) em estudo da atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (urucum), encontraram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Bacillus* sp, *Bacillus subtilis*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*, utilizando tinturas de *B. orellana* preparadas a partir de seus órgãos e suas drogas, tinturas liofilizadas e tinturas obtidas de drogas originadas dos órgãos do fruto imaturo e flor.

Os resultados obtidos no presente estudo não excluem o potencial antimicrobiano do corante de urucum nanoencapsulado contra outros microrganismos, sendo necessários ensaios complementares, utilizando um modelo experimental diferente, pois, como citado anteriormente, o corante apresentou dificuldade para se difundir em ágar, o que poderia justificar a ausência de atividade contra os microrganismos *Escherichia coli* e *Salmonella choelerasius*.

### 4.3 Testes de estabilidade

#### 4.3.1 Estabilidade das nanocápsulas na ausência e presença de luz, através dos teores de bixina total e superficial

Na Tabela 2 estão os resultados da quantificação de bixina total e superficial nas nanocápsulas obtidas, durante os 40 dias de armazenamento.

**Tabela 2:** Valores de bixina total e superficial nas nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na ausência e presença de luz

Armazenamento (dias)	Presença de luz		Ausência de luz	
	Teor de bixina total (mg/100g)	Teor de bixina superficial (mg/100g)	Teor de bixina total (mg/100g)	Teor de bixina superficial (mg/100)
0	50,21 ± 4,63	27,64 ± 2,13	50,21 ± 4,63	27,64 ± 2,13
10	44,31 ± 2,55	18,41 ± 2,20	49,03 ± 3,74	21,28 ± 1,15
20	31,71 ± 2,27	8,65 ± 1,62	35,05 ± 2,99	12,44 ± 4,49
30	24,26 ± 0,69	10,81 ± 1,43	35,94 ± 1,23	16,45 ± 0,80
40	10,80 ± 1,25	11,18 ± 2,06	29,18 ± 4,61	20,46 ± 2,07

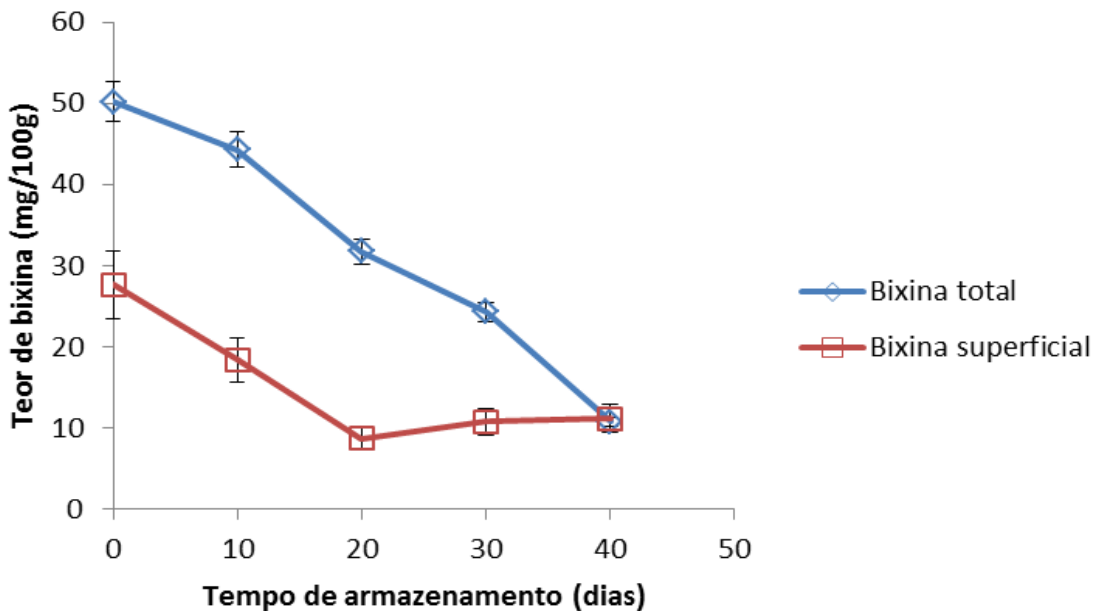
Médias seguidas de desvios padrões

Para as análises de quantificação de bixina total e superficial verificou-se interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os processos (presença e ausência de luz) e o tempo de armazenamento (0, 10, 20, 30 e 40 dias), portanto, a análise de regressão foi feita separadamente, para as amostras armazenadas na presença e ausência de luz, testando-se até modelo cúbico.

#### 4.3.1.1 Quantificação do teor de bixina total e superficial na presença de luz

Os modelos testados não se adequaram aos valores de bixina total e superficial das nanocápsulas contendo extrato de urucum armazenadas na presença de luz, a temperatura média de 25°C. Na Figura 12 pode ser observado o comportamento dos teores de bixina total e superficial na presença de luz, obtidos neste estudo. Conforme observado na Tabela 2, os valores de bixina total variaram de 50,21 mg/100g a 10,80 mg/100g, e de bixina superficial oscilaram de 27,64 mg/100g a 8,65 mg/100g, para amostras submetidas à luz.

**Figura 12:** Teores de bixina total e superficial das nanocápsulas contendo extrato de urucum, em função do tempo, na presença de luz



Os valores de bixina total comportaram-se de forma decrescente o que pode ser possivelmente atribuído à degradação do pigmento exposto à luz, uma vez que estudos, como o de Mendes (2012), mostram que a bixina é rapidamente degradada nesta condição. Os dados apresentados na Tabela 2 reforçam esse comportamento, que revela maiores valores para o

processo de degradação da bixina presente nas nanocápsulas expostas à luz que naquelas acondicionadas na ausência de luz.

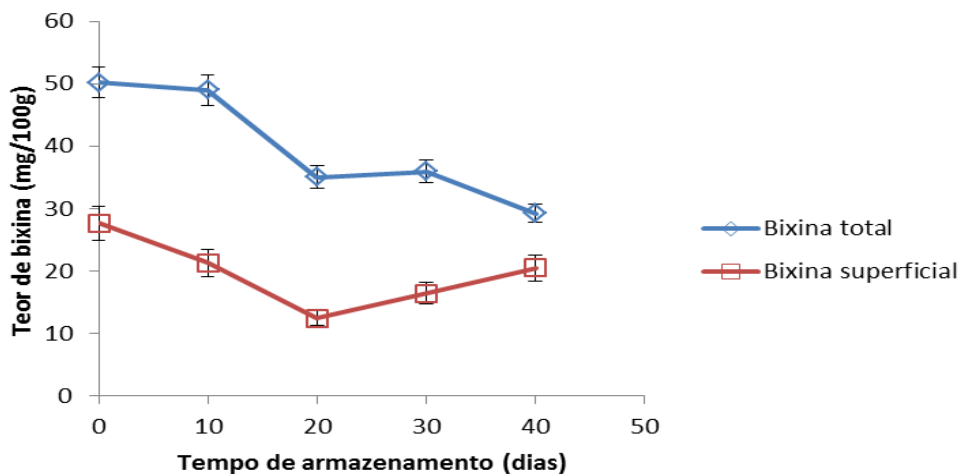
Segundo Azeredo (2005) o processo de encapsulação permite que a liberação do material do núcleo ocorra lentamente com o tempo, ou a partir da ocorrência de certo evento. A diminuição do teor de bixina superficial até o tempo de 20 dias de armazenamento e seu posterior aumento após este tempo, estão possivelmente associados ao mecanismo de liberação controlada. Dessa forma pode-se considerar que a bixina contida na superfície externa da nanocápsula foi primeiramente degradada pela luz, seguido da liberação do pigmento contido no interior da nanocápsula, o que, provavelmente justifica os aumentos determinados nos teores de bixina. É importante mencionar que tais aumentos não são expressivos, pois, certamente, tem-se degradação dos conteúdos liberados.

#### 4.3.1.2 Quantificação do teor de bixina total e superficial na ausência de luz

Os modelos testados não se adequaram aos valores de bixina total e superficial das nanocápsulas contendo extrato do urucum armazenadas na ausência de luz, a temperatura média de 25°C, durante os 40 dias de armazenamento.

A degradação da bixina total na ausência de luz se comportou de forma semelhante àquela observada na presença de luz, ou seja, aumentou com o tempo, conforme pode ser verificado na Figura 13, embora ao avaliarmos em termos percentuais a bixina total teve uma redução de 78,48% para as nanocápsulas expostas à luz, enquanto que na condição de ausência de luz essa redução foi de apenas 41,88%.

**Figura 13:** Teores de bixina total e superficial das nanocápsulas contendo extrato de urucum, em função do tempo, na ausência luz



Os valores de bixina superficial variaram de 27,64 mg/100g a 12,44 mg/100g até o tempo de 20 dias de armazenamento, e depois aumentaram até o valor de 20,46 mg/100g, em comportamento semelhante para o observado na condição de presença de luz. De acordo com Assis *et al.* (2012), em compostos nanoencapsulados o revestimento permite o controle da liberação das substâncias ativas contidas em seu interior, portanto as observações de Azeredo (2005), apresentadas no item 4.3.1.1, são concordantes com as divulgadas por Assis *et al.* (2012). Assim, a goma do cajueiro permitiu a lenta liberação de bixina para a superfície das nanocápsulas, o que fez com que seus teores variassem durante o seu armazenamento.

Semelhante ao justificado para o material exposto à luz, a redução e posterior aumento do teor de bixina superficial, possivelmente deve-se a degradação da porção não encapsulada e sequencialmente a migração para a superfície da porção interna. Como não se tem, nesta situação, a ação direta da luz, a degradação é decorrente, provavelmente, de oxidação, provocada pela permeação do ar através das paredes das caixas de papelão utilizadas para estocar as amostras.

A conhecida e já apresentada ação degradativa da luz sobre a bixina pode ser observada na Tabela 2, quando se considera não apenas os maiores valores referentes à redução dos teores desse pigmento nas amostras expostas à luz, mas também quando se considera o aumento dos teores após os vinte dias de armazenamento, onde, menores aumentos são constatados nas amostras expostas à luz, indicando maior velocidade de degradação, quando comparada a das amostras armazenadas na ausência de luz.

#### **4.3.2 Estabilidade das nanocápsulas na ausência e presença de luz, através de parâmetros colorimétricos**

Na Tabela 3 estão os resultados das análises de cor das nanocápsulas, obtidas durante os 40 dias de armazenamento.

Para os parâmetros colorimétricos  $a^*$ ,  $b^*$ , Croma e ângulo Hue, houve interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os processos (presença e ausência de luz) e o tempo de armazenamento (0, 10, 20, 30 e 40 dias), assim, a análise de regressão foi testada separadamente, para as amostras armazenadas na presença e ausência de luz, até o modelo cúbico. Já para o parâmetro  $L^*$  não houve interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as condições de presença ou ausência de luz e o tempo de armazenamento, então, a análise de regressão foi testada em conjunto, para as amostras armazenadas na presença e ausência de luz, até o

modelo cúbico. De acordo com os dados apresentados na Tabela 3 verifica-se que no teste de média houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras armazenadas na presença e ausência de luz.

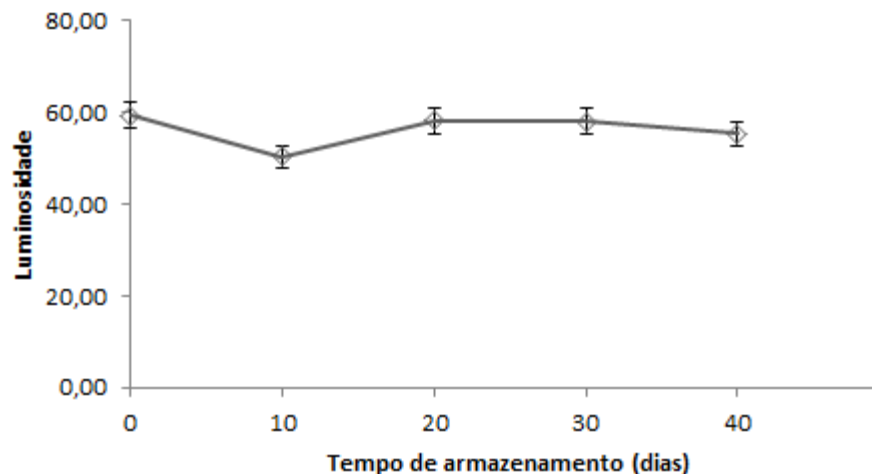
**Tabela 3:** Coordenadas colorimétricas das nanocápsulas contendo extrato do urucum, na presença e ausência de luz, em função do tempo de armazenamento, a 25°C

	Armazenamento (dias)	L*	L* médio	a*	b*	Croma	Hue
Presença de luz	0	59,36 ± 3,96		24,87 ± 1,03	47,93 ± 2,21	54,00 ± 2,42	61,89 ± 1,63
	10	52,20 ± 3,11		24,17 ± 1,05	40,81 ± 1,99	47,43 ± 2,24	59,36 ± 0,29
	20	52,92 ± 4,39	57,44 <sup>a</sup>	16,63 ± 2,82	24,74 ± 5,75	29,82 ± 6,32	55,74 ± 1,96
	30	61,92 ± 1,59		17,96 ± 2,83	28,82 ± 3,88	33,96 ± 4,79	58,13 ± 0,66
	40	60,78 ± 3,94		13,00 ± 3,26	22,23 ± 4,29	25,76 ± 5,35	59,92 ± 1,44
Ausência de luz	0	59,36 ± 3,96		24,87 ± 1,03	47,93 ± 2,21	54,00 ± 2,42	61,89 ± 1,63
	10	48,50 ± 3,36		23,14 ± 1,51	41,70 ± 2,18	47,61 ± 2,71	60,98 ± 0,84
	20	47,83 ± 3,70	51,95 <sup>b</sup>	22,82 ± 1,19	40,50 ± 2,02	46,54 ± 2,40	60,60 ± 0,23
	30	54,20 ± 3,51		25,55 ± 2,39	44,94 ± 3,27	50,59 ± 3,98	60,41 ± 0,63
	40	49,86 ± 4,04		24,16 ± 2,52	41,95 ± 2,52	48,44 ± 2,89	60,00 ± 0,53

Médias seguidas de desvios padrões

A coordenada L\* (luminosidade) é uma medida de quanto mais clara ou mais escura é a amostra, com valores variando de 0 (totalmente preta) a 100 (totalmente branca) (SPADA, 2011). A Figura 14 apresenta o gráfico do comportamento do parâmetro colorimétrico L\* em função do tempo, para as nanocápsulas armazenadas na presença e ausência de luz, a 25°C, cujos modelos testados não se adequaram aos valores obtidos.

**Figura 14:** Luminosidade das nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C



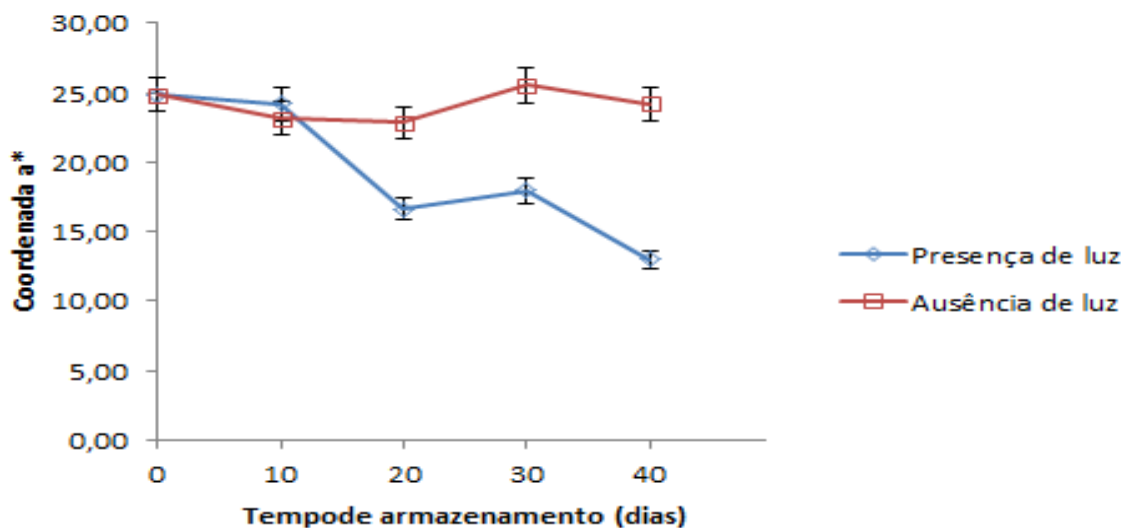
Diversos estudos relatam um aumento no valor de  $L^*$  em compostos encapsulados expostos à luz (MENDES, 2012; SPADA, 2011; NACHTIGALL *et al.*, 2009), indicando que as amostras foram tornando-se mais claras com o passar do tempo. Nesta pesquisa os valores de  $L^*$  não sofreram o aumento relatado nos demais estudos, indicando que a degradação do pigmento contido nas nanocápsulas não tendeu ao branco.

Em relação aos valores da coordenada  $a^*$ , as amostras armazenadas na presença de luz apresentaram um decréscimo de 47,73% durante os 40 dias de armazenamento. Como valores positivos de  $a^*$  quantificam a intensidade de vermelho, este comportamento era esperado, visto que na presença de luz os pigmentos vermelhos/alaranjado que constituem os pigmentos do urucum são degradados a compostos amarelos.

Em estudo com microcápsulas constituídas de  $\beta$ -caroteno encapsulado em manitol/gelatina, submetidas a diferentes umidades relativas à 25° C, Sutter *et al.* (2006) reportaram que a coordenada de cor  $a^*$  foi a que melhor se correlacionou com a degradação do pigmento na superfície das microcápsulas. Elizalde, Herrera e Buera (2002) em pesquisa de avaliação da alteração de cor de  $\beta$  - caroteno encapsulado em matriz de trealose/gelatina estocado em diferentes atividades de água, verificaram que a coordenada de cor  $a^*$  foi a que melhor se correlacionou com a degradação do carotenóide.

Na Figura 15 observa-se o comportamento da coordenada  $a^*$  durante o período de estocagem das nanocápsulas na presença e ausência de luz.

**Figura 15:** Coordenada  $a^*$  das nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C



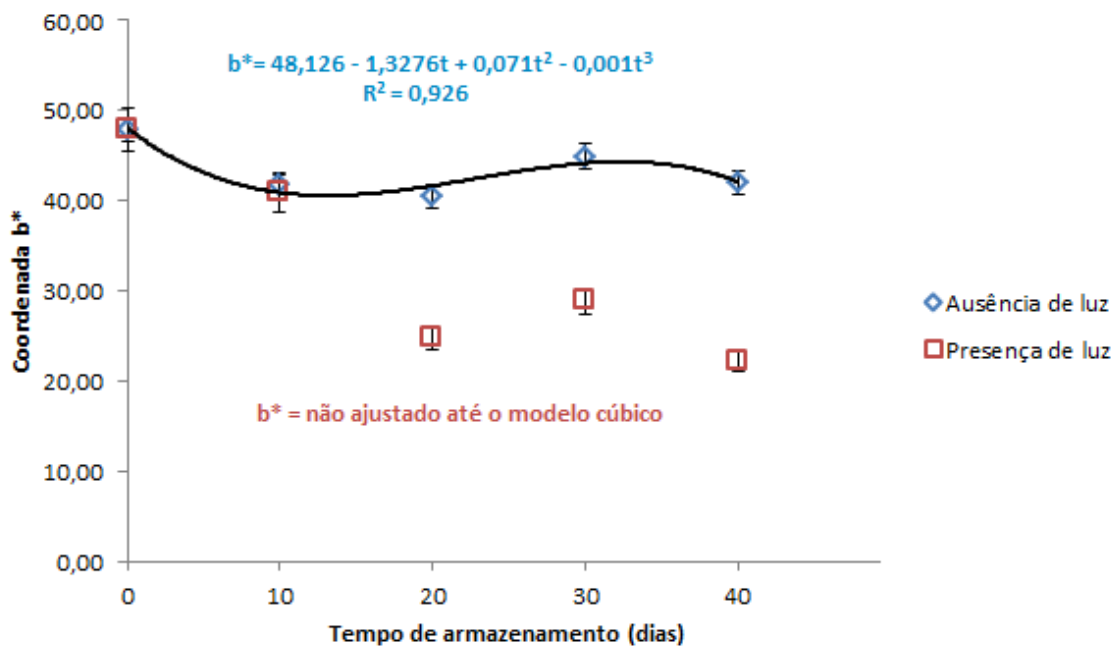
Na ausência de luz percebe-se que a degradação dos componentes vermelhos do corante nanoencapsulado ocorreu de forma mais suave, uma vez que os valores de  $a^*$  sofreram um decréscimo menor quando comparados com os das amostras submetidas à luz.

Na Tabela 3 verifica-se um decréscimo nos valores da coordenada  $b^*$  durante os quarenta dias, para ambas as condições de armazenamento. De acordo com Spada (2011) esse parâmetro caracteriza o eixo azul-amarelo e oscilações nos seus valores podem significar aumento ou perda na cor amarela. A acentuada redução dos valores é coerente com a condição de exposição à luz.

Oscilações da cor amarela são comuns nos processos de degradação de carotenoides, aonde os componentes avermelhados vão se degradando e gerando componentes amarelados, que por sua vez, também sofrem degradação (LANDIM, 2008). Uma vez protegidos da luz, esta degradação é mais lenta, o que justifica as pequenas variações nos valores de  $b^*$  para as amostras armazenadas ao abrigo da luz (Tabela 3).

O comportamento do parâmetro colorimétrico  $b^*$  em função do tempo, para as nanocápsulas mantidas na ausência e presença de luz pode ser observado na Figura 16. Os valores de  $b^*$  para as amostras mantidas ao abrigo da luz se ajustaram ao modelo cúbico, variando de  $47,93 \pm 2,21$  a  $40,50 \pm 2,02$ .

**Figura 16:** Coordenada  $b^*$  das nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na ausência e presença de luz, a 25°C

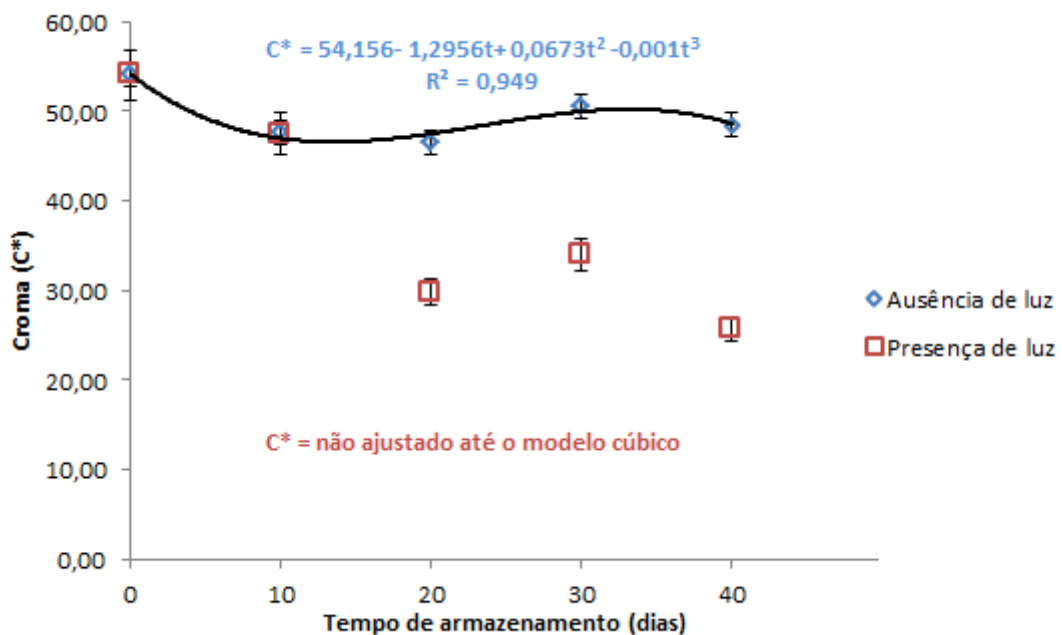


Para as amostras armazenadas na presença de luz, os valores de  $b^*$  variaram de  $47,93 + 2,21$  a  $22,23 + 4,29$ , o que indica uma tendência à diminuição da cor amarela ao longo do período de armazenamento.

Os modelos testados não se adequaram aos valores de croma ( $C^*$ ), que representa a saturação de cor, para as amostras armazenadas sob a luz. De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, podemos observar que este parâmetro apresentou uma tendência gradativa à diminuição, ao longo do período de armazenamento. Comportamento semelhante foi descrito por Mendes (2012), em estudo com extrato do urucum microencapsulado em goma de cajueiro. Este autor atribuiu a diminuição da saturação da cor a maiores reduções dos valores de  $a^*$  e  $b^*$ , com o tempo de armazenamento, que resultou na redução da percepção da cor, uma vez que o croma ( $C^*$ ) é obtido pela relação entre esses valores. Tal comportamento, ou seja, a redução dos valores de  $a^*$  e  $b^*$  nas amostras armazenadas sob a luz, também foi observado neste estudo (Tabela 3), o que colabora para justificar a redução dos valores de  $C^*$ .

Para as amostras armazenadas em condições de ausência de luz, os valores de croma se ajustaram ao modelo cúbico. O comportamento da saturação da cor nas nanocápsulas contendo extrato do urucum, armazenadas na ausência e presença de luz, pode ser visualizado na Figura 17.

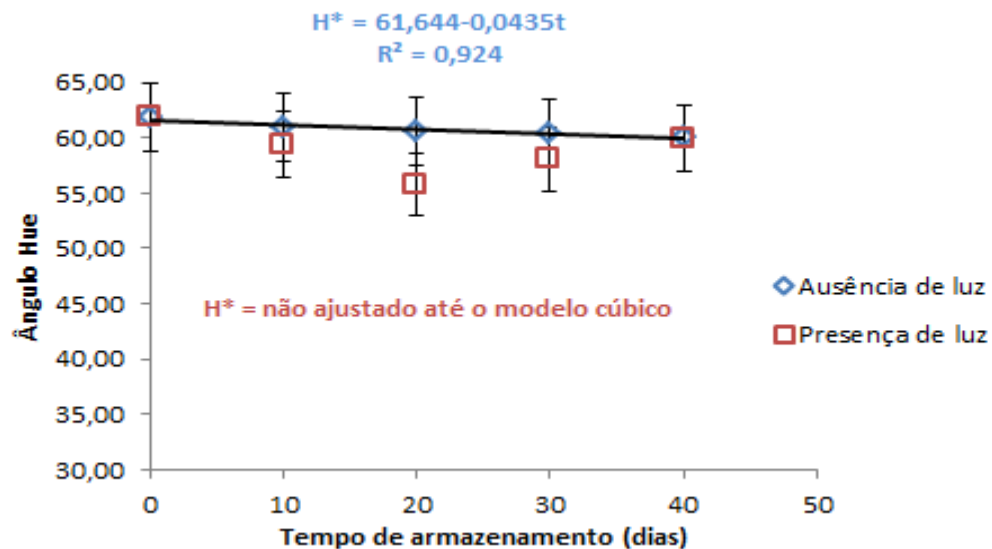
**Figura 17:** Saturação da cor ( $C^*$ ) das nanocápsulas em função do tempo para as amostras armazenadas na ausência de luz



O menor declínio dos valores de croma nas amostras armazenadas ao abrigo da luz, quando comparadas com as nanocápsulas armazenadas na presença de luz, pode estar relacionado a pouca variação dos valores dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  nas amostras estocadas na ausência de luz, resultando em valores para  $C^*$  maiores e com menores variações (Tabela 3). Como citado anteriormente, existe uma relação entre os valores de  $a^*$  e  $b^*$  e o croma.

O ângulo de tonalidade (Hue) se comportou de forma decrescente nas amostras armazenadas sem a presença de luz (Figura 18), se enquadrando ao modelo linear, com tendência a diminuição gradativa ao longo do período de armazenamento.

**Figura 18:** Ângulo Hue das nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na ausência e presença de luz, a 25°C



Para as amostras armazenadas na presença de luz, os valores de Hue variaram de  $61,89 \pm 1,63$  a  $55,74 \pm 1,96$ , o que indica uma diminuição na tonalidade das nanocápsulas contendo extrato do urucum durante os 40 dias de armazenamento, o que é condizente com as reduções das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ . Nenhum dos modelos estudados se enquadrou nesses valores.

#### 4.3.3 Estabilidade do sistema modelo (solução tampão) adicionado das nanocápsulas, na ausência e presença de luz, através de parâmetros colorimétricos

Para os sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, a análise de interação para os parâmetros colorimétricos  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e ângulo Hue

detectou interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as condições de armazenamento (presença e ausência de luz) e o tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias), portanto a análise de regressão foi testada separadamente para os dois processos, até o modelo cúbico. Para o parâmetro  $L^*$  não houve interação significativas entre as condições de presença ou ausência de luz e o tempo de armazenamento, então, a análise de regressão foi testada em conjunto, para as amostras armazenadas na presença e ausência de luz, até o modelo cúbico. Os resultados das análises de cor dos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, obtidos durante os 40 dias de armazenamento, estão dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Coordenadas colorimétricas do sistema modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na ausência e presença de luz, a 25°C

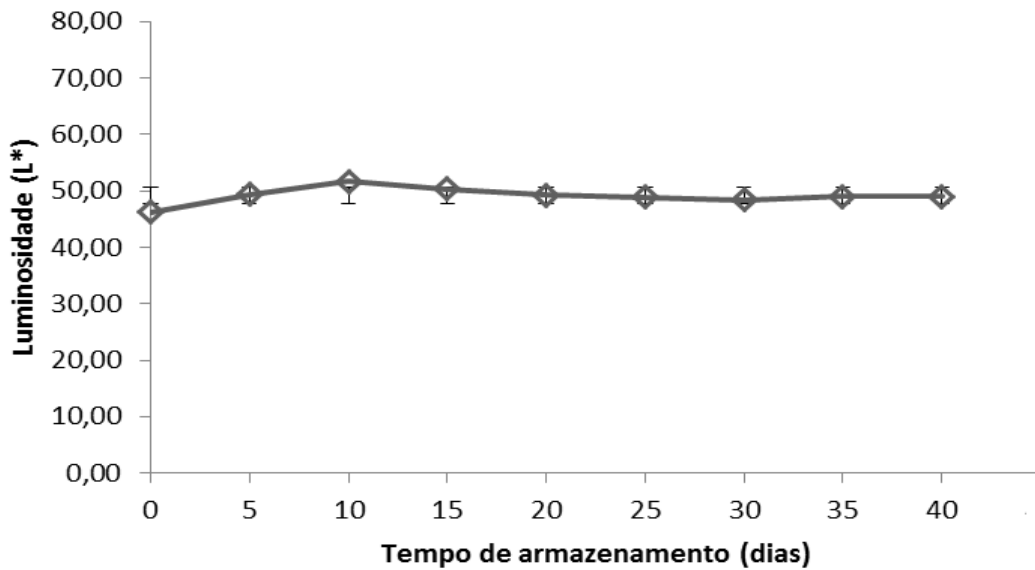
	Armaze- namento (dias)	$L^*$	$L^*$ médio	$a^*$	$b^*$	Croma	Hue
Presença de luz	0	46,23 ± 1,00		-0,28 ± 0,03	8,85 ± 0,40	8,85 ± 0,41	91,82 ± 0,25
	5	50,46 ± 0,75		0,21 ± 0,09	2,86 ± 0,18	2,87 ± 0,18	85,58 ± 1,93
	10	51,62 ± 1,05		-0,97 ± 0,14	1,52 ± 0,17	1,81 ± 0,15	122,68 ± 5,05
	15	52,18 ± 1,96		-0,78 ± 0,11	0,30 ± 0,04	0,83 ± 0,11	158,44 ± 3,21
	20	51,00 ± 1,40	50,35 <sup>a</sup>	-0,84 ± 0,09	0,13 ± 0,23	0,88 ± 0,09	171,32 ± 15,16
	25	50,30 ± 0,80		-1,16 ± 0,05	0,58 ± 0,12	1,30 ± 0,07	153,44 ± 5,00
	30	49,92 ± 0,55		-1,24 ± 0,03	0,61 ± 0,12	1,38 ± 0,07	153,83 ± 4,40
	35	50,80 ± 0,24		-1,24 ± 0,01	1,07 ± 0,18	1,64 ± 0,12	139,27 ± 4,74
	40	50,62 ± 0,25		-1,43 ± 0,07	1,11 ± 0,21	1,82 ± 0,11	142,21 ± 6,07
Ausência de luz	0	46,23 ± 1,00		-0,28 ± 0,03	8,85 ± 0,40	8,85 ± 0,41	91,82 ± 0,25
	5	48,25 ± 0,91		-0,47 ± 0,03	8,46 ± 0,63	8,46 ± 0,62	93,22 ± 0,24
	10	51,62 ± 1,05		-0,30 ± 0,10	8,86 ± 0,12	8,86 ± 0,13	47,72 ± 1,09
	15	48,51 ± 1,75		0,06 ± 0,15	8,14 ± 0,40	8,14 ± 0,39	89,51 ± 1,07
	20	47,37 ± 1,55	47,86 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,18	7,66 ± 0,15	7,66 ± 0,15	89,34 ± 1,35
	25	47,47 ± 0,82		-0,14 ± 0,07	7,89 ± 0,48	7,89 ± 0,48	91,07 ± 0,62
	30	46,81 ± 0,47		-0,17 ± 0,09	7,60 ± 0,22	7,60 ± 0,22	91,27 ± 0,70
	35	47,25 ± 0,44		-0,11 ± 0,03	8,10 ± 0,04	8,10 ± 0,04	90,75 ± 0,23
	40	47,26 ± 0,27		-0,30 ± 0,10	8,02 ± 0,26	8,03 ± 0,25	92,17 ± 0,80

Médias seguidas de desvios padrões

Os modelos estatísticos testados não se adequaram aos valores dos parâmetros colorimétricos para as amostras armazenadas tanto na ausência como na presença de luz.

O comportamento da luminosidade ( $L^*$ ) para os sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, durante os quarenta dias de armazenamento, pode ser observado na Figura 19. O teste de média detectou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para os valores de  $L^*$ , entre as amostras armazenadas na ausência e presença de luz.

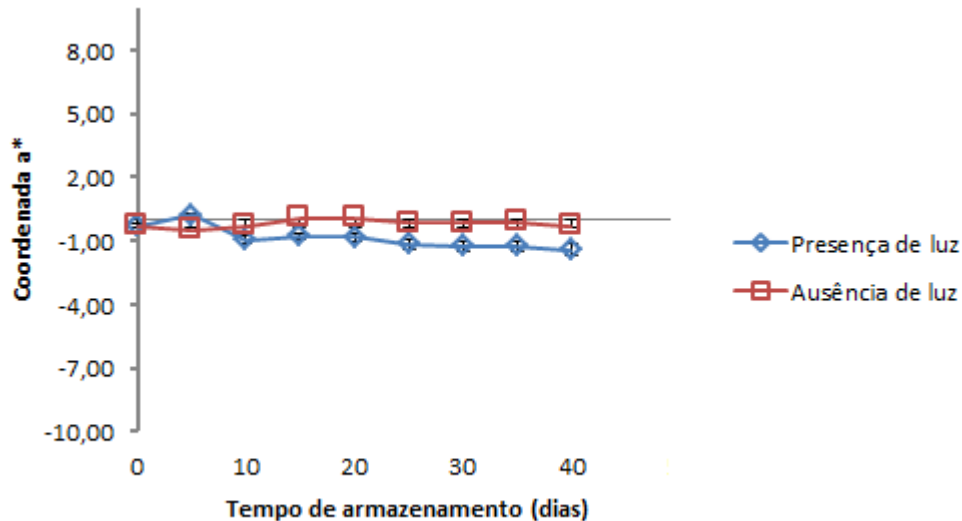
**Figura 19:** Luminosidade ( $L^*$ ) em função do tempo nos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum na presença e ausência de luz



Segundo Melendez-Martinez, Vicario e Heredia (2004), a ação de luz intensa em carotenóides induz a ruptura da molécula com a consequente formação de compostos incolores de baixo peso molecular, aumentando os valores de  $L^*$ . De acordo com a Figura 19 podemos observar que os valores de  $L^*$  para os sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum apresentaram pequena variação. Tal comportamento indica que o meio utilizado (solução tampão) promoveu estabilidade às nanocápsulas obtidas, protegendo assim o extrato de urucum encapsulado da degradação.

A componente  $a^*$  tem sido utilizada para descrever a degradação dos carotenóides encapsulados em diferentes tipos de sistemas modelo, uma vez que esse parâmetro corresponde ao componente vermelho da cor (Elizalde *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2006; Sutter *et al.*, 2006). A Figura 20 representa o comportamento da coordenada  $a^*$  para o sistema modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, durante os quarenta dias de armazenamento, nas condições de presença e ausência de luz.

**Figura 20:** Comportamento da coordenada  $a^*$  dos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C

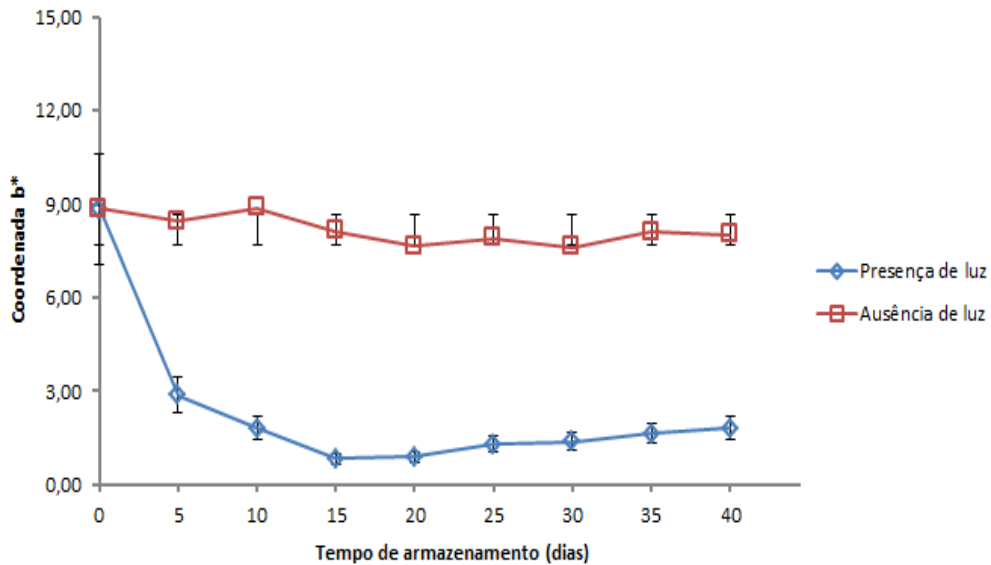


De acordo com a Figura 20 verificamos um decréscimo nos valores de  $a^*$  para os sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum submetidos à luz. Como já citado anteriormente, a degradação dos compostos vermelhos do extrato do urucum resultam em compostos amarelos, e estes, na presença de luz, também são degradados. Comportamento diferente pode ser observado na condição de ausência de luz, onde a coordenada  $a^*$  sofreu pequena variação. Como já apresentado o sistema modelo parece ter proporcionado conservação às nanocápsulas, com a preservação dos pigmentos vermelhos, constatado pela tendência à estabilidade da coordenada  $a^*$  na ausência de luz.

O parâmetro  $b^*$  (Figura 21) sofreu uma queda acentuada nos primeiros cinco dias de armazenamento na condição de presença de luz, o que demonstra que a degradação dos compostos amarelos foi maior do que a sua formação, nesse período. Na sequência, observa-se pequena variação, tendendo à estabilidade, o que reforça a indicação de ação estabilizadora do sistema modelo frente às nanocápsulas. Resultados semelhantes foram descritos por Mendes (2012), ao estudar sistemas modelo adicionados de microcápsulas contendo extrato de urucum em goma do cajueiro e goma arábica, e Landim (2008), ao estudar microcápsulas de extrato do urucum nos sistemas maltodextrina/goma do cajueiro e maltodextrina/goma arábica, aplicadas em solução-tampão.

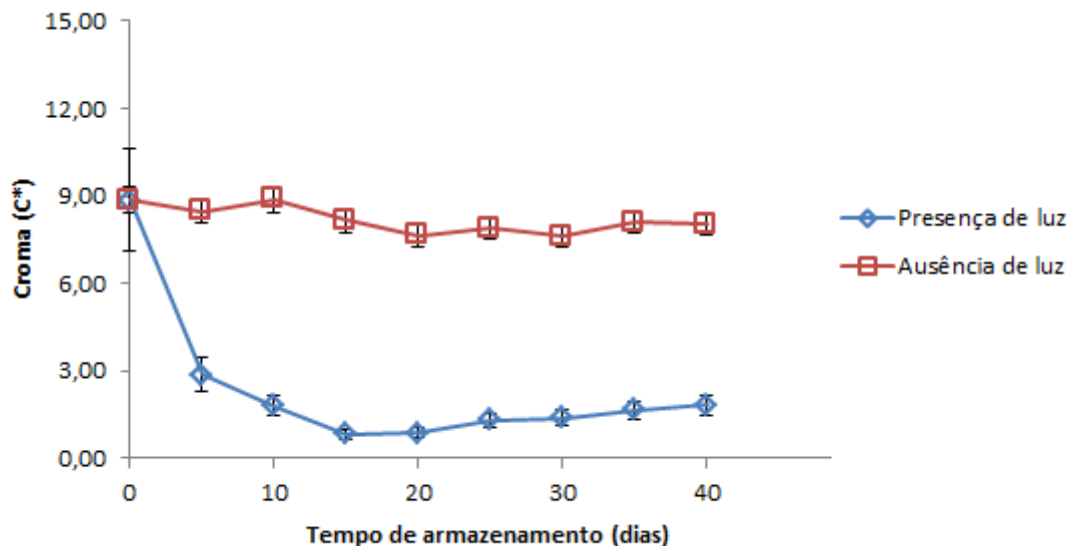
Na condição de ausência de luz, o parâmetro  $b^*$  apresentou comportamento semelhante ao observado no parâmetro  $a^*$ , o que provavelmente deve-se a possível preservação dos pigmentos amarelos pelo sistema modelo.

**Figura 21:** Comportamento da coordenada  $b^*$  em função do tempo, nos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum na presença e ausência de luz



Em relação ao comportamento da coordenada  $C^*$  (Figura 22) para os sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, observou-se diminuição da saturação da cor na condição de presença de luz, o que já era esperado, uma vez que houve diminuição nos valores de  $a^*$  e  $b^*$ , que são utilizados para o cálculo dos valores de croma.

**Figura 22:** Croma ( $C^*$ ) dos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C

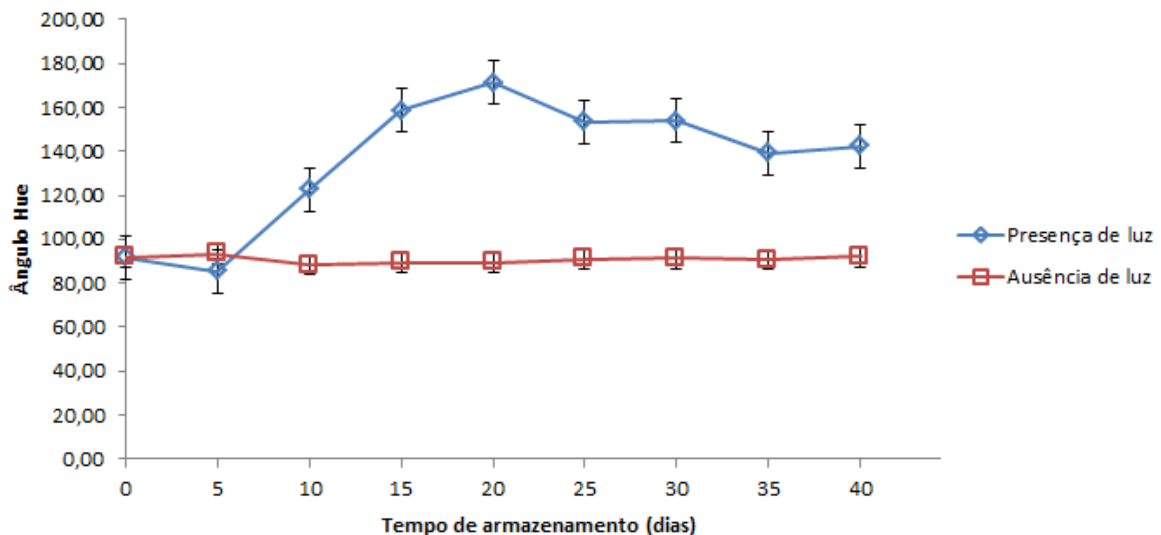


A redução dos valores de croma possivelmente indica degradação dos pigmentos vermelho e amarelo do extrato de urucum, com a ação da luz. Porém, é importante mencionar que a saturação da cor tende a estabilidade, apresentando-se como mais um indício da conservação das nanocápsulas, promovida pelo sistema modelo.

Para a condição de ausência de luz, os valores de croma apresentaram pequena variação, o que é coerente frente ao comportamento observado para as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ .

Nos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum submetidos à luz, o ângulo Hue sofreu variações em seus valores durante os 40 dias de armazenamento, conforme pode ser verificado na Figura 23.

**Figura 23:** Ângulo Hue dos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, em função do tempo de armazenamento, na presença e ausência de luz, a 25°C



Mendes (2012) em estudo com microcápsulas contendo extrato do urucum aplicadas em solução-tampão atribuiu a mudança na tonalidade da solução-tampão, submetida à luz, à degradação e formação dos pigmentos vermelhos e amarelos.

Pelo fato do ângulo Hue ser obtido por meio de uma função arco-tangente da relação dos valores de  $b^*$  e  $a^*$ , é natural que seu comportamento seja atrelado às variações desses parâmetros. Sendo assim, verifica-se na Figura 23 que nos sistemas modelo adicionados das nanocápsulas submetidos à ausência luz, o ângulo Hue sofreu pequena variação, uma vez que nesta condição também houve estabilidade nos valores de  $a^*$  e  $b^*$ .

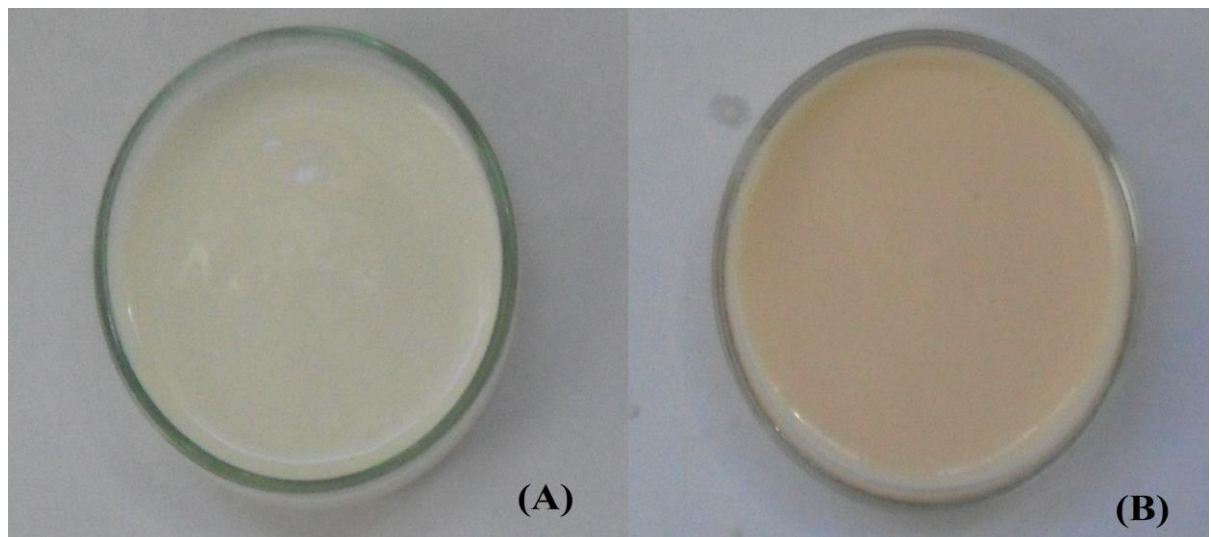
De uma maneira geral verificou-se que nos sistemas modelo adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum armazenados na ausência de luz, houve pouca

variação dos parâmetros colorimétricos o que sugere que o sistema modelo possa ter promovido estabilidade nas nanocápsulas, conservando seus núcleos. Segundo Uenojo, Marostica Junior e Pastore (2007) na ausência da luz e à temperatura ambiente, a velocidade de degradação dos pigmentos carotenoides torna-se muito lenta. Constant e Stringheta (2002) encontraram resultados semelhantes em estudo com pigmentos microencapsulados e atribuíram a pouca variação das coordenadas colorimétricas ao fato de os pigmentos estarem protegidos de um de seus fatores mais deletérios, a luz, na referida condição de armazenamento.

#### 4.3.4 Estabilidade do iogurte adicionado de nanocápsulas

Os iogurtes adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum apresentaram diferença em sua coloração, quando comparados aos iogurtes sem a adição do corante nanoencapsulado, conforme pode ser verificado na Figura 24.

**Figura 24:** Iogurtes sem a adição de nanocápsulas contendo extrato do urucum (A) e com a adição de nanocápsulas contendo extrato do urucum (B)



Fonte: Autora

A diferença visual entre os iogurtes com e sem a adição de nanocápsulas contendo extrato do urucum foi confirmada pelos valores inferiores dos parâmetros CIELAB  $b^*$  e saturação da cor (croma) do iogurte que não continha as nanocápsulas (Tabela 5) e pela análise de interação que demonstrou interação significativa ( $p \leq 0,05$ ), para todas as coordenadas colorimétricas, entre os tratamentos e o tempo de armazenamento.

De acordo com as coordenada do sistema CIELAB verificou-se que os iogurtes adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum tenderam à coloração amarelo/alaranjado, uma vez que valores de  $a^*$ ,  $b^*$  e croma para essas amostras, foram superiores aos dos iogurtes sem a adição das nanocápsulas.

**Tabela 5:** Coordenadas colorimétricas do iogurte com e sem a adição de nanocápsulas contendo extrato de urucum, em função do tempo de armazenamento, a 25°C

	Armazena- mento (dias)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Croma	Hue
Iogurte sem a adição de nanocápsulas contendo extrato de urucum	0	74,16 ± 0,42	-3,55 ± 0,03	5,22 ± 0,09	6,31 ± 0,09	124,17 ± 0,22
	5	70,79 ± 0,75	-3,74 ± 0,05	5,25 ± 0,08	6,45 ± 0,10	125,41 ± 0,09
	10	68,57 ± 0,13	-3,50 ± 0,01	5,15 ± 0,02	6,23 ± 0,02	124,25 ± 0,13
	15	68,44 ± 0,88	-3,55 ± 0,06	4,95 ± 0,06	6,09 ± 0,08	125,67 ± 0,16
	20	64,40 ± 0,20	-3,31 ± 0,02	4,44 ± 0,03	5,54 ± 0,03	126,66 ± 0,02
	25	71,49 ± 1,19	-3,73 ± 0,02	5,29 ± 0,06	6,47 ± 0,04	125,22 ± 0,47
	30	69,68 ± 0,09	-3,69 ± 0,02	5,15 ± 0,04	6,34 ± 0,04	125,62 ± 0,19
	35	69,45 ± 0,52	-3,70 ± 0,03	5,32 ± 0,01	6,48 ± 0,02	124,81 ± 0,24
	40	67,54 ± 0,50	-3,70 ± 0,04	5,10 ± 0,11	6,30 ± 0,10	125,97 ± 0,45
Iogurte com a adição de nanocápsulas contendo extrato de urucum	0	65,32 ± 0,73	-0,16 ± 0,02	9,37 ± 0,19	9,37 ± 0,19	90,98 ± 0,10
	5	65,66 ± 0,35	-0,02 ± 0,01	10,46 ± 0,08	10,46 ± 0,08	90,16 ± 0,09
	10	68,43 ± 0,53	-0,08 ± 0,01	11,81 ± 0,14	11,81 ± 0,14	89,41 ± 1,71
	15	64,60 ± 0,46	-0,07 ± 0,01	11,04 ± 0,16	11,04 ± 0,16	90,37 ± 0,08
	20	65,27 ± 0,11	-0,09 ± 0,01	11,35 ± 0,10	11,35 ± 0,10	90,47 ± 0,07
	25	67,68 ± 0,41	-0,12 ± 0,01	12,16 ± 0,04	12,16 ± 0,04	90,56 ± 0,07
	30	67,85 ± 0,18	-0,27 ± 0,01	12,61 ± 0,06	12,62 ± 0,06	91,24 ± 0,03
	35	67,84 ± 0,72	-0,17 ± 0,01	12,80 ± 0,05	12,80 ± 0,05	90,76 ± 0,05
	40	69,11 ± 0,21	-0,31 ± 0,01	13,21 ± 0,05	13,21 ± 0,05	91,34 ± 0,04

Médias seguidas de desvios padrões

Os valores da luminosidade ( $L^*$ ) e da tonalidade (ângulo hue) para os iogurtes adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum foram inferiores aos dos iogurtes sem a adição das nanocápsulas. Isso caracteriza a coloração mais escura das amostras adicionadas das nanocápsulas contendo extrato de urucum.

Durante o período de armazenamento houve redução dos valores de  $a^*$  e aumento dos parâmetros  $b^*$  e croma, o que significa uma diminuição da coloração vermelha e intensificação da coloração amarelo/alaranjado, respectivamente.

## 5 CONCLUSÕES

A produção de nanocápsulas empregando a goma de cajueiro como material de parede e o extrato do urucum como núcleo foi possível e a metodologia utilizada para obtenção das nanocápsulas mostrou-se eficiente.

As nanocápsulas contendo extrato do urucum apresentaram maior estabilidade quando armazenado ao abrigo da luz, comprovando o efeito deletério da luz ao corante natural de urucum e, portanto, a não total proteção da goma de cajueiro como material de parede frente ao extrato de urucum,

Os testes com sistema modelo indicaram efeito protetor às nanocápsulas.

Verificou-se a viabilidade da aplicação de nanocápsulas obtidas, como agente para conferir cor em iogurte natural.

As nanocápsulas contendo extrato do urucum demonstraram possuir atividade antioxidante e atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, o que confere a este composto, além das aplicações tecnológicas como agente capaz de atribuir cor, promover e/ou reforçar propriedades funcionais aos alimentos acrescidos desse pigmento.

## REFERÊNCIAS

- AGNER, A. R.; BARBISAN, L. F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D. M. F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1687–1693, 2004.
- ALMEIDA, L. P. Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa L.*, avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese in vitro na produção de curcuminóides e óleos essenciais. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos**. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2006. 120p.
- ALVES, N. N. Desidratação de suco de laranja probiótico por spray-dryer. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2012, 59p.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª Edição. Viçosa-UFV, 2004.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, 2012.
- AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: Aplicação à tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.
- BARBOSA, M. I. M. J. Microcapsulas de bixina: obtenção, aplicação e estudos de fotodegradação em sistemas-modelo. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- BARBOSA, M. I. M. J.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Research International**. v.38 ,p.989–994,2005.
- BARCELOS, G. R. M. Avaliação das propriedades antígenotóxicas e antioxidantes do flavonóide quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos no material genético e distúrbios do estado redox causados pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio, *in vitro* e *in vivo*. **Tese de Doutorado em Toxicologia**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. 118 p.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, p. 493-496. 1966.
- BHAVANISHANKAR, T.N.; MURTHY S.V. Effect of turmeric fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria in vitro. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 17, p. 1363-1366, 1979.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, V.111, n.2, p. 267- 271, 2007.

- CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 6, p. 429-428, 2005.
- CARVALHO, P. R. N.; SILVA, M. G.; FABRI, E. G.; TAVARES P. E. R.; MARTINS, A. L. M.; SPATTI, L. R. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do Instituto Agrônomo (IAC). **Bragantia**. Campinas, v. 69, n. 3, p519-524, 2010.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª Ed- Campinas, SP. Editora da Unicamp. 2003. 210p.
- COELHO, A. M. S. P.; SILVA, G. A.; VIEIRA, O. M. C.; CHAVASCO, J. K. Atividade antimicrobiana de Bixa orellana L. (Urucum). **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 47-54, jan./dez. 2003.
- COLLINS, P. The role of annatto in food colouring. In: **Food ingredients and processing international**. Rickmansworth, Hertfordshire, UK: Turret Group, 1992. p. 23-27.
- CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do CEPPA**, v. 20, p. 203-220, 2002.
- CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2007, 18(1), 85.
- CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, 2009.
- DE PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterisation of Anacardium occidentale exudate polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, p. 27-35, 1998.
- DESAI, K.G.H.; PARK, J.H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, Nova Iorque, v. 23, p. 1361–1394, 2005.
- ELIZALDE, B. E; HERRERA, M. L.; BUERA, M. P. Retention of  $\beta$ -carotene encapsulated in a trehalose-based matrix as affected by water content and sugar crystallization. **Journal of Food Science**, 67, 3039-3045, 2002.
- FABRI, R.L et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, 2011.
- FANG,Z.;BHANGADARI,B. Encapsulation of polyphenols e a review. **Trends in Food Science e Technology**, v.20, p. 1-14, 2010.
- FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, 2011.

- FÁVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A.. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, p. 103-112, 2008
- FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; MENSAH, M.L.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v.74, n.1-2, p.136-138, 2003.
- FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C. P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; FONTINÉLLI, I. S. C. **Urucuzeiro: Agronegócio de Corantes Naturais**. 1ª ed., Emepa, P.B., João Pessoa, 2002, 120 p.
- GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL GOMES, O.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.42, n.8. 2012.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, Amsterdam, v. 40, n. 9, 2007.
- GHIRALDINI, J.E. Produção e comercialização interna de corantes naturais para alimentos. In: **Seminário de Corantes Naturais para Alimentos**, p. 20-25, 1989. Campinas.
- GOMES, G. V. L. Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação de beta-caroteno. Pirassununga. **Dissertação Mestrado em Ciências – Universidade de São Paulo**, 2011. 100p.
- GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3 p.353-358, 2005.
- GONSALVES, J. K. M. C.; COSTA, A. M. B.; DE SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H.; NUNES, R. S. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, vol 5, nº 11, 2009.
- GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.2, p.129-139, 2007.
- GUL, N.; MUJAHID T.Y.; JEHAN, N.; AHMAD, S. Studies on the antibacterial effect of the different fractions of *Curcuma longa* against tract infections isolated, Pakistan **Journal of Biological Sciences**, n. 7, v. 12, p. 2055-2060, 2004.
- HENRY, B.S. Natural food colours. In: HENDRY, G.A.F; HOUGHTON, J.D. **Natural Food Colorants**. 2nd ed. Glasgow: Blackie Academic e Professional, 1996. p.40-79.
- HEYANG, J.; FEI, X.; CUILAN, J.; YAPING, Z.; LIN, H. Nanoencapsulation of lutein with hydroxypropylmethyl cellulose phthalate by supercritical antisolvent. **Chemical Engineering Journal**, Vol. 17, No. 4, 2009.

HUNTERLAB. **Color measurement of translucent materials**. Hunter Associates Laboratory, Incorporated 9529. Lee Highway, Fairfax VA 22030, USA. 1978.

IBGE. **Produção agrícola e municipal - Culturas Temporárias e Permanentes**, Rio de Janeiro, v. 37, p.1-91, 2010.

JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; BHANDARI, B. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying, **Drying Technology**, Nova Iorque, v. 26, p. 816–835, 2008.

KAPOR, M. A.; YAMANAKA, H.; CARNEIRO, P. A.; ZANONI, M. V. B. Eletroanálise de corantes alimentícios: determinação de índigo carmim e tartrazina. **Eclética Química**, São Paulo, 2001.

KIOKIAS, S.; OREOPOULOU, V. Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.7, p.132-139, 2006.

KLAYPRADIT, W.; HUANG, Y. W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 6, 2008.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, 2006.

LANDIM, E.M.C. Obtenção, caracterização e avaliação da estabilidade de pigmentos naturais microencapsulados. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2008. 90p.

LARA, W. H. **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios - padrões de identidade e qualidade**. São Paulo, SP, 1987. 117 p.

LEMOS, A.R.; RÊGO JÚNIOR, N.O.; SÃO JOSÉ, A.R.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, M.V. Atividade antioxidante e correlação com fenólicos totais em genótipos de Urucum (*Bixa orellana* L.). **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo; 70(1):62-68, 2011.

LIMA, E. S.; DA SILVA, E. G.; NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) industrializado e cajuína. **Química Nova**, Vol. 30, No. 5, 1143-1146, 2007.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PACHECO, S.; Efeito de flavonoides e de corantes do urucum sobre a hiperlipidemia induzida em coelhos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 42(1): 69-74, 2010.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

- MAJOLO, C. Atividade antibacteriana in vitro de diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2009. 57 p.
- MARTINEZ-TOME, M. et al. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, v.64, n.9, p.1412-1419, 2001.
- MAU, J.L.; CHEN, C.; HSIEH, P. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and conif fructus. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.49, n.1, p.183- 188, 2001.
- McNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Effect of partial replacement of gum Arabia with carbohydrates on its microencapsulation properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 3385-3388, 2001.
- MELLENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 2, jun. 2004.
- MELO. C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parceiras Estratégicas**, v.18, n.9, 2004.
- MENDES, L. G. Microencapsulação do corante natural de urucum: uma análise da eficiência da goma do cajueiro como material de parede. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2012. 130 p.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry**, v. 2, p. 79-91, 1998.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.48, p.91, 1971.
- MOREIRA, G. E. G. Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, 2007.86p.
- MOTHE, C. G. Produção de goma de cajueiro 2000, **patente n°PI0004114-9**.
- MOURA NETO, E. Desenvolvimento de Novos Materiais à base de Goma do Cajueiro (*Anacardium Occidentale*): Derivados e Microesferas com Gelatina. **Dissertação de Mestrado em Química Orgânica**. Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2008. 92 p.
- MOZAFARI, M. R.; JOHNSON, C., HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, 18, 309 – 327, 2008.

- NACHTIGALL, A. M.; SILVA, P. I.; BERTOLDI, M. C. ; STRINGHETA, P. C. Estudo da saponificação em pigmentos de urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(4): 873-878, out.- dez. 2009.
- NALIMOVA, M.S.; PENÃ, S.G.R.; IZQUIERDO, M.F.C. Efecto in Vitro de extractos de plantas sobre especies bacterianas del gênero Xantomonas. **Fitosanidad**, v.9, n.3, p.49-51, 2005.
- NASCIMENTO, P. F.C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JUNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol 17(1): Jan./Mar. 2007.
- OKUYAMAA, K.; ABDULLAHB, M.; LENGGOROA, I. W.; ISKANDARA, F. Preparation of functional nanostructured particles by spray drying. **Advanced Powder Technology**. Vol 17(6), 2006.
- OLIVEIRA, J. S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Tese de Doutorado em Engenharia Química**. Universidade Federal de Santa Catarina , Florianópolis, 2005. 192p.
- OLIVEIRA, M. A. Avaliação da influência de adjuvantes de secagem sobre as propriedades de suco de caju atomizado. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2008, 63p.
- PAULA, H. C. B.; SOMBRA, F. M.; ABREU, F. O. M. S. DE PAULA, R. C. M. Preparação e caracterização de nanopartículas de goma de angico e quitosana contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Foz do Iguaçu. 2009.
- PIMENTEL, F. A. Avaliação de métodos de obtenção e de estabilidade de pigmentos de sementes de urucum. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 1995. 132 p.
- PRADO, S.M., BUERA M.P, ELIZALDE, B.E. Structural collapse prevents  $\beta$ -carotene loss in a super-cooled polymeric matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 79–85, 2006.
- PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O.; CARVALHO, P. R. N. Efeito do pH na quantidade de bixina obtida em extratos alcalinos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 182- 187, 1992.
- QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, 2004.
- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**. v. 36, 887–913, 2011.
- RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; COSTA S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: Comparação Através da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 1993.

RODRIGUES, R. A. F. Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por sapry-drying, contendo extrato de café crioconcentrado. **Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos**. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004. 258p.

ROJAS, J.J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; MUÑOZ, J.F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicines**, v.6, p.2, 2006.

SANDI, M. P. et al., El Achiote. **Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. Ano 7, no 46, 7-11, 2003.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M.A.; Nanoscale materials development - a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, p. 547- 556, 2006.

SANTOS, A. B., FERREIRA, V. L.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável-Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação: óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, 2, 26-30. 2004.

SANTOS, A. B.; FERREIRA V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** v.3.p.26-30,2000.

SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B.; OLIVEIRA, L. A. A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como sistema inovador de extração líquido-líquido. **Exacta**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 145-154, jan./jun. 2007.

SILVA, D. A., Hidrogéis e copolímeros de goma do cajueiro e poliacrilamida. **Tese de Doutorado em Química Orgânica**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

SILVA, P. I. Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2007. 145 p.

SILVA, P.I.; NACHTIGALL, A.M.; STRINGHETA, P.C. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (*bixa orellana* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1892-1897, 2009.

SOUZA, M. C. Qualidade e atividade antioxidante de frutos de diferentes progênies de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart). **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2007. 142p.

SPADA, J. C. Uso do amido de pinhão como agente encapsulante. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2011. 165p.

STREIT, N.M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35,n.3, p.748-755, 2005.

STRINGHETA, P. C. Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). Campinas.

**Tese Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos** – Universidade Estadual de Campinas, 1991. 138p

SUTTER, S. C.; BUERA, M. P; ELIZALDE, B. E.  $\beta$ -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. **International Journal of Pharmaceutics**. Corrected Proof. Available online 22 September 2006.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21(3): 310-313, 2001.

TORQUATO, D.S.; FERREIRA, M.L.; SÁ, G.C.; BRITO, E.S.; PINTO, G.A.S.; AZEVEDO, E.H.F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 20, 505–507, 2004.

TURCHIULI, C.; FUCHS, M.; BOHIN, M.; CUVELIER, M. E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, E. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 6, 2005.

UENOJO, M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, June 2007 .

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.1. 2009.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**. vol. 71, n. 9, 2006.

Apêndice A - Quadrado médio (QM) dos parâmetros colorimétricos L\*, a\*, b\*, croma e Hue, e dos teores de bixina total e superficial para as nanocápsulas contendo extrato do urucum armazenados na presença e ausência de luz

FV	GL	Quadrado Médio						
		L*	a*	b*	Croma	Hue	Bixina total	Bixina superficial
Tratamento (Tr)	1	676,78048*	514,8541*	2479,7851*	2843,6077*	70,1720*	1308,4310*	419,1268*
Erro (a)	4	49,3178	23,4974	55,5521	73,8482	0,9974	15,7957	37,1099
Tempo (t)	4	319,6455*	123,7626*	784,1025*	884,8511*	33,2903*	2761,7492*	785,4285*
Tr x t	4	76,3667 <sup>NS</sup>	120,6037*	390,4338*	493,7513*	17,8122*	244,1774*	53,2539*
Erro (b)	16	31,7138	11,3719	29,7393	36,0354	4,2267	41,3809	7,9146

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade;

FV – Fonte de variação

GL - Grau de liberdade

Apêndice B - Quadrado médio (QM) dos parâmetros colorimétricos L\*, a\*, b\*, croma e Hue para sistema modelo (solução-tampão) adicionados de nanocápsulas contendo extrato do urucum, armazenados na presença e ausência de luz

FV	GL	Quadrado Médio				
		L*	a*	b*	Croma	Hue
Tratamento (Tr)	1	250,1587*	18,5914*	1599,5168*	1363,5802*	98097,9218*
Erro (a)	4	1,3970	0,0129	0,5230	0,4414	197,4701
Tempo (t)	8	37,8696*	1,0423*	42,4997*	35,7861*	5332,8395*
Tr x t	8	9,8791 <sup>NS</sup>	1,7413*	26,7539*	22,4444*	4593,3483*
Erro (b)	32	4,5591	0,0330	0,2855	0,2651	67,5101

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade;

FV – Fonte de variação

GL - Grau de liberdade

Apêndice C - Quadrado médio (QM) dos parâmetros colorimétricos L\*, a\*, b\*, croma e Hue para o sistema alimentício (iogurte) com e sem adição de nanocápsulas contendo extrato do urucum

FV	GL	Quadrado Médio				
		L*	a*	b*	Croma	Hue
Tratamento (Tr)	1	7158,7604*	254,8451*	173,2363*	37,0182*	738,5606*
Erro (a)	1	0,0123	0,0103	0,0139	0,1663	1,4945
Tempo (t)	8	1,0395*	0,6679*	0,7276*	9,7885*	1009,5716*
Tr x t	8	0,5147*	1,0709*	1,0427*	7,6186*	892,4604*
Erro (b)	8	0,1033	0,0059	0,0058	0,6491	2,4115

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade;

FV – Fonte de variação

GL - Grau de liberdade