UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - PPGSHMA

ARALÍ DA COSTA GOMES

EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE BIXINA POR LIOFILIZAÇÃO

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2019

ARALÍ DA COSTA GOMES

EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE BIXINA POR LIOFILIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente

Orientador: Christine Lamenha Luna Finkler

Coorientador: Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2019

Catalogação na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia F. dos Santos, CRB4-2005

G633e Gomes, Aralí da Costa.

Extração e microencapsulação de bixina por liofilização / Arali da Costa Gomes. - Vitória de Santo Antão, 2019.

75 folhas; il.: graf., tab., fig..

Orientadora: Christine Lamenha Luna Finkler.

Coorientador: Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Bixaceae. 2. Liofilização. 3. Produtos Biológicos. I. Finkler, Lima Christine Lamenha Luna (Orientadora). II. Aguiar Júnior, Francisco Carlos Amanajás de (Coorientador). III. Título.

664 CDD (23.ed.) BIBCAV/UFPE-81/2019

ARALÍ DA COSTA GOMES

EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE BIXINA POR LIOFILIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovado em: 31/05/2019.

BANCA EXAMINADORA

_____
Profº. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profº. Dr. Leandro Finkler (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profª. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedicado à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus minha força vem e sempre virá de Ti.

À minha família, que me apoiou em todos os momentos difíceis que passei, obrigada por nunca desistirem de mim e nem permitirem que eu desistisse.

À Universidade Federal de Pernambuco por meio do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – PPGSHMA, por me proporcionar alcançar mais esse objetivo na minha caminhada.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Christine, por toda paciência, atenção e cuidado, não só comigo, mas com todos os seus orientandos. Agradeço à Professora Dra. Ester Ribeiro e à Professora Dra. Mariane Lira por toda colaboração durante a realização das análises e aos demais professores que fizeram parte, de algum modo, da minha caminhada nesses dois anos.

Agradeço também a todos os amigos que fiz durante esse período no laboratório de Bioprocessos e no LabBio, em especial Gabriel; Raquel e Diana, vocês tornaram menos dolorosa a vida nas bancadas.

Por fim agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e para a minha vida profissional.

RESUMO

O urucum (*Bixa orellana L*.) é uma planta de vida perene pertencente à família *Bixaceae* e comumente encontrada nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil. Industrialmente é empregado em formulações farmacêuticas, cosméticas e em alimentos como corante natural em substituição aos aditivos químicos. Na porção externa das suas sementes encontra-se como o principal carotenoide a bixina. Os carotenoides são compostos que apresentam baixa estabilidade molecular devido à sua estrutura química com duplas ligações conjugadas, deixando-a instável a diversas condições ambientais, tais como temperatura e presença ou ausência de luz e oxigênio. A microencapsulação é uma técnica utilizada para estabilização de corantes naturais e permite uma melhor incorporação desses produtos nos alimentos. O objetivo deste trabalho foi extrair a bixina de sementes do urucum e encapsular esse composto pela técnica de liofilização utilizando-se maltodextrina (MD) como agente encapsulante em diferentes condições experimentais. Inicialmente, a bixina foi extraída das sementes empregando-se o método de lavagens sucessivas com solventes orgânicos, sendo posteriormente purificada por cristalização. Foi obtido um rendimento médio da extração de bixina de 1,5 ± 0,2 %. O composto foi então microencapsulado seguindo um planejamento experimental do tipo 2^2, tendo como variáveis independentes a concentração de maltodextrina e a proporção de bixina em relação ao material encapsulante (Mb/Me); e como variáveis respostas a eficiência de encapsulação (E%) e a solubilidade do pó encapsulado. A maior eficiência de encapsulação foi obtida para uma concentração de MD de 40 % m/v e para uma proporção Mb/Me de 1:20. A maior solubilidade foi observada para uma concentração de MD de 20 % m/v e para uma proporção Mb/Me de 1:20.

Palavras-Chave: *Bixa orellana L.* Carotenoide. Liofilização. Produtos naturais.

ABSTRACT

Bixa orellana L. is a perennial plant that belongs to the family *Bixaceae* commonly found in the North and Northeast Regions of Brazil. It is industrially employed in pharmaceutical and cosmetic formulations and in food as natural dyes to replace chemical additives. In the outer portion of its seeds, bixin is found as the main carotenoid. Carotenoids are compounds that have low molecular stability due to their chemical structure with conjugated double bonds, being unstable under several environmental conditions such as temperature and presence or absence of light and oxygen. Microencapsulation is a technique used to stabilize natural dyes and allows a better incorporation of these products into foods. The objective of this work was to encapsulate bixin by the lyophilization technique using maltodextrin (MD) as an encapsulating agent under different experimental conditions. Initially, bixin was extracted from the seeds using a method of successive washes with organic solvents and then purified by crystallization. The average bixin extraction yield was 1.5 ± 0.2 %. The compound was then microencapsulated according to an experimental design of type 2^2, having as independent variables the concentration of maltodextrin and the ratio of bixin to encapsulant material (Mb/Me); and as response variables the encapsulation efficiency (E%) and the solubility of the encapsulated powder. Higher encapsulation efficiency was obtained for a MD concentration of 40% m/v and Mb/Me ratio of 1:20. Higher solubility was observed at a MD concentration of 20% m/v and Mb/Me ratio of 1:20.

Keywords: *Bixa orellana L.* Carotenoid. Lyophilization. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Ilustrações do urucum	18
Figura 1.2	Corte Longitudinal de uma Cápsula de Urucum	19
Figura 1.3	Estrutura Molecular da Norbixina	21
Figura 1.4	Estrutura Molecular da Bixina	22
Figura 1.5	Modelos de Micropartículas	25
Figura 1.6	Representação de um espectrofotômetro de feixe simples e com monocromador de prisma	30
Figura 1.7	Esquema representativo de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência	31
Figura 2.1	Imagens das sementes de urucum e da bixina	43
Figura 2.2	Cromatograma do padrão de bixina (>90% de pureza – A) e da amostra de bixina obtida após a extração (B)	45
Figura 2.3	Espectrofotometria de varredura da bixina extraída de sementes de urucum nos solventes etanol (**--**), álcool isopropílico (--), DMSO (--), clorofórmio (--) e hexano (--)	47
Figura 2.4	Curvas de contorno (A) e Diagrama de Pareto (B) para a variável resposta eficiência de microencapsulação em função das variáveis concentração de maltodextrina e razão maltodextrina/bixina	49
Figura 2.5	Curvas de contorno (A) e Diagrama de Pareto (B) para a variável resposta solubilidade do pó microencapsulado em função das variáveis concentração de maltodextrina e razão maltodextrina/bixina	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Variáveis a serem investigadas no planejamento experimental	39
Tabela 2.2	Caracterização físico-química das sementes de urucum	42

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
ß	Beta
Π	Pi- símbolo matemático
µ	Micro
°C	Graus Celcius
C	Carbono
cm	Centímetro
g	Grama
G	Força gravitacional
h	Hora
H	Hidrogênio
M	Massa
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mT	Militesla
m/v	Relação massa volume
nm	Nanômetros
O	Oxigênio
p	p-valor
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
t	Tempo
Tr	Tempo de retenção

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
BX	Bixina
CEE	Comunidade Econômica Europeia
Ce	Concentração de bixina na amostra encapsulada
Ci	Concentração inicial de bixina
Cs	Concentração de bixina de superfície
cis	Configuração da molécula da bixina na posição *cis*
CI	Códex Intex
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DE	Dextrose equivalente
DMSO	Dimetilsulfóxido
dp	Desvio padrão
E160b	Código internacional dos corantes de urucum
E%	Eficiência de microencapsulação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MD	Maltodextrina
Ms	Massa de pó sobrenadante
Mt	Massa de pó total
Mb	Massa de bixina
Me	Massa do agente encapsulante maltodextrina
R	Rendimento
S	Solubilidade
trans	Configuração da molécula da bixina na posição *trans*
UV- VIS	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 17

2.1 Objetivo geral **17**

2.2 Objetivos específicos **17**

3 REVISÃO DA LITERATURA **18**

3.1 Urucum 18

3.1.1 Aplicações do urucum 19

3.1.2 Pigmentos do urucum 21

3.1.2.1. Norbixina 21

3.1.2.2. Bixina 22

3.2 Carotenoides 23

3.3 Encapsulação 24

3.3.1 Encapsulação por liofilização 26

3.3.2 Materiais de parede 27

3.3.2.1. Maltodextrina como agente encapsulante 28

3.4 Espectrofotometria 28

3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 30

4 ARTIGO 32

4.1 Resumo 33

4.2. Abstract 34

4.3 Introdução 35

4.4 Material e métodos 36

4.4.1 Sementes de urucum (Bixa orellana L.) 36

4.4.2 Extração de bixina 37

4.4.3 Ensaios de varredura da bixina em diferentes solventes 38
4.4.4 Encapsulação por liofilização 38
4.4.5 Eficiência de encapsulação 39
4.4.6 Solubilidade em água 41
4.4.7 Umidade 41
4.4.8 Análise da bixina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 41
4.5 Resultados e discussão 42
4.5.1 Caracterização das sementes de urucum (Bixa orellana L) 42
4.5.2 Extração da bixina 43
4.5.3 Análise da bixina extraída das sementes e comparação com o padrão 44
4.5.4 Espectrofotometria de Varredura UV-VIS 46
4.5.5 Encapsulação por liofilização 48
4.6 Conclusões 53
4.7 Referências 53
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 60
REFERÊNCIAS 61
Anexo A - Fluxograma do processo de retirada dos interferentes 71
Anexo B - Fluxograma do processo de extração e cristalização da bixina 72
Anexo C - Matriz do planejamento composto central 2^2 com cinco centrais (nível 0) 73
Anexo D- Curva-padrão de absorbância × concentração de bixina em hexano obtida por espectrofotometria a 455 nm 74
Anexo E- Gráfico do padrão de bixina quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência 75
Anexo F - Tabela dos resultados da amostra de bixina obtida por extração e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência 76

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem favorecido historicamente o uso de corantes sintéticos sobre os corantes naturais (PRENSTON; RICKARD, 1980). Essa preferência é baseada no que chamamos de vantagens técnicas, tais como: baixo custo de produção; contribuição ao sabor e/ou aroma do produto acabado; alta eficácia em baixas concentrações e estabilidade química superior às condições de processamento, distribuição e armazenamento; como calor; pH; luz ou oxigênio (CORRADINI, 2018). A cor dos alimentos desempenha um fator essencial na sua aceitabilidade e palatabilidade, e para isso, os corantes alimentícios são adicionados aos alimentos para: melhorar sua aparência, compensar as variações naturais nas matérias-primas ou a perda de cor durante o processamento, além de atribuir identidade de cor/sabor para outros produtos alimentícios incolores (GUKOWSKY *et al.*, 2018; SPENCE, 2016).

Apesar das vantagens técnicas que corantes sintéticos proporcionam, existem preocupações com os seus efeitos adversos à saúde. Há estudos que avaliam tais aditivos alimentares como agentes causadores de cânceres (BALAKRISHNAN *et al.*, 2016), reações alérgicas (SHARMA; MCKONE; MARKOW, 2011), transtornos de déficit de atenção (ARNOLD *et al.*, 2012) e outros sintomas. Nota-se também que o uso indevido e a adulteração são fatores que têm impulsionado a estrita regulamentação da aplicação em alimentos e sua substituição por corantes naturais ou eliminação contínua (WROLSTAD; CULVER, 2012).

O aumento do mercado consumidor, as mudanças sociológicas e os avanços tecnológicos, levaram a modificações no processamento de alimentos, principalmente na produção de corantes. Atualmente, muitos fitoquímicos são usados como corantes naturais, tais como: antocianinas (GORDILLO *et al.*, 2018), betacianinas (WICZKOWKI, 2018), bixina (ZHANG; ZHONG, 2013) e curcumina (ALMEIDA et al, 2018). Corantes alimentares naturais são estudados e utilizados para serem tão eficazes quanto os derivados de produtos químicos. Além disso, são mais seguros, proporcionam benefícios à saúde, além de contribuírem para as propriedades funcionais dos gêneros alimentícios (CAROCHO *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016).

No âmbito dos produtos naturais e da sua utilização como alternativa em substituição aos aditivos químicos nos alimentos, destaca-se o uso de carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Entre os carotenoides mais usados como aditivos alimentares estão os corantes à base de urucum (BOLOGNESI; GARCIA, 2018). A extração industrial de pigmento de urucum tem aumentado desde que a União Europeia autorizou o uso destes compostos como aditivo alimentar (E160b) em diversas *commodities* alimentícias, sendo o Brasil um dos maiores produtores e exportadores, respondendo por 57% da produção mundial (SILVEIRA; TAPIA-BLACIDO, 2018).

O urucum, é uma importante fonte de corante natural para as indústrias alimentícia (bebidas, laticínios e produtos cárneos), farmacêutica (expectorante, laxativo, cardiotônico, hipotensor, antibiótico, anti-inflamatório e cicatrizante) e têxtil, representando 90% dos aditivos de cor naturais utilizados no Brasil (BRASIL, 2016; CAPELLA, 2016; SOUSDALEF *et al.*,2013; SOUZA, 2000; SOUZA *et al.*, 2016). O corante é extraído do pericarpo (MANTOVANI *et al.*, 2013; VALÉRIO, 2012), do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.), planta nativa da América Central e do Sul que possui ciclo de vida perene (OLIVEIRA, 2005). No Brasil, foi identificada principalmente nos Estados do Norte e Nordeste, principalmente Amazonas, Pará, Paraíba, Piauí, Maranhão, Ceará e Bahia (COSTA, 2007).

A partir das sementes do urucuzeiro é extraída a bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) (ROJAS *et al.*, 2015), um carotenóide insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos e que apresenta baixa estabilidade química. Uma das alternativas usadas para melhorar a estabilidade da bixina é a técnica de encapsulação, que consiste no revestimento de partículas (RUNTZ, 2013) e que pode fornecer inúmeros benefícios ao material encapsulado, pois pode protegê-lo das reações de oxidação, degradação e volatilização (CARMO; BARROS FERNANDES; BORGES, 2015). Os materiais de revestimento mais utilizados são: goma arábica, maltodextrina, amidos emulsionantes e proteína de soro de leite (AZEREDO, 2005; FERNANDES *et al.*, 2012; ZUIDAM; SHIMONI, 2009).

As maltodextrinas são amplamente utilizadas como material de parede, pois possuem pouca capacidade de emulsificação. Estes carboidratos têm características

como baixo custo, alta solubilidade e sólidos solúveis elevados, proporcionando proteção adicional para o material encapsulado (CAMPELO, 2017).

Dentre as técnicas de encapsulação conhecidas, destaca-se a liofilização. Essa tecnologia é bem conhecida na indústria alimentícia e farmacêutica (PADRÓ-RODRÍGUEZ; LÓPEZ-GONZÁLEZ; NUVIOLA-FRÓMETA, 2017) e baseia-se na remoção de água por sublimação formando micropartículas de material ativo protegido por um filme (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006; RATTI, 2001).

O objetivo principal desse processo é proteger o material contido na cápsula de condições adversas, contribuindo assim para a redução de sua instabilidade. Isto ocorre devido à capacidade que as microcápsulas possuem de reduzir a taxa de evaporação e de transferência de material do núcleo para o ambiente. Além disso, modificam as características físicas do material, facilitando seu manuseio e propiciando a liberação do material encapsulado de maneira controlada (FANG; BHANDARI, 2010; SCHROOYEN; VAN DER MEER; KRUIJF, 2001).

Nesse contexto, objetiva-se a preparação de um pó encapsulado de bixina de modo que as suas propriedades como composto bioativo sejam preservadas; proporcionando uma melhora da sua solubilidade e estabilidade e a ampliação da sua aplicação como composto natural em substituição ao uso de corantes sintéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Extrair o pigmento bixina a partir de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*) e encapsular este composto por liofilização.

2.2 Objetivos específicos

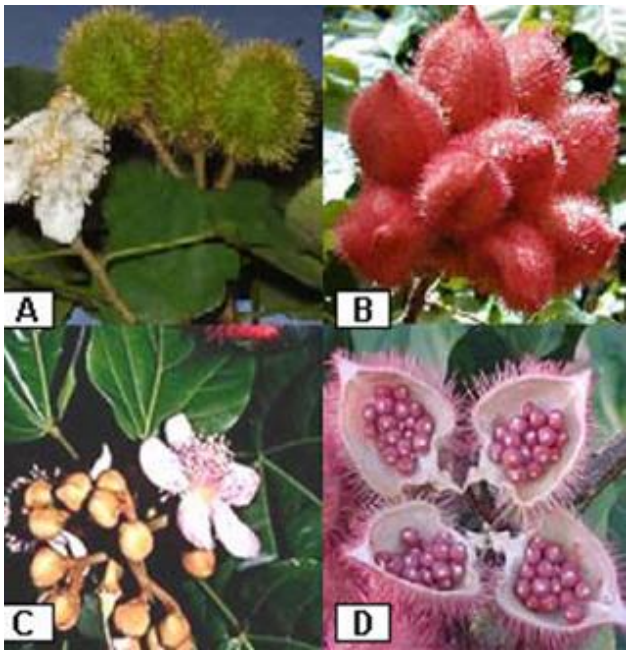
- Caracterizar as sementes de urucum quanto à sua composição físico-química;
- Extrair a bixina a partir da semente de urucum;
- Quantificar a bixina extraída por análise cromatográfica;
- Liofilizar a bixina utilizando como veículo encapsulante a maltodextrina;
- Avaliar a eficiência de microencapsulação;
- Avaliar a solubilidade do pó microencapsulado.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Urucum

O urucum (*Bixa orellana L.*) (Figura 1.1) é o fruto do urucuzeiro e foi nomeado pelo pesquisador Francisco Orellana (PRESTON; RICKARD, 1980), sendo internacionalmente conhecido como *annatto*. Apesar de sua denominação científica, ainda possui várias nomeações pelo mundo, tais como urucu e urucum (Brasil); atole, achiote e bija (Peru, Colômbia e Cuba); achiote, anoto (Venezuela); urukú (Paraguai); rocou e rocoyer (República Dominicana e Guiana Francesa); rocuyer (França); changuaricá e K' u-zub (México) (CUNHA, 2008).

Figura 1.1 – Ilustrações do urucum.



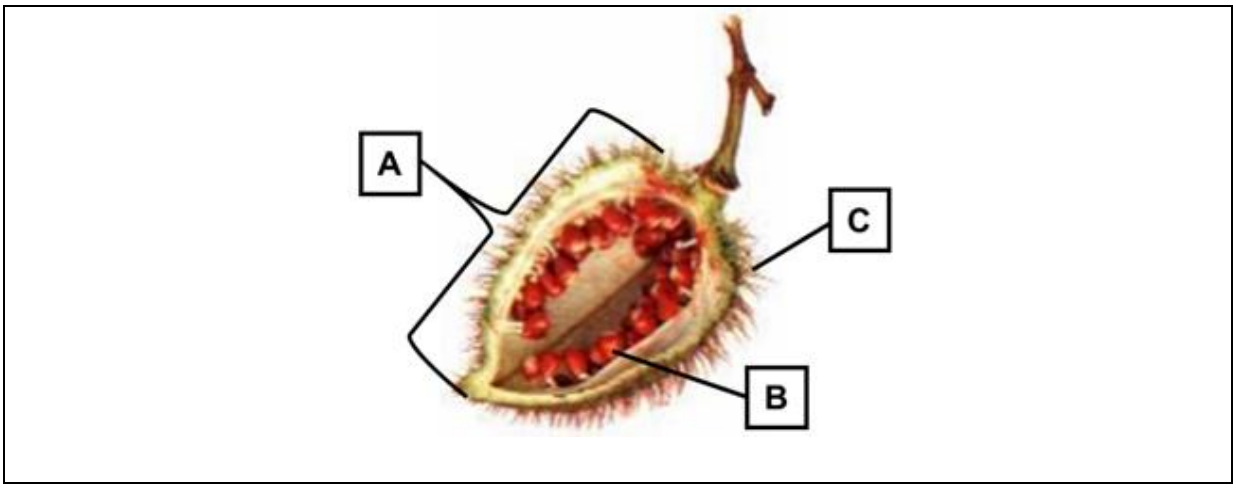
A: fruto verde; B: cachopa com frutos maduros; C: em floração; D: fruto aberto com sementes expostas.
Fonte: Oliveira (2005, p. 31).

Essa planta possui ciclo de vida perene e é pertencente à subdivisão: *Angiospermae*, classe: *Dicotiledoneae*, ordem: *Parietales*, subordem: *Cristianeae*, família: *Bixaceae* e gênero: Bixa. Essa espécie é nativa da Floresta Tropical da

América Central e do Sul, sendo também encontrada no Leste e Sul da África (Quênia e Gana), podendo atingir de 2 a 6 metros de altura. No Brasil, é comumente encontrada na região Norte (FELICISSIMO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2005).

O arbusto dessa planta tem folhas codiformes, dentadas e pontuadas (Figura 1.2). Suas flores são hermafroditas de cor azul róseo com cinco pétalas nas extremidades dos galhos, formando fascículos. Desses, nascem as cachopas (cápsulas ovoides com dois ou três capelos que protegem as sementes). As cachopas são cobertas por espinhos, e cada uma dessas unidades contém cerca de 54 sementes rodeadas de polpa mole e de coloração vermelho intensa (ALVES, 2005).

Figura 1.2 – Corte longitudinal de uma cápsula de urucum.



A: cachopa; B: sementes; C: espinhos.
Fonte: Alves (2001, p. 6).

3.1.1 Aplicações do urucum

Essa planta vem sendo amplamente utilizada para fins desde comerciais, devido à sua capacidade de colorir, quanto medicinais (VALÉRIO, 2012; OLEGÁRIO; SANTOS, 2014). O urucum é uma fonte importante de corantes naturais para as indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de produtos de cuidados pessoais. Segundo dados do IBGE, a produção de urucum no ano de 2016 chegou a 1817 toneladas (BRASIL, 2016). O corante é extraído do pericarpo (tegumento que

envolve externamente a semente do urucum) (MANTOVANI *et al.*, 2013; VALÉRIO, 2012).

Os corantes de urucum representam cerca de 90% dos corantes naturais utilizados no Brasil e 70% em todo o mundo (SOUSDALEF *et al.,* 2013). Na culinária regional, é comum o uso do urucum, que tem a denominação popular de “colorau”; e o seu consumo é estimado em 20 a 25 mil toneladas/ano em todo o país (ANSELMO; MATA; RODRIGUES, 2008). O seu uso pela indústria de alimentos data de cerca de 100 anos atrás (LANCASTER; LAWRENCE, 1996). A princípio, restringia-se à aditivos alimentares em leite e derivados lácteos; hoje, também são utilizados em uma ampla faixa de produtos alimentícios como: cereais, salgadinhos, sorvetes e temperos (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001).

Na cosmetologia, o corante natural de urucum pode ser empregado na fabricação de pós faciais, esmaltes, batons e creme bronzeador da pele. Há um segmento desse setor, chamado de fitocosméticos, do qual os pigmentos de *Bixa orellana L*. fazem parte. O pigmento extraído da semente é oferecido em cápsulas que auxiliam e estabilizam a cor da pele em processos de bronzeamento (SILVA; BIZERRA; FERNANDES, 2018).

O urucum possui muitos compostos bioativos que são provenientes do metabolismo secundário das plantas, e entre eles destacam-se os compostos fenólicos e os carotenoides. No organismo humano, os carotenoides atuam na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, redução da degeneração celular relacionada ao envelhecimento e na redução do desenvolvimento de cânceres (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; MORAIS, 2006).

Estes compostos estão relacionados com as propriedades funcionais das sementes, entre elas a atividade antioxidante, responsável pela proteção à oxidação celular (LIMA *et al.*, 2003; MOREIRA, 2013). Em relação às propriedades farmacológicas existentes, pode-se citar: antibacteriana e anti-fúngica, antioxidante, diurética, anti-inflamatória, hipoglicêmica, hepatoprotetora e anti-hipertensiva (GARCIA *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014; WALESKA *et al.*, 2010).

3.1.2 Pigmentos do urucum

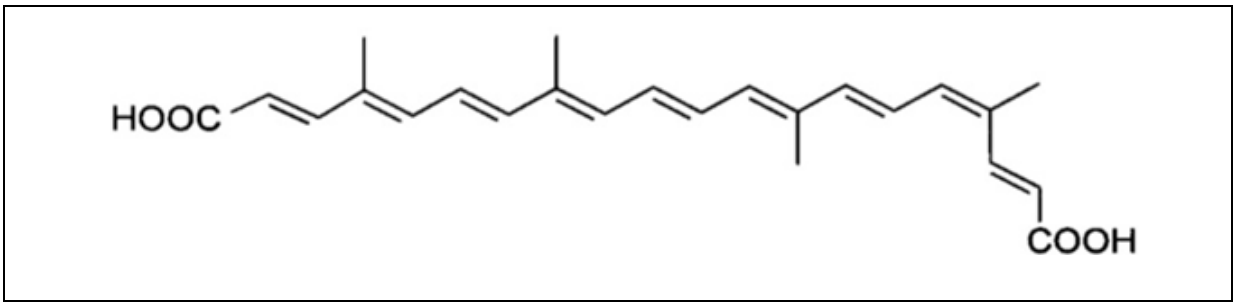
A partir das sementes de urucum são obtidos os pigmentos norbixina (hidrossolúvel) e bixina (lipossolúvel) (LIMA, 2010). Segundo Kang *et al.* (2010), existem três processos comerciais usados para extrair o pigmento das sementes de urucum secas: extração direta em óleo, extração direta em álcali aquoso ou extração indireta com solventes. A partir da extração com óleo ou solvente, o corante obtido principalmente é a bixina; já a extração com base aquosa saponifica o grupo metila da bixina, produzindo norbixina como corante principal.

Tanto a norbixina como a bixina ocorrem naturalmente na forma *cis*, mas podem ser convertidas para a forma *trans* pela luz e pelo calor. As formas *trans* da bixina e da norbixina são mais vermelhas que suas formas *cis* (OLIVEIRA, 2005).

3.1.2.1. Norbixina

A norbixina, de fórmula molecular $C_{24}H_{28}O_4$ (Figura 1.3), é o produto da saponificação da bixina, que quando submetida à hidrólise em meio alcalino produz a norbixina, pigmento de cor vermelho intensa (OLIVEIRA, 2005). É encontrada em grandes concentrações nas preparações hidrossolúveis, estando presente em menor quantidade nas preparações lipossolúveis e nas sementes (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001).

Figura 1.3 – Estrutura molecular da norbixina.



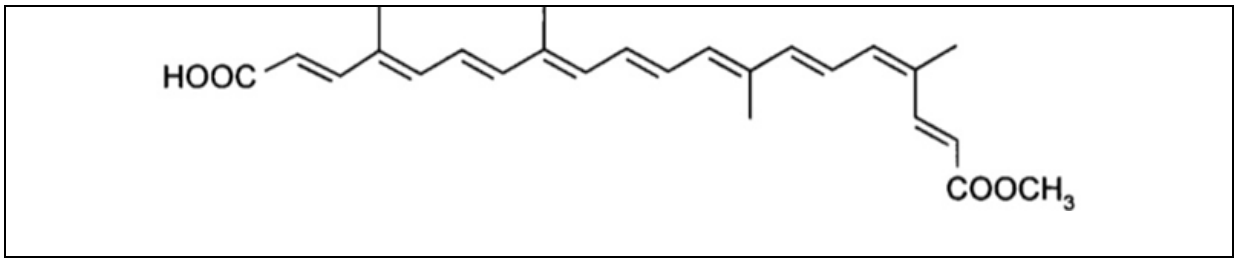
Fonte: Tocchini e Mercadante (2001, p. 311).

3.1.2.2. Bixina

A bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) é um diapocarotenoide de éster dicarboxílicomonometil, com configuração *cis* 1,8. Esse pigmento, que representa cerca de 80% dos carotenoides totais presentes nos grãos, é o principal componente natural do urucum. Foi isolado pela primeira vez no ano de 1825, sendo que a sua primeira cristalização foi realizada em 1878 (PRESTON; RICKARD, 1980). Além disso, é a bixina a responsável pela coloração vermelho intensa das sementes (AZZA *et al.*, 2015; BOUVIER; DOGBO; CAMARA, 2003; CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008; FONTANA *et al.*, 2010; MANTOVANI *et al.*, 2013; PACHECO, 2014; SILVEIRA, 2017).

Na semente bruta, a concentração desse carotenoide pode chegar a até 5%, porém como existem diferentes variedades de grãos, estes podem apresentar teores às vezes inferiores a 2%. O valor comercial da semente é baseado no percentual de bixina (CARVALHO *et al.*, 2010). A Figura 1.4 mostra a estrutura molecular da bixina.

Figura 1.4 – Estrutura molecular da bixina.



Fonte:Tocchini e Mercadante (2001, p. 311).

Esta estrutura central pode possuir uma ou ambas extremidades com estruturas cíclicas ou grupos funcionais. Os elétrons π deslocalizados do sistema de dupla ligação conjugada são de tal forma que a energia do primeiro estado excitado é relativamente pequena. Esta energia corresponde à absorção da luz visível na faixa de comprimento de onda de 400 a 500 nm, sendo esse espectro responsável pelas cores que vão desde o amarelo ao vermelho e que são geralmente associadas aos carotenoides (TAY ABOGZO, 2018).

A bixina é classificada e indexada como corante natural no *Color índex* como CI N° 75120, e pela Comunidade Econômica Européia (CEE) no Código internacional dos corantes de urucum como E160b e CI Natural Color 4 (OLIVEIRA, 2005). Na natureza, a maioria dos carotenoides ocorre como hidrocarbonetos *trans-isômero* e são insolúveis em água. Dos poucos carotenoides que ocorrem como *cis-isômero* na natureza, a *cis-bixina* está entre os menos estudados (MORAIS, 2006).

3.2 Carotenoides

O termo carotenoide refere-se a um conjunto de pigmentos nos quais as suas colorações variam do amarelo ao vermelho, sendo estes distribuídos entre os reinos vegetal e animal (ALVES, 2005). Nos anos 70 eram conhecidos apenas 300 pigmentos desse grupo; já em 1992, esse número duplicou e hoje, devido ao isolamento desses compostos a partir de organismos marinhos, acredita-se que esse número está em constante crescimento (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000; DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Os carotenoides são uma extensa classe estrutural de compostos caracterizados pela presença de uma cadeia poliênica conjugada, podendo ter 40 ou mais carbonos em sua estrutura. As variações estruturais encontram-se na extremidade da cadeia, podendo apresentar anéis ou terminação poliênica (MERCADANTE; PFRANDER, 2001, TAY-AGBOZO, 2018), sendo responsáveis por uma alteração no comprimento de onda da absorção máxima no espectro visível, aproximando-se de 440 a 489 nm, o que resulta em tons de amarelo a vermelho alaranjado (WROLSTAD; CULVER, 2012).

A grande estrutura de duplas ligações conjugadas presentes nos grupamentos cromóforos da cadeia de hidrocarboneto também é responsável pela baixa estabilidade dessa molécula, sendo esta influenciada por fatores como: presença/ausência de oxigênio, altas temperaturas e luz (MERCADANTE; PFRANDER, 2001; MONTENEGRO *et al.*, 2004). Sendo assim, a organização estrutural química da molécula de bixina é composta por uma cadeia de carbono de

20 dienos conjugados com quatro grupos metila e radicais hidrogênio ou metila nas extremidades. O polieno cadeia neste tipo de sistema conjugado (isto é, onde os elétrons-π são altamente deslocalizados) fornece as características fitoquímicas do carotenóide, incluindo a *cis-trans* isomerização (SCOTTER, 2009).

Os carotenoides são classificados pela sua estrutura química como carotenos, que são constituídos por carbono e hidrogênio, e oxicarotenoides ou xantofilas, que possuem carbono, hidrogênio e oxigênio (MORAIS, 2006).

Além disso, os carotenoides podem ser classificados como primários ou secundários. Os carotenóides primários são integrantes do processo de fotossíntese (β-caroteno, violaxantina e neoxantina), enquanto que os secundários estão localizados em frutas e flores (α-caroteno, β-criptoxantina, zeaxantina, antheraxantina, capsantina e capsorubina) (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

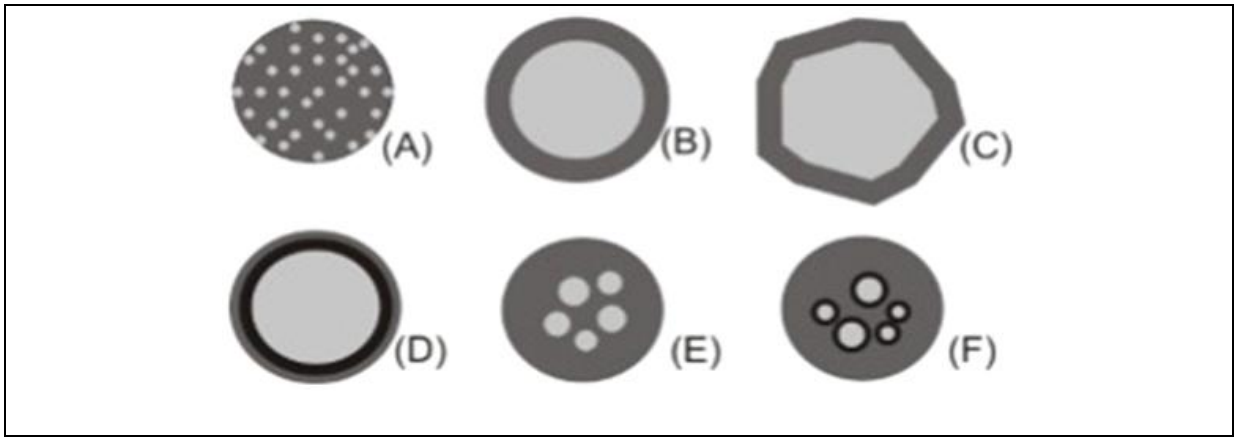
3.3 Encapsulação

Uma das alternativas usadas para melhorar a estabilidade dos carotenoides de urucum é a técnica de encapsulação (RUNTZ, 2013). Esta técnica consiste em um processo de empacotamento de partículas, como por exemplo: compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas e conservantes. Ainda pode-se definir como o aprisionamento de um ingrediente sensível dentro de um material de revestimento (mais resistente), produzindo partículas de diferentes tamanhos (BURGAIN *et al.*, 2011; LAKKIS, 2007).

A estrutura formada em torno do encapsulado é chamada de parede, que é o material exterior que dá a forma da microcápsula, enquanto que o ingrediente interno constitui o material ativo. Os materiais de parede mais utilizados são: goma arábica, maltodextrina, amidos emulsionantes e proteína de soro de leite (AZEREDO, 2005; FERNANDES; CÂNDIDO; OLIVEIRA, 2012; ZUIDAM; SHIMONI, 2009).

As micropartículas (Figura 1.5) podem ter o tamanho variando entre frações de um mícron até vários milímetros, apresentando-se em diferentes formas, dependendo dos materiais e métodos utilizados na sua preparação. A microencapsulação de corantes se destina a protegê-los contra a oxidação, fornecendo um aumento vida de prateleira e uma solubilização mais eficiente (AZEREDO, 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Figura 1.5 – Modelos de micropartículas.



Modelos: (A): matriz (microsfera); (B): microcápsula simples; (C): simples, irregular; (D): duas paredes; (E): vários núcleos; (F): agrupamento de microcápsulas.
Fonte: Azeredo (2005, p. 89).

O objetivo principal desse processo é proteger o material do núcleo contido na cápsula de condições adversas, contribuindo assim para a melhora da sua estabilidade nas condições ambientais. Além disso, modificam as características físicas do material, facilitando seu manuseio e propiciando a liberação do material encapsulado de maneira controlada (FANG; BHANDARI, 2010; SCHROOYEN; VAN DER MEER; DE KRUIJF, 2001).

A encapsulação apresenta inúmeras vantagens: aumenta o tempo de armazenamento das substâncias; melhora a solubilidade da substância encapsulada e a sua incorporação em sistemas secos; diminui as interações da substância encapsulada em relação aos fatores ambientais, impedindo perdas sensoriais e nutricionais; mascara substâncias com sabores indesejáveis; permite que a liberação da substância encapsulada seja modificada, ocorrendo de forma lenta ou a partir de determinado estímulo e reduz a velocidade de evaporação de substâncias voláteis

(AZEREDO, 2005; ANAL; SINGH, 2007; BURGAIN *et al.*, 2011; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010).

Este processo é particularmente adequado para a encapsulação de antioxidantes naturais que são utilizados em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e indústrias (DURANTE; LENUCCI; MITA, 2012; KANDASWAMI; MIDDLETON, 1994). Diversas técnicas têm sido empregadas na elaboração de microcápsulas, tais como: coacervação, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leito fluidizado, *spray drying*, *spray cooling*, e liofilização (ALVES, 2014; AZEREDO, 2005; SOUZA, 2012).

3.3.1 Encapsulação por liofilização

A liofilização, também denominada de criodesidratação ou criosecagem, é uma tecnologia bem conhecida na indústria alimentícia e farmacêutica (PADRÓ-RODRIGUEZ; LÓPEZ-GONZÁLEZ, 2017). O termo liofilização vem do grego *"liophile*" e significa como solvente, referindo-se à habilidade desse método de secar o produto para reidratá-lo depois (RAY; MAY, 2004).

Historicamente, o primeiro produto liofilizado de maneira adequada foi o vírus da raiva, em 1911 (TERRONI *et al.*, 2013), porém o conhecimento da técnica data de 1906, onde era usada para a preservação de vacinas. Durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), o processo de liofilização atingiu a escala industrial devido à demanda por plasma sanguíneo. Entretanto, já havia a comercialização de café em pó, que surgiu em 1938, pela companhia Nestlé® (TERRONI *et al.*, 2013).

A partir da década de 1960, passaram a surgir vários alimentos liofilizados no mercado, inclusive alimentos fornecidos aos astronautas em missão no espaço (ADAMS, 2002). Depois disso, e com o desenvolvimento da técnica, seu uso foi disseminado em todo o meio industrial, com uma ampla aplicação. São rotineiramente liofilizadas grandes variedades de substâncias, tais como: alimentos (ervas, frutas e produtos lácteos), antibióticos, anticoagulantes, bactérias, vírus,

enzimas, entre outros (DZIEZAK, 1988; SHAHIDI; HAN, 1993; WEISSMUELLER; SCHIFFTER; POLLARD, 2013).

O método baseia-se na remoção de água por sublimação (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006; RATTI, 2001). O ciclo de liofilização pode ser dividido em três etapas: congelamento (solidificação), secagem primária (sublimação de gelo) e secagem secundária (absorção de água descongelada) (STRALLER; LEE, 2017). Para que o produto não passe pelo estado líquido durante a liofilização, é necessário gerar um vácuo durante o processo, mantendo a temperatura suficientemente baixa e à baixa pressão atmosférica. Além disso, é necessário fornecer energia suficiente na forma de calor dentro do equipamento, simultaneamente, para compensar a transição de fase (HOCHI *et al.*, 2011).

O emprego da liofilização como técnica de microencapsulação apresenta a vantagem de obter produtos com elevada solubilidade e estabilidade oxidativa. Para tal, a secagem do produto de interesse é realizada pela adição de um agente encapsulante, em geral um polímero como material de parede. De acordo com a escolha do agente encapsulante utilizado no processo, podem ser obtidas partículas de diferentes tamanhos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

3.3.2 Materiais de parede

A escolha do material de parede é um dos parâmetros mais importantes nos processos de microencapsulação de alimentos. Sua composição e estrutura química podem afetar a qualidade do produto em pó, sendo fatores que devem ser observados e estudados para a formação de uma boa emulsão. E deve-se levar em consideração a necessidade de baixo custo, como boa formação de barreira protetora do material ativo, alta temperatura de transição vítrea e consequentemente estabilidade durante o armazenamento (CAMPELO *et al.*, 2017).

O material a ser utilizado como agente encapsulante deve atender a muitos critérios, como a proteção de material, alta solubilidade em água, cristalinidade, difusibilidade, boas propriedades de emulsificação e formação de filme

(GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Os principais produtos usados como agentes encapsulantes incluem gomas naturais (goma arábica, alginatos, carrageninas), proteínas (proteínas lácteas, proteínas de soja, gelatina), carboidratos (maltodextrinas e derivados de celulose) e/ou lipídios (ceras, emulsionantes) (ZUIDAM; SHIMONI, 2009).

3.3.2.1. Maltodextrina como agente encapsulante

Os carboidratos possuem boa capacidade de absorver os materiais ativos voláteis e retê-los em sua estrutura, sendo amplamente utilizados nos processos de microencapsulação (LIU *et al.*, 2001). Um dos carboidratos mais empregados como agente encapsulante é a maltodextrina. Além do baixo custo, apresenta baixa higroscopicidade, evitando a aglomeração das partículas, efeito antioxidante, alta solubilidade e alto teor de sólidos solúveis (AZEREDO, 2005).

As maltodextrinas são produtos da hidrólise do amido e são classificadas pelo seu teor de dextrose equivalente (DE). A DE desses compostos pode ser definida como o nível de hidrólise do amido e está associado à sua capacidade redutora, ou seja, quanto maior o seu valor, maior o seu grau de hidrólise (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Alguns estudos mostraram que as maltodextrinas com diferentes DEs produzem micropartículas com propriedades físicas e químicas diferentes (CAMPELO *et al.*, 2018).

Como a maltodextrina consiste em uma mistura de polímeros de vários tamanhos (glicose, maltose, oligossacarídeos e polissacarídeos), o DE é um valor médio que pode variar de 3 a 20 (AKHAVAN MAHDAVI *et al.*, 2016).

3.4 Espectrofotometria

A espectroscopia consiste em uma técnica de quantificação de compostos fundamentada na lei de *Lambert-Beer*, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões

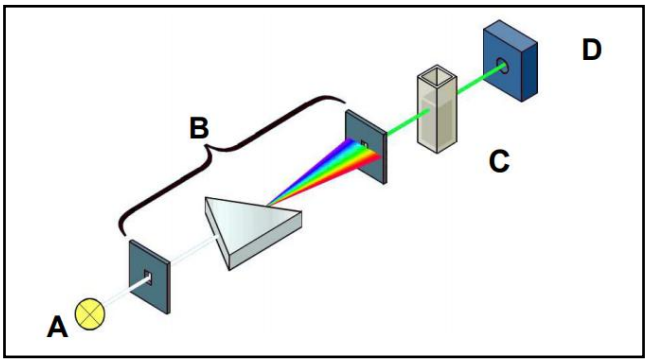
ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. A luz ultravioleta é a radiação eletromagnética com comprimento de onda entre 180 e 400 nm e a luz visível apresenta o comprimento de onda na região entre 400 e 780 nm (SPUDEIT, 2009). Espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, pois apresenta custo relativamente baixo e grande número de aplicações (ROCHA; TEIXIRA, 2004).

Essa quantificação é tipicamente obtida medindo-se a absorbância das soluções estoque e usando os valores obtidos para calcular a concentração do composto de interesse. Os valores de absorbância dependem do coeficiente de absorção do composto nos solventes utilizados (RAHMALIA *et al.*, 2014).Sua aplicação para pesquisa científica e tecnológica abrange uma ampla área do conhecimento, sendo muito utilizada na quantificação direta de pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas, de macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos ou na quantificação indireta de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas através da titulação de indicadores cromogênicos e/ou reagentes específicos (GALO; COLOMBO, 2009).

O equipamento utilizado por essa técnica é denominado do espectrofotômetro. Os espectrofotômetros podem ser de feixe simples ou de feixe duplo, que é direcionado para a amostra várias vezes por segundo. Na Figura 1.6 têm-se a representação esquemática de um espectrofotômetro de feixe simples (PASSOS; SARAIVA, 2019; PASK *et al.*, 2008; SPUDEIT, 2009).

Este consiste basicamente de uma fonte luz (A), na qual normalmente usa-se lâmpada de deutério e tungstênio, sendo a primeira para a região do UV e a segunda para a região do visível; os monocromadores (B), que são destinados a selecionar faixas do espectro de emissão de luz; após passar pelos monocromadores o feixe de luz incide na amostra que está em uma célula. As células (C) normalmente são de quartzo ou vidro; por último, o detector (D). Os espectrofotômetros podem empregar um ou vários detectores (SPUDEIT, 2009).

Figura 1.6 - Representação de um espectrofotômetro de feixe simples e com monocromador de prisma.



Legenda: A: fonte de luz (lâmpada); B: monocromador; C: célula; D: detector.
Fonte: Spudeit (2009, p. 4).

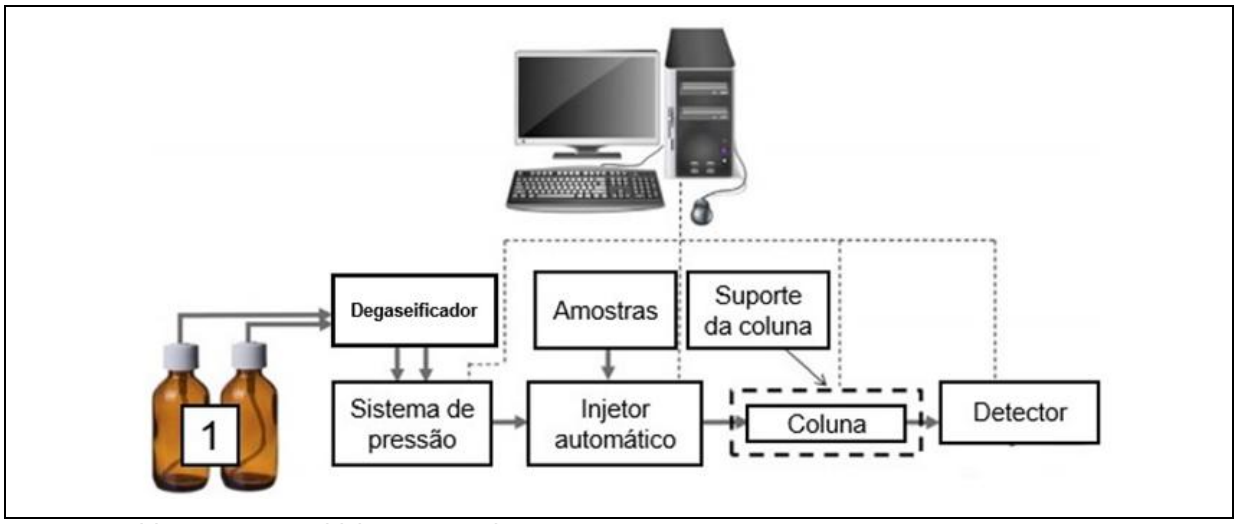
3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica que utiliza alta pressão para forçar a fase móvel e um analito através de uma coluna fechada com partículas em escala micrométrica, que constituem a fase estacionária (LA COURSE, 2017). Consiste numa ferramenta de rotina para a separação de misturas complexas (SHOCKCOR, 2017).

A separação de cada entidade química da mistura baseia-se na sua afinidade distinta em relação ao material adsorvente na coluna ou na fase móvel, fazendo com que vários constituintes se desloquem a diferentes velocidades e se separem. Anteriormente, era chamada de cromatografia líquida de alta pressão, pois depende de bombas de alta pressão para permitir uma separação mais rápida (SAHU *et al.*, 2017).

A composição básica de um instrumento de CLAE inclui as seguintes partes (Figura 1.7): um sistema de fornecimento de solvente (recipientes de solvente e desgaseificador); um sistema de bombeamento de alta pressão; um injetor; um suporte de coluna com termostato; uma coluna cromatográfica (possivelmente com uma coluna de guarda ou pré-coluna); um ou mais detectores e a unidade de controle de instrumento e processamento de dados (MOLDOVEANU; DAVID, 2017).

Figura 1.7 – Esquema representativo de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.



Fonte: Moldoveanu e David (2017, p. 87).

A utilização dessa técnica depende predominantemente de alguns parâmetros intrínsecos da fase móvel, tais como polaridade, vazão, pH e composição, bem como de propriedades inerentes da matriz da amostra e do tipo e natureza da fase estacionária, além de fatores ambientais como temperatura e tipo de detector do equipamento. Esses fatores devem ser controlados concomitantemente para a obtenção das separações desejadas durante a análise (HEYDEN *et al.*, 2001).

4 ARTIGO

EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE BIXINA POR LIOFILIZAÇÃO

Aralí da Costa Gomes[1], Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior[2], Ester Ribeiro[3], Christine Lamenha Luna Finkler[2]

[1]MSc do Programa de Pós Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – PPGSHMA, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil, CEP: 55608-680

[2]Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil, CEP: 55608-680

[3]Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil, 50670-901

Revista para submissão: Journal of Microencapsulation

Autor para correspondência: Christine Lamenha Luna Finkler

E-mail: chrislluna@yahoo.com.br

4.1 Resumo

A bixina é o principal carotenoide encontrado na porção externa das sementes de *Bixa orellana L*., popularmente conhecida como *urucum*. Industrialmente, é empregada em formulações farmacêuticas, cosméticas e em alimentos como corante natural em substituição aos aditivos químicos. Este trabalho visa extrair a bixina de sementes do urucum e encapsular este carotenoide usando a técnica de liofilização empregando-se maltodextrina como agente encapsulante sob diferentes condições experimentais. A bixina foi extraída das sementes de urucum *in natura* empregando-se um método de lavagens sucessivas com solventes orgânicos e posterior purificação por cristalização, obtendo-se um rendimento de 1,5 ± 0,2 %. O composto foi submetido a análises espectrofotométricas em etanol, álcool isopropílico, dimetilsulfóxido (DMSO), clorofórmio e hexano. Os melhores resultados foram obtidos para o clorofórmio (escolhido para solubilizar a bixina durante o preparo das amostras na etapa de microencapsulação) e hexano (solvente utilizado nas análises espectrofotométricas). A bixina foi microencapsulada seguindo um planejamento experimental do tipo 2^2, tendo como variáveis independentes a concentração de maltodextrina (20 a 40 %) e a proporção de bixina em relação ao material encapsulante (Mb/Me-1:20 a 1:40), enquanto que as variáveis resposta foram a eficiência de encapsulação (E%) e a solubilidade do pó encapsulado. A maior eficiência de encapsulação foi obtida para uma concentração de MD de 40 % m/v e para uma proporção Mb/Me de 1:20. A maior solubilidade foi observada para uma concentração de MD de 20 % m/v e para uma proporção Mb/Me de 1:20.

***Palavras-chave**: Carotenoides. Urucum. Partícula*

4.2. Abstract

Bixin is the main carotenoid found in the outer portion of the seeds of *Bixa orellana* L., popularly known as annatto. This compound is industrially employed in pharmaceutical, cosmetic and food formulations as natural dyes to replace chemical additives. This work aims to extract the bixin carotenoid from the annatto seeds and encapsulate using the lyophilization technique. Maltodextrin was used as encapsulating agent under different experimental conditions. Bixin was extracted from the annatto seeds *in natura* employing a method of successive washes with organic solvents and subsequent purification by crystallization, getting a yield of 1,5 ± 0,2 %. Bixin was analyzed spectrophotometrically in different organic solvents: ethanol, isopropyl alcohol, dimethylsulfoxide (DMSO), chloroform and hexane. The best results were obtained for chloroform (chosen to solubilize bixin during the preparation of the samples in the microencapsulation stage) and hexane (solvent used in the spectrophotometric analyzes). Bixin was microencapsulated following an experimental design of type 2^2, having as independent variables the concentration of maltodextrin (20 to 40%) and the ratio of bixin to maltodextrin (Mb/Me-1: 20 to 1:40), while the response variables were the encapsulation efficiency (E%) and the solubility of the encapsulated powder. Higher encapsulation efficiency was obtained at a MD concentration of 40% w/v and a Mb/Me ratio of 1:20. Higher solubility was observed at a MD concentration of 20% w/v and a Mb/Me ratio of 1:20.

Keywords: *Carotenoid.* Urucum. Particles.

4.3 Introdução

A bixina é um diapocarotenóidede éster dicarboxílicomonometil, com configuração *cis*, 1,8, solúvel em solventes orgânicos e encontrado majoritariamente nas sementes de *Urucum* (*Bixa orellana* L.) (Mercadante, 2001). Possui formula molecular $C_{25}H_{30}O_4$ e está presente no revestimento externo dos grãos da planta (Rahmalia *et al.*, 2014). É considerado um corante natural responsável pelas tonalidades que variam do amarelo ao vermelho (Mantovani, Grando, Xavier, & Otoni, 2013).

Os carotenoides de *urucum* são amplamente utilizados tanto pelas indústrias de alimentos quanto pela farmacêutica (Dornas *et al.*, 2010) Nas indústrias alimentícias é empregado como antioxidante (Souza *et al.*, 2016), agente fotoprotetor (Rojas *et al.*, 2015) e corante natural (Mercadante, 2001). Sob o aspecto medicinal, as sementes de urucum possuem propriedades expectorante; laxativa; cardiotônica; hipotensora e antibiótica; anti-inflamatória e cicatrizante (Bolognesi, 2018; Capella *et al.*, 2016; Olegário & Santos, 2014).

A estrutura da bixina contém uma longa cadeia de hidrocarbonetos poli-insaturados com um ácido carboxílico e um grupo éster metílico em cada extremidade da cadeia. Devido à presença desses grupos funcionais em sua estrutura química, a molécula é insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos polares, como: hexano, metanol e acetona (Humeau *et al.*, 2000) o que a caracteriza como composto lipossolúvel (Jahangiri *et al.*, 2018).

As variações na cadeia proporcionam à molécula capacidade de absorção da luz no comprimento de onda no espectro visível, aproximando-se de 440 a 489 nm, o que resulta em tons de amarelo a vermelho alaranjado (Wrolstad & Culver, 2012). Esta capacidade deve-se à presença de uma cadeia poliênica conjugada, que possui um sistema de dupla ligação localizado centralmente que atua como cromóforo e é essencial para múltiplas funções e ações (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2018). Sendo assim, os modelos analíticos mais utilizados para a determinação de bixina são a espectroscopia UV-visível e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Rahmalia *et al.*, 2014).

A presença de uma cadeia poliênica conjugada torna os carotenoides propensos à isomerização e oxidação (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2018), tornando-os instáveis por fatores como presença/ausência de oxigênio, altas temperaturas e luz (Montenegro *et al.*, 2004).

Uma das alternativas usadas para melhorar a estabilidade dos carotenoides de urucum é a técnica de microencapsulação (Rutz, 2014). O emprego da liofilização como técnica de microencapsulação apresenta a vantagem de obter produtos com elevada solubilidade e estabilidade oxidativa. Para tal, a secagem do produto de interesse é realizada pela adição de um agente encapsulante, em geral um polímero como material de parede. De acordo com a escolha do agente encapsulante utilizado no processo, podem ser obtidas partículas de diferentes tamanhos (Campelo *et al.*, 2017).

Este trabalho visa encapsular por liofilização o carotenoide bixina, usando maltodextrina como material de parede. A encapsulação foi realizada seguindo um planejamento experimental do tipo 2^2, tendo como variáveis independentes a concentração de maltodextrina e a proporção de bixina em relação ao material encapsulante (Mb/Me), enquanto que as variáveis resposta foram a eficiência de encapsulação (E%) e a solubilidade do pó microencapsulado.

4.4 Material e métodos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Bromatologia, Bioprocessos e de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pernambuco – *campus* Vitória de Santo Antão e nos Laboratórios de Bioprocessos e Bioprodutos da Universidade Federal de Pernambuco - *campus* Recife e do Laboratório de Imunopatologia Kiezo Asami.

4.4.1 Sementes de urucum (Bixa orellana L.)

As sementes de urucum (*Bixa orellana L*.) foram adquiridas da Empresa Beleza da Terra (Space Green FE0444), sendo estocadas em sacos de polietileno hermeticamente fechados em refrigerador a 8-10°C (Santana *et al.*, 2008). As

sementes foram caracterizadas em termos do teor de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade de acordo com os métodos analíticos oficiais (Pregnolatto & Pregnolatto, 1985).

4.4.2 Extração de bixina

Cada extração de bixina foi realizada a partir de 200 g de sementes de urucum (Rios & Mercadante, 2004). Inicialmente, foram realizadas duas lavagens sucessivas das sementes com solução de hexano/metanol (1:1) por 15 min sob agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas por duas vezes com acetato de etila por 15 min sob agitação. Nesta etapa, ocorre a remoção dos compostos indesejáveis que afetam a pureza do produto final sendo, na maioria das vezes, constituídos por lipídeos e compostos polares. Após a lavagem das sementes, estas foram drenadas e secas a 30 ^{o}C em estufa. O Fluxograma do processo de retirada dos interferentes encontra-se no Anexo 1.

Após a retirada dos interferentes, as sementes foram submetidas ao processo de extração propriamente dita visando à obtenção dos cristais de bixina. Esta etapa consiste em promover a extração e a purificação do extrato de urucum por meio da cristalização. As sementes secas foram lavadas com diclorometano e etanol absoluto (numa proporção de 1:4 em volume). Em seguida, o material foi levado para um banho de gelo por 5 minutos, sendo posteriormente congelado. Em seguida, a mistura foi filtrada, lavada com etanol absoluto e seca em estufa com circulação de ar à temperatura de 29 °C por 24 h. Os cristais de bixina foram então mantidos em frasco âmbar envolto em folha de alumínio e congelados a -8 ^{o}C. O fluxograma do processo de extração e cristalização da bixina encontra-se no Anexo 2.

Foram realizados dez experimentos de extração de forma a serem obtidos cristais com teor padronizado de bixina e em quantidade suficiente para a realização dos ensaios de microencapsulação. O teor de bixina do extrato foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência.

A extração dos cristais de bixina tem seu rendimento (R%) calculado pela relação entre a massa de cristais de bixina obtida após a extração e a massa inicial

de sementes (200 g). Dessa forma, o rendimento foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$Rendimento\ (R\%) = \frac{massa\ dos\ cristais}{massa\ das\ sementes} \times 100\% \quad \text{(Equação 1)}$$

4.4.3 Ensaios de varredura da bixina em diferentes solventes

Os ensaios de varredura da bixina em diferentes solventes foi realizado de acordo com de Oliveira (2005), com modificações. Uma massa de 25 mg de bixina foi adicionada a 30 mL do solvente em estudo. Após agitação em vórtex por 1 min e repouso a 30 ^{o}C, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. Posteriormente, os sobrenadantes foram submetidos à análise espectrofotométrica em espectrofotômetro UV-VIS (Thermoscientific Genesys 10S) numa faixa de comprimento de onda de 300 a 800nm.

Os ensaios de varredura foram determinados nos seguintes solventes: álcool isopropílico, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), clorofórmio e hexano.

4.4.4 Encapsulação por liofilização

Foi realizado um planejamento estatístico experimental do tipo 2^2, com duas variáveis a dois níveis e quintuplicata no ponto central, totalizando 9 experimentos. As variáveis independentes foram a concentração de maltodextrina e a proporção de bixina em relação ao material encapsulante (Mb/Me), enquanto que a variável resposta foi a eficiência de encapsulação (E%) e a solubilidade do pó microencapsulado.

A Tabela 2.1 mostra os valores das variáveis que foram investigadas no planejamento experimental. A matriz completa do planejamento é mostrada no Anexo 3. Os experimentos foram realizados de forma randômica e as análises dos dados foram efetuadas por meio do programa Statistica® (versão 7.0).

Tabela 2.1- Variáveis investigadas no planejamento experimental

Variável	**-1**	**0**	**+1**
Concentração de maltodextrina (%)	20	30	40
Proporção bixina/maltodextrina (Mb/Me)	1:20	1:30	1:40

Mb - massa de bixina; Me - massa encapsulante (maltodextrina)

Inicialmente, a massa de maltodextrina indicada por cada condição do planejamento estatístico experimental foi previamente dissolvida em água destilada aquecida a 60 ^{o}C para formar uma suspensão aquosa. Para facilitar a formação da emulsão, adicionou-se Tween 80 (0,1 %) a cada emulsão aquosa de maltodextrina.

Os cristais de bixina foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio e a mistura foi adicionada à suspensão aquosa de maltodextrina. A suspensão foi agitada vigorosamente em agitador magnético por 30 min, de acordo com trabalho de Spada *et al.* (2012), com modificações. Foi escolhido o solvente clorofórmio (solvente relativamente polar, momento de dipolo 1,04 D) por ter um ponto de fusão de -63 ^{o}C (1 atm), o que permite que as amostram estejam solidificadas na temperatura utilizada para o seu congelamento (-80 ^{o}C) antes do procedimento de liofilização. Além disso, apesar de ser um solvente relativamente polar, consegue solubilizar os cristais de bixina.

As amostras foram distribuídas em frascos de vidro tipo penicilina com tampa de borracha para liofilização, sendo posteriormente congeladas a -80 ^{o}C *overnight*. Em seguida, as amostras foram liofilizadas no LIKA - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami utilizando liofilizador (FTSsystems). O processo de secagem foi realizado por até 48 h a -84 ^{o}C, com vácuo a 188 mT. Os frascos contendo os pós foram lacrados, armazenados sob refrigeração e protegidos da luz para as análises subsequentes.

4*.4.5 Eficiência de encapsulação*

A eficiência de encapsulação (E%) foi determinada de acordo com a Equação 2:

$$E\% = \frac{Ce}{Ci} \times 100$$ (Equação 2)

Onde E% é a eficiência de encapsulação, *Ci* é a concentração inicial de bixina na suspensão e *Ce* é a concentração de bixina na amostra encapsulada.

A concentração de bixina na amostra encapsulada foi determinada de acordo com a Equação 3:

$$Ce = Ci - Cs$$ (Equação 3)

Onde *Cs* é a concentração de bixina de superfície (amostra não encapsulada).

A determinação das concentrações de bixina nas amostras inicial (*Ci*) e de superfície (*Cs*) foi realizada com base no fato de que este carotenóide é lipofílico e solúvel em hexano, e que a matriz (maltodextrina) é, por outro lado, solúvel em água e insolúvel em hexano. O solvente hexano foi escolhido por ser apolar (momento dipolar 0.00 D), ou seja, os cristais de bixina são solúveis neste solvente.

A concentração de bixina de superfície foi determinada pela lavagem de alíquotas de 50 mg do pó liofilizado com 20 mL de hexano em tubo de centrífuga (Hettichzeentrifugen Rotina 420R) por 15 s a 100 rpm. Em seguida, a amostra foi centrifugada (Hettichzeentrifugen Rotina 420R) a 528 g por 1 min e a absorbância do sobrenadante foi medida a 455 m em espectrofotômetro (ThermoscientificGenesys 10S).

A concentração inicial de bixina foi determinada pela dispersão de 50 mg da amostra liofilizada em 2,5 mL de água e 20 mL de hexano. A amostra foi agitada em centrífuga (Hettichzeentrifugen Rotina 420R) a 2500 rpm por 20 min, sendo retiradas alíquotas da fase orgânica para a análise espectrofotométrica a 455 nm.

As quantificações de bixina por espectrofotometria foram realizadas a 455 nm, comprimento de onda de máxima absorção de bixina quando solubilizada em hexano. Foi plotada uma curva-padrão de *absorbância* × *concentração* para a quantificação da bixina nas amostras (Anexo 4).

4.4.6 Solubilidade em água

A solubilidade do pó microencapsulado foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Eastman & Moore (1984), com adaptações. Uma massa correspondente a 0,5 g da amostra foi diluída em 50 mL de água destilada. Após homogeneização da suspensão sob agitação magnética de 1.000 rpm por 5 min, a amostra foi centrifugada a 4.500 rpm por 5 min. Uma alíquota de 12,5 mL do sobrenadante foi levada à estufa a 105 °C, até peso constante, e a solubilidade (S) foi calculada, em termos percentuais, pela diferença de peso, de acordo com a Equação 4. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$S\% = \frac{Ms}{Mt} \times 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde M_S: massa de pó no sobrenadante; M_T: massa de pó total.

4.4.7 Umidade

O teor de umidade do pó microencapsulado foi determinado a partir da perda de massa de 5 g de amostra liofilizada submetida a aquecimento a 105 ^{o}C, até obtenção de peso constante (AOAC, 1995).

4.4.8 Análise da bixina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foram realizadas as análises da bixina obtida na etapa de extração e de uma amostra de bixina padrão (Sigma Aldrich Brasil LTDA.) com pureza ≥ 90%.

Foram preparadas amostras contendo uma massa de 0,01 g e dissolvidas na fase móvel metanol/ácido acético 0,5% (70:30 v/v), de acordo com Rahmalia, Fabre, & Mouloungui (2015). As amostras foram filtradas a vácuo (Prismatec) em membrana *Milipore* 0,22 µm (Chromafil® Xtra PVDF -20/25, Macherey-Nagel) antes de serem injetadas no cromatógrafo. Foi utilizada uma coluna cromatográfica C_{18} (ShimParck CLC ODS (M), 25 cm), mantida a 29 ^{o}C, fase móvel sob condições isocráticas e taxa de fluxo de 1,0 mL/min. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatográfo Shimadzu (modelo CGM – 20A), os espectros foram

adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados no comprimento de onda de 455 nm, com um tempo de corrida cromatográfica de 10 min.

No Anexo 6 são mostrados os resultados de área do cromatograma e de concentração de bixina que foram obtidos para a injeção de volumes de 20, 30, 40 e 50 µL da amostra de bixina obtida por extração. Os valores de concentração foram calculados com base no gráfico do padrão de bixina obtido por CLAE (Anexo 5), considerando os valores de área dentro do intervalo da curva-padrão.

4.5 Resultados e discussão

4.5.1 Caracterização das sementes de urucum (Bixa orellana L)

A Tabela 2.2 mostra a composição centesimal das sementes de bixina. De acordo com Scotter (2009), as sementes de urucum geralmente contêm 1 a 6,3 % de bixina, 9,6 a 13,3 % de umidade, 5,4 a 6,9 % de cinzas, 2,0 a 4,8 % de lípideos, 12,1 a 17,0 % de proteína e 70 % de carboidratos totais. Em estudos mais recentes, Albuquerque & Meireles (2012) também encontraram valores semelhantes para sementes de urucum *in natura* variedade Piave, a saber: 4,9 % ± 0,2 % de bixina, 12,3 % ± 0,1 % de umidade, 6,2 % ± 0,1 % de cinzas, 3,7 % ± 0,0 % de lipídios, 12,1 % ± 0,2 % de proteínas e 65,7 % de carboidratos totais.

Tabela 2.2 – Caracterização físico-química das sementes de urucum

Componente	**Concentração (%) (média ± dp[1])**
Cinzas	9,73 ± 0,45
Proteínas	12,93 ± 0,15
Lipídeos	2,12 ± 0,20
Umidade	10,18 ± 0,68

dp[1] – desvio padrão

Rodrigues (2013) obteve os seguintes valores: umidade 15,6 %; cinzas 4,8 %; proteínas 16,1 %; lipídeos 17 %; carboidratos totais 46,5 % e bixina 2,9 %. Deste

modo, considerando as variabilidades de cultivares, solo e condições de armazenamento, os valores aqui encontrados divergem dos dados mencionados.

4.5.2 Extração da bixina

O rendimento do processo de extração da bixina das sementes de urucum é fator determinante para a viabilidade econômica do emprego deste carotenoide na indústria. A extração dos cristais de bixina tem seu rendimento calculado pela relação entre a quantidade de pó produzida ao final da extração a partir da quantidade inicial de sementes. Utilizando-se a metodologia adotada neste trabalho, foi obtido um rendimento de 1,5 ± 0,2 %. A Figura 2.1 mostra o aspecto visual das sementes de urucum *in natura* e dos cristais de bixina extraído das sementes.

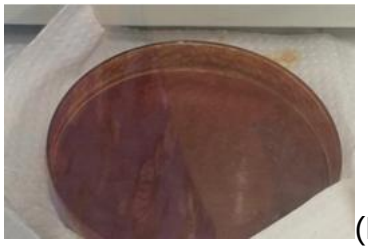
(A)

(B)

Figura 2.1 - Aspecto visual das sementes de urucum *in natura* (A) e dos cristais de bixina extraído das sementes(B)

Após a colheita e principalmente durante o armazenamento, os grãos de urucum ficam expostos a alguns fatores ambientais, como atividade de água, temperaturas elevadas, exposição ao ar e alta umidade relativa do ambiente. Variações nesses fatores também acabam interferindo no rendimento da produção dos pigmentos. O teor desses compostos presentes nas sementes de urucum oscila de acordo com a variedade da cultura, do solo, do clima e dos tratos culturais, podendo ser encontradas sementes com menos de 1 % e outras até com 6 % de bixina (Demczuk Jr & Hoffmann Ribani, 2015). De acordo com Carvalho *et al.* (2010), as técnicas de extração em sua maioria visam à produção de um pó de coloração vermelho intensa no qual a bixina, maior responsável pela cor, encontra-se em baixa concentração.

Em seus estudos, Rahmalia *et al.* (2015) analisaram a concentração de bixina em sementes de urucum usando-se um método de extração com os solventes ciclohexano/acetona em diferentes proporções. Os autores observaram que a quantidade do carotenóide nas suas amostras foram: 27,90 ± 0,02 mg de bixina/g (2,79 ± 0,02 % em peso). A concentração média de bixina foi relatada como variando 12 a 23 mg/g nas sementes, dependendo das condições climáticas de plantio (como temperatura, iluminação, chuva e solo) e fatores genéticos (cultivares).

Chisté *et al.* (2011) utilizaram água, etanol, acetato de etila, etanol-água (1:1, v/v) e etanol-acetato de etila (1:1, v/v) em sementes de urucum intactas. Os solventes foram adicionados numa relação massa/solvente de 1:2 (m/v) e agitados num agitador orbital. Os extratos obtidos utilizando etanol, acetato de etila e etanol-acetato de etila apresentaram o maior teor de bixina. A bixina apresenta a propriedade de ser lipossolúvel e, portanto, sujeita a extração com diversos solventes orgânicos, dentre os quais os mais utilizados são clorofórmio, acetona, propilenoglicol e o etanol (Rahmalia *et al.*, 2014).

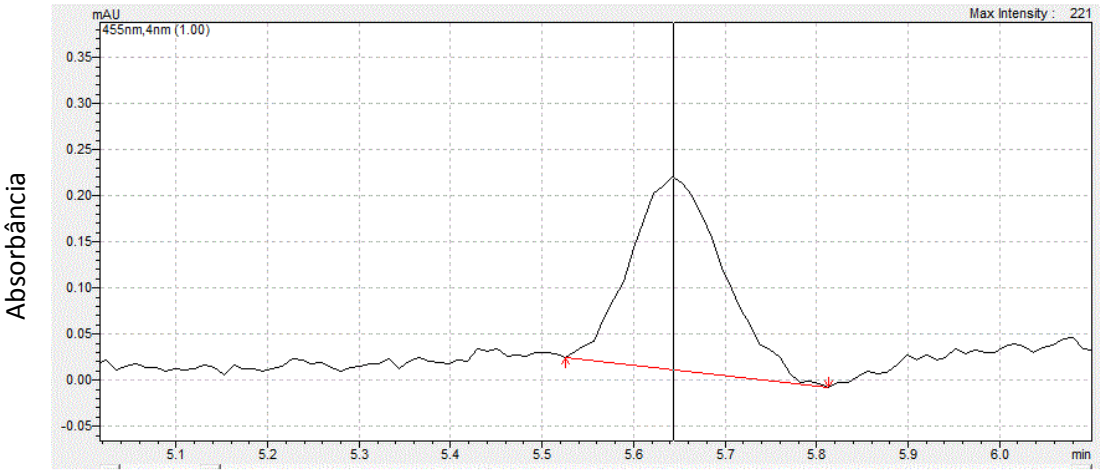
Fatores como escolha do solvente, proporção entre os solventes, temperatura de extração e a quantidade de água presente nos grãos influenciam na quantidade final de bixina obtida (Saini & Keum, 2018).

As dificuldades na comparação entre os resultados do teor de bixina de diferentes procedências e variedades podem estar relacionadas à falta de uniformidade dos métodos de análise. As metodologias usadas variam desde a utilização de diferentes soluções para extração dos pigmentos até o uso inadequado de coeficientes de absorção para quantificação (Carvalho *et al.*, 2010).

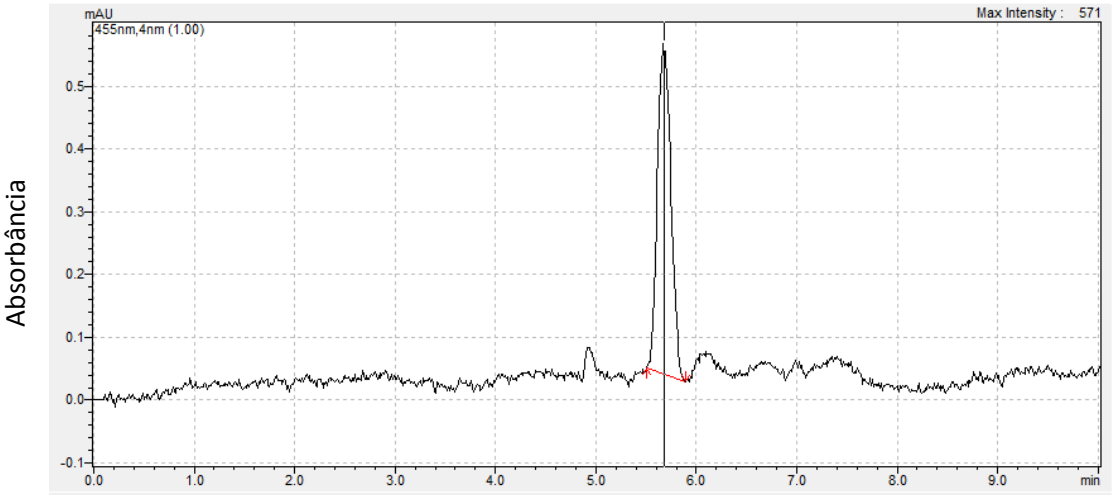
4.5.3 Análise da bixina extraída das sementes e comparação com o padrão

A Figura 2.2 mostra o cromatograma do padrão de bixina (>90% de pureza – 2.2-A) e da amostra de bixina obtida após a extração (2.2-B). Pode-se observar que, nas condições experimentais utilizadas, a separação cromatográfica indica o aparecimento de um pico referente ao padrão de bixina correspondente a um tempo de retenção de cerca de 5,65 s, o que coincide com o pico do extrato obtido a partir

da semente do urucum (Figura 2.2B). Os resultados indicaram que a concentração de bixina na amostra do extrato foi 0,12 ± 0,01 g/L (Anexo 6).



(A)



(B)

Figura 2.2 - Cromatograma do padrão de bixina (>90% de pureza – A) e da amostra de bixina obtida após a extração (B).

Rios & Mercadante (2004) verificaram o efeito de diferentes condições na extração orgânica de bixina e norbixina seguida de cristalização a partir de "*snacks*" extrusados. Os autores utilizaram CLAE com fase móvel acetonitrila/ácido acético 2% (65:35) e comprimento de onda da análise de 461 nm. Foram encontrados dois tempos de retenção significativos: Tr entre 18 e 22 min, identificado como sendo da bixina, e um Tr entre 6 a 10 min como sendo a norbixina.

Chisté *et al.* (2011), usando um extrato com 98% de pureza, identificaram a bixina como sendo o pico que aparece em 38,6 min. Cardeñosa *et al.* (2011) avaliaram a concentração de bixina e norbixina em alimentos e observaram tempos de retenção entre 8 a 10 min para a bixina e entre 4 a 6 min para a norbixina.

Como observado, os valores encontrados na literatura para o Tr da bixina nas análises por CLAE dependem de fatores como: metodologia de extração; tipo de solvente utilizado como fase móvel e proporção de solventes entre a fase móvel e a fase estacionária. Sendo assim, os resultados encontrados neste trabalho (amostras do extrato de urucum e do padrão de bixina com tempos de retenção entre 5 e 6 min) indicaram que o a metodologia proposta neste trabalho para a quantificação da bixina foi bem sucedida, confirmando que os cristais obtidos a partir do procedimento de extração das sementes de urucum eram formados por bixina.

4.5.4 Espectrofotometria de Varredura UV-VIS

Os resultados da varredura estão apresentados na Figura 2.3. De acordo com Takamoto (2015), o perfil espectrofotométrico dos carotenoides, como é o caso da bixina, apresenta três picos de absorção dos quais os dois últimos apresentam maior intensidade. Como observado na Figura 2.3, o perfil se repete para a bixina em todos os solventes testados. O autor relata que os espectros podem ser utilizados para a identificação dos carotenoides, já que cada molécula apresenta picos específicos de comprimentos de onda.

De acordo com Rahmalia *et al.* (2014), o sistema de dupla ligação conjugada da bixina resulta numa forte banda de absorção acima de 400 nm. Os solventes que apresentaram as maiores absorções foram o clorofórmio e o hexano, com valores de comprimento de onda de 455 e 430 nm, respectivamente.

A bixina é um composto orgânico lipossolúvel, solúvel em soluções alcalinas (sais de sódio e potássio) e insolúvel em água (Humeau *et al.*, 2000; Jahangiri *et al.*, 2018). Os estudos publicados sobre carotenoides *trans*, como β-caroteno, zeaxantina e a cantaxantina indicam que a geometria *trans* é a estrutura de energia mais baixa e é considerada insolúvel em água (Polyakov *et al.*, 2004).

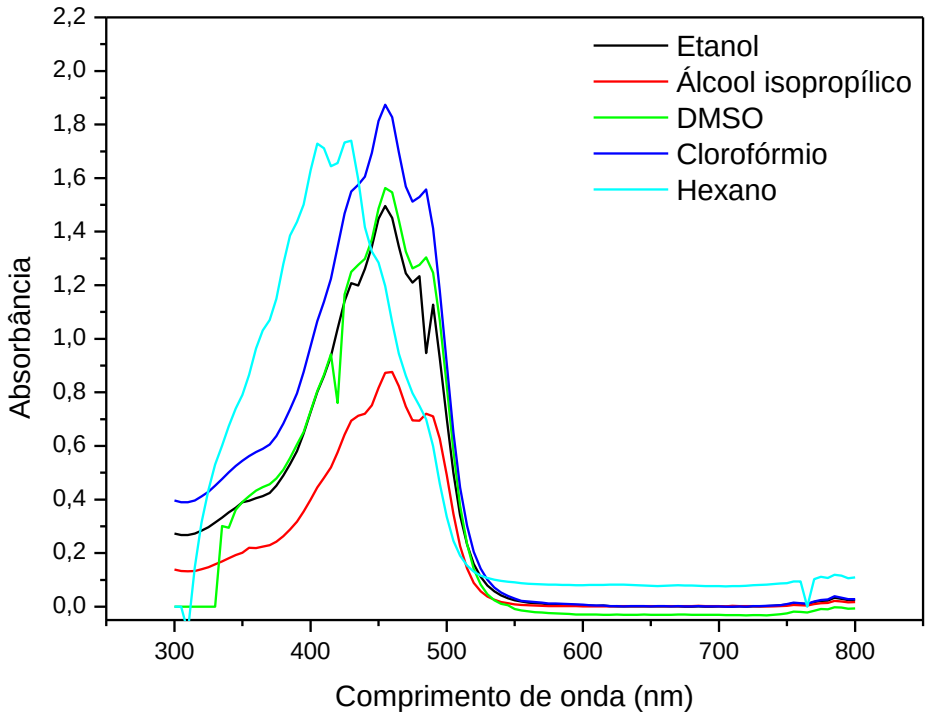


Figura 2.3 – Espectrofotometria de varredura da bixina extraída de sementes de urucum nos solventes etanol (**--**), álcool isopropílico (**--**), DMSO (**--**), clorofórmio (**--**) e hexano (**--**).

A localização do pico de absorção na espectrofotometria fornece informação estrutural sobre o composto, já que o grupo cromóforo ocupa uma grande porção da molécula; a intensidade do pico de absorção está relacionada tanto à estrutura quanto à concentração do carotenoide. Além disso, a posição e intensidade do pico de absorção são sensíveis às variações do ambiente como a polaridade do solvente (Takamoto, 2015).

Os carotenoides de urucum, principalmente a bixina, são encontrados na natureza, na sua maioria, na conformação *cis* (Scotter, 2009) e mesmo assim se apresentam como compostos de baixa polaridade sendo, portanto, solúveis em solventes orgânicos. Segundo Tay-Agbozo *et al.* (2018), isso ocorre devido a presença de interações fracas e reversíveis, como ligações de hidrogênio, interações de van dar Waals e forças de dipolo (Hempel*et al.*, 2016), exercendo efeito de molécula hidrofóbica.

Considerando a metodologia adotada, a condição lipossolúvel da bixina e os dados da literatura, observa-se que a concentração do carotenoide no extrato

orgânico dependerá da sua interação com o solvente escolhido, variando conforme for estabelecida a relação soluto/solvente.

4.5.5 Encapsulação por liofilização

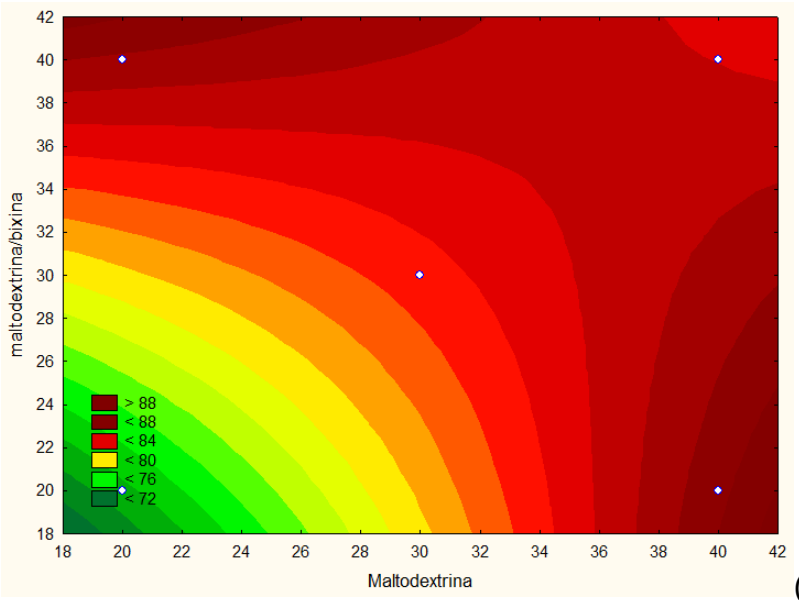
A Figura 2.4 mostra a curvas de contorno (2.4-A) e Diagrama de Pareto (2.4-B) para a variável resposta eficiência de microencapsulação em função das variáveis concentração de maltodextrina e razão maltodextrina/bixina.

Os resultados mostram que para a variável resposta eficiência de encapsulação, as variáveis concentração de maltodextrina e razão maltodextrina/bixina, bem como a interação entre ambas, foram significativas ao nível de 95% de confiança ($p > 0,5$). As maiores eficiências de encapsulação foram obtidas para maiores concentrações de maltodextrina e para maiores valores da razão maltodextrina/bixina. O menor valor obtido para a eficiência de encapsulação (*E%*) foi na condição 20 % de MD e razão MD/bixina de 20 (72,5 %), ao passo que o maior valor de E% (85,5 %) foi observado para uma concentração de MD de 40 % a essa mesma razão MD/bixina.

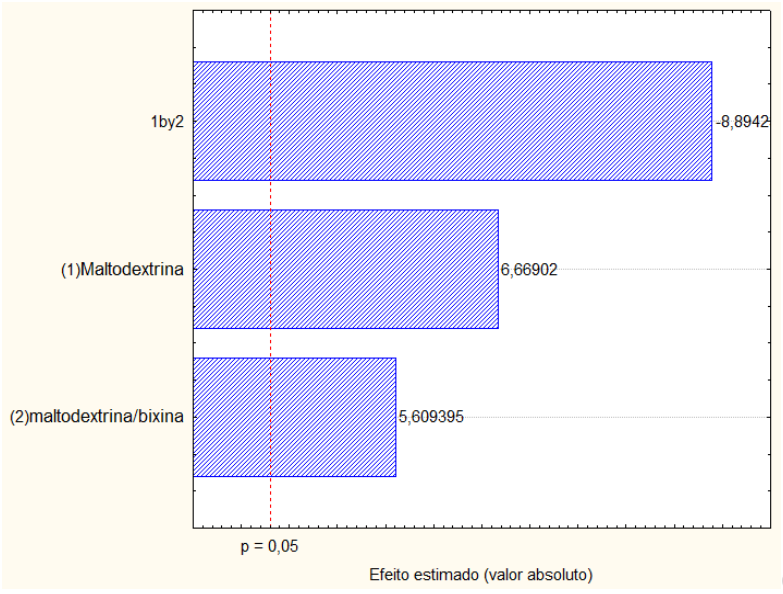
Curi-Borda *et al.* (2019) utilizaram a maltodextrina como material de parede em combinação com outros compostos para encapsulação de corantes de urucum. Os autores relataram que quando a maltodextrina foi utilizada de maneira isolada, formaram-se microcápsulas com uma eficiência de encapsulação de 77 %. No entanto, quando foi associada a uma fração de carboidratos nativa (goma arábica, carboximetilcelulose e pectina), foi observado um aumento da eficiência para valores acima de 90%.

Sabe-se que a quantidade de um composto que pode ser incorporado em sistemas microencapsulados é afetada pelo tipo de formulação e técnica utilizada (Lobato *et al.*, 2013), o que explica os diferentes valores de eficiência publicados na literatura. Nesse trabalho, a maltodextrina provou ser adequada como um material de parede, oferecendo uma eficiência de encapsulação E% > 70% em todas as condições experimentais investigadas. Trabalhos que utilizaram a metodologia de encapsulação por *spray drying* para bixina (Barbosa *et al.*, 2005), carotenoides

(Rodríduez-Huezo *et al.*, 2006) e licopeno (Shu *et al.*, 2006) relatam valores de eficiência 86, 82,2 e 87,5 %, respectivamente.



(A)



(B)

Figura 2.4 - Curvas de contorno (A) e Diagrama de Pareto (B) para a variável resposta eficiência de microencapsulação em função das variáveis concentração de maltodextrina e razão maltodextrina/bixina

A quantidade de um composto que pode ser incorporado em sistemas encapsulados é afetada pelo tipo de formulação e técnica utilizada (Lobato *et al.*, 2013). Para Monterroza (2018), a eficiência de encapsulação da bixina em amido

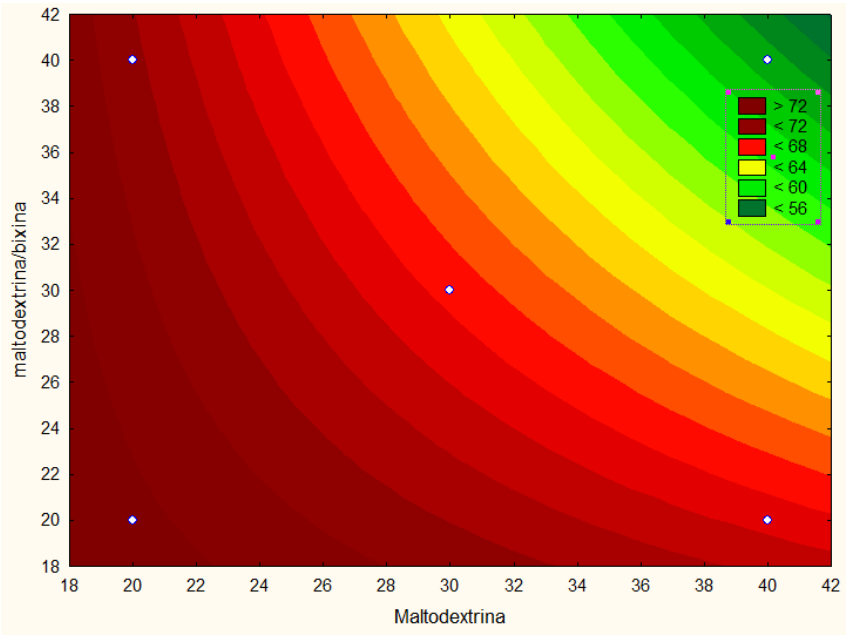
variou de 13,1% a 62,1% e de 17,3% a 94,5% utilizando métodos de ultrassom e o método alcalino, respectivamente.

A Figura 2.5 mostra as curvas de contorno (2.5-A) e Diagrama de Pareto (2.5-B) para a variável resposta solubilidade do pó microencapsulado em água em função das variáveis concentração de maltodextrina e razão maltodextrina/bixina. Observa-se que apenas a variável concentração de maltodextrina foi significativa ($p > 0,5$), mas com um efeito negativo (-5,40), ou seja, quanto maior a concentração de MD, menor a solubilidade do pó microencapsulado. Maiores solubilidades foram obtidas para menores concentrações de maltodextrina e para menores valores da razão MD/bixina.

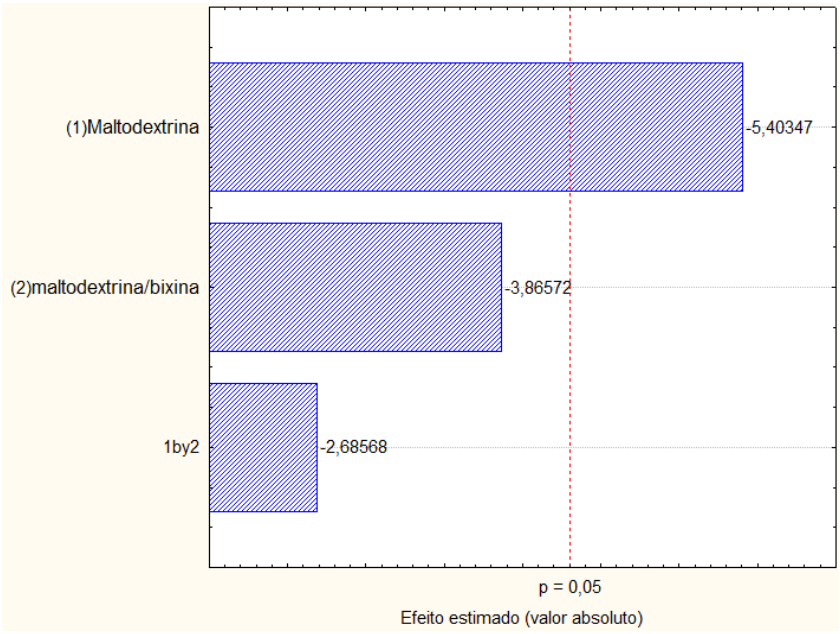
O maior valor de solubilidade em água (75,3 %) foi observado na condição MD 20 % m/v e razão MD/bixina de 20, enquanto que a menor solubilidade (59,5 %) foi obtida para MD 40 % m/v e razão MD/bixina de 40. Dessa forma, observa-se que a microencapsulação de bixina em maltodextrina favoreceu a solubilidade da bixina em água. Experimentos anteriores foram realizados para avaliar o grau de solubilidade dos cristais de bixina em água, e os resultados demonstraram que os cristais eram insolúveis.

Os resultados obtidos assemelham-se aos relatados por Barbosa *et al.* (2005). Os autores, ao avaliarem a solubilidade da bixina encapsulada e não encapsulada em água, constataram que as microcápsulas possuíam boa solubilidade (64 segundos), enquanto que os cristais puros foram considerados insolúveis.

Outro estudo que também demonstrou a solubilidade do microencapsulado em comparação com o cristal do carotenoide foi realizado por Santos *et al.* (2005), que avaliaram microcápsulas de páprica em oleoresina utilizando carboidratos como material de parede. Sousdaleff *et al.* (2013), ao avaliarem a solubilidade da curcumina após liofilização em maldodextrina, concluíram que a curcumina microencapsulada a uma proporção 1:20 proporcionou uma solubilidade após 1 min e 35 s sem produzir precipitados ou aglomerados. Este resultado mostra que o processo de liofilização combinado com a maltodextrina fornece uma melhoria na solubilidade deste corante.



(A)



(B)

Figura 2.5 - Curvas de contorno (A) e Diagrama de Pareto (B) para a variável resposta solubilidade do pó microencapsulado em função das variáveis concentração de maltodextrina e razão maltodextrina/bixina.

O composto hidrofóbico presente no núcleo da microcápsula é disperso em água quando o material da parede da microcápsula é dissolvido. Sendo assim, a estabilidade da dispersão aquosa formada do composto hidrofóbico será afetada por vários fatores, como: distribuição e tamanho da partícula; condições ambientais e as interações repulsivas ou atraentes entre as partículas (Berton-Carabin & Schroën,

2015). A inter-relação desses fatores produz vários mecanismos de instabilidade, como sedimentação, floculação ou coalescência das partículas hidrofóbicas (Curi-Borda *et al.*, 2019), o que pode explicar as diferentes solubilidades entre os ensaios realizados nesse trabalho.

Existem numerosos métodos de microencapsulação que podem ser usados, por isso a escolha do método de secagem é determinante para obtenção do produto final. Vários fatores devem ser levados em consideração: propriedades químicas e físicas diferentes da substância encapsulada e material do núcleo, não reatividade com o material do núcleo, sua estabilidade por um longo tempo e uso futuro. Também são importantes o tamanho da cápsula e sua forma final.

Não existe um método de secagem que permita a estabilização do carotenoide sem adição de material de parede. Por exemplo, ao secar um produto por *spray dryer* sem a adição de um agente encapsulante, ocorre a formação de partículas viscosas e pegajosas, o que é desvantajoso na sua aplicação posterior. Isto ocorre devido à presença de substâncias de baixo peso molecular, que são caracterizadas por uma baixa temperatura de transição vítrea (Janiszewska, 2014). O problema de aumentar a temperatura do estado vítreo é resolvido usando agentes encapsulantes, que ao serem adicionados à suspensão, também influenciam as propriedades finais do produto. Os resultados do planejamento experimental indicaram que a eficiência de encapsulação aumenta para maiores concentrações de maltodextrina. Uma hipótese é que o aumento na concentração de MD altere a temperatura de transição vítrea da amostra durante o processo de encapsulação, favorecendo a formação das microcápsulas.

O teor médio de umidade dos pós liofilizados variou entre 4,1 e 6,1 % (desvio padrão de 0,64 %). Tupuna *et al.* (2018) relataram que a temperatura de secagem, o percentual de sólidos solúveis totais em cada amostra e a higroscopicidade específica do material de parede são fatores que influenciam o teor de umidade.

Considerando que os parâmetros operacionais de secagem foram mantidos constantes para todos os experimentos neste estudo, as variações dos percentuais de umidade dos pós microencapsulados são devido às características de cada amostra (concentração de MD e diferentes razões MD/bixina). O teor de umidade

pode afetar significativamente a qualidade dos pós; já que a baixa umidade garante a sua estabilidade durante o armazenamento.

4.6 Conclusões

Os carotenoides são pigmentos naturais instáveis que precisam de proteção. Dentre as inúmeras técnicas que podem ser usadas para a microencapsulação de carotenoides, destaca-se a liofilização.

A técnica de microencapsulação por liofilização da bixina utilizando maltodextrina como polímero de parede permitiu a produção de microcápsulas com boa eficiência de encapsulação a depender da concentração de maltodextrina na suspensão inicial e da razão Me/Mb, sendo observados maiores valores de eficiência de encapsulação para maiores concentrações de maltodextrina e para maiores valores da razão Me/Mb.

No que se diz respeito à solubilidade da bixina microencapsulada, as maiores solubilidades foram obtidas para menores concentrações de maltodextrina e para menores valores da razão maltodextrina/bixina, tendo apenas a concentração de maltodextrina com diferença significativa ($p < 0,05$).

Dessa maneira, pode-se afirmar que a secagem por liofilização foi bem sucedida, gerando pós de fácil solubilização em água, o que não acontece com o material ativo não encapsulado, já que o mesmo é hidrofóbico. A alteração da solubilidade do material sem perda das suas propriedades é de grande importância para a indústria alimentícia, sendo uma alternativa para proteger esses compostos de fatores que provocam a oxidação e a degradação da bixina, melhorando assim a sua estabilidade.

4.7 Referências

Albuquerque, C. L. C., & Meireles, M. A. A. (2012). Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. *The Journal of Supercritical Fluids*, *66*, 86–95. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.01.004

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington, 1995.

Barbosa, M. I. M. J., Borsarelli, C. D., & Mercadante, A. Z. (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, *38*(8), 989–994. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.018

Berton-Carabin, C. C., &Schroën, K. (2015). Pickering Emulsions for Food Applications: Background, Trends, and Challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*, *6*(1), 263–297. https://doi.org/10.1146/annurev-food-081114-110822

Bolognesi, V. J. ([s.d.]). *Chapter 12 - Annatto Carotenoids as Additives Replacers in Meat Products*. 30.

Campelo, P. H., do Carmo, E. L., Zacarias, R. D., Yoshida, M. I., Ferraz, V. P., de Barros Fernandes, R. V., Borges, S. V. (2017). Effect of dextrose equivalent on physical and chemical properties of lime essential oil microparticles. *Industrial Cropsand Products*, *102*, 105–114. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.021

Capella, S. O., Tillmann, M. T., Félix, A. O. C., Fontoura, E. G., Fernandes, C. G., Freitag, R. A., Nobre, M. O. (2016). Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: Estudo em modelo experimental. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *68*(1), 104–112. https://doi.org/10.1590/1678-4162-8374

Cardarelli, C. R., Benassi, M. de T., & Mercadante, A. Z. (2008). Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(9), 1689–1693. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.10.013

Cardeñosa, V., Lunar, M. L., &Rubio, S. (2011). Generalized and rapid supramolecular solvent-based sample treatment for the determination of annatto in food. *Journal of Chromatography A*, *1218*(50), 8996–9002. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.041

Carvalho, P. R. N., Silva, M. G. da, Fabri, E. G., Tavares, P. E. da R., Martins, A. L. M., & Spatti, L. R. (2010). Concentração de bixina e lipídios em sementes de

urucum da coleção do Instituto Agronômico (IAC). *Bragantia*, *69*(3), 519–524. https://doi.org/10.1590/S0006-87052010000300002

Chisté, R. C., Yamashita, F., Gozzo, F. C., & Mercadante, A. Z. (2011). Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *Journal of Chromatography A*, *1218*(1), 57–63. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.094

Curi-Borda, C. K., Linares-Pastén, J. A., Tat, T., Tarqui-Dueñas, R., Chino-Flores, N., Alvarado, J.-A., &Bergenstahl, B. (2019). Multilayer bixin microcapsules: the impact of native carbohydrates on the microencapsulation efficiency and dispersion stability. *Foods*, *8*(3), 108. https://doi.org/10.3390/foods8030108

de Oliveira, J. S. ([s.d.]). *Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (Bixa orellana L.)*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

Demczuk Jr, B., & Hoffmann Ribani, R. (2015). Updates on chemistry and use of annatto (*Bixa orellana* L.). *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, *6*(1), 37. https://doi.org/10.14685/rebrapa.v6i1.144

Dornas, W. C., Oliveira, T. T. de, Augusto, L. E. F., &Nagem, T. J. (2010). Aterosclerose experimental em coelhos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, *95*(2), 272–278. https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010001200020

Eastman, J. E.; Moore, C. O. Cold Water Soluble Granular Starch for Gelled Food Composition. U.S. Patent 4465702, 14 ago. 1984.

Garcia, C. E. R., Bolognesi, V. J., Dias, J. de F. G., Miguel, O. G., & Costa, C. K. (2012). Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*, *42*(8), 1510–1517. https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800029

Hempel, J., Schädle, C. N., Leptihn, S., Carle, R., &Schweiggert, R. M. (2016). Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *317*, 161–174. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.10.024

Humeau, C., Rovel, B., & Girardin, M. (2000). *Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid*. Biotechnology Letters 22(2):165-168.

Jahangiri, A., Møller, A. H., Danielsen, M., Madsen, B., Joernsgaard, B., Vaerbak, S., … Dalsgaard, T. K. (2018). Hydrophilization of bixin by lipase-catalyzed transesterification with sorbitol. *Food Chemistry*, *268*, 203–209. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.085

Mantovani, N. C., Grando, M. F., Xavier, A., & Otoni, W. C. (2013). Avaliação de genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.) por meio da caracterização morfológica de frutos, produtividade de sementes e teor de bixina. *Ciência Florestal*, *23*(2). https://doi.org/10.5902/198050989281

Mercadante, A. Z. (2001). Composition of Carotenoids from Annatto. In J. M. Ames & T. Hofmann (Orgs.), *Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants* (Vol. 775, p. 92–101). https://doi.org/10.1021/bk-2001-0775.ch006

Montenegro, M. A., Rios, A. de O., Mercadante, A. Z., Nazareno, M. A., & Borsarelli, C. D. (2004). Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(2), 367–373. https://doi.org/10.1021/jf0349026

Monterroza, E. J. P. ([s.d.]). *Encapsulação de carotenoides em matrizes de amilose por diferentes processos: Formação de criogéis, ultrassom e precipitação em meio ácido*. 144.

Olegário, L. S., & Santos, J. A. B. (2014). Prospecção tecnológica sobre o corante natural de urucum (*Bixa orellana* L.). *Cadernos de Prospecção*, *7*(4), 601–611. https://doi.org/10.9771/S.CPROSP.2014.007.061

Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Konovalova, T. A., Hand, E. O., &Kispert, L. D. (2004). Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: 1HNMR, EPR, andopticalstudies. *Free Radical Biologyand Medicine*, *36*(7), 872–880. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.009

Pregnolatto, W.; Pregnolatto, N. P. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v. 1. 533 p.

Rahmalia, W., Fabre, J.-F., &Mouloungui, Z. (2015). Effects of cyclohexane/acetone ratio on bixin extraction yield by accelerated solvent extraction method. *Procedia Chemistry*, *14*, 455–464. https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.061

Rahmalia, W., Fabre, J.-F., Usman, T., & Mouloungui, Z. (2014). Aprotic solvents effect on the UV–visible absorption spectra of bixin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *131*, 455–460. https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.119

Rios, A. de O., & Mercadante, A. Z. (2004). *Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em "snacks" extrusados por CLAE*. Alimentos e Nutrição Araraquara, Vol. 15, N 3 *15*(3), 12.

Rodríduez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L. A., Beristain, C. I., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journalof Food Science*, *69*(7), 351–359. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13641.x

Rodrigues, L. M. (2013). *Obtenção de extratos com bixina a partir de sementes de urucum desengorduradas: estudo dos parâmetros de processo*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 124.

Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., … Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, *70*, 62–93. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004

Rojas V., V., Callacna C., M., & Arnaiz P., V. (2015). Use of an additive canthaxanthin based and annatto extract in diets of laying hens and its effect on the color of the yolk and the egg shelf life. *Scientia agropecuaria*, 191–199. https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.05

Rutz, J.K., Sousa, C.T., Borges, C.D., Moura, J.B., ZAMBIAZI, R.C. (2014). *Microencapsulação de suco de pitanga roxa: perfil de liberação dos compostos bioativos*. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química.

Saini, R. K., &Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, *240*, 90–103. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099

Santos, A. B. dos, Fávaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2005). Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por

atomização. *Food Science and Technology*, *25*(2), 322–326. https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000200024

Scotter, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives&Contaminants: Part A*, *26*(8), 1123–1145. https://doi.org/10.1080/02652030902942873

Shu, B., Yu, W., Zhao, Y., & Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, *76*(4), 664–669. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062

Sousdaleff, M., Baesso, M. L., Neto, A. M., Nogueira, A. C., Marcolino, V. A., &Matioli, G. (2013). Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(4), 955–965. https://doi.org/10.1021/jf304047g

Souza, L. F., Pagno, C. H., Medeiros, N. da S., Barbosa, S., dos Santos, P. C. P., Rios, A., … de Jong, E. V. (2016). The effect of the carotenoid bixin and annatto seeds on hematological markers and nephrotoxicity in rats subjected to chronic treatment with cisplatin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *26*(4), 446–450. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.005

Takamoto, R. T. de O. (2015). *Caracterização e aplicação de nanodispersão de bixina* (Text, Universidade de São Paulo). https://doi.org/10.11606/D.9.2016.tde-18022016-103955

Tay-Agbozo, S., Street, S., &Kispert, L. D. (2018). The carotenoid bixin: Optical studies of aggregation in polar/water solvents. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *362*, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.05.008

Tupuna, D. S., Paese, K., Guterres, S. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., & Rios, A. de O. (2018). Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. *Industrial Crops and Products*, *111*, 846–855. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.001

Wrolstad, R. E., & Culver, C. A. (2012). Alternatives to those artificial FD&C food colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 59–77. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101118

Zardo, I. (2014). *Extração e microencapsulação de compostos antociânicos do bagaço de mirtilo (Vaccinium corymbosum L.)*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 118.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração de bixina das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.), realizada através de lavagens com solventes orgânicos e posterior purificação por cristalização, permitiu a obtenção de cristais de bixina que foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, obtendo-se resultados que confirmam a extração da bixina quando comparada ao padrão.

A espectrofotometria de varredura da bixina extraída de sementes de urucum demonstrou que os solventes que apresentaram as maiores absorções foram o clorofórmio e o hexano. Todos os resultados de varredura indicaram a obtenção de fortes bandas de absorção acima de 400 nm, um perfil típico de substâncias que contém duplas ligações conjugadas, como é o caso do carotenoide bixina.

O processo de liofilização dos cristais de bixina em maltodextrina apresentou uma eficiência significativa na produção das microcápsulas e a solubilização da amostra encapsulada em água. Ao levarmos em consideração a instabilidade do carotenoide bixina, a microencapsulação é uma alternativa importante para a alteração da sua propriedade física, gerando pós de fácil solubilização e que podem ser mais facilmente aplicados na formulação de diversos produtos. Em adição, o processo de microencapsulação promove a proteção desse composto contra fatores que provocam a sua oxidação e degradação, melhorando assim a sua estabilidade.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage, **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, Netherlands, v. 63, n. 2, p. 87-94, 2006.

AKHAVAN MAHDAVI, S. *et al.* Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatina, **International Journal of Biolology Macromol**, Ntherlands, v. 85, p. 379–385, 2016.

ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process, **The Journal of Supercritical Fluids**, Estados Unidos, v. 66, p. 86-95, 2012.

ALMEIDA, H. H. *et al.* Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt), **Food chemistry**, [S. I.], v. 261, p. 224-232, 2018.

ALVES, A. I. **Obtenção de extrato de carotenoide de polpa de pequi (CayrocarbrasilienceCamb.) encapsulado pelo método de secagem por atomização**. 2014, 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Viçosa, 2014.

ALVES, R. W. **Extração de corantes de urucum por processos adsortivos utilizando argilas comerciais e colloidal gás aphrons.** 2005. 158 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2005.

ALVES, R. W. **Extração e purificação de corantes de urucum.** 2001. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2001.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, **Food Science and Technology**, Campinas, v. 18, p. 240-251, 2007.

ANDRADE, L. de A. **Nanoencapsulamento de carotenoides em dispersão:** uma revisão. 2015. 53 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, 2015.

ANSELMO, G. C. dos S.; MATA, M. E. R. M. C.; RODRIGUES, E. Comportamento Higroscópico do Extrato Seco de Urucum (BixaOrellana L). **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1888-1892, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 16 ed. Arlington, VA: AOAC, 1995. 1025 p.

ARNOLD, L. E. Pediatric bipolar disorder and ADHD: Family history comparison in the LAMS clinical sample, **Journal of Affective Disorders**, Netherlands, v. 141, n., p.382-389, 2012.

AZEREDO, H. M. C. de. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos, **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

AZZA A. A. *et al.* Encapsulation of Nano Carotenoids; Evaluation of Stability and Safety. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Índia, v. 4, n. 2, p. 1017-1029, 2015.

BALAKRISHNANA, V. K. *et al.* Genotoxic and carcinogenic products arising from reductive transformations of the azo dye, Disperse Yellow 7. **Chemosphere**, Nova York, v. 146, p. 206-215, 2016.

BOLOGNESI, V. J.; GARCIA, C. E. R. Cap.12 Annatto Carotenoids as Additives Replacers in Meat Products. In: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. **Alternative and Replacement Foods. Academic,** Curitiba, v. 17, p. 355-384, 2018.

BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). **Science**, London, v. 300, n. 5628, p. 2089- 2091, 2003.

BURGAIN, J.; *et al.* Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications, **Journal of Food Engineering**, Netherlands, v. 104, p. 467-483, 2011.

CAMPELO, P.H. *et al.* Effect of dextrose equivalent on physical and chemical properties oflime essential oil microparticles, **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 102, n., p.105–114, 2017.

CAMPELO, P. H. *et al.* Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends, **Food research international**, Canadá, v. 105, p. 936-944, 2018.

CAPELLA, S. O. *et al.* Potencial cicatricial da Bixaorellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 68, n. 1, 104-112, 2016.

CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidante and colour properties, **LWT – Food Science Technology**, Campinas, n. 41, p. 1689-1693, 2008.

CARMO, E. L.; DE BARROS FERNANDES, R. V.; BORGES, S. V. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, Viçosa, v. 1, n. 2, p. 30-44, 2015.

CAROCHO, M. *et al.* Adding Molecules to Food, Prosand Cons: A Reviewon Synthetic and Natural Food Additives, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, n. 13, p. 337-399, 2014.

CHISTÉ, R. C. *et al.* Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds, **Journal of Chromatography**, [S.I.], v. 1218, n. 1, p. 57-63, 2011.

CORRADINI, M. G. **Synthetic Food Colors University of Massachusetts**. Massachusetts: Elsevier, 2018.

COSTA, C. K. **Estudo Fitoquímico de *Bixa orellana* L., Bixaceae e Aplicação de seu Óleo em Formulação Cosmética**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, Curitiba, 2007.

CUNHA, F. G. **Estudo da extração mecânica de bixina das sementes de urucum em leito de jorro**. 2008. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Uberlândia, 2008.

CURI-BORDA, C. *et al.* Multilayer Bixin Microcapsules: The Impact of Native Carbohydrates on the Microencapsulation Efficiency and Dispersion Stability, **Foods**, Switzerland, v. 8, n. 108, p. 1-24, 2019.

DELGADO-VARGAS, Francisco; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical reviews in food science and nutrition**, Boca Raton, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring Our Foods In The Last And Next Millennium, International, **Journal Food Science Technology**, New Delhi, n.35, v., p. 5–22, 2000.

DURANTE, M.; LENUCCI, M.; MITA, G. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from pumpkin (Cucurbita spp.): a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 4, p. 6725-6740, 2014.

DZIEZAK, J. D. Emulsifiers: the interfacial key to emulsion stability. **Food technology**, Campinas, v. 42, n. 10 p. 172-186, 1988.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols a review, **Food Science & Technology**, Campinas, v. 21, p. 510-523, 2010.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios, **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FELICISSIMO, M. P. et al, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy analyses of Bixaorellana seeds. **Journal Agriculture, Food Chemistry,** Washington, v. 52, n.7, p.1810-1814, 2004.

FERNANDES, L. P.; CÂNDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. P. Spray Drying Microencapsulation of LippaSidoides Extracts in Carbohydrate Blends. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 9, n., p. 425–432, 2012.

FONTANA, J. D. *et al.* Carotenoides: Cores Atraentes e Ação Biológica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 32, p. 15574- 15586, 2010.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa, **Química Nova**, São Paulo, p. 488-492, 2009.

GARCIA, C. E. R. *et al.* Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (Bixaorellana L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 8, p.1510-1517, 2012.

GHARSALLAOUI A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International,** Canada**,** v. 40, p. 1107–1121, 2007.

GORDILLO, B.; *et al.* Assessment of the color modulation and stability of naturally copigmented anthocyanin-grape colorants with different levels of purification. **Food Research International**, Ontario, v. 106, p. 791-799, 2018.

GUKOWSKY, C.J. *et al.* Rapid identification of artificial and natural food colorants with surface enhanced Raman spectroscopy**. Food Control**, Netherlands, v., 92, p. 267-275, Out. 2018.

HEMPEL, J. *et al.* Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters. **Journal Photochemistry Photobiolology,** Netherlands, v. 317, p. 161-174, 2016.

HEYDEN, Y. V. *et al.* Guidance for robustness: ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis,** [S.I.], v. 24, p. 723-753, 2001.

HOCHI S. *et al.* Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. **Journal of Reprodution and Development**, Tokyo, v. 57, p.557-563, 2011.

HUMEAU, C.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M. Enzymatic esterification of bixin by Lascorbic acid. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v.22, n.2, p.165–168, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1:** Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 3. ed., São Paulo: IMESP, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal:** Culturas Temporárias e Permanentes. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. p. 1-64.

JAHANGIRIA, A. *et al.* Hydrophilization of bixin by lipase-catalyzed transesterification with sorbitol. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 268, p.203–209, 2018.

KANDASWAMI, C.; MIDDELTON, E. J. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 336, p. 351-376,1994.

KANG, E. J., *et al.* Invited review: Annatto usage and bleaching in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, Estados Unidos, v. 93, n. 9, p. 3891–3901, 2010.

KUANG, S. S.: OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Reino Unido, v. 50, n. 10, p. 1913-1918, 2010.

LACOURSE, M. E.; LACOURSE, W. R. General instrumentation in HPLC. *In:* FANALI, S. *et al.* **Liquid Chromatography**. 2. ed. [s. l.]: Elsevier 2017. p. 417-429.

LAKKIS, J. M. Encapsulation and Controlled Release Technologies. *In:* LAKKIS, J. M **Food systems, encapsulation and controlled release in bakery applications.** Oxford, UK: Blackwell, 2007. cap. 5, p. 113 -133.

LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, α-and β-bixin, and α-and β-norbixin, and the determination of carminic acid in foods. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 732, n. 2, p. 394-398, 1996.

LIMA, L. R. P. *et al.* Toxidade Aguda de Rutina e de Bixaorellana. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, La Plata, v. 22, n. 1, p. 21-26, 2003.

LIMA, R. L. P.; Efeito de flavonóides e de corantes do urucum sobre a hiperlipidemia induzida em coelhos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42 n.1, p.69-74, 2010.

LIU, X. D. *et al.* Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by *spray drying*. **Drying Technology**, Estados Unidos, v. 19, n. 7, p. 1361-1374, 2001.

LOBATO, K. B. *et al.* Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 141, n. 4, p. 3906–3912, 2013.

MANTOVANI, N. C. *et al.* Avaliação de Genótipos de Urucum (BixaOrellana L.) por Meio da Caracterização Morfológica de Frutos, Produtividade de Sementes e Teor de Bixina. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 355-362, abr.-jun., 2013.

MARTINS, N. Food colorants: challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, Netherlands, v. 52, p. 1- 15, 2016.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do Licopeno com Ciclodextrinas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p.102- 105, dez. 2003.

MERCADANTE, Adriana Zerlotti *et al.* Caracterização de um novo carotenoide minoritário de urucum. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 2, p.193-196, maio/ago. 2001.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Cap. 4 Basic Information Regarding the HPLC Techniques. *In:* MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. **Selection of the HPLC method in chemical analysis.** [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 87–187.

MONTENEGRO, M. A. *et al.* Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin. **Journal of Agricultural, Food and Chemistry**, Estados Unidos, v.52 n. 2, p. 367-373, 2004.

MORAIS, T. P. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Pulínia, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MOREIRA, V. S. **Atividade Antioxidante e Caracterização Físico-química de Variedades de Urucueiros *In Natura* e Encapsulado**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Itapetinga, 2013.

OLEGÁRIO, L. S.; SANTOS, J. A. B. dos. Prospecção Tecnológica Sobre o Corante Natural de Urucum (Bixaorellana L.). **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 7, n. 4, p. 601-611, 2014.

OLIVEIRA, J. S. Caracterização, **Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.)**. 2005. 215 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2005.

OLIVEIRA, M. I. S. *et al.* Stability of spraydryed strawberry pulp produced with different carrier agents. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 310–318, 2013.

PACHECO, S. D. G.; **Uso do sal de bixina extraído do Urucum (*Bixa orellana* L.) como substituinte do nitrito de sódio em produtos cárneos reestruturados**. 2014. 110f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curitiba, 2014.

PADRÓ-RODRÍGUEZ, L.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, T.; NUVIOLA-FRÓMETA, D. Caracterización preliminar de tinturas al 10% de Bixaorellana L. **Revista Cubana de Química**, Santiago de Cuba, v. 29, n. 1, p. 103-114, 2001.

PASK, H. M. *et al.* Wavelength-versatile visible and UV sources based on crystalline Raman laser, **Progress in Quantum Electronics**, Reino Unido, v. 32, n. 3-4, p. 121–158, 2008.

PASSOS, L. C. M.; SARAIVA, M. F. S. M. L. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies, **Measurement**, Reino Unido, v. 135, p. 896–904, 2019.

PÉREZ-MONTERROZA, E. J. **Encapsulação de carotenoides em matrizes de amilose por diferentes processos: formação de criogéis, ultrassom e precipitação em meio ácido**. 2018. 144f. Dissertação (Mestrado Engenharia e Ciências de Alimentos) -Universidade Estadual Paulista, Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos), São José do Rio Preto, SP, 2018.

POLYAKOV, N. E.; MAGYAR, A.; KISPERT, L. D., Photochemical and Optical Properties of Water-Soluble Xanthophyll Antioxidants: Aggregation vs Complexation, **Journal Physical Chemistry**, Whasington, v. 35, n. 117, p.10173-10182, 2013.

PRESTON, H. D.; RICKARD, M.D. Extraction and chemistry of annatto, **Food Chemistry**, v. 5, p. 47-56, 1980.

RAHMALIA, W., FABRE, J-F., MOULOUNGUI, Z., Effects of cyclohexane/acetone ratio on bixin extraction yield by accelerated solvent extraction method, **Procedia Chemistry**, Netherlands, v. 14, n., p. 455-464, 2015.

RAHMALIA, W.; *et al.* Aprotic solvents effect on the UV–visible absorption spectra of bixin, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Reino Unido, v. 131, p. 455-460, 2014.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review, **Journal of Food Engineering**, Netherlands, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology, **Food Bioscience**, Reino Unido, v. 13, p. 76-83, 2016.

REY, L.; MAY, J. C. **Freeze-Drying/Lyophilization of pharmaceutical & biological products:** revised and expanded. New York, CRC Press, 2004.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química nova**, São Paulo, v. 27, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, L. M. **Obtenção de extratos com bixina a partir de sementes de Urucum desengorduradas: estudo dos parâmetros de processo**. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, Netherlands, p. 1-6, 2018.

ROJAS, V. V.; CALLACNA C. M.; ARNAIZ V. Uso de un aditivo a base de cantaxantina y extracto de achioteen dietas de gallinas de postura y suefecto sobre lacoloración de layema y la vida de anaqueldelhuevo. **Scientia Agropecuaria**, Trujillo, v. 6 n. 3, p. 191 – 199, 2015.

RUTZ, J. K. **Caracterização E Microencapsulação de Suco de Pitanga Roxa** (Eugenia Uniflora L.). 2013. 106 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, 2013.

SAHU, P. K. *et al.* An overview of experimental designs in HPLC method development and validation, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Netherlands, v. 147, p. 590–611, 2017.

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

SANTOS, J. A. A. *et al.* Avaliação Histomorfométrica do Efeito do Extrato Aquoso de Urucum (Norbixina) no Processo de Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos, **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Pulínia, v.16, n.3, p.637-643, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, **Química nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHROOYEN, P. M. M.; VAN DER MEER, R.; KRUIJF. G. De. Microencapsulation: its application in nutrition, **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 60, p. 475–479, 2001.

SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review, **Food Additives and Contaminants**, Reino Unido, v. 26, n. 8, p. 1123-1145, 2009.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. Critical Review, **Food Science and Nutrition**, Ottawa, v.33, n.6, p. 501-547, 1993.

SHARMA, V.; MCKONE, H. T.; MARKOW, P. G., A Global Perspective on the History, Use, and Identification of Synthetic, **Food Dyes Journal of Chemical Education**, Washington, v. 88, n. 1, p. 24-28, 2011.

SHOCKCOR, J. P. **HPLC–NMR: pharmaceutical applications, encyclopedia of spectroscopy and spectrometry**. 3. ed. [S. l.]: Elsevier, 2017.

SILVA, F. *et al.* Fítoquimicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L (URUCUM), **HOLOS**, Natal, v. 2, p. 484-498, 2018.

SILVEIRA, T. M. G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Is isolating starch from the residue of annatto pigment extraction feasible, **Food Hydrocolloids**, Whasington, v. 77, p. 117-125, 2018.

SILVEIRA, T.M.G. **Desenvolvimento de Filmes Biodegradáveis a partir do Resíduo da Extração de Corante de Urucum**. 2017. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Química, Ribeirão Preto, SP, 2017.

SOUZA, A. L. R. *et al.* REVIEW: Microencapsulação de Sucos e Polpas de Frutas Por Spray Drying: Uma Revisão, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.17, n.3, p.327-338, 2015.

SOUZA, L.F.; *et al.* Articlethe Effect of The Carotenoid Bixin And Annatto Seeds on Hematologicalmarkers And Nephrotoxicity In Rats Subjected To Chronic Treatmentwith Cisplatin, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 4, p. 446 – 450, 2016.

SOUZA, M. S. M. Ativos Microencapsulados Encontram mais Aplicações. **Química e derivados**, São Paulo, n. 388, p. 20, 2001.

SPENCE, C. Cap. 2 The psychological effects of food colors. *In:* REINHOLD, C.; Schweiggert, R. **Handbook on natural pigments in food and beverages industrial applications for improving food color.** [S. l.]: Elsevier, 2016. p. 29-58.

STRALLER, G.; LEE, G. Hrinkage of spray-freeze-dried microparticles of pure protein for ballistic injection by manipulation of freeze-drying cycle. **International Journal of Pharmcology**, Deira, v. 532, n.1, p.444-449, 2017.

TAKAMOTO, R. T. de O., **Caracterização e aplicação de nanodispersão de bixina.** 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, São Paulo, 2015.

TAY-AGBOZO, S. **Characterization of the carotenoid cis-bixin.** 2018. 152 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - University of Alabama Libraries, Programa de Pós-Graduação em Química, Tuscaloosa, Alabama, 2018.

TAY-AGBOZO, S.; STREET, S.; KISPERT, L. D. The carotenoid bixin: Optical studies of aggregation in polar/water solvents. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 362, p. 31-39, 2018.

TERRONI, H. C. *et al.* Liofilização. **Revista Cientifica UNILAGO**, São José do Rio Preto, v. 1, n. 1, p. 271-284, 2013.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e Determinação, por CLAE, de Bixina e Norbixina em Colorífícos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.3, p.310-313, 2001.

VALÉRIO, M. A. **Resíduo da Semente do Urucum (*Bixa orellana* L.): Avaliação Nutricional e Aproveitamento para Uso na Alimentação Humana**. 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado em Saúde) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, Campo Grande, 2012.

WALESKA, C. D. *et al.* Aterosclerose Experimental em Coelhos. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 2, p. 272-278, 2010.

WEISSMUELLER, N. T.; SCHIFFTER, H. A.; POLLARD, A. J. Intradermal powder immunization with protein-containing vacines, **Expert review of vaccines**, London, v. 12, n. 6, p. 687-702, 2013.

WICZKOWSKI, W. *et al.* The impact of the matrix of red beet products and interindividual variability on betacyanins bioavailability in humans. **Food Research International**, Ottawa, v. 108, p.530–538, 2018.

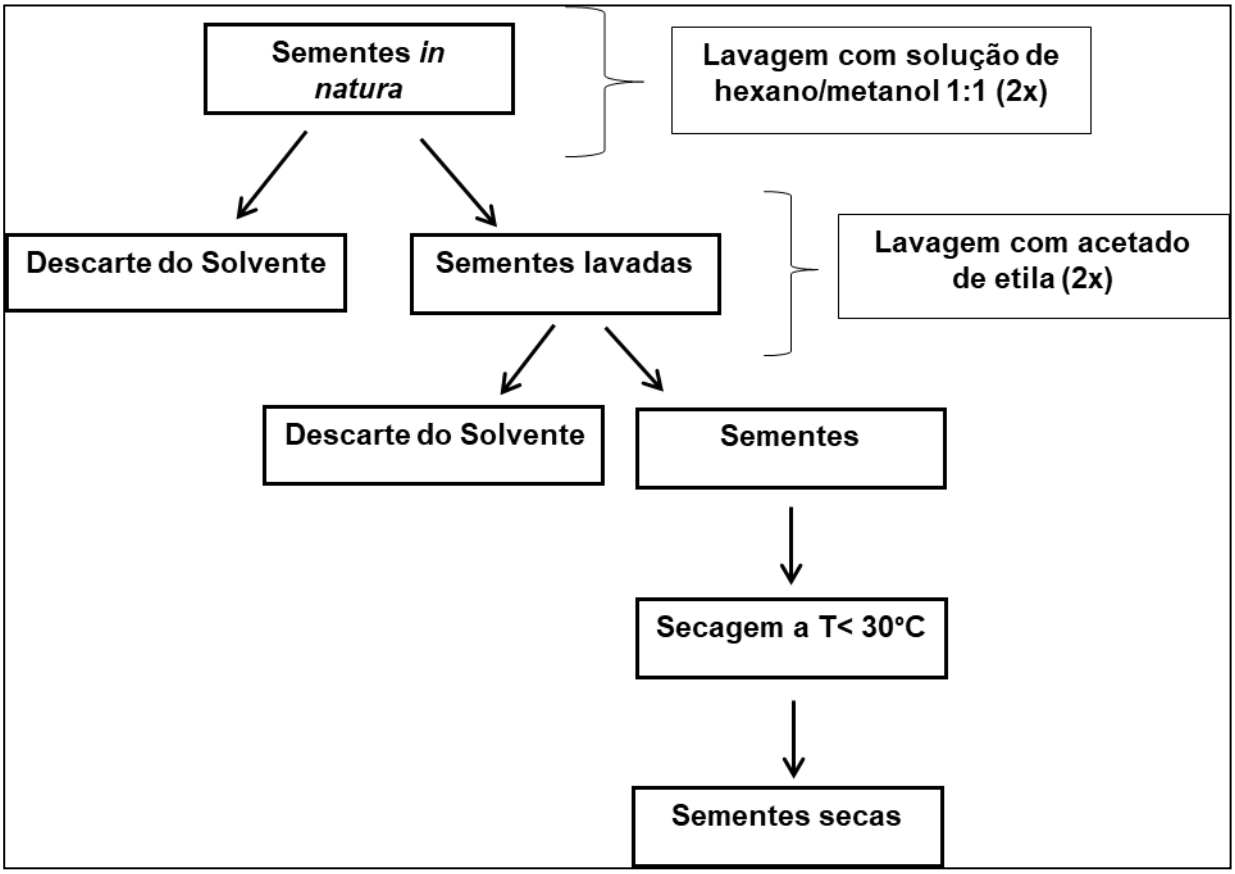
WROLSTAD, R. E.; CULVER, C, A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 3, p.59-77, 2012.

ZARDO, I. **Extração e microencapsulação de compostos Antociânicos do Bagaço de Mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.)**. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Porto Alegre, 2014.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions, **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 33, p. 1- 9, 2013.

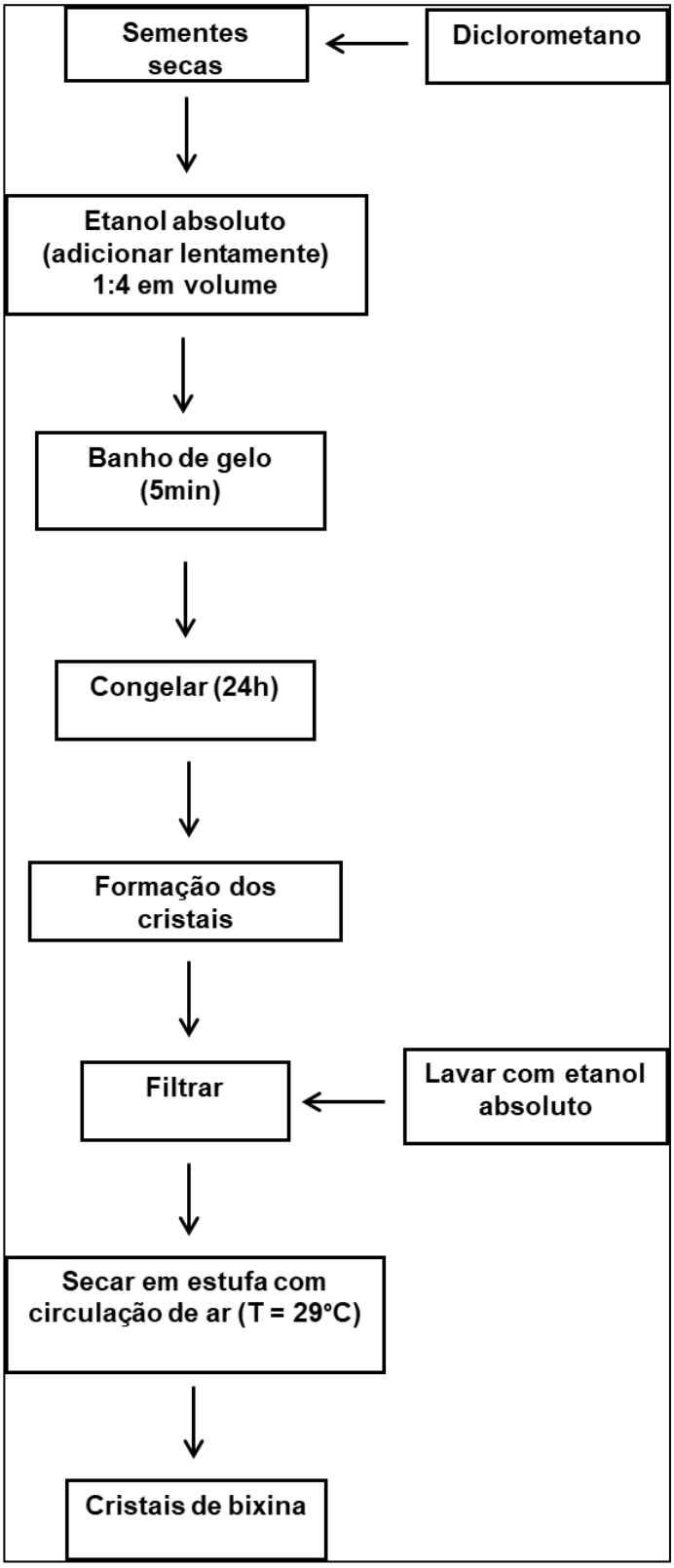
ZUIDAM N.J.; SHIMONI E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. *In:* ZUIDAM, N.; NEDOVIC, V. (eds). **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York, NY: Springer, 2009. p. 03-29.

ANEXO A - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE RETIRADA DOS INTERFERENTES



Fonte: Adaptado de Rios e Mercadante (2004).

ANEXO B - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CRISTALIZAÇÃO DA BIXINA



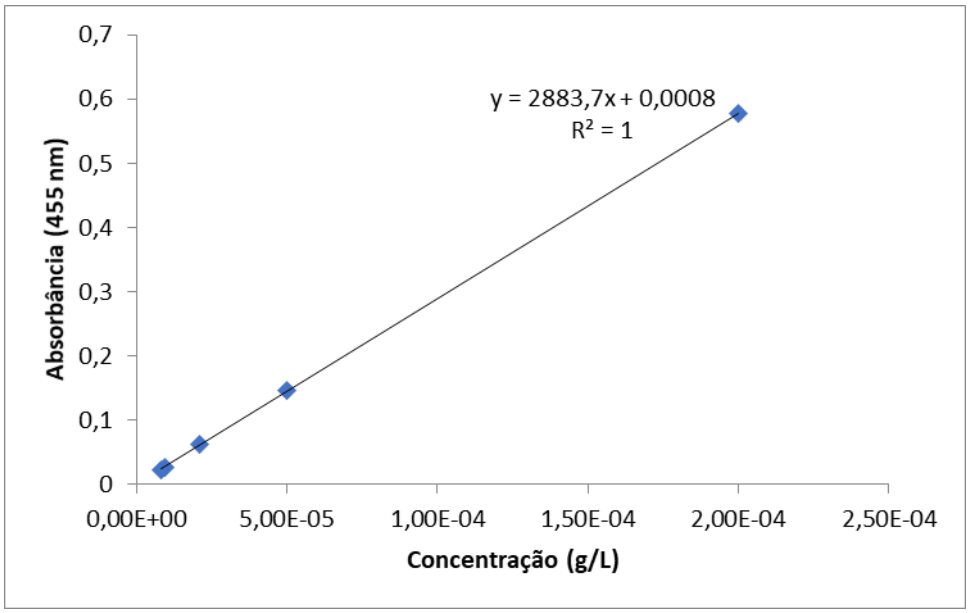
Fonte: Rios e Mercadante (2004).

ANEXO C - MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL 2^2 COM CINCO CENTRAIS (NÍVEL 0)

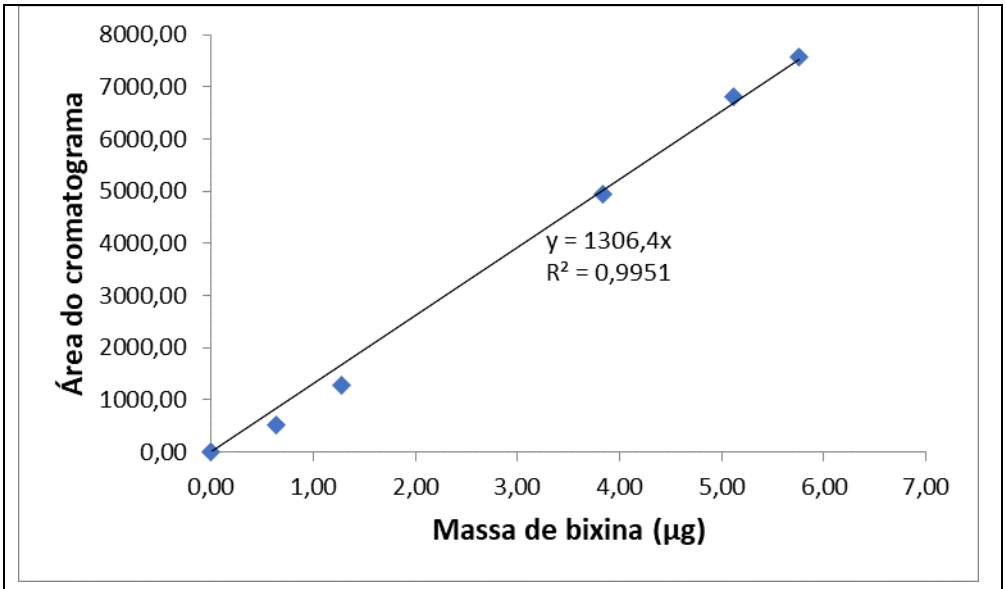
Ensaio	Concentração de maltodextrina (%)	Proporção bixina/maltodextrina (Mb/Me)
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0

Mb - massa de bixina; Me - massa encapsulante (maltodextrina)

ANEXO D- CURVA-PADRÃO DE ABSORBÂNCIA × CONCENTRAÇÃO DE BIXINA EM HEXANO OBTIDA POR ESPECTROFOTOMETRIA A 455 NM



ANEXO E- GRÁFICO DO PADRÃO DE BIXINA QUANTIFICADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA



Massa de bixina (□g)	Área	T_R (min)
0,00	0,00	0,00
0,64	525,60	5,63
1,28	1281,30	5,63
3,84	4952,60	5,67
5,12	6821,40	5,67
5,76	7570,80	5,69

ANEXO F - TABELA DOS RESULTADOS DA AMOSTRA DE BIXINA OBTIDA POR EXTRAÇÃO E QUANTIFICADA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

T_R (min)	Área	V (µL)	C (g/L)
6,05	3527,4	20	0,1350
5,67	4224,3	30	0,1078
5,79	6514,8	40	0,1247
5,68	7018,6	50	0,1074
		Média ± dp	**0,12 ± 0,01 g/L**