



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

Produção e avaliação da estabilidade de nanocápsulas de bixina em sistemas modelo de  
fotossensitização e aquecimento

KLEIDSON BRITO DE SOUSA LOBATO

PORTO ALEGRE, 2013

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

Produção e avaliação da estabilidade de nanocápsulas de bixina em sistemas modelo de fotossensitização e aquecimento

KLEIDSON BRITO DE SOUSA LOBATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

PORTO ALEGRE, 2013

## CIP - Catalogação na Publicação

Lobato, Kleidson Brito de Sousa  
Produção e avaliação da estabilidade de  
nanocápsulas de bixina em sistemas modelo de  
fotossensitização e aquecimento / Kleidson Brito de  
Sousa Lobato. -- 2013.

94 f.

Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Nanocápsulas. 2. Estabilidade. 3.  
Sensitizador. 4. Aquecimento. I. Rios, Alessandro de  
Oliveira, orient. II. Título.

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

Autor: Kleidson Brito de Sousa Lobato (Eng. de Alimentos/ UFPA).

Título da dissertação: Produção e avaliação da estabilidade de nanocápsulas de bixina em sistemas modelo de fotossensitização e aquecimento

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Dissertação aprovada por:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios  
Orientador- PPGCTA/ UFRGS

Prof. Dra. Leila Queiroz Zepka (- DTA/ UFSM)  
Membro da comissão julgadora

Prof. Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres (PPGCF/ UFRGS)  
Membro da comissão julgadora

Prof. Dr. Adriano Brandelli (PPGCTA/UFRGS)  
Membro da comissão julgadora

Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub  
Coordenador do PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi  
Diretor do ICTA/ UFRGS

Porto Alegre, 25 de Fevereiro de 2013.

Aos meus pais, Marlene e Messias

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

À minha família Marlene, Messias, Matheus, Kleiton e Priscila.

À minha segunda família, Profs. Elisa e Roberto Neves por seus conselhos e toda ajuda oferecidos.

À Daniela Neves por sua compreensão, carinho, motivação, troca de idéias e por estar presente sempre me ajudando.

Ao Prof. Alessandro de Oliveira Rios pela orientação.

À Profa. Silvia Staniçuaski Guterres pela parceria, pela orientação e todo auxílio laboratorial oferecido no laboratório 405 do PPGCF- UFRGS.

À Karina Paese e Joana Forgearini pela orientação, pela ajuda concedida nas análises laboratoriais e por todas as suas contribuições.

Ao Prof. André Jablonski pela amizade e por todo suporte técnico e laboratorial oferecido no Laboratório de Geoquímica Ambiental- LAGEAMB.

Aos amigos Karla Moresco, Gicele de Bona, Giulio Palmitessa por todos os momentos juntos.

À Mariana Dullius e Priscilla Reque pela ajuda no Laboratório LAGEAMB.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos utilizada durante os 24 meses de mestrado.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos colegas Eduardo Steckert, Yuri Buratto, Carin Gerhardt, Alexandre Furlan, Djonathan Boaro, Adilson Pimentel, Elisandro Santos.

À todos os colegas do Laboratório 405 do PPGCF- UFRGS pela ajuda.

À todos os colegas que direta ou indiretamente torceram ou contribuíram para que este trabalho se realizasse.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	3
1.2 OBJETIVO GERAL.....	6
<b>1.2.1 Objetivos específicos</b> .....	6
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	7
<b>2. REVISÃO</b> .....	8
2.1 CORANTES NATURAIS.....	8
2.2 CAROTENOIDES.....	10
<b>2.2.1 Características gerais</b> .....	10
<b>2.2.2 Estrutura</b> .....	11
<b>2.2.3 Funções dos carotenoides</b> .....	13
2.2.3.1 Atividade pró-vitamina A.....	13
2.2.3.2 Atividade antioxidante.....	13
2.2.3.3 Estabilidade dos carotenoides.....	16
2.3 URUCUM.....	18
<b>2.3.1 Generalidades</b> .....	18
<b>2.3.2 Bixina</b> .....	21
2.3.2.1 Atividade antioxidante e desativação de oxigênio singlete.....	23
2.3.2.2 Estabilidade de bixina em alta temperatura, na presença de oxigênio e luz.....	24
2.4 ENCAPSULAMENTO.....	27
<b>2.4.1 Encapsulamento de carotenoides</b> .....	32



<b>CAPÍTULO 2: ARTIGOS</b> .....	35
<b>CHARACTERIZATION AND STABILITY EVALUATION OF BIXIN-LOADED LIPID-CORE NANOCAPSULES</b> .....	36
1. Introduction .....	38
2. Materials and Methods .....	40
2.1. <i>Materials</i> .....	40
2.2. <i>Preparation of the standard of bixin</i> .....	40
2.3. <i>Development of the bixin-loaded lipid core nanocapsules</i> .....	42
2.4. <i>Determination of mean diameter and zeta potential</i> .....	43
2.5. <i>High performance liquid chromatography (HPLC)</i> .....	43
2.6. <i>Determination of the bixin content and encapsulation efficiency</i> .....	44
2.7. <i>Viscosity</i> .....	45
2.8. <i>pH</i> .....	45
2.9. <i>Colorimetric analysis</i> .....	45
2.10. <i>Statistical analysis</i> .....	46
3. Results and discussion .....	46
3.1 <i>Development of the bixin-loaded lipid core nanocapsules</i> .....	46
3.2 <i>Characterization and stability evaluation of the BIX-LNC</i> .....	49
4. Conclusions .....	56
Acknowledgements .....	57
References .....	57
<b>EVALUATION OF THE STABILITY OF BIXIN-LOADED LIPID-CORE NANOCAPSULES USING MODEL SYSTEMS OF PHOTSENSITIZATION AND HEATING</b> .....	60
1. Introduction .....	62
2. Materials and Methods .....	63
2.1 <i>Materials</i> .....	63
2.2. <i>Preparation of the standard of bixin</i> .....	64
2.3 <i>Preparation of the bixin nanocapsules</i> .....	65
2.4 <i>Characterization of the bixin nanocapsules</i> .....	65
2.5 <i>Photosensitization and heating of the bixin nanocapsules in model system</i> .....	66

2.7 High performance liquid chromatography (HPLC) analysis .....	68
3. Results and Discussions .....	69
3.1 Characterization of the bixin nanocapsules .....	69
3.2 Photosensitization of BIX-LNC in the model system .....	70
3.3 Heating of BIX-LNC in the model system .....	73
4. Conclusions .....	76
Acknowledgements .....	77
References .....	77
<b>CAPÍTULO 3: DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>85</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: Estrutura básica dos carotenoides .....	11
Figura 2: Exemplos de estruturas carotenos e xantofilas .....	12
Figura 3: Síntese de bixina .....	22
Figura 4: Estrutura da <i>cis</i> -bixina. ....	22

### CAPÍTULO 2: ARTIGOS

#### CHARACTERIZATION AND STABILITY EVALUATION OF BIXIN-LOADED LIPID-CORE NANOCAPSULES.

Figure 1: Structure of <i>cis</i> -bixin (methyl hydrogen 9'- <i>cis</i> -6,6'-diapocarotene-6,6'-dioate)...	38
Figure 2: Chromatogram of bixin standard obtained by HPLC .....	41
Figure 3: Size distribution of the BIX-LNC formulations 4 by volume (a) and number (c), and BIX-LNC formulation 5 by volume (b) and number (d) with their respective accumulated distribution, analyzed by laser diffraction, respectively.....	48
Figure 4: Mean diameter of BIX-LNC evaluated by laser diffraction (a) and dynamic light scattering (b) during 119 days of storage and and their respective size distribution at the intervals at 0 (□), 28 (○), 63 (Δ), 91 (∇) and 119 (◇) days of storage (b and d) .....	50
Figure 5: Variation of bixin content in BIX-LNC during 119 days of storage. ....	53
Figure 6: Viscosity analysis of BIX-LNC (a) and pH variation of BX-LNC during 119 days of storage (b).....	55

#### EVALUATION OF THE STABILITY OF BIXIN-LOADED LIPID-CORE NANOCAPSULES USING MODEL SYSTEMS OF PHOTSENSITIZATION AND HEATING

Figure 1: Diameters (a) and polydispersity index (b) of BIX-LNC in a model system of ethanol: water (2:8) throughout 300 minutes at 25 °C. ....	70
Figure 2: Bixin concentration during photosensitization of free bixin (a) or BIX-LNC (b) in a N <sub>2</sub> - saturated solution, and free bixin (c) or BIX-LNC (d) in an air-saturated solution at 5°C (□), 15°C (○) and 25°C (Δ).....	71

Figure 3: Residual contents of bixin during heating of free bixin (a) or BIX-LNC (b) during heating at 65 °C (□), 80 °C (○) and 95 °C (Δ).....74

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1: Composição de carotenoides e equivalentes de atividade de vitamina A em frutas, legumes e verduras. ....	11
Tabela 2: Constantes de reação de desativação ( $k_q$ ) de oxigênio singlete de alguns carotenoides em sistema-modelo utilizando benzeno. ....	16
Tabela 3: Métodos de extração de corantes de urucum. ....	20
Tabela 4: Limites de utilização de urucum, extrato de bixina ou norbixina estabelecidos. .	20
Tabela 5: Principais produtos presentes nos extratos de bixina e norbixina produzidos em diferentes condições. ....	25
Tabela 6: Técnicas de encapsulamento. ....	29

### CAPÍTULO 2: ARTIGOS

#### STABILITY EVALUATION OF BIXIN-LOADED LIPID-CORE NANOCAPSULES IN MODEL SYSTEMS OF PHOTSENSITIZATION AND HEATING

Table 1: Calculated rate constants ( $k$ ) and activation energy ( $E_a$ ) for the photosensitized isomerization of bixin in an ethanol: water (2:8) solution as either free bixin or in BIX-LNC. ....	72
Table 2: Calculated rate constants ( $k$ ) and activation energy ( $E_a$ ) for bixin loss during heating in an ethanol: water (2:8) solution of free bixin or BIX-LNC. ....	75

## RESUMO

A bixina é o principal pigmento presente nas sementes de urucum, é formada de 25 carbonos (9 duplas ligações), absorve luz na região do UV-visível, apresenta capacidade de desativação de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio. Entretanto, apresenta baixa solubilidade em água, e assim como outros carotenoides, a bixina é instável na presença de oxigênio singlete e altas temperaturas. De modo a aumentar a estabilidade e solubilidade de alguns compostos, são empregadas técnicas, tais como o encapsulamento, que consiste no recobrimento do composto por um agente encapsulante, produzindo partículas. A maioria dos estudos de encapsulamento de carotenoides se dedica a produção de micropartículas e nanopartículas de  $\beta$ -caroteno e até o momento nenhum estudo se dedicou a produção de nanocápsulas de bixina. As nanocápsulas (BIX-LNC) foram produzidas pela técnica de deposição interfacial do polímero poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL). A formulação de nanocápsulas foi caracterizada em termos dos parâmetros de diâmetro médio, potencial zeta, concentração de bixina, eficiência de encapsulamento, viscosidade, pH e cor. Foi avaliada a estabilidade das nanocápsulas durante armazenamento em temperatura ambiente e durante experimentos de fotossensitização a 5, 15 e 25 °C, utilizando rosa de bengala como sensibilizador em condições de saturação com ar e nitrogênio (N<sub>2</sub>) durante 300 minutos, além de avaliação durante aquecimento a 65, 80 e 95 °C na ausência de luz durante 120 minutos. Ambos os experimentos de sensibilização e aquecimento foram realizados em sistema-modelo de Etanol:água (2:8). O tamanho das BIX-LNC estava distribuído em um perfil monomodal, com diâmetro médio (*z-average*) de  $199 \pm 1,8$  nm, índice de polidispersão de  $0,12 \pm 0,01$ , diâmetro (D<sub>4,3</sub>) de  $195 \pm 26$  nm e span de  $1,4 \pm 0,1$ . As BIX-LNC foram obtidas com aproximadamente 100 % de eficiência de encapsulamento e teor de  $16,92 \pm 0,16$  µg/ml. A suspensão BIX-LNC foi classificada como um fluido newtoniano, com viscosidade de  $11,4 \pm 0,24$  mPas e apresentou pH de  $5,89 \pm 0,70$  e potencial zeta de  $-14,45 \pm 0,92$  mV. Durante o armazenamento, as BIX-LNC foram consideradas estáveis por não apresentarem alterações significativas no diâmetro médio e no potencial zeta ( $p < 0,05$ ). Após 119 dias de armazenamento, o teor residual de bixina foi de  $45,7 \pm 1,1\%$  em relação ao inicial. A degradação bixina livre e nas BIX-LNC obedeceu durante a fotossensitização e aquecimento a uma cinética de degradação de primeira ordem com um coeficiente médio de correlação R<sup>2</sup> acima de 0,99. Durante a fotossensitização, a bixina livre apresentou energia de ativação de 7,09 e 8,96 kcal/mol nas condições de saturação com ar e N<sub>2</sub>, respectivamente, e a bixina encapsulada (BIX-LNC) apresentou energia de ativação de 11,48 e 16,31 kcal/mol nas condições de saturação com ar e N<sub>2</sub>, respectivamente. Nos experimentos de aquecimento, a bixina livre e encapsulada (BIX-LNC) apresentaram energia de ativação de 15,06 e 23,81 kcal/mol, respectivamente. O encapsulamento demonstrou ser uma técnica adequada para aumentar a solubilidade aparente da bixina em meios aquosos, comprovado pela eficiência de encapsulamento. Além disso, os resultados dos experimentos demonstraram que o encapsulamento promoveu o aumento da estabilidade da bixina durante fotossensitização e aquecimento em sistema modelo de etanol:água (2:8).

Palavras-chave: nanocápsulas, estabilidade, sensibilizador, aquecimento.

## ABSTRACT

Bixin is the main pigment found in annatto seeds, is formed by 25 carbons (with 9 conjugated double bonds), absorbs light in the UV-visible range and deactivates singlet oxygen and reactive oxygen species. Although, bixin is poor-water soluble and like other carotenoids, is unstable in the presence of singlet oxygen and high temperatures. To provide stability, bioavailability and solubility, are applied some strategies, such as the encapsulation technique, which consists of coating a compound with an encapsulating agent to produce particles. Most studies of encapsulated carotenoids concerned the production of microparticles and nanoparticles of  $\beta$ -carotene, although, up to now, no studies have been published concerning the production of bixin nanocapsules and evaluation of their stability. In the present work, the bixin nanocapsules (BIX-LNC) were produced by the technique of interfacial deposition of the preformed polymer poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL). The BIX-LNC formulation was characterized for the parameters of mean diameter, zeta potential, bixin concentration, encapsulation efficiency, viscosity, pH and color. The stability of the BIX-LNC was evaluate during 119 days of storage at  $25 \pm 1$  ° C and during photosensitization at 5, 15 and 25 °C using rose bengal as the sensitizer in air- and N<sub>2</sub> saturated conditions during 300 minutes, and during heating at 65, 80 e 95 °C in the absence of light during 120 minutes. Both experiments were carried out using a model system of ethanol:water (2:8). The nanocapsules obtained in this study were distributed in a monomodal profile with a mean diameter (z-average) of  $199 \pm 1.8$  nm, a polydispersity index of  $0.12 \pm 0.01$ , a volume-weighted mean diameter (D<sub>4,3</sub>) of  $195 \pm 27$  nm and span value of  $1.4 \pm 0.1$ . The BIX-LNC were obtained with an encapsulation efficiency approximately of 100 % and concentration of  $16.92 \mu\text{g bixin/ mL}$ . The BIX-LNC suspension was classified as a Newtonian fluid with viscosity of  $11.4 \text{ mPas} \pm 0.24$ , a pH of  $5.89 \pm 0.70$  and a zeta potential of  $-14.45 \pm 0.92$  mV. No significant changes ( $p < 0.05$ ) were observed in the mean diameter and zeta potential during 119 days and in the end of the storage. In the end of the storage,  $45.7 \pm 1.1\%$  of the initial bixin content was found. The bixin loss in the BIX-LNC during photosensitization and heating followed a first-order kinetic decay with an average coefficient correlation R<sup>2</sup> greater than 0.99. During photosensitization the free bixin loss had an activation energy of 7.09 and 8.96kca/mol in air and N<sub>2</sub>-saturated conditions, respectively, and the encapsulated bixin (BIX-LNC) had an activation energy of 15.06 and 23.81 kcal/mol, respectively in the same conditions. Encapsulation showed to be a suitable technique to increase the apparent solubility of bixin in a aqueous media. Moreover, the experiments showed that encapsulation increased the stability of bixin in an aqueous medium during photosensitization and heating.

Keywords: nanocapsules, stability, sensitizer, heating.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a ANVISA (resolução CNNPA n° 44 de 1977), corante é a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida). Os corantes podem ser divididos em corantes naturais, corantes sintéticos, corantes inorgânicos e caramelos.

Os corantes, independente da origem natural ou sintética, são utilizados com diversas finalidades, tais como dar cor, intensificar ou recuperar a cor de um alimento que descoloriu parcialmente ou completamente durante o processamento (DIAS *et al.*, 2011).

As principais diferenças entre corantes naturais e sintéticos são estabilidade e custo, sendo os corantes sintéticos geralmente mais estáveis e de menor custo (PINTEA, 2008). Entretanto, vários estudos toxicológicos apontam estes como possíveis causadores de danos à saúde, principalmente em exposição prolongada (DIAS *et al.*, 2011).

Os corantes naturais apresentam vantagem de serem renováveis e por seu consumo relacionar-se a promoção de uma vida saudável. Assim como outros pigmentos naturais, os carotenoides são conhecidos pela sua atividade antioxidante e por desempenharem várias funções, atuando como protetores celulares, reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares e prevenindo o surgimento de diversos tipos de câncer (STRINGHETA; VOLP; OLIVEIRA, 2010).

A bixina é o principal pigmento das sementes de urucum e corresponde a 80% dos carotenoides presentes (LOTSCHERT; BEESE, 1994). A extração da bixina pode ser feita de diversas formas e cada uma delas origina um extrato com aplicações diferentes (PRESTON; RICKARD, 1980). A bixina apresenta capacidade seqüestrar radicais livres e de desativação de oxigênio singlete e está presente no corante de urucum, um dos corantes



naturais mais aplicados em produtos alimentícios, tais como queijos, *snacks*, manteigas, sorvetes, massas, etc, (DIAS *et al.*, 2011; RIOS; MERCADANTE; BORSARELLI, 2007). Apesar disso, a bixina, assim como vários outros compostos antioxidantes, apresenta baixa estabilidade na presença de luz, oxigênio e alta temperatura (MONTENEGRO *et al.*, 2004),

Para evitar a perda de compostos bioativos em formulações, são usadas técnicas que aumentam a estabilidade. Dentre elas cita-se o nanoencapsulamento: uma aplicação da nanotecnologia na área de alimentos e farmacêutica. Tal técnica consiste basicamente em revestir o composto com uma matriz polimérica. Vários estudos mostram o aumento da estabilidade de carotenoides nanoencapsulados (TAN; NAKAJIMA, 2005; YUAN *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011).

Barbosa, Borsarelli; Mercadante (2005) produziram microcápsulas de bixina e verificaram menor taxa de degradação para bixina encapsulada comparada a bixina livre. A degradação de bixina nas microcápsulas foi atribuída a eficiência de encapsulamento, visto que baixa eficiência de encapsulamento indica maior proporção de bixina livre ou desprotegida.

Os principais produtos de degradação formados durante o aquecimento de *cis*-bixina em etanol foram di-*cis*-bixina, *trans*-bixina e 4,8-dimetil-tetradecahexaene-dioico. Neste estudo, também foi verificada a formação outros compostos de degradação (tolueno e xileno). Entretanto, esses compostos somente foram verificados quando a bixina foi aquecida em óleo vegetal a 75 e 140 °C durante 2 horas.

Os dados encontrados na literatura mostram que embora ocorra degradação do carotenóide, o encapsulamento é eficaz para diminuir a velocidade de degradação durante o armazenamento. Durante 12 semanas a 4 °C, o teor residual de  $\beta$ -caroteno em nanodispersões variou de 25,2 a 56 % em relação ao teor inicial (TAN; NAKAJIMA,

2005). Yuan et al. (2008) avaliaram a estabilidade de  $\beta$ -caroteno nanoemulsões e descobriram que após 4 semanas de armazenamento ( 4 e 25 ° C), a concentração de  $\beta$ -caroteno residual variou de 75 a 86%. Yin et al. (2009) estudaram os efeitos de emulsificantes na estabilidade do  $\beta$ -caroteno em nanodispersões e constataram que após 8 semanas a 4 ° C, o teor residual de  $\beta$ -caroteno variou de 45,6 a 63,3%.

Qian et al. (2012) verificaram que a adição de antioxidantes (EDTA, ácido ascórbico, vitamina E e coenzima Q10) promoveu a diminuição da velocidade de degradação de  $\beta$ -caroteno em nanoemulsões durante armazenamento a 50 ° C. Os autores verificaram também que a adição dos antioxidantes não influenciou o tamanho das partículas.

Nanopartículas poliméricas são sistemas de transporte que apresentam diâmetros inferiores a 1  $\mu$ m. Dependendo da composição, as nanopartículas podem ser chamadas de nanocápsulas ou nanoesferas. A presença de óleo nas nanocápsulas conduz a uma estrutura vesicular, enquanto a sua ausência em nanoesferas proporcionar uma organização matricial das cadeias poliméricas. As nanocápsulas podem ser preparadas utilizando polímeros pré-formados por deposição interfacial do polímero (contendo o óleo) (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

## 1.2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanocapsulas de núcleo lipídico contendo bixina e avaliar sua estabilidade durante o armazenamento em temperatura ambiente, durante fotossensitização (sensitizador rosa de bengala, oxigênio singlete) e durante aquecimento em sistema-modelo de etanol:água (2:8).

### 1.2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver nanocápsulas de bixina pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando Poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL);
- Caracterizar as suspensões de nanocápsulas de bixina através da determinação da eficiência de encapsulamento, pH, viscosidade, análise colorimétrica, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Avaliar a estabilidade das nanocápsulas pela determinação do diâmetro médio, pH, concentração de bixina durante armazenamento em temperatura ambiente;
- Avaliar a estabilidade da bixina livre e encapsulada em sistema-modelo de etanol: água (2:8) durante fotossensitização do sensitizador rosa de bengala e de oxigênio singlete;
- Avaliar a estabilidade de bixina livre e encapsulada em sistema-modelo de etanol: água (2:8) durante aquecimento;
- Determinar as constantes cinéticas e energia de ativação no processo de degradação de bixina durante fotossensitização e aquecimento.

## **CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA**

## 2. REVISÃO

### 2.1 CORANTES NATURAIS

A cor de um alimento pode ser considerada um dos atributos de qualidade mais importantes. Isto se deve a habilidade que o ser humano tem em perceber e a necessidade de avaliar essa característica no momento da escolha do produto. Kildegaard *et al.* (2011), por exemplo, verificaram que a cor de iogurtes e sucos tem influência sobre a escolha de consumidores infantis.

Segundo Mortensen (2006), as primeiras impressões acerca de um alimento são feitas a partir da avaliação de sua cor. Baseado nisso, um julgamento prévio é realizado considerando se o alimento é seguro e, inclusive, se o sabor esperado será agradável ou não. Isto ocorre, pois, segundo Schwartz, Von Elbe e Giusti (2010), cores específicas de frutos estão associadas ao grau de maturação, tais como no caso de uma maçã, onde a cor vermelha intensa relaciona-se a um fruto maduro de sabor mais adocicado e textura crocante.

A cor é uma consequência direta da composição em corantes de sua matriz e pode estar relacionada à concentração de compostos antioxidantes de alguns frutos e vegetais (ARTE'S; MÍNGUEZ; HORNERO, 2000; MELENDEZ *et al.*, 2011), além disso, pode influenciar a percepção de outros atributos sensoriais (FRANCIS, 1995; ZAMPINI *et al.*, 2008; SHANKAR; LEVITAN; SPENCE, 2010; WEI *et al.*, 2011).

Os corantes alimentícios são aditivos aplicados com o objetivo de intensificar, compensar perda ou dar cor ao produto, mantendo um visual agradável e atrativo, semelhante ao produto natural (DIAS *et al.*, 2011). Os corantes podem ser divididos em corantes naturais, sintéticos, inorgânicos e caramelos.

Embora existam vários estudos demonstrando os efeitos que os corantes sintéticos têm sobre a saúde humana (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; MCCANN *et al.*, 2007), sendo o público infantil o mais afetado (POLÔNIO; PERES, 2009), estes ainda são muito utilizados em formulações alimentícias. Isto se deve principalmente ao baixo custo e a alta estabilidade (PINTEA, 2008).

A utilização de corantes naturais ao longo dos anos tem sido uma tendência apesar da grande comercialização de corantes sintéticos. As indústrias de alimentos têm usado os corantes naturais visto que seu uso está associado a um aspecto mais saudável conferido aos produtos. Além disso, alguns corantes naturais apresentam indicação de efeitos benéficos a saúde em virtude de suas propriedades de proteção de componentes celulares contra danos oxidativos, redução do risco de doenças cardiovasculares e câncer (STRINGHETA; VOLP; OLIVEIRA, 2010).

Os corantes naturais são vastamente distribuídos na natureza, presentes tanto em organismos procarióticos como cianobactérias, assim como em organismos dos reinos fungi, animal e vegetal (MORTENSEN, 2006). Os corantes naturais podem ser obtidos de várias fontes e podem ser divididos em poucas classes, sendo os três principais grupos: os tetrapirróis, os tetraterpenóides e os flavonóides. O membro mais importante dos tetrapirróis é a clorofila, encontrada em todas as plantas aéreas. Os carotenoides são tetraterpenóides encontrados na natureza de forma tão ampla quanto a clorofila. As antocianinas constituem o grupo dos flavonóides e conferem a alguns vegetais colorações variando do azul ao vermelho (ABEROUMAND, 2011).

## 2.2 CAROTENOIDES

### 2.2.1 Características gerais

Os carotenoides constituem o maior grupo de pigmentos naturais distribuídos na natureza, são lipossolúveis, responsáveis pelas cores vermelha, laranja e amarela de alguns frutos, verduras, legumes, flores, pássaros, insetos, crustáceos e peixes (MÍNGUEZ-MOSQUERA; HORNERO-MÉNDEZ; PÉREZ-GÁLVEZ, 2008).

Embora presentes em alguns animais, os carotenoides não podem ser sintetizados pelos mesmos. A presença nestes é devido a alimentação (MORTENSEN, 2006). Nos vegetais, os carotenoides estão localizados nos plastídeos das células de plantas superiores e nas folhas fotossintéticas são encontrados nos cloroplastos. Nas flores, frutos e folhas senescentes são encontrados nos cromoplastos. Mais de 40 tipos de carotenoides foram exclusivamente encontrados em flores e mais de 70 tipos em frutos (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2003). A Tabela 1 apresenta a concentração de carotenoides em frutas, verduras e legumes.

Tabela 1: Composição de carotenoides e equivalentes de atividade de vitamina A em frutas, legumes e verduras.

Fonte	Carotenoide ( $\mu\text{g/g}$ )						RAE
	a	b	c	d	e	f	
Acerola ( <i>Malpighia glabra</i> )	1,1	12	1,1	-	1,3	0,6	109
Pitanga ( <i>Eugenia uniflora</i> )	-	1,4 (E)	7,6(E)	34(E)	3,1(E)	3,9(E)	43
Abóbora ( <i>Curcubita moschata</i> )	47(E)	235(E)	-	-	8,5(E)	0,6(Z)	2165
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	-	3,2(E)	-	35(E)	1,0(E)	-	27
Alface ( <i>Lactuca sativa</i> )	-	22	-	-	14	15	184
Espinafre ( <i>Tetragonia expansa</i> )	-	29(E)	-	-	45(E)	32(E)	242
Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	22	34	-	-	-	-	375

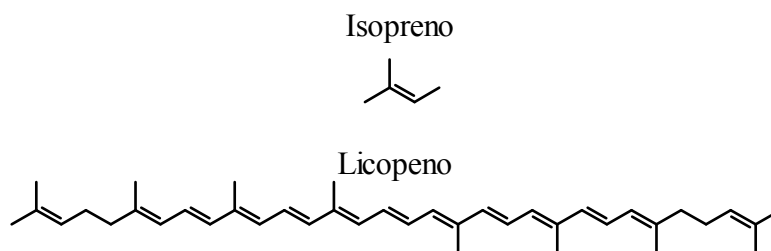
Adaptado de: RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008.

$\alpha$ -Caroteno (a);  $\beta$ -Caroteno (b);  $\beta$ -Criptoxantina (c); Licopeno (d); Luteína (e); Violaxantina (f); RAE= Equivalentes de Atividade de Retinol (12  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno ou 24  $\mu\text{g}$  de outras pró-vitaminas); E = *trans*; Z= *cis*.

### 2.2.2 Estrutura

A estrutura básica dos carotenoides é de tetraterpenóide formado de oito unidades de isopreno, cuja ordem isoprenoide é invertida no centro da molécula. Estas unidades são ligadas de forma cabeça-cauda, exceto no centro, onde a ligação cauda-cauda inverte a ordem (Figura 1). Isso produz a forma base da estrutura de 40 carbonos, do qual as outras moléculas são derivadas (ÖTLES; ÇAGINDI, 2008).

Figura 1: Estrutura básica dos carotenoides. Adaptado de: ÖTLES; ÇAGINDI, 2008.

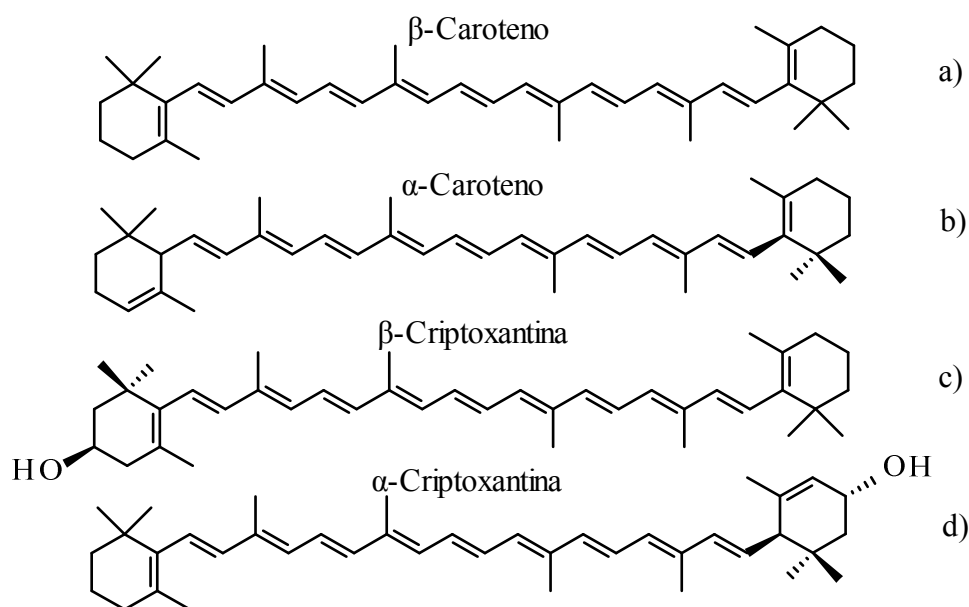




Os carotenoides são divididos em dois grupos principais: os carotenos, os quais são estritamente hidrocarbonetos (Figura 2- a e b) e as xantofilas, as quais possuem oxigênio em sua molécula (Figura 2- c e d) (COULTATE, 2002).

A estrutura básica dos carotenoides pode ser modificada através de reações de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, introdução de grupos contendo oxigênio, rearranjos, encurtamento de cadeias ou combinações dessas modificações, resultando numa imensa variedade de estruturas. Mais de 650 diferentes carotenoides naturais já foram isolados e caracterizados (YAHIA; ORNELAS-PAZ, 2010), e estima-se que a produção anual de carotenoides seja em torno de  $10^8$  toneladas (MÍNGUEZ-MOSQUERA; HORNERO-MÉNDEZ; PÉREZ-GÁLVEZ, 2008).

Figura 2: Exemplos de estruturas carotenos e xantofilas. Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008; CANENE-ADAMS; ERDMAN JR., 2009.



## 2.2.3 Funções dos carotenoides

### 2.2.3.1 Atividade pró-vitamina A

Nos seres humanos, uma das principais funções que os carotenoides desempenham é de serem convertidos em vitamina A, como no caso do  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina (DEMING *et al.*, 2002). A exigência mínima para um carotenoide possuir atividade pró-vitamínica A é ter um anel- $\beta$  não substituído, com uma cadeia poliênica de 11 carbonos. Basicamente, a estrutura da vitamina A (retinol) é a metade da molécula do  $\beta$ -caroteno, com uma molécula de água adicionada no final da cadeia poliênica. Consequentemente, o  $\beta$ -caroteno é o carotenoide de maior potência pró-vitamínica A e ao qual se atribui 100% de atividade. Por sua vez, o  $\alpha$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina tem cerca de 50% da atividade do  $\beta$ -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008-a).

### 2.2.3.2 Atividade antioxidante

Vários estudos têm sido realizados com objetivo de determinar não somente o teor de carotenóides presentes nos alimentos (ZEB; MEHMOOD, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008-a), mas também avaliar suas atividades antioxidantes *in vitro* (LI *et al.*, 2011; WATANABE; MUSUMI; AYUGASE, 2011) e efeitos *in vivo*. Mayne *et al.* (1994), por exemplo, verificaram que o consumo de folhosos crus de cor verde e amarelada proporcionou maior redução no risco de câncer de pulmão de mulheres não-fumantes.

Osganian *et al.* (2003), após avaliação da dieta, histórico médico e estilo de vida de mais de 70.000 pessoas do sexo feminino constataram que o consumo de alimentos ricos em carotenoides estava associado a redução do risco de doença coronariana. O  $\beta$ -caroteno foi o principal carotenoide presente nos alimentos consumidos pelos participantes do estudo. O mecanismo de ação antioxidante dos carotenoides frente a radicais livres se dá pela transferência do elétron desemparelhado para o carotenoide. Existem pelo menos 4 tipos de reação de transferência (Equações 1, 2, 3 e 4) (EDGE; TRUSCOTT, 2010).



Onde:

$R^{\bullet}$ : Radical livre;

$R^{+}$  e  $R^{-}$ : Formas catiônica e aniônica do radical;

CAR: Carotenoide;

$CAR^{\bullet+}$  e  $CAR^{\bullet-}$ : Formas catiônica e aniônica de carotenoides;

$CAR(-H)^{\bullet}$ : Radical formado pela transferência de H ao  $R^{\bullet}$ ;

$(RH-CAR)^{\bullet}$ : Radical aduto.

Os carotenoides têm capacidade de estabilizar moléculas eletronicamente excitadas, tais como oxigênio singlete e sensibilizadores. A estabilização pode ocorrer de duas maneiras: química e fisicamente. Na estabilização química, há a união entre o carotenoide e

a molécula excitada. Na estabilização física, a molécula excitada transfere sua energia para o carotenoide, tornando-se em seguida com menor energia. Em seguida, o carotenoide libera energia em forma de calor para o ambiente, retorna ao seu estado fundamental e pode realizar novos ciclos de estabilização. Entretanto, pode ocorrer a degradação o carotenóide, impedindo a realização de novos ciclos de estabilização (YAHIA; ORNELAS-PAZ, 2010).

O oxigênio é triplete quando seus dois elétrons do orbital antiligante 2p têm a mesma direção de spin. Quando têm direções opostas, o oxigênio é chamado de singlete . Uma vez que os elétrons do oxigênio singlete ajustam-se à direção de spin do elétron na ligação dupla, podem reagir com ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos com uma velocidade 1500 vezes maior que o oxigênio triplete (MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

Uma das formas de geração de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) inicia com a recepção de energia na forma de fótons por um sensibilizador (S), se tornando mais excitado no estado triplete ( $^3\text{S}^*$ ). Várias moléculas encontradas nos alimentos podem atuar como sensibilizadores (clorofilas, rib oflavinas, porfirinas). O sensibilizador no seu estado excitado ( $^3\text{S}^*$ ) pode transferir energia para uma molécula de oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ), originando o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). O carotenoide (CAR) pode atuar de duas maneiras, para evitar as reações posteriores provocadas pela presença de oxigênio singlete. A primeira delas é estabilizando o sensibilizador no seu estado triplete, recebendo energia e se tornando mais excitado. A segunda é estabilizando o oxigênio singlete (MONTENEGRO *et al.*, 2004).

Estudos em sistema-modelo têm sido muito utilizados para demonstrar a capacidade de desativação de oxigênio singlete que os carotenoides têm. Dentre outras características, sabe-se que há uma tendência a maior capacidade de desativação pelos carotenóides com maior número de duplas ligações conjugadas (Tabela 2) (EDGE; TRUSCOTT, 2010).

Tabela 2: Constantes de reação de desativação ( $k_q$ ) de oxigênio singlete de alguns carotenoides em sistema-modelo utilizando benzeno.

Carotenoide	Duplas ligações conjugadas	$K_q$ ( $\times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
Dodecano- $\beta$ -caroteno	19	23,0
Decapreno- $\beta$ -caroteno	15	20,0
Tetradehidrolícopeno	15	10,7
Rodoxantina	12(+2,C=O)	12,0
Astaxantina	12(+2,C=O)	14,0
Cantaxantina	12(+2,C=O)	12,0
Lícopeno	11	17,0
all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	11	13,0
15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	11	11,0
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	11	11,0
Zeaxantina	11	12,0
$\alpha$ -caroteno	10	12,0
$\beta$ -apo-8'-carotenal	10	5,27
Luteína	10	6,64

Adaptado de: EDGE; TRUSCOTT, 2010.

### 2.2.3.3 Estabilidade dos carotenoides

Os carotenoides são susceptíveis a degradação em alta temperatura e na presença de agentes oxidantes. No caso do  $\beta$ -caroteno, a utilização de altas temperaturas no tratamento térmico de alimentos pode induzir a isomerização *cis-trans*. Para diminuição da isomerização excessiva, é preciso minimizar o tratamento térmico, quando possível. Em certas condições, além da diminuição do teor de carotenoides por isomerização pode ocorrer perda por degradação térmica (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os alimentos são matrizes complexas que podem conter componentes que interferem na elucidção das reações envolvidas com a degradação de carotenoides. Para evitar a interferência destes compostos, que podem ser, por exemplo, oxidantes ou antioxidantes, são realizados estudos de estabilidade de carotenoides em sistemas modelo.

Aman, Schieber e Carle (2005) verificaram que o teor residual de  $\beta$ -caroteno e luteína em folhas de espinafre foram de 84,7% e 83,8%, respectivamente após 60 minutos de aquecimento em tolueno a 98 °C. A conversão espontânea de carotenoides na forma *all-trans*- submetidos a tratamentos em temperatura ambiente pode ser considerada um processo lento. A taxa de conversão depende das condições ambientais, tais como tipo de solvente e estrutura do carotenoide. Por exemplo, soluções de  $\beta$ -caroteno em uma mistura de tetrahidrofurano (THF), metanol e acetonitrila contendo 95% de *all-trans* e 5% de ácido 9-*cis*- apresentou no final de 24 horas a 25 °C 90% de *all-trans*- $\beta$ -caroteno e 9% de 9-*cis*-. Ao mudar o sistema modelo para clorofórmio, o teor de 9-*cis* aumentou para 13,6 % (PESEK, WARTHESEN; TAOUKIS, 1990).

Henry, Catignani e Schwartz (1998) estudaram a estabilidade térmica e oxidativa de *all-trans*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno, licopeno e luteína em sistema modelo de óleo de cártamos. Os autores verificaram que os carotenóides estudados apresentaram degradação seguindo a uma cinética de primeira ordem quando aquecidos a 75 °C, 85 °C e 95 °C. Os valores das constantes de velocidade reação ( $k$ ) para licopeno foram cerca de duas vezes maiores que os dos outros carotenoides. O valor de energia de ativação para licopeno foi menor que para os outros carotenoides, indicando maior susceptibilidade à degradação.

Scotter, Castle e Appleton (2001) avaliaram a estabilidade de bixina em sistema modelo de metanol, etanol e n-propanol nas temperaturas de 65 °C, 78 °C e 97 °C por até 24 horas. Durante aquecimento a 78 °C foi verificada a produção de di-*cis*-bixina, *trans*-bixina e o composto de degradação C17 (monometil éster do ácido 4, 8, dimetil tetradecahexaenedióico) com constantes de velocidade de reação ( $k$ ) de  $3,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $1,2 \times 10^{-7}$ ,  $1,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. O isômero di-*cis*-bixina foi produzido rapidamente, com tempo de meia vida de 30 minutos.

Rios, Mercadante e Borsarelli (2005) estudaram a cinética de degradação de bixina juntamente com os produtos formados em sistema modelo de água:etanol (8:2) em temperaturas de 70 °C a 125 °C. Em todas as condições a perda de bixina seguiu uma cinética de primeira ordem. Os autores verificaram que o isômero *all-trans*-bixina foi produzido somente a 125 °C. Montenegro *et al.* (2004), também verificaram que o isômero *all-trans*-bixina é o principal produto formado durante a degradação de *cis*-bixina em sistema modelo de fotossentização em acetonitrila:metanol (1:1) a 5, 15 e 20 °C em condições de saturação de nitrogênio (99,9%) e ar.

## 2.3 URUCUM

### 2.3.1 Generalidades

O urucuzeiro ou urucueiro (*Bixa orellana* L.) é um arbusto originário da América Tropical que pode alcançar até 5 m de altura, possui folhas glabras de 8 a 11 cm de comprimento, suas flores são levemente rosadas e estão dispostas em panículas terminais viscosas. Os frutos, os quais se encontram em cachos com até 17 unidades, são do tipo cápsula deiscentes, ovóides com dois ou três carpelos, cobertos por espinhos maleáveis, geralmente de cor avermelhada, podendo ser esverdeados ou pardos (LORENZI; MATOS, 2002). Cada fruto possui de 20 a 50 sementes cobertas por uma resina de cor avermelhada (LOTSCHERT; BEESE, 1994).

O urucuzeiro é cultivado em várias regiões do Brasil como planta ornamental e para obtenção de suas sementes, de onde se extrai corante que é usado em diversos produtos e também no tingimento da pele de algumas tribos indígenas amazônicas durante rituais religiosos e para repelir insetos (LORENZI, 2002).

Do urucuzeiro, o que mais se comercializa são as sementes. A maior produção de sementes se dá na América Latina, na África e Ásia. A América Latina contribui com cerca de 60% da produção, a África contribui com 27% e a Ásia com 12% (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003).

O Brasil produziu em 2008, 12.472 toneladas de sementes de urucum (IBGE, 2009). Da produção brasileira, cerca de 60% é destinada a fabricação do colorífico ou colorau (produto elaborado pela mistura do pigmento com farinha de milho ou mandioca) que, nas regiões Norte e Nordeste têm consumo anual em torno de 500 g *per capita*. Do restante da produção, 25% das sementes são exportadas *in natura* principalmente para os Estados Unidos, Inglaterra, França e Japão; os 15% restantes são utilizados na fabricação de corantes (CARVALHO, 1999).

A utilização das sementes de urucum como matéria-prima na fabricação de corantes se dá pela extração dos pigmentos presentes na parte externa da semente (camada resinosa). Estes pigmentos representam de 1,5 a 4% do peso total da semente (MERCADANTE, 2008) e, a partir dos quais são obtidos os extratos com colorações que variam do amarelo ao vermelho.

Existem diferentes métodos de extração do corante de urucum e cada um define o tipo de extrato a ser obtido (Tabela 3) (PRESTON; RICKARD, 1980; JECFA, 2006). Na extração com óleo sob aquecimento, por exemplo, há a predominância de *trans*-bixina, embora, também ocorra a presença de *cis*-bixina, o que indica isomerização devido a temperatura. No método de suspensão em óleo, que é realizada em baixa temperatura, há a ausência de *cis*-bixina. Na extração com álcalis, há a predominância de sais de norbixina, entretanto, devido ao tratamento térmico, a norbixina pode estar em ambas as configurações *cis*- e *trans*-.



Tabela 3: Métodos de extração de corantes de urucum.

Tipo de Extrato	Descrição
Extração com óleo	Imersão das sementes em óleo comestível a 70 °C sob agitação para remoção do pericarpo. Em seguida, a fração líquida é filtrada;
Suspensão em óleo	Mistura de partículas do pericarpo com óleo comestível; Extração com solvente seguida de lavagem com hexano; Extração com mono- e diglicerídios, ácidos graxos ou propilenoglicol.
Extração com álcali	O pericarpo é extraído na presença de álcali sob agitação e aquecimento; A partir da extração com solvente, seguida de hidrólise com álcali;

Adaptado de: PRESTON; RICKARD, 1980.

Os corantes a base de urucum apresentam grande vantagem por terem baixo custo comparando-se a outros corantes naturais, além disso, conferem características sensoriais agradáveis, sendo por isso, utilizados em vários de produtos (Tabela 4) (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008).

Tabela 4: Limites de utilização de urucum, extrato de bixina ou norbixina estabelecidos.

Produto	Máximo (g/ 100 g ou g/ 100 mL)
Biscoitos, bolos, mistura para preparos de bolos, tortas, doces, sobremesas de gelatina;	0,001
Carnes e produtos cárneos, conservas cárneas, produtos frescos embutidos, secos, curados;	0,002
Licores, aperitivos, aguardente composta;	0,003
Bebidas não alcoólicas a base de soja, bebidas não alcoólicas gaseificadas, gelados comestíveis;	0,005
Creme vegetal e margarinas, mostarda, molhos desidratados, maionese;	0,01
Sopas e caldos concentrados, sopas e caldos desidratados, preparações culinárias industriais;	0,015
Balas e caramelos, pastilhas, confeitos, balas de goma e balas de gelatinas, goma de mascar e chicle, torrone;	0,02
Sementes oleaginosas e nozes processadas, com cobertura ou não;	0,03
Queijos, iogurtes, néctares de frutas, sucos de frutas, cereja em calda, sangria, proteína texturizada de soja, revestimento de embutidos, vinhos licorosos e compostos.	q.s.p

Fonte: BRASIL (2012).

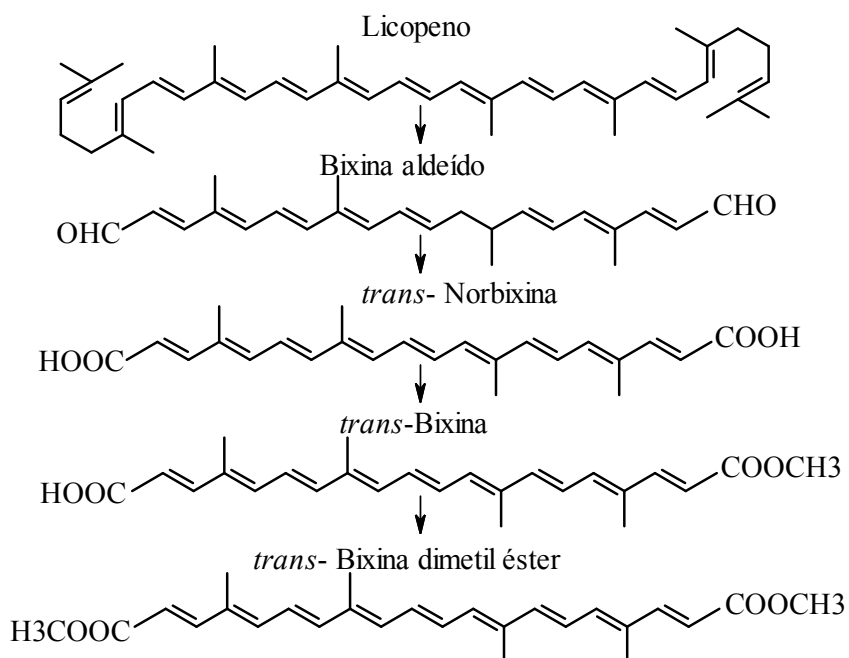
q.s.p.: Quantidade suficiente para obter o efeito desejado.

Embora os corantes a base de urucum sejam bastante consumidos, por estarem presentes em vários produtos, as pesquisas do JECFA (2006) concluíram que, respeitando-se os níveis de aceitáveis de ingestão, o consumo não traz riscos a saúde. Foi estabelecida para bixina a ingestão diária aceitável (IDA) de 0- 12 mg/ kg de peso corpóreo baseando-se em um nível de efeito não observável de (NOAEL) de 1,311 mg/ kg de peso corpóreo/ dia. Para a norbixina é estabelecida uma IDA de 0,6 mg/ kg de peso corpóreo, baseando-se em um NOAEL de 69 mg/ kg de peso corpóreo/ dia.

### **2.3.2 Bixina**

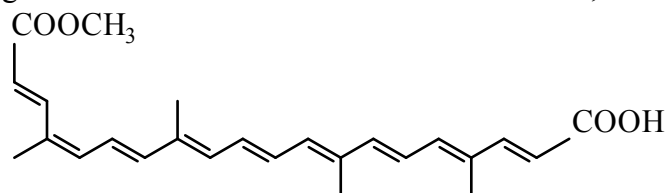
Embora o mecanismo de síntese da bixina ainda não seja completamente elucidado, tem-se sugerido que sua formação seja a partir do licopeno, pois, existe grande semelhança estrutural com a molécula de crocetina (principal pigmento do açafrão) e pelos traços de apocarotenoides presentes na camada resinosa da semente de urucum. O mecanismo proposto para a síntese de bixina se inicia com a clivagem oxidativa do licopeno, seguida pela ação das enzimas aldeído oxidase e metiltransferase (Figura 3) (BOUVIER; DOGBO; CAMARA, 2003).

Figura 3: Síntese de bixina. Fonte: BOUVIER; DOGBO; CAMARA, 2003.



A bixina (6-metil hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) (Figura 4) é o principal pigmento da semente de urucum, correspondendo a cerca de 80% dos carotenoides encontrados, possui uma estrutura peculiar contendo 25 átomos de carbono, 9 duplas ligações conjugadas e dois ácidos carboxílicos, no qual um é um éster metílico (MERCADANTE; STECK; PFANDER, 1997).

Figura 4: Estrutura da *cis*-bixina. Fonte: JECFA, 2006.



A estrutura dos carotenoides é responsável pelas suas características em comum. Dentre elas, pode-se citar a baixa solubilidade em meio aquoso (devido a longa cadeia poliênica) (MÍNGUEZ-MOSQUERA; HORNERO-MÉNDEZ; PÉREZ-GÁLVEZ, 2008).

As duplas ligações conjugadas da estrutura dos carotenoides são também responsáveis pela absorção da luz no visível. Isto é base para vários métodos de identificação e quantificação espectrofotométrica. A bixina, por exemplo, apresenta espectro de absorção máxima nos comprimentos de onda 432, 456 e 490 nm em éter de petróleo e 433, 470 e 502 nm em clorofórmio (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

### 2.3.2.1 Atividade antioxidante e desativação de oxigênio singlete

A bixina, assim como a maioria dos carotenoides, é um desativador de oxigênio singlete, pois o nível de energia da bixina em no estado triplete (18 kcal/mol) é menor que o nível de energia do oxigênio singlete (22,5 kcal/mol) (RIOS; MERCADANTE; BORSARELLI, 2007), o que possibilita a transferência de energia do oxigênio para o carotenoide.

A oxidação de alimentos por oxigênio singlete é bastante significativa, visto que a velocidade da reação é maior do que a reação de oxidação por oxigênio triplete e, independente da temperatura, a velocidade de reação pode aumentar rapidamente. Existem várias formas de se produzir oxigênio singlete nos alimentos: quimicamente, enzimaticamente e fotoquimicamente (MIN; BOFF, 2002).

A ação antioxidante da bixina se deve ao sistema de duplas ligações conjugadas, que atua como excelente receptor de radicais livres (DIAS *et al.*, 2011). A ação antioxidante e de desativação de oxigênio singlete têm importância para a saúde humana por contribuir para a proteção de células (DI MASCIO; MURPHY; SIES, 1991).

A cisplatina é um agente citostático utilizado em tratamentos de tumores, mas seu uso está associado a efeitos colaterais, tais como nefrotoxicidade (ATESSAHIN, 2005).

Silva, Antunes e Bianchi (2001), em um estudo para avaliar a modulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), produzidos pela interação cisplatina/DNA verificaram que a administração prévia de bixina em ratos Wistar reduziu em 33% as metáfases anormais das células da medula óssea, reduziu a peroxidação lipídica nos rins, inibiu a redução dos níveis de glutathiona renal causados pela administração de cisplatina. Além disso, Rios, Antunes e Bianchi (2009), verificaram que a bixina foi responsável pela inibição de 82% de  $O^{\bullet-}_2$  e 42% das espécies  $H_2O_2$  e  $HO^{\bullet}$  geradas na interação de cisplatina com o DNA.

Chisté *et al.* (2011), estudando a capacidade de desativação de extratos de sementes de urucum contra as espécies reactivas de oxigénio (ROS) e das espécies reativas de nitrogénio *in vitro* verificaram que extratos de bixina produzidos com diferentes tipos de solventes (água, etanol, acetato de etila, água: etanol, etanol: acetato de etila) com concentração variando de 15,06 a 311,35 mg/g, apresentaram excelente capacidade de desativação das espécies reativas  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ ,  $^1O_2$ ,  $^{\bullet}NO$  e  $ONOO^{\bullet}$ .

#### 2.3.2.2 Estabilidade de bixina em alta temperatura, na presença de oxigénio e luz

Segundo Montenegro *et al.* (2004), o sistema de ligações duplas conjugadas presentes na estrutura da bixina é responsável não somente pela cor e ação antioxidante, mas também pela instabilidade da molécula em condições de processamento e armazenamento, quando submetida a altas temperaturas, presença de luz e oxigénio.

Preston e Rickard (1980) estudaram os diferentes tipos de produtos de degradação formados em diferentes tipos processos comumente utilizados na produção de corante a base de urucum (Tabela 5). Estes autores citaram que na extração com óleo (realizada a 130 °C) ocorre maior produção de *trans*-bixina (*trans*-BIX).

Tabela 5: Principais produtos presentes nos extratos de bixina e norbixina produzidos em diferentes condições.

Métodos de extração	Produtos
Extração com óleo	C17, <i>cis</i> -BIX, <i>trans</i> -BIX
Suspensão em óleo	<i>cis</i> -BIX, <i>trans</i> -BIX
Extração com solvente	<i>cis</i> -BIX, <i>trans</i> -BIX
Extração com álcali	<i>cis</i> -NOR, <i>trans</i> -NOR (sais de Na ou K)
Extração com solvente e hidrólise com álcali	<i>cis</i> -NOR, <i>trans</i> -NOR (sais de Na ou K)

Adaptado de: PRESTON; RICKARD (1980).

C17: Ácido 4,8-dimetiltetradecahexaenedióico (SCOTTER, 1995).

BIX: Bixina; NOR: Norbixina.

Nos métodos de extração de suspensão em óleo e com solventes, não há a presença de outros compostos de degradação, pois não são utilizadas altas temperaturas durante o processo. Nas extrações com álcali e solvente/álcali, as formas *cis* e *trans* de norbixina são as principais encontradas pois, de acordo com os autores, a temperatura de processo normalmente não excede 70 °C.

A norbixina (9-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) é um apocarotenoide encontrado em pequena quantidade nas sementes de urucum que pode ser produzida através da saponificação da bixina, sendo os álcalis a base de sódio e potássio os principais utilizados durante a saponificação (SILVA, NACHTIGALL, STRINGHETA, 2009).

De modo a facilitar o entendimento dos fatores que contribuem para a formação dos compostos de degradação, várias pesquisas se dedicam ao uso de sistemas modelo. Scotter, Castle e Appleton (2001) estudando a cinética de degradação térmica de *cis*-bixina em sistema-modelo de metanol, etanol e propanol em ebulição a 64,6 °C, 78,3 °C e 97,2 °C encontraram valores de constante de velocidade de reação ( $k$ ) de  $0,68 \times 10^{-5}$ ,  $1,08 \times 10^{-5}$  e  $2,08 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, verificaram que em todos os experimentos, o decréscimo no teor de *cis*-bixina obedece a uma cinética de primeira ordem com energia de ativação de 8,53 kcal/mol. Durante o aquecimento em etanol, os principais produtos de

degradação formados foram di-*cis*-bixina, *trans*-bixina e ácido 4,8-dimetiltetradecahexaenedióico (C17). No mesmo estudo, os autores também verificaram a formação de tolueno e do composto aromático xileno a partir de alguns isômeros de bixina aquecidos em óleo vegetal a 75 e 140 °C por 2 horas.

Rios, Mercadante e Borsarelli (2005) estudando a cinética de degradação de bixina durante aquecimento em sistema modelo de etanol:água (2:8) a 70, 77, 84, 98, and 125 °C, verificaram a formação de 6 diferentes compostos de degradação. Os valores de *k* encontrados foram de  $1,67 \times 10^{-6}$ ,  $2,33 \times 10^{-5}$  e  $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  nas temperaturas de 70 °C, 98 °C e 125 °C, respectivamente. Estes autores relataram também que o isômero all-*trans*-bixina foi detectado apenas a 125 °C, com a energia de ativação de formação de 24,4 kcal/ mol.

Montenegro *et al.* (2004), avaliando a sensitização de bixina em sistema-modelo (acetonitrila: metanol), verificaram que all-*trans*-bixina é o principal isômero formado, independente da presença de oxigênio, além de serem produzidos mais outros três isômeros de bixina em quantidade bem menor. Foram determinados valores de constantes de velocidade para bixina livre (76 µM) de  $2,3 \times 10^{-4}$ ,  $3,00 \times 10^{-4}$  e  $3,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  nas temperaturas de 5 °C, 15 °C e 20 °C, respectivamente, utilizando rosa de bengala como sensitizador numa concentração de 10 µM. Neste mesmo estudo foi possível verificar que não houve formação dos compostos característicos de degradação térmica.

Glória, Vale e Bobbio (1995) em um estudo para avaliar o efeito da atividade de água na estabilidade de bixina em sistema modelo de celulose microcristalina armazenada a  $21 \pm 1$  °C( na presença/ausência de luz ou ar), verificaram que a diminuição do teor de bixina obedeceu a uma cinética de degradação de 1° ordem. A degradação da bixina foi principalmente causada pela presença de oxigênio. Estes autores citaram que o aumento da

atividade de água teve um efeito protetor sobre a bixina. Neste estudo não foram determinadas as constantes de velocidade e a energia de ativação.

Balaswamy *et al.* (2006), estudando a estabilidade da bixina em três diferentes condições (na ausência de luz em temperatura refrigeração de 5 a 8°C, ausência de luz (30±2 °C), na presença de luz (30±2 °C) durante 360 dias, verificaram que a bixina é mais estável quando está na oleoresina do que sob a forma de pó (após extração). Isto foi atribuído a uma porção de resina que se liga a bixina e a protege da degradação por exposição ao ar e a luz. Os valores de constantes de velocidade de reação ( $k$ ) para bixina nas condições de ausência de luz em temperatura de refrigeração (5 a 8°C), ausência de luz (30 ± 2 °C), na presença de luz (30±2 °C) para oleoresina foram de  $1,70 \times 10^{-9}$ ,  $9,39 \times 10^{-9}$  e  $1,68 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$  e na forma de pó foram de  $4,41 \times 10^{-8}$ ,  $1,57 \times 10^{-7}$  e  $2,03 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

## 2.4 ENCAPSULAMENTO

O encapsulamento pode ser definido como um processo destinado a reter uma substância (composto bioativo) dentro de uma estrutura, normalmente chamada de membrana, revestimento, cápsula, fase externa, matriz, etc (NEDOVIC *et al.*, 2011). Os dois principais objetivos do encapsulamento de compostos bioativos são: promover a estabilidade na presença de oxigênio, luz e umidade. O segundo é aumentar a biodisponibilidade desses compostos em um processo de liberação controlada (FANG; BANDHARI, 2010), tal como no aumento da biodisponibilidade oral de curcumina presente em nanopartículas, sendo cerca de 9 vezes maior (SHAIKH *et al.*, 2009).



Muitos micronutrientes não podem ser adicionados diretamente a produtos alimentícios, em função da solubilidade em água ou da baixa estabilidade em relação a degradação química ou física (SAGALOWICZ; LESER, 2010). É grande a variedade de compostos que podem ser encapsulados, podendo ser citados lipídios, vitaminas, peptídeos, ácidos graxos, antioxidantes, minerais e células vivas (probióticos) (NEDOVIC *et al.*, 2011).

Embora a maioria dos antioxidantes destinados a proteger o corpo humano do estresse oxidativo sejam eficientes *in vitro*, quando aplicados *in vivo*, mesmo em concentrações consideradas altas apresentam diferentes resultados, sendo atribuído a baixa biodisponibilidade que estes e outros compostos bioativos possuem (MOZAFARI *et al.*, 2006).

Algumas partículas produzidas pelo processo de encapsulamento têm a capacidade de atuar em locais específicos, tais como órgãos-alvo (QIU; BAE, 2006). Em outras situações, o encapsulamento pode ser usado para mascarar o sabor desagradável de adstringência que certos polifenóis proporcionam durante a mastigação (NEDOVIC *et al.*, 2011).

Os processos de encapsulamento se baseiam na formação de gotículas dispersas em fase líquida, gasosa ou em pó, sendo o recobrimento dessas gotículas feito pelo agente encapsulante através de diferentes processos físico-químicos. No interior das gotículas está presente o composto bioativo (ZUIDAM; SHIMONI, 2010). Existem várias técnicas de encapsulamento, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Técnicas de encapsulamento.

Técnica	Etapas	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )
<i>Spray-drying</i>	1) Dispersão ou dissolução do composto em meio aquoso contendo o encapsulante; 2) Atomização; 3) Desidratação.	10-400
Leito fluidizado	1) Fluidização do composto; 2) Aspersão do encapsulante; 3) Desidratação ou resfriamento.	5- 5000
Emulsificação	1) Dissolução do composto e do emulsificante em meio aquoso ou óleo; 2) Mistura do óleo e fase aquosa sob agitação.	0,2- 5000
Emulsões com multicamadas	1) Preparação de emulsão óleo em água, sendo o composto dissolvido no óleo e o emulsificante iônico dissolvido em água; 2) Mistura com solução contendo polieletrólito de carga oposta; 3) Remoção do excesso de polieletrólitos; 4) Repetição das etapas 2 e 3.	0,2- 5000
Produção de lipossomas	1) Dispersão de moléculas lipídicas em água, sendo o composto presente ou no óleo ou na água; 2) Redução do tamanho por aplicação de cisalhamento ou extrusão; 3) Remoção do composto (opcional).	10- 1000
Liofilização/ ou secagem a vácuo	1) Dissolução ou dispersão do composto do encapsulante em água; 2) Congelamento; 3) Secagem a vácuo; 4) Moagem.	20- 5000

Adaptado de: ZUIDAM; SHIMONI, 2010.

A técnica de *spray-drying* é uma das mais antigas e mais usadas no encapsulamento. É considerada uma operação contínua, flexível e econômica. As partículas produzidas podem apresentar diâmetro menor que 40  $\mu\text{m}$ . Na técnica de utilização de leito fluidizado é aplicada uma cobertura sobre as partículas na forma de pó em um sistema contínuo ou em batelada. As partículas ficam suspensas por uma corrente de ar e aspergidas juntas do material encapsulante. O material encapsulante pode ser uma solução aquosa de celulose ou derivados de carboidratos, proteínas e gomas (NEDOVIC *et al.*, 2011).

Na técnica de emulsificação, podem ser feitas duas combinações de emulsões: emulsão do tipo água/óleo ou óleo/água e emulsões duplas, do tipo água/ óleo/água. Uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) pode ser concentrada por diferentes métodos de

secagem, tais como *spray-drying* ou liofilização, produzindo um pó. Essas emulsões desidratadas podem ser incorporadas em formulações alimentícias (NEDOVIC *et al.*, 2011), além disso, é uma técnica usada para encapsular moléculas lipofílicas e podem produzir partículas com diâmetro médio de 100 nm a 10 µm. Entretanto, nessa técnica as partículas são mais susceptíveis a instabilidade física, polimorfismo (SAGALOWICZ; LESER, 2010).

A liofilização ou secagem à vácuo, são métodos comuns de secagem, mas a secagem à vácuo é mais rápida e mais econômica, pelo fato de operar em temperatura acima do ponto de congelamento do solvente. A maior desvantagem da liofilização está no alto consumo de energia e elevado tempo de processo, além disso, durante a liofilização, uma rede porosa é formada, o que dificulta o controle da liberação do composto bioativo, principalmente quando se deseja liberação prolongada (NEDOVIC *et al.*, 2011).

Os lipossomas são produzidos normalmente com diâmetro médio entre 20 nm e 100 µm, podendo ser encapsulados tanto moléculas lipofílicas quanto hidrofílicas com controle de liberação. Por outro lado, apresenta custo elevado de produção e pode apresentar baixa eficiência de encapsulamento (SAGALOWICZ; LESER, 2010).

O método de emulsão-difusão, desenvolvido para encapsular compostos consiste na formação de emulsão do tipo óleo em água entre um solvente parcialmente miscível em água contendo o composto com um solvente que contém o agente estabilizante. A adição de água a essa emulsão promove a difusão do solvente para a fase externa, com subsequente agregação gerando as nanopartículas (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

Os emulsificantes desempenham um importante papel na formação de nanoemulsões em sistemas aquosos, pois diminuem a tensão superficial entre as fases aquosa e apolar, diminuindo a quantidade de energia necessária para romper as interações

entre as gotículas levando a produção de partículas cada vez menores. Além disso, formam uma camada protetora em volta da fase dispersa (MCCLEMENTS, 1999).

Nanopartículas poliméricas são sistemas de transporte que apresentam diâmetros inferiores a 1  $\mu\text{m}$ . Dependendo da composição, as nanopartículas podem ser chamadas de nanocápsulas ou nanoesferas. A presença de óleo nas nanocápsulas conduz a uma estrutura vesicular, enquanto a sua ausência em nanoesferas proporcionar uma organização matricial das cadeias poliméricas. As nanocápsulas podem ser preparadas utilizando polímeros pré-formados por deposição interfacial do polímero (contendo o óleo). A técnica de deposição de polímero pré-formado é considerada um método reprodutível com a vantagem de se formarem espontaneamente nanocápsulas de forma simples, eficiente e com alta capacidade de encapsulamento de fármaco (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Fessi *et al.* (1989) descrevem um método de produção de nanocápsulas, denominado método de deposição de polímero pré-formado. No seu trabalho, Fessi *et al.*, produziram nanocápsulas contendo o anti-inflamatório indometacina utilizando PLA (poliácido D,L láctico) como polímero. Conforme é citado em seu trabalho, o método de produção consistiu basicamente em dissolver o polímero em uma mistura de fosfolípidios em solvente orgânico (acetona). A fase orgânica foi então dispensada na fase aquosa contendo o surfactante Poloxamer (Pluronic<sup>®</sup> F-68) e esta mistura foi mantida sob agitação. Imediatamente após injetar a fase orgânica na fase aquosa houve formação de nanocápsulas e a solução se tornou com uma aparência leitosa. A acetona foi removida sob pressão reduzida e a solução foi concentrada.

#### 2.4.1 Encapsulamento de carotenoides

A nanotecnologia é considerada um campo dinâmico, multidisciplinar em natureza, que emprega conhecimento das áreas da Física, Química, Biologia, Ciência de Materiais e Engenharia. Nos últimos dez anos, foi observado um aumento significativo na aplicação de nanotecnologias nos campos da ótica, eletrônica, farmacêutica, alimentos, agricultura, etc. Nas ciências farmacêuticas, a produção de sistemas de transporte de compostos é de grande interesse, visto que este tem um impacto positivo no tratamento de várias doenças, tais como câncer, doenças metabólicas e infecciosas, inflamações e doenças auto-imunes (CARVALHEIRO, 2010).

Na área de alimentos, a identificação bacteriana e monitoramento do controle de qualidade usando biosensores, sistemas de embalagens ativas (“*smartpackaging*”); nanotubos de carbono (aumento da resistência) são exemplos da aplicação de nanotecnologia (SEKHON, 2010). O nanoencapsulamento é definido como uma tecnologia desenvolvida para envolver substâncias gerando partículas com dimensões nanométricas pelo uso de técnicas, tais como nanoemulsificação, nanocompósitos e nanoestruturação, aumentando a estabilidade e promovendo a funcionalidade, que inclui liberação controlada do composto bioativo (vitaminas, antioxidantes, proteínas, lipídeos e carboidratos) (QUINTANILLA-CARVAJAL *et al.*, 2010).

O encapsulamento de compostos bioativos para a formação de nanoestruturas é um exemplo emergente da aplicação da nanotecnologia na indústria de alimentos (SEKHON, 2010). Vários pesquisadores avaliaram a estabilidade de carotenoides encapsulados. Tan e Nakajima (2005) estudaram a estabilidade de nanodispersões aquosas de  $\beta$ -caroteno pelo método emulsificação-evaporação, utilizando hexano como fase orgânica e Tween 20 como

emulsificante. As nanodispersões apresentaram diâmetro de 40 a 260 nm e foi verificado que após 12 semanas de armazenamento a 4 °C, o teor de  $\beta$ -caroteno era de 25 a 56% da quantidade inicial. Para aumentar a estabilidade das nanopartículas, os autores sugeriram a utilização de outro emulsificante poderia ser capaz de estabilizar quimicamente o  $\beta$ -caroteno.

Yuan *et al.* (2008) ao caracterizarem nanoemulsões do tipo óleo em água (O/W), variando-se a concentração, o tipo de emulsificante, temperatura, pressão de homogeneização e números de ciclos de homogeneização produziram nanoemulsões diâmetros de 40 a 400 nm estáveis após 4 semanas de armazenamento a 4 e 25 °C. Entretanto, os autores verificaram perda do carotenóide, tendo como teor final variando de 75 a 86 % em relação a quantidade inicial.

Ribeiro *et al.* (2008) produziram nanopartículas de  $\beta$ -caroteno utilizando como polímeros, PLA (Poli ácido D,L-lático) e PLGA (Poli ácido D,L- co-glicólico), gelatina e Tween 20. As nanopartículas elaboradas com gelatina e Tween 20 apresentaram diâmetro médio de 74 e 77 nm, e estabilidade de pelo menos 5 meses armazenadas a 4 °C. Os autores atribuíram o tamanho das nanopartículas à alta difusão da acetona em água.

Parize *et al.* (2008) produziram microcápsulas de bixina pela técnica de *spray-drying* utilizando quitosana como encapsulante e contendo diferentes formulações de ácido acético, ácido lático e ácido cítrico, verificaram que o microencapsulamento aumentou a estabilidade térmica da bixina. Barbosa; Borsarelli; Mercadante (2005) produziram microcápsulas de bixina pelo método de *spray-drying* utilizando goma arábica e maltodextrina como agentes encapsulantes e verificaram que a formulação elaborada com goma arábica apresentou maior eficiência de encapsulamento e que a adição de 0,2 % de

Tween 80 tornou as microcápsulas elaboradas com maltodextrina mais estáveis na presença de luz, provavelmente pela alta turbidez e baixa solubilidade das microcápsulas em água.

Em todos os estudos de encapsulamento descritos anteriormente, foi verificado aumento da estabilidade do carotenoide. Os estudos de encapsulamento de bixina se dedicaram basicamente a produção de microcápsulas pela técnica de spray-drying, não havendo estudos da produção de nanopartículas ou nanocápsulas de bixina.

## **CAPÍTULO 2: ARTIGOS**



**CHARACTERIZATION AND STABILITY EVALUATION OF BIXIN-LOADED  
LIPID-CORE NANOCAPSULES**

**Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Food Chemistry”.**

## CHARACTERIZATION AND STABILITY EVALUATION OF BIXIN-LOADED LIPID-CORE NANOCAPSULES.

**Kleidson Brito de Sousa Lobato<sup>a</sup>, Karina Paese<sup>b</sup>, Joana Casanova Forgearini<sup>b</sup>, Silvia Stanisquaski Guterres<sup>b</sup>, André Jablonski<sup>c</sup>, Alessandro de Oliveira Rios<sup>a\*</sup>.**

<sup>a</sup> *Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre (RS, Brazil).*

<sup>b</sup> *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS, Brazil).*

<sup>c</sup> *Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre (RS, Brazil).*

### ABSTRACT

The aim of this work was to produce bixin nanocapsules by the interfacial deposition of preformed poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL). PCL (250 mg), capric/caprylic triglyceride (400  $\mu$ L), sorbitan monostearate (95 mg) and bixin were dissolved in a mixture of acetone (60 mL) and ethanol (7.5 mL) under stirring (40 °C). This organic solution was added to the aqueous solution (130 mL) containing Tween 80 (195 mg). The nanocapsules size distributions in the formulations (bixin concentration varying from 11 to 100  $\mu$ g/ mL) were evaluated periodically during 3 weeks of storage at ambient temperature. The optimal formulation (bixin concentration of  $16.92 \pm 0.16$   $\mu$ g/ mL) was characterized (particle size distribution, zeta potential, bixin content and encapsulation efficiency) and showed a volume-weighted mean diameter ( $D_{4,3}$ ) of  $195 \pm 27$  nm, around 100 % of encapsulation efficiency and were considered physically stable during 119 days of storage at ambient temperature.

*Keywords:* carotenoid; bioactive compounds; lipid-core nanocapsules; bixin.

\* *Corresponding author.* Tel.: +55 51 33089787; Fax: +55 51 33087048, *E-mail:* alessandro.rios@ufrgs.br (A. de O. Rios).

## 1. Introduction

Annatto is a natural colorant mostly used in food products, such as cheese, ice cream, butter and meats, because of its low cost and high-quality sensorial characteristics (Cardarelli, Benassi & Mercadante, 2008). The primary coloring component found in annatto seeds is bixin, a carotenoid formed by 9 conjugated double bonds and 2 carboxylic groups (Figure 1) (Mercadante, Steck & Pfander, 1997). The structure of bixin is responsible not only for its light absorption and antioxidant activity but also for its low solubility in water, which impairs its use in low-fat foods (Rodriguez-Amaya, 2001).

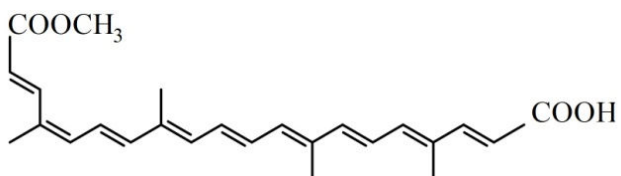


Figure 1: Structure of *cis*-bixin (methyl hydrogen 9'-*cis*-6,6'-diapocarotene-6,6'-dioate).

Like other carotenoids, bixin is an efficient quencher of singlet oxygen, a scavenger of reactive species of oxygen and nitrogen (Rios, Mercadante & Borsarelli, 2007; Rios, Antunes & Bianchi, 2009; Chisté *et al.*, 2011) and appears to be important to the health (Kovary *et al.*, 2001; Junior *et al.*, 2005).

Bixin is considered to be unstable in the presence of oxygen, heat and light, although, Balaswamy *et al.* (2006) verified that bixin is protected by oleoresin naturally found in annatto seeds. Other studies have found that the complexation and encapsulation techniques protect bixin from damage caused by light, air, ozone, oxygen and high

temperatures (Barbosa, Borsarelli & Mercadante, 2005; Lyng, Passos & Fontana, 2005; Marcolino *et al.*, 2011).

Encapsulation is a process of re-vesting compound inside of a structure, producing particles with diameters from nanometers to millimeters. Nanoencapsulation involves the formation of particulate dispersions with a size range from 10 to 1000 nanometers (Mohanraj & Chen, 2006; Tan & Nakajima, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008). This process generally improves chemical stability and bioavailability in a controlled release process (Shaikh *et al.*, 2009; Zuidam & Shimoni, 2010; Paese *et al.*, 2009),

Several compounds have been encapsulated for different purposes (Shaikh *et al.*, 2009; Fang & Bandhari, 2010; Byun *et al.*, 2011). Specifically with respect to group of the carotenoids, most research has been dedicated primarily to the study of  $\beta$ -carotene nanodispersions/nanoemulsions (Tan & Nakajima, 2005; Yuan *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008; Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2011). However, until now, no studies have been published about the production of bixin nanocapsules and the evaluation of their stability.

Based on the indications that bixin may be important to human health and because of its prevalence in the food industries as a colorant and antioxidant, there are reasons to study nanoencapsulation as a technique suitable for increasing its solubility in aqueous media. Therefore, the aim of this work was to prepare, to characterize and to evaluate the stability of bixin-loaded lipid-core nanocapsules.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Materials*

The polymer PCL (Poly- $\epsilon$ -caprolactone) ( $M_w = 80,000$  g/mol) and Span 60 (sorbitan monostearate) were obtained from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). Capric/caprylic triglycerides (CCT) and polysorbate 80 were purchased from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Annatto seeds were obtained from a local market in Porto Alegre, Brazil. All other chemicals and solvents were of analytical or pharmaceutical grade.

### *2.2. Preparation of the standard of bixin*

The standard of bixin was prepared in triplicate, according to Rios and Mercadante (2004). This method consisted in the production of a standard of bixin extracted from the annatto seeds. The annatto seeds (300 g) were washed twice with hexane. The seeds were separated by tamisation and the solvent discarded. Then, the seeds were washed twice with methanol. The seeds were separated again by tamisation and the solvent discarded. Finally, the bixin in the seeds was extracted twice with ethyl acetate. Each wash or extraction was carried out under magnetic stirring during 15 minutes using 600 mL of solvent. The extract was filtered and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator (Fisatom, model 801/802, São Paulo, SP, Brazil). After concentration, the recipient containing the extract was placed in a cold bath and was added slowly to this extract the dichloromethane (5 mL). After the addition of the dichloromethane, was added slowly the ethanol (99.7 %) (20 mL). This solution was kept at  $-18$  °C during 12 hours for crystallization. The crystals

formed in the bottom of the recipient were filtered, washed during filtration with 50 mL of ethanol (99.7 %) and dried under reduced pressure ( $T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

The standard of bixin was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) and was found a purity of  $98.7 \pm 0.20\%$  (Figure 2). Rios & Mercadante (2004), Rios, Antunes & Bianchi (2009) and Barbosa, Borsarelli & Mercadante (2005), produced bixin standards with 98%, 96% and 94% of purity, respectively. The authors did not report the number of washes used to produce the standards. The type of solvent and the characteristics of extraction, such as crystallization and temperature, influence the purity of the bixin standard.

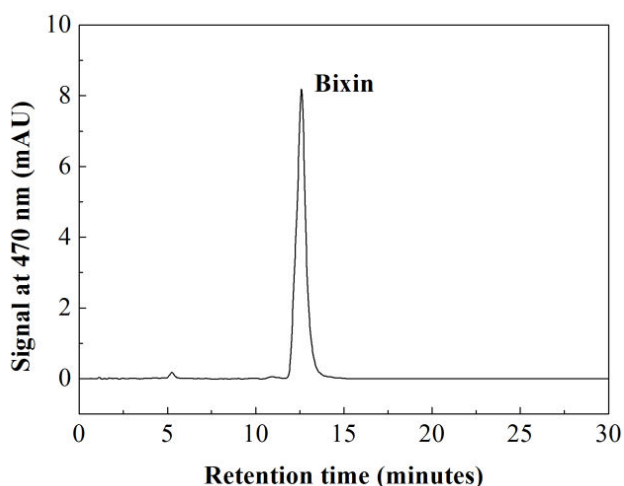


Figure 2: Chromatogram of bixin standard obtained by HPLC. Chromatographic conditions see the text.

The bixin standard was produced with a yield of  $0.86 \pm 0.03\%$  as a result of the washings that were made to increase the purity. Using ethanol:water (93:7) as extractor solution, Kovary *et al.* (2001) obtained 1-2 % of yield; however, these authors did not report the purity of bixin produced.

### *2.3. Development of the bixin-loaded lipid core nanocapsules*

The bixin-loaded lipid core nanocapsules (BIX-LNC) were prepared by the technique of interfacial deposition of preformed polymer, according to Venturini et al (2011). The polymer (PCL) (250 mg), the triglycerides (CCT) (400  $\mu$ L) and the sorbitan monostearate (SM) (95 mg) were dissolved in a mixture of acetone (60 mL) and ethanol (7.5 mL) under magnetic stirring at 40 °C. After the solubilization of PCL, CCT and SM in the solvents, the bixin was added and remained under magnetic stirring for 10 minutes (40 °C). This organic phase was added to the aqueous phase (130 mL) containing polysorbate 80 (195 mg) and remained under stirring for 10 minutes. The dispersion was concentrated under reduced pressure until it reached a final volume of 25 mL.

In preliminary tests, the bixin concentrations tested were 100, 58, 37, 16 and 11  $\mu$ g/mL. The bixin nanocapsules formulations were stored in ambient temperature ( $25 \pm 1$  °C) in amber glasses and the parameter of size distribution was evaluated periodically during three weeks.

Based in the results of the preliminary experiment of nanocapsules stability, the formulation chosen for further experiments (optimal formulation) was prepared in triplicate and characterized in terms of the parameters of viscosity, bixin content, encapsulation efficiency, pH, diameter and zeta-potential and colorimetric analyses. Moreover, the stability of the optimal formulation was studied during storage at ambient temperature. The parameters of pH (BIX-LNC formulation), diameter (BIX-LNC) and the bixin concentration in the formulation were evaluated weekly for 9 weeks; after this period, the evaluation was performed every two weeks until 119 days.

#### *2.4. Determination of mean diameter and zeta potential*

Initially, the analyses of diameter measurement were carried out by laser diffraction (LD) (Mastersizer 2000<sup>®</sup>, Malvern Instruments, UK), using water as dispersant. The data were analyzed by Mastersizer 2000 5.54 software. The span values were determined by the software and are calculated dividing the difference between  $D_{0,1}$  and  $D_{0,9}$  by  $D_{0,5}$ .

Subsequently, the particle diameter (z-average) and zeta potential of suspensions were measured at 25 °C by Dynamic Laser Scattering (DLS) and electrophoretic mobility, respectively (Zetasizer<sup>®</sup> nano-ZS ZEN mod. 3600, Nanoseries, Malvern, UK). The samples were diluted (approximately 200 times) with a pre-filtered (0.45 µm) 10 mM NaCl aqueous solution or with MilliQ<sup>®</sup> water for zeta potential and z-average determination, respectively. The data analysis was performed by Dispersion Technology Software (version 4.0, 2002, Malvern Instruments ltd). The use of DLS and LD was applied as a good means to evaluate changes during storage, since Zetasizer nano ZS<sup>®</sup> and Mastersizer 2000<sup>®</sup> determine particle sizes ranging from 0.003 to 10 µm and 0.02 to 2000 µm, respectively.

#### *2.5. High performance liquid chromatography (HPLC)*

The analyses were carried out using an HPLC system (Agilent series 1100, Santa Clara, CA, USA) that was equipped with an online degasser, a quaternary pump, an automatic injector and that was coupled to a C18 Spherisorb ODS-2 column (150 x 4.6 mm i.d.; 3 µm particle size), adjusted at 25 °C. Data acquisition and processing were performed using the CHEMSTATION<sup>®</sup> software. Bixin was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL/ min using acetonitrile/ 2% (v/v) acetic acid/ dichloromethane (63:35:2 v/v) as the



mobile phase. The chromatograms were processed at the maximum absorption of bixin (470 nm).

All the solvents used in the HPLC separation were of chromatographic grade and previously filtered through the Millipore vacuum filtration system using a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane for organic solvents (Millipore, Barueri, São Paulo, Brazil).

For the quantification of bixin, a standard curve with a determination coefficient ( $R^2$ ) greater than 0.99 was used. This standard curve was obtained plotting the peak areas (from the HPLC) of five different concentrations of bixin solutions (from 1.37 to 80.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) quantified previously by spectrophotometer (UV-Visible Agilent 8453, Santa Clara, CA, USA) at 470 nm with an absorptivity coefficient of 2,826 in chloroform. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.231  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.235  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively, and were determined according to Long & Winefordner (1983).

Before the injections at the chromatograph, the bixin standard was diluted in acetonitrile and the injections were made in duplicate and all samples were previously filtered (0.45  $\mu\text{m}$ , Millex with modified PTFE membrane for aqueous and organic solvents, Millipore, Barueri, São Paulo, Brazil).

#### *2.6. Determination of the bixin content and encapsulation efficiency*

The total content of bixin was determined through the extraction of bixin from the BIX-LNC formulation. This method consisted in the extraction from an aliquot of 250  $\mu\text{L}$  of formulation with acetonitrile (4.75 mL). This extract was sonicated in ultrasound (30 minutes) and centrifuged (15 min at 2,820xg). The supernatant was injected in the chromatograph. The bixin content in the aqueous phase of the BIX-LNC formulation was

determined through the injection in the chromatograph of the filtrate. The filtrate was obtained after the ultrafiltration/centrifugation of an aliquot of BIX-LNC formulation (400  $\mu$ L) using a Ultrafree-MC<sup>®</sup> (10,000 MW, Millipore, Bedford, USA) in a centrifuge (15 minutes at 1,690xg). The encapsulation efficiency was determined, according to Venturini et al (2011), dividing the difference between total concentration of bixin and the concentration of bixin in the BIX-LNC aqueous phase by the total concentration, multiplied by 100.

### *2.7. Viscosity*

The viscosity of the BIX-LNC formulation was measured immediately after preparation using a Brookfield rotational viscometer (model DV-II+Pro, spindle LV2, Brookfield Engineering, USA) at 25 °C. The Data were analyzed using the Brookfield Rheocalc 32 software.

### *2.8. pH*

The pH of the formulation was measured at 25 °C using a potentiometer DM-22 (Digimed, São Paulo, Brazil).

### *2.9. Colorimetric analysis*

The samples of the BIX-LNC formulation (10 mL) and a free bixin solution (10 mL) were analysed using a portable colorimeter (Konica Minolta model CR 400,

Singapore). The free bixin was solubilized in ethanol:water (2:8) due to the low solubility of bixin in pure water. Both samples were prepared in triplicate in the same bixin concentration (16.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

The colorimetric parameters were obtained according to the Commission Internationale de l'Eclairage (CIELAB system) and were  $L^*$  (lightness), and the color coordinates  $a^*$  (red-green component) and  $b^*$  (yellow-blue component) using the illuminant  $D_{65}$  and angle of viewing of  $0^\circ$ . The parameters Chroma ( $C=[a^{*2} + b^{*2}]^{0.5}$ ) and Hue ( $h=\arctan b^*/a^*$ ) was determined for both free and encapsulated bixin. Moreover, the colour difference  $\Delta E^*$  ( $\Delta E^*=[\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{0.5}$ ) was determined comparing the BIX-LNC formulation with the free bixin solution.

### *2.10. Statistical analysis*

The results were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and mean values were analyzed by Tukey's test using STATISTICA<sup>®</sup> 8.0 software.

## **3. Results and discussion**

### *3.1 Development of the bixin-loaded lipid core nanocapsules*

The standard formulation of nanocapsules applied in this study was chosen because is biocompatible and was used in various applications in drug delivery (Paese et al, 2009; Jäger et al, 2009; Pohlmann et al, 2012). These nanocapsules have been optimized by Venturini et al (2011) in a study to formulate aqueous suspensions exclusively composed by lipid-core nanocapsules.

Preliminary tests were conducted to produce suspensions composed only by bixin nanocapsules with diameter smaller than 1  $\mu\text{m}$  distributed in a monomodal profile. The formulations were analyzed by laser diffraction for 3 weeks. In this study, 5 formulations were produced that were called 1, 2, 3, 4 and 5, containing bixin concentrations of 100, 58, 37, 16 and 11  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively.

Immediately after the preparation, formulation 1 showed bixin crystals in suspension. The crystallization process is induced by high-purity, although, in this work, the crystals formed in the formulation 1 resulted from the high concentration of the standard of bixin used. Formulation 2 showed bimodal distribution with particles in nanometric but also in micrometric sizes. Differently, formulation 3 presented good results of particle size with a monomodal distribution profile, mean diameter ( $D_{4,3}$ ) of 151 nm, span of 1.284 and 90% of nanocapsules had a mean diameter ( $D_{0,9}$ ) less than 115 nm. However, after 5 days of storage, this formulation showed an unstable behavior, visualized by the bimodal distribution profile with particles in nanometric and micrometric sizes (larger than 1  $\mu\text{m}$ ).

Immediately after been produced and during 3 weeks of storage, both formulations 4 and 5 presented a monomodal distribution (determined by volume and number of particles) with a mean diameter less than 1  $\mu\text{m}$  (Figure 3). The volume-weighted mean diameters ( $D_{4,3}$ ) found for formulations 4 and 5 were 208 and 163 nm with span values of 1.397 and 1.271, respectively.

The span value is related to the particles distribution and low span values indicate narrow size distribution. The particle size distribution of formulation 5 may be considered more homogeneous due to the smaller span values compared to the span values determined in the formulation 4. The mean diameters of the formulations 4 and 5 evaluated by number

of particles ( $D_{4,3}$ ) were 208 and 163 nm with span values of 1.397 and 1.271, respectively. Similarly, Venturini *et al.* (2011) produced optimized formulations of indomethacin ethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules with mean diameter (z-average) ranging from 169 to 238 nm, with span values from 1.28 to 1.75

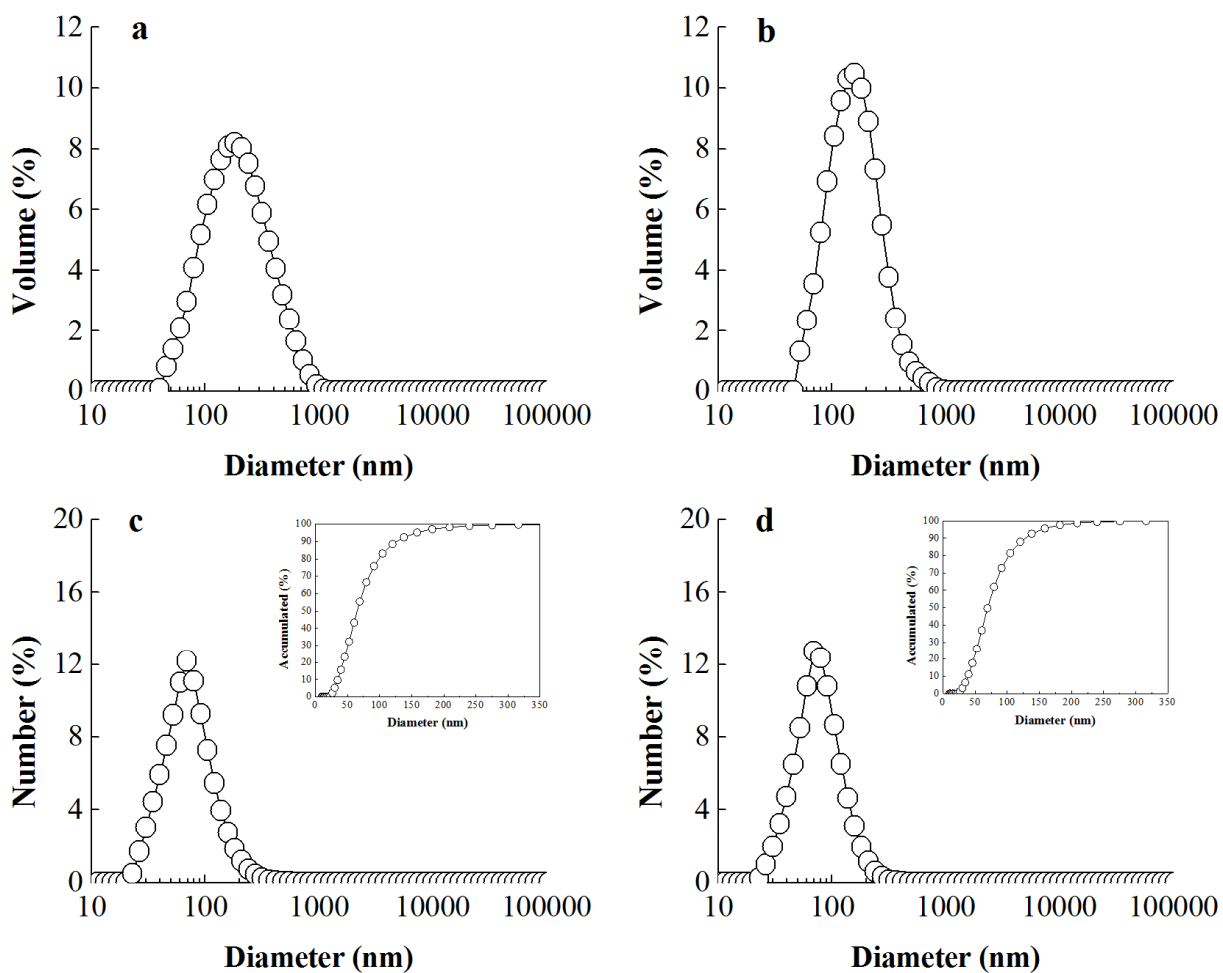


Figure 3: Size distribution of the BIX-LNC formulations 4 by volume (a) and number (c), and BIX-LNC formulation 5 by volume (b) and number (d) with their respective accumulated distribution, analyzed by laser diffraction, respectively.

The results of the cumulative distribution show that 90 % of nanocapsules presented in formulations 4 and 5 have a ( $D_{0,9}$ ) less than 126 and 127 nm (Figure 3 c and d), respectively. After 3 weeks of storage, no changes were observed in the mean diameter of

nanocapsules in formulations 4 and 5, and both were considered stable. However, formulation 4 was chosen for further experiments because of the higher concentration of bixin found, besides satisfactory characteristics of size and distribution.

The results of our preliminary tests show that there is a limit of bixin solubilization in the nanocapsules. The concentration of bixin in the nanocapsules affected the physical characteristics of the nanocapsules, such as diameter, particle-size distribution and stability. The evaluation of particle size distribution by particle volume allowed us to verify the presence of particles with diameters greater than 1  $\mu\text{m}$ . This verification difficult when the analyse is carried out in terms of the number of particles, since these particles (diameter > 1  $\mu\text{m}$ ) were present in small amounts.

### *3.2 Characterization and stability evaluation of the BIX-LNC*

Based on the results discussed above, were prepared three batches of BIX-LNC. The objective of producing capsules exclusively with nanometric dimensions was achieved, since the analyses of LD showed a narrowed monomodal distribution of BIX-LNC with a mean diameter ( $D_{4,3}$ ) of  $195 \pm 27$  nm, a surface-weighted mean diameter ( $D_{3,2}$ ) of  $138 \pm 13$  nm, and span values of  $1.4 \pm 0.1$  (Figure 4- a). In addition, 90 % of the nanocapsules presented diameters ( $D_{0,9}$ ) that were less than  $124.0 \pm 5.0$  nm.

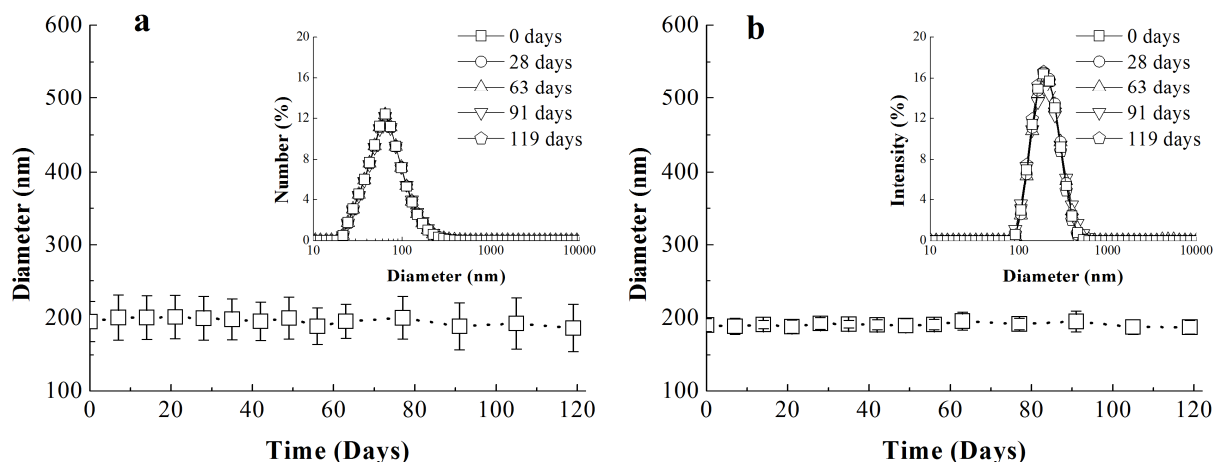


Figure 4: Mean diameter of BIX-LNC evaluated by laser diffraction (a) and dynamic light scattering (b) during 119 days of storage and their respective size distribution at the intervals at 0 ( $\square$ ), 28 ( $\circ$ ), 63 ( $\Delta$ ), 91 ( $\nabla$ ) and 119 days ( $\diamond$ ) of storage (b and d). Standard deviation is represented by bars.

Tan & Nakajima (2005) produced  $\beta$ -carotene nanodispersions by solvent displacement method using Tween 20 as emulsifier, with mean diameters ( $D_{4,3}$ ) varying from 60 to 135 nm and with span values varying from 0.4 to 0.7. Ribeiro *et al.* (2008) used food grade materials, gelatin and Tween 20 to produce polymeric nanodispersions of  $\beta$ -carotene with a mean diameter ( $D_{3,2}$ ) ranging from 74 to 77 nm.

The analyses of DLS also showed that BIX-LNC presented a monomodal distribution with a z-average of  $190.2 \pm 8.7$  nm and a polydispersity index of  $0.098 \pm 0.03$  (Figure 4- b). Paese *et al.* (2009) produced benzophenone-3-loaded lipid-core nanocapsules with z-average of  $247 \pm 4$  nm and a polydispersity index lower than 0.2. Yuan *et al.* (2008), applied the technique of high pressure homogenization and studied the influence of emulsifier type and concentration, homogenization pressure, temperature and number of cycles, produced  $\beta$ -carotene nanoemulsions with diameters ranging from 132 to 184 nm (determined by DLS).

The formulation of BIX-LNC stayed stable during the storage, since no significant changes ( $p < 0.05$ ) were verified in the mean diameter of nanocapsules evaluated by LD and DLS during the 119 days of storage and the distributions of particle size also remained constant, with no significant changes ( $p < 0.05$ ), at 0, 28, 63, 91 and 119 days (Figure 4: a and b). The steric effect provided by the surfactant polysorbate 80 is the responsible for the stability of this type of nanocapsules formulation (Jager *et al.*, 2009; Venturini *et al.*, 2009).

Yuan *et al.* (2008) studying the effects of production parameters, developed  $\beta$ -carotene nanoemulsions with z-average ranging from 132 to 184 nm that were stable for four weeks in amber bottle flushed with nitrogen and stored at 4 and 25 °C. Tan & Nakajima (2005) verified that  $\beta$ -carotene nanodispersions prepared only with Tween 20 as the emulsifier remained stable after 12 weeks at 4 °C in amber bottles. Ribeiro *et al.* (2008) reported that the  $\beta$ -carotene nanoparticles prepared with polymers poly-D,L lactic acid and poly-D,L-lactic-co-glycolic acid were stable over 20 weeks of storage at 4 °C in the dark.

The BIX-LNC presented mean zeta potentials of  $-14.45 \pm 0.92$  mV immediately after preparation and decreased to  $-25.85 \pm 6.58$  mV after 119 days of storage. Yin *et al.* (2009), while studying the effects of sodium caseinate, Tween 20, decaglycerol monolaurate, and sucrose fatty acid ester using solvent displacement technique produced  $\beta$ -carotene nanodispersions with zeta potentials of -32.8, -8.2, -17.6 and -30.9 mV by using sodium caseinate, Tween 20, decoglycerol monolaurate and sucrose fatty acid ester, respectively. In addition, benzophenone-3 nanocapsules prepared with PCL and Tween 80 showed zeta potentials of  $-9.5 \pm 1.0$  mV (Paese *et al.*, 2009). The concentration of PCL influence the zeta potential (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2011) since the negative zeta potential is a consequence of the negative charge density of the carboxylate groups in the PCL backbone (Paese *et al.*, 2009).



The BIX-LNC suspension was prepared in triplicate with a mean bixin concentration of  $16.92 \pm 0.16 \mu\text{g/ mL}$  (Figure 5). Venturini *et al.* (2011) produced lipid-core nanocapsules with higher concentration of indomethacin ethyl ester (1 mg/ mL) using the same formulation components, which indicated the influence of the encapsulate structure on the amount incorporated into the formulation. However, the concentration of bixin is not considered low because food dyes are normally used at low concentrations.

The quantity of a compound that can be incorporated into nanoencapsulated systems is influenced by the type of formulation and technique used (Yuan *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008; Tan & Nakajima, 2005). In the aqueous phase of the BIX-LNC formulation (triplicate), the bixin concentration was below the limit of detection of  $0.231 \mu\text{g/ mL}$  (None bixin peak was found). The mean total concentration of bixin in the formulations was of  $16.92 \pm 0.16 \mu\text{g/ mL}$ . The determination of encapsulation efficiency could be made in this way:  $[(16.92-0.00) / 16.92] \times 100$ . Thus, the value of encapsulation efficiency is around 100% or greater than 98.63 % if the limit of detection is subtracted from the total concentration of bixin. The high encapsulation efficiency indicates that all the bixin in the suspension was present in the nanocapsule structure (inner part and wall).

This high encapsulation efficiency occurred probably due to the nanocapsule core which contain triglycerides (CCT) that facilitates solubilization of bixin. Moreover, the encapsulation efficiency results show that the technique used in the present work is effective to improve the bixin apparent solubility in aqueous media. Microencapsulation of bixin in different food polymers achieved a maximum efficiency of 86.4 % (Barbosa, Borsarelli & Mercadante, 2005).

The reduction of bixin content during the first days of storage most likely occurred because of the formation of free radicals in the oil (Capric/caprylic triglyceride) during the

solubilization step of bixin in the organic phase (40 °C). From the 7<sup>th</sup> to the 28<sup>th</sup> days of storage in ambient temperature, no significant change in the bixin content was verified ( $p < 0.05$ ) (Figure 5).

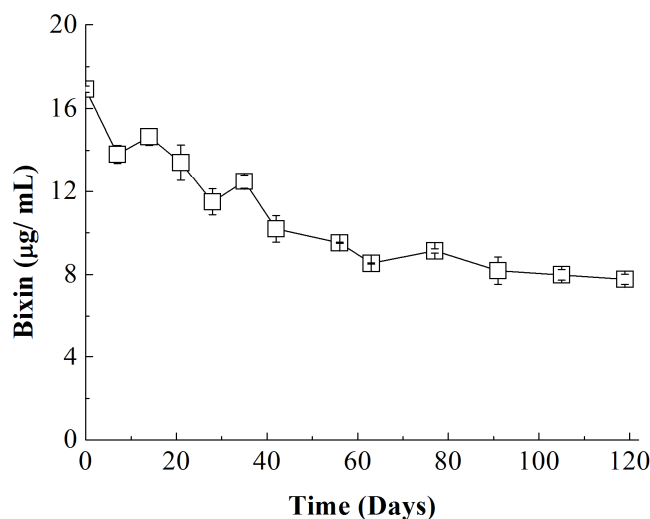


Figure 5: Variation of bixin content in BIX-LNC during 119 days of storage.

After 119 days of storage,  $45.7 \pm 1.1$  % of bixin was still found. The data found in the literature show that encapsulation is more effective to inhibit the degradation of carotenoids during storage, although, decrease in carotenoid content has also been verified by other authors. During 12 weeks at 4 °C, the residual content of  $\beta$ -carotene in nanodispersions varied from 25.2 to 56 % (Tan & Nakajima, 2005). Yuan *et al.* (2008) evaluated the stability of  $\beta$ -carotene nanoemulsions and found that after 4 weeks of storage at 4 and 25 °C, the residual  $\beta$ -carotene concentration ranged from 75 to 86 %. Yin *et al.* (2009) studied the effects of emulsifiers on the stability of  $\beta$ -carotene nanodispersions and found that after 8 weeks at 4 °C, the content of  $\beta$ -carotene fell to values varying from 45.6 to 63.3 %.

Tan & Nakajima (2005) reported that probably the formation of free radicals during the high-pressure homogenization process and the large surface contributed for  $\beta$ -carotene loss in nanodispersions. Yuan *et al.* (2008) reported that the degradation during storage represents a problem for the use of high-pressure homogenization in commercial products.

Another alternative to decrease the bixin degradation rate in lipid-core nanocapsules during storage might be to encapsulate it in the same manner as Ribeiro *et al.* (2008), where the addition of  $\alpha$ -tocopherol prevented  $\beta$ -carotene loss in nanodispersions; the authors reported that the  $\beta$ -carotene content remained stable for at least 5 months at 4 °C. Qian *et al.* (2012) verified that the water-soluble antioxidants EDTA and ascorbic acid and the oil-soluble vitamin E acetate, coenzyme Q10, decreased the degradation rate under accelerated storage conditions (50 °C) when added to  $\beta$ -carotene nanoemulsions. In addition, these authors also reported that the addition of water- and oil-soluble antioxidants did not have an influence on the particle size.

The viscosity of a nanocapsules suspension is important because rheological properties affect all stages of manufacture such as mixing, pumping, filling and are valuable tools in quality control. The behaviour of the BIX-LNC suspension is typical for a Newtonian fluid, since the increase of the shear stress was proportional to the increase of the shear rate (Figure 6: a). The BIX-LNC suspension showed a viscosity of  $11.4 \pm 0.24$  mPa.s and a mean initial pH of  $5.89 \pm 0.70$  (Figure 6: b). Paese *et al.* (2009), with the objective of improving the in vitro effectiveness of benzophenone-3, produced formulations with pH values of  $6.56 \pm 0.09$  and Pohlmann *et al.* (2002) in a study to apply the technique of spray-drying in indomethacin-loaded nanocapsules obtained pH values of  $4.2 \pm 0.1$ .

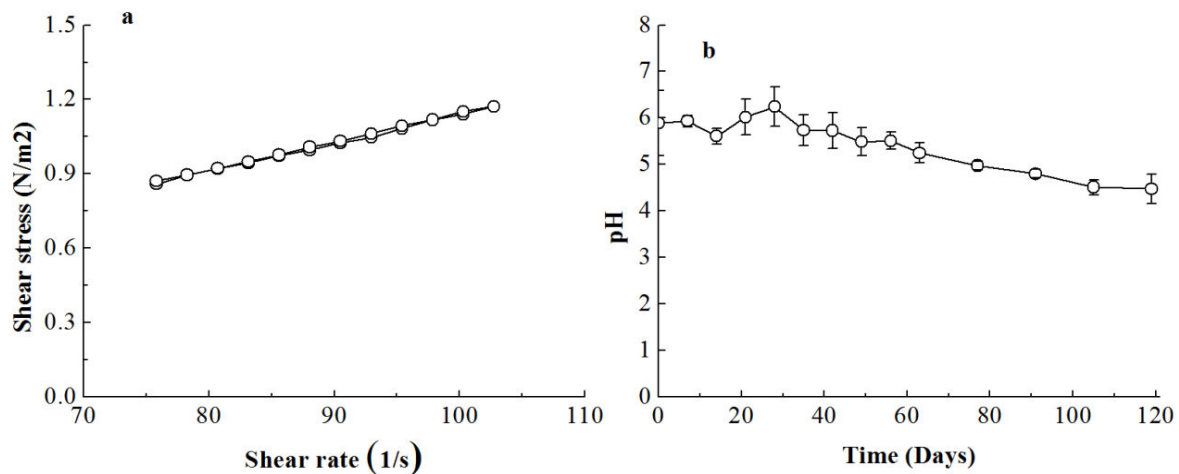


Figure 6: Viscosity analysis of BIX-LNC (a) and pH variation of BX-LNC during 119 days of storage (b). Standard deviation is represented by bars.

During the first 63 days of storage, no significant change was observed in pH values ( $p < 0,05$ ); later, on the 119<sup>th</sup> day, the pH decreased to  $4.48 \pm 0.32$ . One way to minimize the changes in pH is to use a buffering agent in the aqueous phase. Indomethacin-loaded nanocapsules also showed decreased pH values during storage (3 months) that varied from  $4.2 \pm 0.1$  to  $3.4 \pm 0.0$  and  $3.2 \pm 0.0$  at room temperature and at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively (Pohlmann *et al.*, 2002). The pH decreased probably due to the partial hydrolysis of PCL which occurs naturally during storage releasing free hydroxycaproic acid (Calvo, Vila-Jato & Alonso, 2000). Besides, the hydrolysis of triglycerides (CCT) might release free fatty acids, which decrease the pH.

Immediately after production, the BIX-LNC suspension presented a yellowish color (similar to milk) and the colorimetric parameters were:  $L^* = 73.67 \pm 0.34$ ,  $a^* = 6.01 \pm 0.24$ ,  $b^* = 48.60 \pm 0.95$ , Chroma:  $48.97 \pm 0.95$  and Hue:  $1.45 \pm 0.003$ . A solution containing free bixin in ethanol:water (2:8) prepared with the same concentration of the BIX-LNC suspension ( $16.9\text{ }\mu\text{g/ mL}$ ) showed parameters of  $L^* = 42.10 \pm 0.35$ ,  $a^* = 13.54 \pm 0.98$ ,  $b^* = 25.50 \pm 2.2$ , Chroma:  $28.87 \pm 2.42$  and Hue:  $1.08 \pm 0.01$ . Comparing the results of the

BIX-LNC suspension with free bixin solution was verified that encapsulation provided an increase in the luminosity and in the yellow color. At same time, occurred a decrease in the red color. Visually, there was a change afforded by encapsulation. The free bixin solution had a translucent appearance and the BIX-LNC formulation had a yellowish white color. It represents a disadvantage for the use of bixin as colorant. Taking all these considerations into account, encapsulation promoted the solubility of bixin in an aqueous medium through production of lipid-core nanocapsules with suitable physicochemical characteristics of particle size, polydispersity index, zeta potential, viscosity and pH.

#### **4. Conclusions**

Bixin is an antioxidant and the predominant pigment in fat-soluble preparations that are used to colorize butter, cheese, bakery products, oils, ice creams, sausages, cereals and extruded products. The technique of interfacial deposition of preformed polymer allowed the production of BIX-LNC with high encapsulation efficiency (100%), satisfactory diameter ( $D_{4,3}$ ) of  $195.0 \pm 26.9$  nm and monomodal distribution. No significant changes ( $p < 0.05$ ) were observed in particle diameter during 119 days of storage when evaluated for both LD and DLS. The solubilization of bixin in aqueous media increases the possibility of using bixin in low-fat foods and in other studies evaluating its effects in vivo, which would expand the field of industrial application.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

## References

- Balaswamy, K.; Rao, P. G. P.; Satyanarayana, A.; RAO, D.G. (2006). Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 39, 952- 956.
- 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, 989- 994.
- Byun, Y.; Whiteside, S.; Cooksey, K.; Darby, D.; Dawson, P. L. (2011).  $\alpha$ -Tocopherol-Loaded Polycaprolactone (PCL) Nanoparticles as a Heat-Activated Oxygen Scavenger. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1428- 1431.
- Cardarelli, C. R.; Benassi, M. T.; Mercadante, A. Z. (2008). Characterization of different Annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *Food Science and Technology*, 41, 1689- 1693.
- Chisté, R. C.; Mercadante, A. Z.; Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L.; Bragagnolo, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127, 419- 426.
- Fang, Z.; Bandhari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols- a review. *Trends in FoodScience & Technology*. 21, 510- 523.
- Jäger, E.; Venturini, C. G.; Poletto, F.; Colome, L. M.; Pohlmann, J. P. U.; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. (2009). Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5, 130- 140.
- Junior, A. C.; Asad, L. M.; Oliveira, E. B.; Kovary, K.; Asad, N. R.; Felzenszwalb, I. (2005). Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genetics and Molecular Research*, 4, 94- 99.

Kovary, K.; Louvai, T. S.; Silva, M. C. C.; Albano, F.; Pires, B. B. M.; Laranja, G. A. T.; Lage, C. L. S.; Felzenszwalb, I. (2001). Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. *British Journal of Nutrition*, 85, 431-440.

Long, G. L., Winefordner, J.D. (1983). Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, 55, 712- 724.

Lyng, O. S. M.; Passos, M.; Fontana, J. D. (2005). Bixin and  $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. *Process Biochemistry*, 40, 865– 872.

Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. (1996). Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 530- 536.

Marcolino, V. A.; Zanin, G. M.; Durrant, L. R.; Benassi, M. T.; Matioli, G. (2011). Interaction of curcumin and bixin with  $\beta$ -cyclodextrin: Complexation Methods, Stability and Applications. *Food Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3348- 3357.

Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. (1997). Isolation and Structure Elucidation of minor Carotenoids from Annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochemistry*, 46, n. 8, 1379-1383.

Mohanraj, V. J.; Chen, Y. (2006). Nanoparticles- a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, n.1, 561-573.

Paese, K.; Jäger, A.; Poletto, F. S.; Pinto, E. F.; Rossi-Bergmann, B.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. (2009). Semisolid Formulation Containing a Nanoencapsulated Sunscreen: Effectiveness, In Vitro Photostability and Immune Response. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5, 1- 7.

Pohlmann, A. R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Silveira, N. P.; Guterres, S. S. (2002). Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16, 305- 312.

Qian, C.; Decker, E. A.; Xiao, H.; McClements, D. J. (2012). Inhibition of  $\beta$ -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: Influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. *Food Chemistry*, 135, 1036- 1043.

Ribeiro, H. S.; Chua, B. S.; Ichikawa, S.; Nakajima, M. (2008). Preparation of nanodispersions containing  $\beta$ -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, 22, 12- 17.

Rios, A. O.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. P. (2009). Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. *Food Chemistry*, 113, 1113– 1118.

- Rios, A. 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*, 15, n. 3, 203- 213.
- Rios, A. O.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D. (2007). Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes and Pigments*, 74, 561-565.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI, Washington.
- Shaikh, J.; Ankola, D. D.; Beniwal, V.; Singh, D.; Ravi Kumar, M. N. V. (2009). Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 223- 230.
- Tan, C. P.; Nakajima, M. (2005).  $\beta$ -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 92, 661- 671.
- Venturini, C. G.; Jager, E.; Oliveira, C. P.; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. (2011). Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 375, 200- 208.
- Yin, L. J.; Chu, B. S.; Bobayashi, I.; Nakajima, M. (2009). Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of  $\beta$ -carotene nanodispersions. *Food Hydrocolloids*, 23, 1617- 1622.
- Yuan, Y.; Gao, Y.; Zhao, J.; Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41, 61- 68.
- Zambrano-Zaragoza, M. L.; Mercado-Silva, E.; Gutiérrez-Cortez, E.; Castaño-Tostado, E.; Quintanar-Guerrero, D. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. *LWT-Food Science and Technology*, 4, 1362- 1368.
- Zuidam, N. J.; Shimoni, E. (2010). Overview for microencapsulates for use in food Products or processes and methods to take them. In: Zuidam, N. A.; Nedović, V. A.: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer, New York.



**EVALUATION OF THE STABILITY OF BIXIN-LOADED LIPID-CORE  
NANOCAPSULES USING MODEL SYSTEMS OF PHOTSENSITIZATION AND  
HEATING**

**Artigo formatado de acordo com as normas da revista "Food Chemistry"**

# EVALUATION OF THE STABILITY OF BIXIN-LOADED LIPID-CORE NANOCAPSULES USING MODEL SYSTEMS OF PHOTSENSITIZATION AND HEATING

**Kleidson Brito de Sousa Lobato<sup>a</sup>, Karina Paese<sup>b</sup>, Joana Casanova Forgearini<sup>b</sup>, Silvia Stanisçuaski Guterres<sup>b</sup>, André Jablonski<sup>c</sup>, Alessandro de Oliveira Rios<sup>a\*</sup>.**

<sup>a</sup> *Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre (RS, Brazil).*

<sup>b</sup> *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS, Brazil).*

<sup>c</sup> *Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, n. 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre (RS, Brazil).*

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the stability of bixin-loaded lipid-core nanocapsules (BIX-LNC) prepared by the technique of interfacial deposition of preformed polymer. The stability was evaluated during photosensitization at 5, 15 and 25 °C (in air- and N<sub>2</sub>-saturated conditions) using rose bengal as sensitizer and during heating at 65, 80 and 95 °C in model system of ethanol:water (2:8). The BIX-LNC were produced with a particle-size distribution in a monomodal profile with a mean diameter (D<sub>4,3</sub>) of 195.0 ± 26.9 nm. During photosensitization (air saturated), the free and encapsulated bixin (BIX-LNC) showed activation energy of 7.09 and 11.48 kcal/mol, respectively; and during the heating, free and encapsulated bixin (BIX-LNC) showed an activation energy of 15.06 and 23.81 kcal/mol, respectively. The activation energies found in this study suggest that encapsulation increased the stability of bixin in both experiments of photosensitization and heating in model system of ethanol:water (2:8).

*Keywords:* singlet oxygen, kinetics, antioxidant

*\*Corresponding author. Tel.: +55 51 33089787; Fax: +55 51 33087048, E-mail: alessandro.rios@ufrgs.br (A. de O. Rios).*

## 1. Introduction

The major colorant of annatto seeds is bixin (methyl hydrogen 9'-*cis*-6, 6'-diapocarotene-6, 6'-dioate), a carotenoid containing 9 conjugated carbon double bonds and 2 carboxylic groups (Mercadante, Steck & Pfander, 1997). Bixin is an efficient quencher of singlet oxygen, since the bixin triplet state energy level (18 kcal/ mol) is less than the energy level of singlet oxygen (22.5 kcal / mol). This energy difference enables the energy transfer from the singlete oxygen to the bixin (Rios, Mercadante & Borsarelli, 2007).

Bixin is a scavenger of reactive species of oxygen and nitrogen that has been shown to have beneficial health effects (Chisté *et al.*, 2011; Kovary *et al.*, 2001; Junior *et al.*, 2005). The antioxidant capacity of bixin is due to its conjugated double bonds, which are excellent receptors of free radicals (Dias *et al.*, 2011).

The oxidation of some food components caused by singlet oxygen is significant, because their reaction rate is greater than the oxidation reaction of triplet oxygen, independent of temperature. The oxygen in its singlete-state is more electrophilic than triplet state oxygen, reacting 1500 times faster with moieties of high electron-density, such as C=C bonds. Singlet oxygen can react with each final carbon double bond, yielding the *trans*-isomer (Damodaran, Parkin & Fennema, 1996).

One of the mechanism responsible for the existence of singlet oxygen in foods is the chemical reaction that occurs in the presence of sensitizers, light and triplet oxygen. Many types of sensitizers are commonly found in foods, such as chlorophyll, pheophytins, porphyrins, riboflavin, myoglobin, and some synthetic colorants. These compounds absorb energy from light and transfer it to triplet oxygen to form singlet oxygen. A carotenoid may act in two ways to prevent subsequent reactions of the singlet oxygen: the first is stabilizing

the sensitizer in its excited state and the second is stabilizing the singlet oxygen formed (Min & Boff, 2002).

However, the structure of bixin is responsible not only for its light absorption and antioxidant activities but also for its low solubility in water, which impairs its use in low-fat foods (Rodriguez-Amaya, 2001). Encapsulation is the process of entrapping one compound inside of a structure with diameters ranging from nanometers to millimeters. Nanoencapsulation involves the formation of particulate dispersions or solid particles with a size range of 10 to 1000 nanometers. This technique is used to increase the solubility and stability of bioactive compounds and provide their controlled release (Mohanraj & Chen, 2006; Tan & Nakajima, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008).

The stability of free bixin was evaluated in model systems of photosensitization and heating (Montenegro *et al.*, 2004; Rios, Mercadante & Borsarelli, 2005; Scotter, Appleton & Castle, 2001) and the stability of encapsulated bixin (microcapsules) was evaluated in aqueous model system in the presence of light (Barbosa, Borsarelli & Mercadante, 2005). However, the stability of bixin nanocapsules has not been evaluated in model systems. Therefore, the aim of this study was to evaluate the stability of bixin-loaded lipid-core nanocapsules during photosensitization in model system of ethanol:water (2:8) solution.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Materials*

The polymer PCL (Poly- $\epsilon$ -caprolactone) ( $M_w = 80,000$  g/mol) and Span 60 (sorbitan monostearate) and rose Bengal sodium salt (90%) were obtained from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). Capric/caprylic triglycerides and polysorbate 80 were purchased

from Delaware (Porto Alegre, Brazil). The annatto seeds were obtained from the local market in Porto Alegre, Brazil. All other chemicals and solvents were of analytical or pharmaceutical grade.

## *2.2. Preparation of the standard of bixin*

The standard of bixin was prepared in triplicate, according to Rios and Mercadante (2004). Annatto seeds (300 g) were washed twice with hexane. The seeds were separated by tamisation and the solvent discarded. Then, the seeds were washed twice with methanol. The seeds were separated again by tamisation and the solvent discarded. Finally, the bixin in the seeds was extracted twice with ethyl acetate. Each wash or extraction was carried out under magnetic stirring during 15 minutes using 600 mL of solvent. The extract was filtered and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator (Fisatom, model 801/802, São Paulo, SP, Brazil). After concentration, the recipient containing the extract was placed in a cold bath and to the extract was added slowly the dichloromethane (5 mL). After the dichloromethane, was added slowly the ethanol (99.7 %) (20 mL). This solution was kept at -18 °C during 12 hours for crystallization. The crystals formed in the bottom of the recipient were filtered, washed during filtration with 50 mL of ethanol (99.7 %) and dried under reduced pressure ( $T < 30$  °C).

The standard of bixin was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) and was found a purity of  $98.7 \pm 0.20$  %. Other authors found similar results of purity ranging from 94 to 98% (Rios & Mercadante, 2004; Rios, Antunes & Bianchi, 2009; Barbosa, Borsarelli & Mercadante, 2005). The type of solvent and the characteristics of extraction, such as crystallization and temperature, influence the final content of bixin. The

bixin standard was produced with an yield of  $0.86 \pm 0.03$  % as a result of the washings that were made to increase the purity.

### *2.3 Preparation of the bixin nanocapsules*

The bixin-loaded lipid-core nanocapsules (BIX-LNC) were prepared using the technique of interfacial deposition of a preformed polymer according to Venturini *et al.* (2011). The polymer (PCL) (250 mg), the oil (CCT) (400  $\mu$ L), sorbitan monostearate (SM) (95 mg) and bixin were dissolved in a mixture of acetone (60 mL) and ethanol (7.5 mL) by stirring at 40 °C. This organic phase was dispensed slowly into an aqueous phase (130 mL) containing polysorbate 80 (195 mg) and stirred for 10 minutes. The formulation was concentrated to a final volume of 25 mL under reduced pressure at 40 °C. The formulation was prepared in triplicate.

### *2.4 Characterization of the bixin nanocapsules*

Each formulation of the triplicate was characterized immediately after been prepared in the terms of the parameters of mean diameter, size distribution, zeta potential, total content of bixin and encapsulation efficiency, zeta potential, viscosity and pH of the BIX-LNC formulations.

The mean diameter was measured by laser diffraction (LD) at Mastersizer 2000<sup>®</sup> (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) to ensure that all of the particles were of nanometric size. The data were analyzed with Mastersizer 2000 5.54 software (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom). The particle size

and distribution of the nanoparticles present in the formulation (100  $\mu$ L) were evaluated using water as dispersant (refractive index: 1.330). The span values were determined by dividing the differences between  $D_{0,1}$  and  $D_{0,9}$  by  $D_{0,5}$ .

The zeta potential and mean diameter (z-average) of the nanocapsules suspension were measured at 25 °C by electrophoretic mobility and Dynamic Laser Scattering (DLS), respectively, using Zetasizer<sup>®</sup> nano-ZS ZEN mod. 3,600 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom). The samples were diluted (200 times) with pre-filtered (0.45  $\mu$ m) 10 mM NaCl aqueous solution and MilliQ<sup>®</sup> water for the determination of the zeta potential and z-average determination, respectively. The data analysis was performed using Dispersion Technology Software (version 4.0, 2002, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom).

The viscosity of the nanocapsules suspension was measured at 25 °C in triplicate by a rotational viscometer (model DV-II+Pro, spindle LV2, Brookfield Engineering INC., Middleboro, Massachusetts, USA) and the data were analyzed by the Brookfield Rheocalc 32 software. The pH of the nanocapsules suspension was measured at 25 °C using a potentiometer DM-22 (Digimed, São Paulo, Brazil). The bixin content was determined by HPLC. The encapsulation efficiency was calculated, according to Venturini *et al.* (2011), by dividing the difference between the total concentration of bixin and the concentration of bixin in the aqueous phase by the total concentration, multiplied by 100.

### *2.5 Photosensitization and heating of the bixin nanocapsules in model system*

A solution of BIX-LNC in ethanol:water (2:8) was prepared with a final bixin concentration of 8  $\mu$ M (3.156  $\mu$ g/ mL). The BIX-LNC solution in ethano:water is around 5

times more diluted than the BIX-LNC formulation. In the photosensitization experiments, the sensitizer rose bengal was added (10  $\mu\text{M}$ ) to the nanocapsule solution prepared previously. An aliquot of 10 mL of this solution containing BIX-LNC and the sensitizer was illuminated with a 150 W filament lamp coupled to an orange acrylic cutoff filter (36,000 lux) to exclusively excite the sensitizer at wavelengths above 520 nm (maximum absorbance). This experiment was performed at 5 °C, 15 °C and 25 °C in two different conditions. The first was carried out injecting  $\text{N}_2$  (99.99% purity) to the photosensitization cell (excluding the oxygen) and the second was carried out injecting air in the photosensitization cell.

The filtered light excited only rose bengal and singlet oxygen was formed by the energy transfer from this sensitizer to triplet oxygen (atmospheric oxygen). Montenegro *et al.* (2004) verified the formation of singlet oxygen by phosphorescence (1270 nm) in a similar photosensitization experiment of bixin in a model system of acetonitrile:methanol (1:1). Foote, Chang and Denny (1970), demonstrated that no reaction occurred in the absence of the sensitizer (methylene blue) even in the presence of  $\text{O}_2$ . Montenegro *et al.* (2004) observed that the consumption of bixin in photosensitization only occurs in the presence of light because no changes in the bixin concentration occurred in the dark even in the presence of oxygen.

The BIX-LNC were diluted in an ethanol:water (2:8) solution to allow the comparison with free bixin, which is insoluble in water. In an air-saturated condition (presence of atmospheric oxygen), the sensitizer rose bengal and singlet oxygen both participated in the degradation of bixin, whereas in the  $\text{N}_2$  saturated system (absence of oxygen), only the sensitizer acted in the degradation of bixin.



For the heating experiments, 2 mL of the BIX-LNC solution was heated in glass test tubes with screw caps (20 mm of diameter and wall thickness of 1 mm) in a heating bath at 65 °C, 80 °C and 95 °C in the absence of light. Free bixin (non-encapsulated) in ethanol:water (2:8) solution (8 µM= 3.156 8 µg/ mL) was evaluated under the same conditions of photosensitization and heating. The bixin content was quantified by HPLC.

### *2.7 High performance liquid chromatography (HPLC) analysis*

Quantative analyses were performed using an HPLC system (Agilent series 1100, Santa Clara, CA, USA), equipped with an online degasser, a quaternary pump, an automatic injector and coupled to a C18 Spherisorb ODS-2 column (150 x 4.6 mm i.d.; 3 µm-particle size) adjusted at 25°C. Data acquisition and processing were performed using Chemstation<sup>®</sup> software. Bixin was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL/ min using acetonitrile/ 2% v/v acetic acid/ dichloromethane (65:35:2 v/v) as the mobile phase. The chromatograms were obtained at the maximal absorption of bixin (470 nm).

All of the solvents used for HPLC analysis were chromatographic grade and were pre-filtered using a Millipore vacuum filtration system using a membrane for organic solvents (0.22 µm-pore diameter, Millipore, Barueri, SP, Brazil). The samples were injected in duplicate. The bixin standards were firstly diluted in acetonitrile. The BIX-LNC (250 µL) were extracted with acetonitrile (4.75 mL), homogenized by ultrasonication (30 minutes) and centrifuged (15 min at 2,820 x G). The content of bixin present in the suspension aqueous phase was determined after ultrafiltration-centrifugation (15 minutes at 1,690xG) and the supernatant directly injected at HPLC without dilution. Before being for

chromatography, all of the samples were filtered through a polyethylene membrane (0.45 µm-pore size, Millipore Corp., Billerica, Massachusetts, USA).

The bixin concentration were determined from a bixin standard curve that was prepared by plotting the peak areas obtained by HPLC of 5 different concentrations of bixin solutions that ranged from 1.37 to 80.16 µg/ mL (quantified previously with a UV-Visible Agilent 8453 spectrophotometer at 470 nm using the absorptivity coefficient of 2826 in chloroform). Free bixin exhibited a linear coefficient ( $R^2$ ) greater than 0.99. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined according to Long & Winefordner (1983) and were 0.231 µg/mL and 0.235 µg/ mL, respectively.

The bixin content was evaluated periodically by HPLC during the photosensitization experiments in the periods 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 and 300 minutes; and during the heating experiments in the periods 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 and 300 minutes. The bixin content data were used to determinate the kinetics of rate constants and energy of activation parameters by the Origin Pro 8.0 software.

### **3. Results and Discussions**

#### *3.1 Characterization of the bixin nanocapsules*

The materials used to prepare the BIX-LNC formulation are biocompatible, biodegradable. Moreover, this formulation (except bixin) was used in several pharmaceutical studies of drug delivery (Paese *et al.*, 2009; Jäger *et al.*, 2009; Pohlmann *et al.*, 2012) and optimized by Venturini *et al.* (2011) in a study to formulate exclusively lipid-core nanocapsules. The BIX-LNC formulation used in this work presented a monomodal particle-size distribution with a mean diameter ( $D_{4,3}$ ) of  $195.0 \pm 26.9$  nm, a

span value of  $1.4 \pm 0.1$ , a mean diameter (z-average) of  $190.2 \pm 8.7$ , a polydispersity index of  $0.098 \pm 0.03$ , a zeta potential of  $-14.45 \pm 0.92$  mV, a bixin concentration of  $16.23 \mu\text{g/mL}$ , an encapsulation efficiency of approximately 100 %, a viscosity of  $11.4 \pm 0.24$  mPa.s and a pH of  $5.89 \pm 0.70$ .

### 3.2 Photosensitization of BIX-LNC in the model system

In a preliminary experiment, the mean diameter (z-average) of the BIX-LNC in ethanol:water (2:8) at 25 °C were periodically measured throughout 5 hours (Figure 1- a) to evaluate the physical stability of the BIX-LNC in the ethanolic solution.

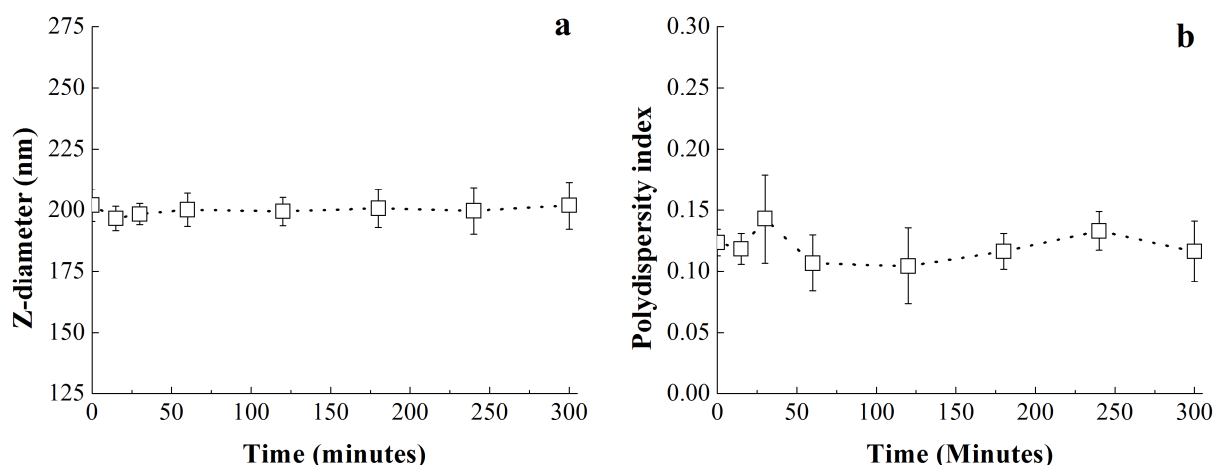


Figure 1: Diameters (a) and polydispersity index (b) of BIX-LNC in a model system of ethanol: water (2:8) throughout 300 minutes at 25 °C.

Immediately after preparation, the BIX-LNC exhibited a mean z-average of  $199.9 \pm 1.8$  nm and a polydispersity index of  $0.12 \pm 0.01$  (Figure 1- b), with a monomodal particle size distribution. No significant changes ( $p < 0.05$ ) were verified in the nanocapsules mean diameter (z-average) and polydispersity index values of the nanocapsules were observed

during 300 minutes. These results suggested that the BIX-LNC would be physically stable in the ethanol:water (2:8) solution during photosensitization in contact with ethanol.

In all of the tested conditions (presence of oxygen and different temperatures), bixin degradation followed a first-order kinetics with a mean coefficient of correlation  $R^2$  above 0.99. The loss of bixin occurred more rapidly in air-saturated solutions than in  $N_2$ -saturated solutions, for both free bixin and BIX-LNC (Figure 2). This loss occurred due to the formation of singlet oxygen.

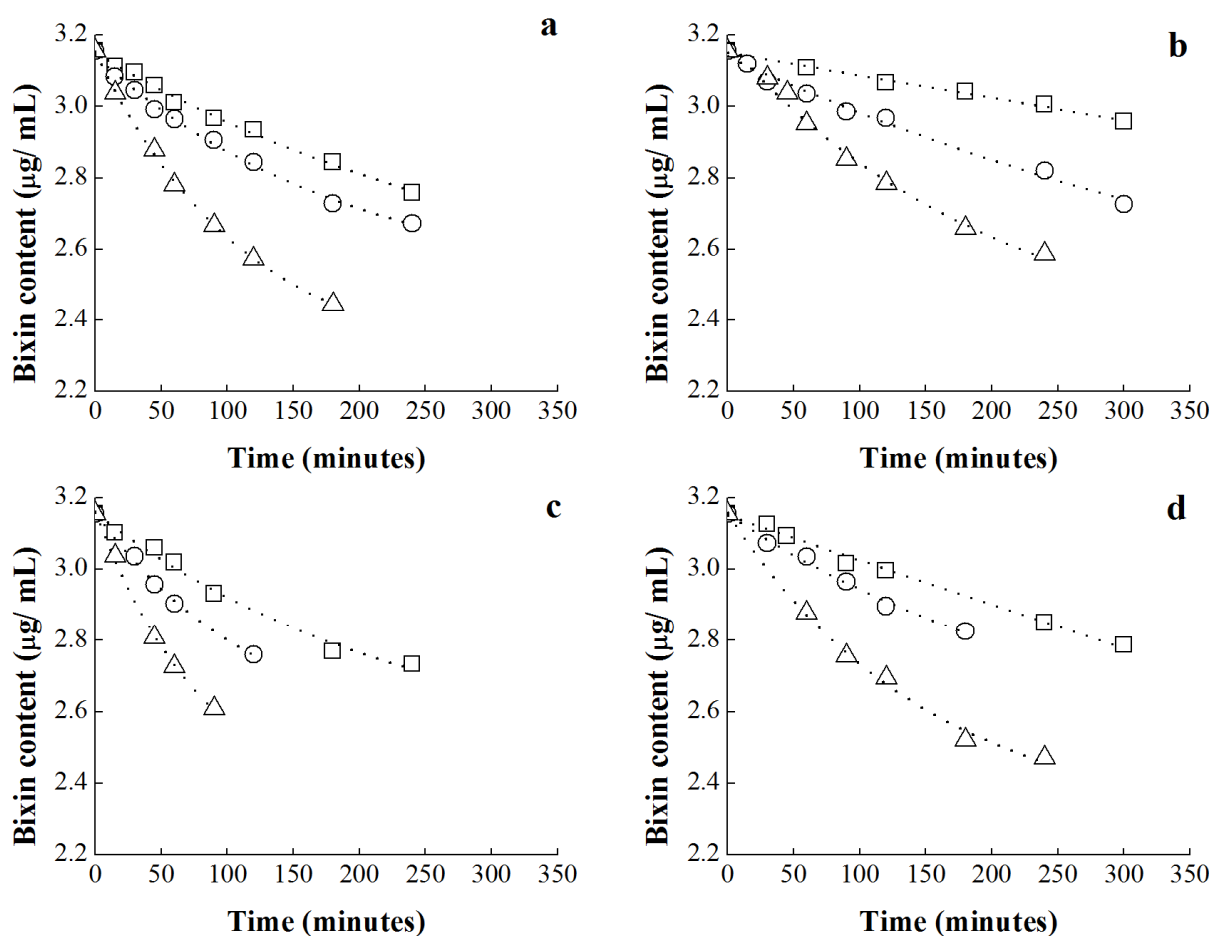


Figure 2: Bixin concentration during photosensitization of free bixin (a) or BIX-LNC (b) in a  $N_2$ - saturated solution, and free bixin (c) or BIX-LNC (d) in an air-saturated solution at 5°C (□), 15°C (○) and 25°C (△).

The nanocapsule structure did not impair the capacity of bixin to stabilize the sensitizer and singlet oxygen. The degradation rate of encapsulated bixin was lower than that of free bixin in the presence of the sensitizer (Figure 2- b) and in the presence of the sensitizer plus singlet oxygen (Figure 2- d).

Montenegro *et al.* (2004) observed that the degradation of bixin was accompanied by an increase in the levels of all-*trans*-bixin, which is considered to be the main product formed during bixin photosensitization in acetonitrile:methanol (1:1). These authors also observed that the rate constant for the formation of this isomer was similar to the rate constant for the loss of bixin.

In the present work, the rate constants ( $k$ ) for bixin loss during photosensitization in ethanol:water (2:8) was higher for free bixin than for bixin in the BIX-LNC in both air-saturated and N<sub>2</sub>-saturated solutions in the same temperatures (Table 1).

Table 1: Calculated rate constants ( $k$ ) and activation energy (Ea) for the photosensitized isomerization of bixin in an ethanol: water (2:8) solution as either free bixin or in BIX-LNC.

Sample	Atmosphere	Rate constant $k$ (s <sup>-1</sup> )			Ea (Kcal/mol)
		5°C	15°C	25°C	
Free bixin	Air-saturated	8.52x10 <sup>-5</sup>	1.33x10 <sup>-4</sup>	2.02x10 <sup>-4</sup>	7.09
	N <sub>2</sub> -Saturated	4.88x10 <sup>-5</sup>	8.78x10 <sup>-5</sup>	1.45x10 <sup>-4</sup>	8.96
BIX-LNC	Air-saturated	2.71x10 <sup>-5</sup>	5.86x10 <sup>-5</sup>	1.09x10 <sup>-4</sup>	11.48
	N <sub>2</sub> -Saturated	1.11x10 <sup>-5</sup>	2.81x10 <sup>-5</sup>	8.04x10 <sup>-5</sup>	16.31

Montenegro *et al.* (2004) observed rate constants ( $k$ ) for free bixin (76 μM) of 2.3x10<sup>-4</sup>, 3.00x10<sup>-4</sup> and 3.7x10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> during photosensitization in the model system of methanol:acetonitrile (1:1) at 5 °C, 15 °C and 20 °C, respectively, using rose bengal (10 μM) as the sensitizer. The highest rate constant (4.2 x 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) was obtained for bixin (8 μM) at 20 °C in the air-saturated condition. The discrepancy between the  $k$  values obtained

for bixin at the same concentration ( $8 \mu\text{M} = 3.156 \text{ } 8 \mu\text{g/ mL}$ ) in the study of Montenegro *et al* (2004) with the present study may be explained by the use of different concentrations of organic solvents.

The activation energies for the BIX-LNC in air- and  $\text{N}_2$ - saturated solutions were 1.62- and 1.82-fold greater than those of the free bixin bixin under the same conditions. The activation energy values for bixin loss in the present investigation revealed that under all of the conditions, the BIX-LNC exhibited a higher activation energy than did the free bixin, indicating that encapsulation increases bixin stability during photosensitization in model systems of ethanol:water (2:8) performed in the present study.

### *3.3 Heating of BIX-LNC in the model system*

A preliminary experiment of heating free bixin and BIX-LNC at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  for 120 minutes in the dark was conducted. The bixin concentration did not significantly change during the experiment. Based on these results, both free bixin and BIX-LNC were exposed to the higher temperatures of  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  for 120 minutes (in the dark). The heated samples were immediately cooled in an ice bath to decrease the degradation rate. The kinetics of degradation was evaluated by the quantification of bixin concentration by HPLC.

The bixin content was evaluated periodically (0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 100 and 120 minutes) by HPLC during the the heating experiments and was used to calculate the kinetics parameters. At all of the temperatures, the degradation of free bixin and bixin in the BIX-LNC followed the same order kinetics (first-order) with a correlation coefficient  $R^2$  greater than 0.99 (Figure 3). Barbosa, Borsarelli & Mercadante (2005) observed two

sequential first-orders decays of bixin that had been encapsulated by spray-drying with different amounts of gum arabic and maltodextrin in an aqueous medium under illumination.

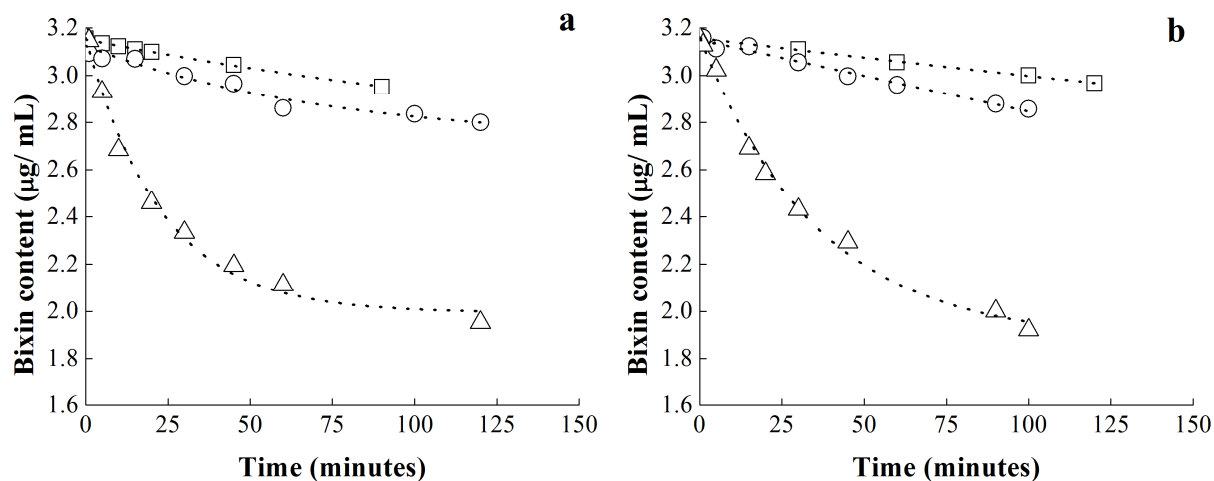


Figure 3: Residual contents of bixin during heating of free bixin (a) or BIX-LNC (b) during heating at 65 °C (□), 80 °C (○) or 95 °C (Δ).

Rios, Mercadante & Borsarelli (2005) observed that the bixin decay curves did not fit the first-order rate law (exponential fitting), although good fitting was obtained using a biexponential model. These authors studied the kinetics of degradation of *cis*-bixin in a model system of ethanol:water (2:8) during heating at 70, 77, 84, 98, and 125 °C in the dark.

Scotter, Castle & Appleton, (2001) studied the thermal degradation kinetics of *cis*-bixin in model systems of methanol, ethanol and propanol heated to their respective boiling points of 64.6 °C, 78.3 °C and 97.2 °C with  $k$  values of  $0.68 \times 10^{-5}$ ,  $1.08 \times 10^{-5}$  and  $2.08 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , respectively. Moreover, it was observed that the decrease in the *cis*-bixin followed first-order kinetics and had activation energy of 8.53 kcal/ mol. The main degradation products formed during heating in ethanol were di-*cis*-bixin, *trans*-bixin and 4,8-dimethyl-tetradecahexaene-dioic acid. The authors also verified in this study the formation of toluene

and xylene in vegetable oil heated at 75 and 140 °C during 2 hours. In the present work, during heating, the loss of the free bixin occurred more rapidly than did that of the bixin in the BIX-LNC, as demonstrated by the higher values of rate constants ( $k$ ) (Table 2).

Table 2: Calculated rate constants ( $k$ ) and activation energy ( $E_a$ ) for bixin loss during heating in an ethanol: water (2:8) solution of free bixin or BIX-LNC.

Sample	Rate constant $k$ ( $s^{-1}$ )			$E_a$ (kcal/mol)
	65°C	80°C	95°C	
Free bixin	$1.16 \times 10^{-4}$	$2.85 \times 10^{-4}$	$7.25 \times 10^{-4}$	15.06
BIX-LNC	$1.94 \times 10^{-5}$	$7.86 \times 10^{-5}$	$3.51 \times 10^{-4}$	23.81

Rios, Mercadante & Borsarelli (2005) studied the bixin kinetics degradation during heating in model system of ethanol:water (2:8) at 70, 77, 84, 98 and 125 °C and found the formation of at least 6 compounds, immediately formed at 98 °C. The  $k$  values found were  $1.67 \times 10^{-6}$ ,  $2.33 \times 10^{-5}$  e  $2.5 \times 10^{-4} s^{-1}$  at 70, 98 and 125 °C, respectively. The authors reported that among the degradation compounds, all-*trans*-bixin was formed only at 125 °C and had showed activation energy of 24.4 kcal/ mol.

Barbosa, Borsarelli & Mercadante (2005) attributed the lower degradation rate of microencapsulated bixin compared to free bixin to the location of the bixin molecules in the structures. The instability of bixin in two of the microcapsule formulations was related to their low encapsulation efficiencies. In the present study, all the bixin appeared to be located inside and bound to the walls of nanocapsule structures because to the maximal encapsulation efficiency had been achieved ( $100 \pm 0.0\%$ ). The authors also reported that that the encapsulated bixin was approximately 10 times more stable in the presence of light than was free bixin.



Other studies have reported that  $\beta$ -carotene is stabilized by encapsulation. Tan & Nakajima (2005) demonstrated that  $\beta$ -carotene remained stable for 3 months at 4°C (in the absence of light) in a nanodispersion produced with Tween 20 as the emulsifier. Ribeiro et al. (2008) reported that the  $\beta$ -carotene nanoparticles produced with poly-D,L lactic acid and poly-D,L-lactic-co-glycolic acid were stable for 5 months of storage at 4 °C. The authors added  $\alpha$ -tocopherol to the formulation in order to decrease the degradation rate of  $\beta$ -carotene in nanodispersions. Qian et al. (2012) studied the effects of the type of antioxidant (ascorbic acid, vitamin E acetate, coenzyme Q10 and EDTA) and the type of emulsifier ( $\beta$ -lactoglobulin and Tween 20) to inhibit carotenoid degradation in nanoemulsions.

The addition of Antioxidant could be an alternative to decreased degradation of bixin. However, in all conditions tested in the present study, encapsulation proved to be a technique to increase the stability of bixin in the model system of ethanol:water (2:8) during photosensitization and during heating. The results obtained in this study extend the knowledge about the stabilization promoted by encapsulation.

#### **4. Conclusions**

The bixin in the BIX-LNC exhibited its characteristic ability to stabilize the sensitizer and singlet oxygen. In the photosensitization experiments, nanoencapsulation was observed to increase the stability of bixin in the presence of a sensitizer and singlet oxygen and during heating in model system of ethanol: water (2:8). These results demonstrated that the nanocapsule structure, in addition to increasing the apparent solubility of bixin in water, did not impair the antioxidant activity and protected bixin from the action of singlet oxygen, the sensitizer and high temperature.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

## References

- 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, 989- 994.
- Chisté, R. C.; Mercadante, A. Z.; Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L.; Bragagnolo, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127, 419- 426.
- Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. (1996). *Food chemistry*. 3rd Edition, New York.
- Dias, V. M.; Pilha, V.; Alves, L. P.; Oliveira, H. P. M.; Munim, E. (2011). Optical Characterization in Annatto and Commercial Colorific. *Journal of Fluorescence*, 21, 415-421.
- Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W. (1970). Chemistry of Singlet Oxygen. XI. *Cis-Trans* Isomerization of Carotenoids by Singlet Oxygen and a Probable Quenching Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 17, p. 5218- 5219.
- Jäger, E.; Venturini, C. G.; Poletto, F.; Colome, L. M.; Pohlmann, J. P. U.; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. (2009). Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5, 130- 140.
- Junior, A. C.; Asad, L. M.; Oliveira, E. B.; Kovary, K.; Asad, N. R.; Felzenszwalb, I. (2005). Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genetics and Molecular Research*, 4, 94- 99.
- Kovary, K.; Louvai, T. S.; Silva, M. C. C.; Albano, F.; Pires, B. B. M.; Laranja, G. A. T.; Lage, C. L. S.; Felzenszwalb, I. (2001). Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. *British Journal of Nutrition*, 85, 431-440.

Long, G. L., Winefordner, J.D. (1983). Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, 55, 712- 724.

Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H. (1997). Isolation and Structure Elucidation of minor Carotenoids from Annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochemistry*, 46, n. 8, 1379-1383.

Min, D. B.; Boff, J. M. (2002). Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 58- 72.

Mohanraj, V. J.; Chen, Y. (2006). Nanoparticles- a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, n.1, 561-573.

Montenegro, M. A.; Rios, A. 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, 367- 373.

Paese, K.; Jäger, A.; Poletto, F. S.; Pinto, E. F.; Rossi-Bergmann, B.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. (2009). Semisolid Formulation Containing a Nanoencapsulated Sunscreen: Effectiveness, In Vitro Photostability and Immune Response. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5, 1- 7.

Pohlmann, A. R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Silveira, N. P.; Guterres, S. S. (2002). Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16, 305- 312.

Qian, C.; Decker, E. A.; Xiao, H.; McClements, D. J. (2012). Inhibition of  $\beta$ -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: Influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. *Food Chemistry*, 135, 1036- 1043.

Ribeiro, H. S.; Chua, B. S.; Ichikawa, S.; Nakajima, M. (2008). Preparation of nanodispersions containing  $\beta$ -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, 22, 12- 17.

Rios, A. O.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. P. (2009). Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. *Food Chemistry*, 113, 1113– 1118.

Rios, A. 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*, 15, n. 3, 203- 213.

Rios, A. O.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D. (2005). Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2307-2311.

Rios, A. O.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D. (2007). Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes and Pigments*, 74, 561-565.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. ILSI, Washington.

Scotter, M. J.; Castle, L.; Appleton, G. P. (2001). Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. *Food Chemistry*, 74, 365-375.

Tan, C. P.; Nakajima, M. (2005).  $\beta$ -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 92, 661- 671.

Venturini, C. G.; Jager, E.; Oliveira, C. P.; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. (2011). Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 375, 200- 208.

## **CAPÍTULO 3: DISCUSSÃO GERAL**

A bixina é o principal pigmento presente nas sementes de urucum. Estas são as principais matérias-primas na produção do corante de urucum, um dos principais corantes naturais utilizados em alimentos. A bixina apresenta características de hidrofobicidade que impede sua solubilização em meio aquoso e por consequência, em produtos com baixo teor lipídico. Além disso, vários estudos demonstram a instabilidade da bixina na presença de fatores, tais como oxigênio, sensibilizadores e alta temperatura.

Uma das técnicas que poderia aumentar tanto a solubilidade da bixina quanto sua estabilidade é o encapsulamento. A maioria dos estudos de encapsulamento enfocam a produção de nanoemulsões, nanopartículas ou nanodispersões de  $\beta$ -caroteno. Na literatura consultada existem somente dois trabalhos se dedicaram a produção de bixina encapsulada. Entretanto, em ambos os trabalhos foi realizada a produção de microcápsulas de bixina pelo método de *spray-drying*.

Com base no exposto acima, o primeiro artigo intitulado “Characterization and stability evaluation of bixin-loaded lipid-core nanocapsules” teve como objetivos principais preparar, caracterizar e avaliar a estabilidade de nanocápsulas de bixina durante 119 dias de armazenamento em temperatura ambiente. O segundo artigo intitulado “Stability evaluation of bixin-loaded lipid-core nanocapsules in model systems of photosensitization and heating” teve como principal objetivo avaliar a estabilidade de nanocápsulas de bixina em sistemas modelo de fotossensitização e aquecimento utilizando solução de etanol: água (2:8).

As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo bixina (BIX-LNC) foram produzidas pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando PCL como polímero. A formulação obtida com essa técnica é biocompatível, já foi otimizada para

produção exclusiva de nanocápsulas e já foi estudada por vários autores. Além disso, o núcleo lipídico das nanocápsulas facilita a solubilização da bixina.

No desenvolvimento das nanocápsulas de bixina, foram avaliadas 5 formulações de contendo diferentes concentrações do carotenoide. Os resultados demonstraram que a concentração de bixina influencia a estabilidade físico-química das nanocápsulas. Das 5 concentrações testadas, os melhores resultados foram obtidos utilizando concentração de bixina de 16 µg/mL onde foram produzidas nanocápsulas com diâmetro médio ( $D_{4,3}$ ) de 208 nm com span de 1,4, distribuídas em um perfil monomodal.

A partir dos resultados preliminares, foram preparados três lotes de BIX-LNC com concentração inicial de bixina de 16.92 µg/mL contendo nanocápsulas distribuídas em um perfil monomodal, com diâmetro ( $D_{4,3}$ ) de  $195,0 \pm 26,9$  nm, diâmetro médio superficial ( $D_{3,2}$ ) de  $138,3 \pm 13,1$  nm, span de  $1,4 \pm 0,1$ , índice de polidispersão de  $0,098 \pm 0,03$  ( $<0,2$ ), potencial zeta de  $-14,45 \pm 0,92$  mV, eficiência de encapsulamento de 100%, viscosidade de  $11,4 \pm 0,24$  mPa s e pH médio de  $5,89 \pm 0,70$ .

Após 119 dias de armazenamento em temperatura ambiente, não foi verificada variação significativa ( $p < 0.05$ ) no diâmetro médio das nanocápsulas avaliadas pelas técnicas de difração de laser e espalhamento dinâmico da luz e nos valores de potencial zeta durante o período de armazenamento de 119 dias. Ao final do período de armazenamento das nanocápsulas, o teor residual de bixina foi de  $45,7 \pm 1,1$  %. Variações significativas nos valores de pH ( $p < 0.05$ ) só ocorreram após 63 dias de armazenamento, alcançando pH final de  $4,48 \pm 0,32$ .

Encapsulamento promoveu a solubilidade da bixina em meio aquoso através da produção de nanocápsulas com características físico-químicas apropriadas de tamanho de

partícula, índice de polidispersidade, potencial zeta, viscosidade e pH semelhantes aos resultados encontrados por outros autores.

Para o experimento de fotossensitização e aquecimento em sistema modelo (Artigo 2), as nanocápsulas de bixina foram produzidas com tamanhos distribuídos em um perfil monomodal, com diâmetro ( $D_{4,3}$ ) de  $195,0 \pm 26,9$  nm. Um experimento preliminar à fotossensitização foi realizado medindo periodicamente o diâmetro (z-diâmetro) das nanocápsulas durante 5 horas em etanol:água (2:8) a 25 °C. Não foi verificada variação significativa ( $p < 0,05$ ) no diâmetro médio das nanocápsulas. Tal fato assegurou que a estrutura das nanocápsulas é fisicamente resistente à solução etanólica.

Os parâmetros cinéticos durante a fotossensitização foram determinados pela quantificação do teor de bixina presente nas soluções de bixina nos sistemas modelo a 5, 15 e 25 °C. Em todas as condições testadas (presença de oxigênio e diferentes temperaturas), a degradação de bixina seguiu uma cinética de degradação de primeira ordem com um coeficiente médio de correlação  $R^2$  acima de 0,99. A perda de bixina foi mais rápida em soluções saturadas de ar do que em soluções saturadas de  $N_2$  devido a formação de oxigênio singlete.

A estrutura das nanocápsulas não impediu que a bixina estabilizasse o sensibilizador rosa de bengala e o oxigênio singlete. Os valores da constante cinética  $k$  foram maiores para bixina livre do que para bixina encapsulada em todas as condições. Do mesmo modo, os valores de energia de ativação em todas as condições demonstraram que o nanoencapsulamento aumentou a estabilidade da bixina. A energia de ativação das nanocápsulas de bixina na presença de oxigênio singlete foi 1,62 maior que a energia de ativação de bixina livre nas mesmas condições.



Durante os experimentos de aquecimento foi verificado que tanto a bixina livre quanto a encapsulada não apresentaram variação no teor ao serem submetidas a 40 °C durante 120 minutos. Em todas as temperaturas testadas (65, 80 e 95 °C), a bixina apresentou cinética de degradação de primeira ordem com coeficiente de correlação  $R^2$  maior que 0,99. Os valores das constantes de velocidade ( $k$ ) para a bixina livre variaram de  $1,16 \times 10^{-4}$  a  $7,25 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  com energia de ativação de 15,06 kcal/mol e os valores de  $k$  de bixina encapsulada variaram de  $1,94 \times 10^{-5}$  a  $3,51 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , com energia de ativação de 23,81 kcal/mol.

Os resultados obtidos demonstraram que a técnica de nanoencapsulamento empregada proporciona tanto o aumento da solubilidade de bixina em meio aquoso quanto sua estabilidade na presença de oxigênio singlete, sensibilizador e alta temperatura. Estudos futuros poderiam ser realizados para diminuir a degradação da bixina durante o armazenamento e estudar os efeitos bioquímicos das nanocápsulas comparado a bixina livre ao serem administradas *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

ABEROUMAND, A. A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. Volume 6, página 71-78, 2011.

AMAN, R., SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of heating and illumination on *trans-cis* isomerization and degradation of  $\beta$ -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 53, páginas 9512- 9518. 2005.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista de Nutrição*. Campinas. Volume 13, nº 2, página 81- 88. 2000.

ANVISA. **Resolução - CNNPA nº 44, de 1977**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44\\_77.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm).

ARTE'S, F.; MÍNGUEZ, M. I.; HORNERO, D. Fruit colour, pigment composition and quality. In: MACDOUGALL, D. B. **Colour in Food: Improving Quality**. CRC Press, Boca Raton, página 269. 2000.

ATESSAHIN, A.; YILMAZ, S.; KARAHAN, I.; CERIBASI, A. O.; KARAOGLU, A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*. Volume 212, página 116- 123. 2005.

BALASWAMY, K.; RAO, P. G. P.; SATYANARAYANA, A.; RAO, D.G. Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. *Swiss Society of Food Science and Technology*. Volume 39, página 952- 956. 2006.

BARBOSA, M. I. M. J.; BORSARELLI, C. D.; MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*. Volume 38, página 989- 994. 2005.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4th edition. Springer. 2009.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*. Volume 281, página 53- 63. 2009.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; BAVARESCO, L.; SALBEGO, C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. *European Journal of Pharmacology*. Volume 586, página 24- 34. 2008.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Compêndio da legislação brasileira de aditivos alimentares. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acessado no dia: 25/01/2012.

BRITTON, G. UV/visible Spectroscopy. IN: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H: **Carotenoids: Spectroscopy**. Birkhauser, Basel. 1995.

BYUN, Y.; WHITESIDE, S.; COOKSEY, K.; DARBY, D.; DAWSON, P. L.  $\alpha$ -Tocopherol-Loaded Polycaprolactone (PCL) Nanoparticles as a Heat-Activated Oxygen Scavenger. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 59, página 1428- 1431. 2011.

CANENE-ADAMS, K.; ERDMAN JR, J. W. Absorption, Transport, Distribution in Tissues and Bioavailability. IN: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids: Nutrition and Health**. Volume 5. Birkhäuser, Basel, 2009.

CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different Annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *Food Science and Technology*. Volume 41, página 1689- 1693, 2008.

CARVALHEIRO, M. C. **Tese de Doutorado**. Liposomes as Nanosystems for the Transport and Delivery of Bioactive Agents. Universidade de Lisboa. Faculdade de Farmácia. Lisboa, 2010.

CARVALHO, P. R. N. Urucum- Avanços Tecnológicos e Perspectivas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Volume 49, n°1. 1999.

CATTANI, V. B.; FIEL, L. A.; JÄGER, A.; JÄGER, E.; COLOMÉ, L. M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; COSTA, T. D.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volume 39, página 116- 124. 2010.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.L.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*. Volume 127, páginas 419- 426, 2011.

COULTATE, T, páginas Food: **The chemistry of its components**. Fourth Edition. RSC, Cambridge, 2002.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Quarta Edição. Artmed, Porto Alegre, 2010.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Natural colorants for food and nutraceutical uses**. CRC Press LLC, Boca Raton, 2003.

DEMING, D. M.; BOILEAU, T. W.-M.; HEINTZ, K. H.; ATKINSON, C. A.; JR., J. W. E. Carotenoids: Linking Chemistry, Absorption, and Metabolism to Potential Roles in Human Health and Disease. IN: CADENÁS, E.; PACKER, L. **Handbook of Antioxidants**. Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.

DI MASCIO, P.; MURPHY, M. E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*. Volume 53, página 194- 200, 1991.

DIAS, V. M.; PILHA, V.; ALVES, L. P.; OLIVEIRA, H, P. M.; MUNIM, E. Optical Characterization in Annatto and Commercial Colorific. *Journal of Fluorescence*. Volume 21, página 415- 421, 2011.

DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*. Volume 44, página 1908- 1914. 2011.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next Millennium. *International Journal of Food Science and Technology*. Volume 35, página 5- 22. 2000.

DUTRA, A. S.; FURTADO, A. A.; PACHECO, S.; NETO, J. O. Efeito do tratamento térmico na concentração de carotenoides, compostos fenólicos, ácido ascórbico e capacidade antioxidante do suco de tangerina murcote. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 15, n. 3, p. 198-207, jul./set. 2012.

EDGE, R.; TRUSCOTT, G. Chapter 14. Properties of Carotenoid Radicals and Excited States and Their Potential Role in Biological Systems. IN Carotenoids: Physical, Chemical and Biological Functions and Properties. LANDRUM, J. J. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 2010.

FANG, Z.; BANDHARI, B. Encapsulation of polyphenols- a review. *Trends in Food Science & Technology*. Volume 21, página 510- 523. 2010.

FERREIRA, V. L. P.; NETO, R. O.; MOURA, S. C. S. R.; SILVA, M. S. Cinética da degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetida a tratamentos térmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Volume 19, nº1. Campinas Jan./Apr. 1999

FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; MENSAH, M.L.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of Bixa orellana. *Fitoterapia*. Volume 74. páginas 136- 138. 2003.

FRANCIS, F. J. Quality as influenced by color. *Food Quality and Preference*. Volume 6, página 149- 155. 1995.

FREITAS, C. A. S.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M.; FERNANDES, A. G. Estabilidade dos carotenoides, antocianinas e vitamina c presentes no suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata*) adoçado envasado pelos processos *hot-fill* e asséptico. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, volume 30, n. 5, p. 942-949, set./out., 2006.

GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: Biochemistry of annatto unveiled. *Trends in Biotechnology*. Volume 21, página 513- 516. 2003.

GLÓRIA, M. B. A.; VALE, S. R.; BOBBIO, P. A. Effect of water activity on the stability of bixin in an annatto extract-microcrystalline cellulose model system. *Food Chemistry*. Volume 52, página 389- 391. 1995.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Review- Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights*. Volume 2, páginas 147- 157. 2007.

HENRY, L. K.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein and 9-*cis* and all-*trans*  $\beta$ -carotene. *Journal of the American Oil Chemists*. Volume 75, páginas 823- 829. 1998.

HOPPE, P. P; KRAMER, K.; VAN DER BERG, H.; STEENGE, G.; VAN VLIET, T. Synthetic and tomato-based lycopene have identical bioavailability in humans. *European Journal of Nutrition*. Volume 42, n° 5, página 272- 278. 2003.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. Volume 36, página 1- 93. Rio de Janeiro, 2009.

JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F.; COLOME, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. Volume 5, página 130- 140. 2009.

JECFA, **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. 67th Meeting on the Joint FAO/WHO Expert Comitee on Food Aditives. Chemical and Technical Assessment (CTA), página 20- 21. 2006.

JUNIOR, A. C.; ASAD, L. M.; OLIVEIRA, E. B.; KOVARY, K.; ASAD, N. R.; FELZENSZWALB, I. Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genetics and Molecular Research*. Volume 4, página 94- 99. 2005.

KILDEGAARD, H.; OLSEN, A.; GABRIELSEN, G.; MOLLER, P.; THYBO, A. K. A method to measure the effect of food appearance factors on children's visual preferences. *Food Quality and Preference*. Volume 22, páginas 763- 771. 2011.

KIOKIAS, S.; GORDON, M.H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chemistry*. Volume 83, página 523- 529. 2003.

KOVARY, K.; LOUVAI, T. S.; SILVA, M. C. C.; ALBANO, F.; PIRES, B. B. M.; LARANJA, G. A. T.; LAGE, C. L. S.; FELZENSZWALB, I. Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. *British Journal of Nutrition*. Volume 85, página 431- 440. 2001.

LI, H.; DENG, Z.; LIU, R.; YOUNG, J. C.; ZHU, H.; LOEWEN, S.; TSAO, R. Characterization of Phytochemicals and Antioxidant Activities of a Purple Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 59, página 11803- 11811. 2011.

LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Improved incorporation and stabilisation of  $\beta$ -carotene in hydrocolloids. *Food Chemistry*. Volume 125, páginas 997- 1004. 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Volume 1. 4<sup>o</sup> ed. Instituto Plantarum. Nova Odessa, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2<sup>o</sup> edição. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LOTSCHERT, W.; BEESE, G. **Tropical plants: Collins Photo Guide**. Harper Collins. London, 1994.

MAYNE, S. T.  $\beta$ -carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*. Volume 10, páginas 690- 701. 1996.

MAYNE, S. T.; JANERICH, D. T.; GREENWALD, P.; CHOROST, S.; TUCCI, C.; ZAMAN, M. B.; MELAMED, M. R.; KIELY, M.; MCKNEALY, M. F. Dietary Beta Carotene and Lung Cancer Risk in U.S. Nonsmokers. *Journal of the National Cancer Institute*. Volume 86, página 33- 38. 1994.

MCCANN, D.; BARRETT, A.; COOPER, A.; CRUMPLER, D.; DALEN, L.; GRIMSHAW, K.; KITCHIN, E.; LOK, K.; PORTEOUS, L.; PRINCE, E.; SONUGA-BARKE, E.; WARNER, J. O.; STEVENSON, J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*. Volume 370, páginas 1560- 1567. 2007.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipídeos. IN: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Quarta Edição. Artmed, Porto Alegre, 2010.

MCCLEMENTS, D.J., 1999. **Food Emulsions. Principles, Practices and Techniques**. Fourth ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.

MCLAREN, D. S. Vitamin A. IN: JR., G. F. C. **The Vitamins: Fundamentals Aspects in Nutrition and Health**. 3rd Edition. Elsevier, San Diego, 2008.

MELLENDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; GÓMEZ-RABELO, J.; MELGOSA, M.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Color of orange juices in relation to their carotenoid contents as assessed from different spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*. Volume 24, página 837- 844. 2011.

MERCADANTE, A. Z. Carotenoids: Sources and Stability during Processing and Storage. IN: SOCACIU, C. **Food colorants:Chemical and Functional Properties**. Crc Press LLC, Boca Raton, 2008.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and Structure Elucidation of minor Carotenoids from Annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochemistry*. Volume 46, N°8, página 1379-1383. 1997.

MIN, D. B.; BOFF, J. M. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 1, página 58- 72. 2002.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and Provitamin A in Functional Foods. IN: HURST, W. J. **Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals**. 2° edition. CRC Press LLC, Boca Raton, 2008.

MONTENEGRO, M. A.; RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z.; NAZARENO, M. A.; BORSARELLI, C. D. Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 52, página 367- 373. 2004.

MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Applied Chemistry*. Volume 78, N° 8, página 1477- 1491. 2006.

MOZAFARI, M. R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A., SUNTRES, Z. E.; SINGH, H. Review Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 86, página 2038- 2045, 2006.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food Applications. *Procedia Food Science*. Volume 1, página 1806- 1815. 2011.

OSGANIAN, S. K.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E.; SPIEGELMAN, D.; MANSON, J. E.; WILLETT, W. C. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *American Journal of Clinical Nutrition*. Volume 77, página 1390- 1399. 2003.

ÖTLES, S.; ÇAGINDI, Ö. Carotenoids as natural colorants. IN: SOCACIU, C. **Food colorants: Chemical and Functional Properties**. Crc Press LLC, Boca Raton, 2008.

PARIZE, A. L.; SOUZA, T. C. R.; BRIGHENTE, I. M. C.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M.; SPINELLI, A.; LONGO, E. Microencapsulation of the natural

urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. *African Journal of Biotechnology*. Volume 7, página 3107- 3114. 2008.

PÉREZ, H. C. L.; SÁNCHEZ, G. M. La Bixa orellana L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Revista Cubana de Farmacia*. Volume 44, n° 2, página 231- 244, 2010.

PESEK, C. A., WARTHESEN, J. J.; TAOUKIS, P. S. A Kinetic model for equilibration of isomeric  $\beta$ -carotenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 41of A 1990.

PIMENTEL, F. A.; STRINGHETA, P. C. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratoras. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*. Volume 3, n° 1, página 53- 57, Viçosa, 1999.

PINTEA, A. M. Synthetic Colorants. IN: SOCACIU, C. **Food colorants: Chemical and Functional Properties**. Crc Press LLC, Boca Raton, 2008.

POLLETO, F. S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*. Volume 28, página 472- 478. 2008.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*. Volume 25, N°8, página 1653- 1666. 2009.

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

QIU, L. Y.; BAE, Y. H. Polymer Architecture and Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*. Volume 23, n° 1, página 1- 30. 2006.

QUINTANA-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a new Process based on Emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*. Volume 15, n° 7. páginas 1056- 1062. 1998.

QUINTANILLA-CARVAJAL, M. X.; CAMACHO-DIAZ, B. H.; MERAZ-TORREZ, L. S.; CHANONA-CÁVEZ, J. J.; ALAMILLA-BELTRÁN, L.; JIMENÉZ-APARICIO, A.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing. *Food Engineering Reviews*. Volume 2, n° 1, página 39- 50, 2010.

RIBEIRO, H. S.; CHUA, B. S.; ICHIKAWA, S.; NAKAJIMA, M. Preparation of nanodispersions containing  $\beta$ -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*. Volume 22, página 12- 17. 2008.

RIOS, A. de O. **Carotenoides de urucum: desenvolvimento de método analítico e avaliação da estabilidade em sistemas-modelo**. Campinas, 2004. 163 páginas. Tese



(Doutorado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos. Departamento de Ciência de Alimentos, UNICAMP.

RIOS, A. de O.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. *Food Chemistry*. Volume, 113. página 1113– 1118. 2009.

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. *Food Additives and Contaminants*. Volume 21, nº 2, páginas125- 133. 2004.

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. 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*. Volume 15, nº 3, página 203- 213, 2004-b.

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 53, :2307- 2311. 2005.

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes and Pigments*. Volume 74, página 561- 565. 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. ILSI, Washington. 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes Brasileiras de carotenoides: **Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. MMA/SBF, Brasília, 2008, 100 páginas.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; GODOY, H. T.; AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*. Volume 21, página 445- 463. 2008-b.

SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E. Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. Volume 15, página 61- 72. 2010.

SCHALCH, W.; BONE, R. A.; LANDRUM, J. T. The functional role of xanthophylls in the primate retina. IN: LANDRUM, J. T. **Carotenoids:Physical and biological functions and properties**. Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2010.

SCHWARTZ, S. T.; VON ELBE, J. H.; GIUSTI, M. M. Corantes. IN: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Quarta Edição. Artmed, Porto Alegre, 2010.

SCOTTER, M. J. Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. *Food Chemistry*. Volume 53, página 177- 185. 1995.

SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; APPLETON, G. P. Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. *Food Chemistry*, 74, 365-375. 2001.

SEKHON, B. S. Food Technology- an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*. Volume 3, página 1- 15. 2010.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D. D.; BENIWAL, V.; SINGH, D.; RAVI KUMAR, M. N. V. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volume 37, página 223- 230. 2009.

SHANKAR, M. U.; LEVITAN, C. A.; SPENCE, C. Grape expectations: The role of cognitive influences in color-flavor interactions. *Consciousness and cognition*. Volume 19, página 380- 390. 2010.

SILVA, C. R.; ANTUNES, L. M.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological Research*. Volume 43, nº 6, página 561- 566. 2001.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; RIBEIRO, C.; AVIDES, M. C.; QUINTAS, M. A. C.; COIMBRA, J. S. R.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions of  $\beta$ -carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. *Journal of Food Engineering*. Volume 102, página 130- 135. 2011.

SILVA, P. I.; NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C. Fatores que Influenciam a reação de saponificação dos carotenoides presentes no urucum (*Bixaorellana* L.). *Ciência e Agrotecnologia*. Volume 33, página 1892-1897. 2009.

SOCACIU, C. Updated Technologies for Extracting and Formulating Food Colorants. IN: SOCACIU, C. **Food colorants: Chemical and Functional Properties**. Crc Press LLC, Boca Raton, 2008.

SPERANZA, G.; MANITTO, P.; MONTI, D. Interaction between singlet oxygen and biologically active compounds in aqueous solution III. Physical and chemical  $^1\text{O}_2$ -quenching rate constants of 6,6'-diapocarotenoids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Volume 8, páginas 51- 61. 1990.

STRINGHETA, P. C.; VOLP, A. C. P.; OLIVEIRA, T. T. Corantes Naturais: Usos e Aplicações como Compostos Bioativos. IN: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos fisiológicos**. Rubio, Rio de Janeiro. 2010.

TAN, C. P.; NAKAJIMA, M.  $\beta$ -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*. Volume 92, página 661–671, 2005.

WATANABE, M.; MUSUMI, K.; AYUGASE, J.; Carotenoid pigment composition, polyphenol content, and antioxidant activities of extracts from orange-colored Chinese cabbage. *Food Science and Technology*. Volume 44, página 1971- 1975. 2011.

WEI, S. T.; OU, L. C.; LUO, M. R.; HTCHINGS, J. B. Optimisation of food expectations using product colour and appearance. *Food Quality and Preference*. Volume 23, página 49- 62. 2012.

XIA, F.; HU, D.; JIN, H.; ZHAO, Y.; LIANG, J. Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. *Food Hydrocolloids*. Volume 26, página 456-463. 2012.

YAHIA, E. M.; ORNELAS-PAZ, J. J. Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. IN: DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability**. Wiley-Blackwell. Ames. 2010.

YEO, Y.; PARK, K. Control of Encapsulation Efficiency and Initial Burst in Polymeric Microparticle Systems. *Archives of Pharmacy Research*. Volume 27, n° 1, página 1- 12. 2004.

YIN, L. J.; CHU, B. S.; BOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of  $\beta$ -carotene nanodispersions. *Food Hydrocolloids*. Volume 23, página 1617- 1622, 2009.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*. Volume 41, página 61- 68, 2008.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M.L.; MERCADO-SILVA, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, E.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion diffusion method for food applications. *Food Science and Technology*. Volume 44, página 1362- 1368. 2010.

ZAMPINI, M.; WANTLING, E.; PHILLIPS, N.; SPENCE, C. Multisensory flavor perception: Assessing the influence of fruit acids and color cues on the perception of fruit-flavored beverages. *Food Quality and Preference*. Volume 19, página 335- 343. 2008.

ZEB, A.; MEHMOOD, S. Carotenoids Contents from Various Sources and Their Potential Health Applications. *Pakistan Journal of Nutrition*. Volume 3, página 199- 204, 2004.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. Overview for microencapsulates for use in food Products or processes and methods to take them. Em. ZUIDAM, N. A.; NEDOVIĆ, V. A: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, New York. 2010.