

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**MICROCÁPSULAS DE BIXINA: OBTENÇÃO, APLICAÇÃO E  
ESTUDOS DE FOTODEGRADAÇÃO EM SISTEMAS-MODELO**

**Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa  
Engenheira de Alimentos - UFRuralRJ  
Mestre em Ciência de alimentos - Unicamp**

**Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante  
Orientadora**

**Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos para  
obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos**

**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B234m      Barbosa, Maria Ivone Martins Jacintho  
Microcápsulas de bixina: obtenção, aplicação e estudos de  
fotodegradação em sistemas-modelo / Maria Ivone Martins Jacintho  
Barbosa. -- Campinas, SP: [s.n.],2009.

Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade  
de Engenharia de Alimentos

1. Bixina. 2. Microencapsulação. 3. Fotodegradação. 4.  
Sistema modelo. 5. Cor. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II.  
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de  
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Microcapsules of bixin: application and photodegradation studies in model-  
systems

Palavras-chave em inglês (Keywords): Bixin, Microencapsulation, Photodegradation, Model  
system, Colour

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Adriana Zerlotti Mercadante

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Florinda Orsatti Bobbio

Mônica Roberta Mazalli

Célia Maria de Sylos

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante (orientador)**

**UNICAMP**

---

**Profa. Dra. Florinda Orsatti Bobbio**

**UNICAMP**

---

**Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso**

**UNICAMP**

---

**Profa. Dra. Mônica Roberta Mazalli**

**USP**

---

**Profa. Dra. Célia Maria de Sylos**

**UNESP**

*“O coração do homem pode fazer planos, mas a resposta certa dos lábios vem do Senhor.” (Provérbios 16:1)*

*Dedico essa vitória a toda à miha família, em especial aos meus amados: pai José Luiz, marido Júnior e filho Vítor Hugo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por não me deixar ser abatida pelo o desânimo ou as dificuldades, por ter me permitido alcançar o meu objetivo e por sempre colocar em meu coração a ESPERANÇA,

À Prof<sup>a</sup> Adriana, pela orientação, confiança, paciência, dedicação, carinho, preocupação e por todos os “puxões de orelha”, importantes para a realização e concretização deste trabalho e para minha formação profissional;

À minha família pelo apoio incansável e incondicional, pela força, pela torcida durante a realização desse trabalho, em especial aos meus amados irmãos (Ana, Dudu, Júnior, João e a Rê), a Sandra (minha “MÃE”dastra), a Borba, a Tias (Vera, Cida, Morena e Lídia) a Gena (que está mais para mãe do que para sogra), aos meus cunhados: Sandro, Sérgio, Sidão e Simone e seus “agregados” (Ju, Fabi, Ana e Galego), meus sobrinhos (Juan, Pedro, Andrea, Biel, Dudu, José, Bibi), tios e tias, primos (Tita, Careca, Arthur e Ale), etc.

Ao meu amado marido, companheiro, incentivador e amigo, (Júnior ou Lucena ou “Juju”...), pelo apoio, amor, paciência, incentivo durante toda a jornada,

Ao meu filho Vítor Hugo, meu dom preciso do céu: *“Há um menino, há um moleque morando sempre no meu coração, Toda vez que o adulto balança ou que a tristeza me alcança, ele vem para me dar a mão...”*,

À minha mãe (Ivone) e tio Miguel, *in memoriam*, que foram grandes incentivadores e que não puderam ver a finalização desse trabalho,

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

Ao CNPq pela bolsa e a FAPESP pelo apoio financeiro concedido,

Às Queridas Prof.<sup>as</sup> Florinda e Neura pelo carinho e torcida para finalização da Tese,

Ao Cosme, secretário da Pós-graduação (FEA), pela grande dose *bônus* de paciência, pela colaboração e auxílio indispensável para a realização deste trabalho,

Às amigas cultivadas na UNICAMP, especialmente a Nádia, André, Lú, Roberto, Itaciara, Alessandro, Veri, Cinthia, Tatiana, Mônica, Gisela e Leila; Carla, Rosemar, Poli,

À minha querida UFRuralRJ pela formação acadêmica, em especial aos professores Djalva e Carlos Alberto (Shalako), grandes exemplos profissionais,

Aos amigos da Rural, da Cefeteq, da Estácio, e todos que forma direta ou indireta contribuíram para realização desse trabalho, OBRIGADA !!!

## ÍNDICE GERAL

<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>xii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xv</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>xviii</b>
<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>xx</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>xxii</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Planta do urucum</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Carotenóides das sementes de urucum</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Aplicação dos corantes de urucum</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Fotodegradação de carotenóides</b> .....	<b>8</b>
<b>5. Microencapsulação</b> .....	<b>13</b>
<b>5.1. Secagem por spray-dryer</b> .....	<b>15</b>
<b>5.2. Material de parede</b> .....	<b>17</b>
<b>5.2.1. Goma arábica</b> .....	<b>19</b>
<b>5.2.2. Maltodextrina</b> .....	<b>21</b>
<b>5.3. Avaliação das propriedades e da qualidade das microcápsulas</b> .....	<b>23</b>
<b>5.4. Microencapsulação de carotenóides</b> .....	<b>25</b>
<b>5.4.1. Aplicação da colorimetria nos estudos de estabilidade de carotenóides microencapsulados</b> 35	
<b>6. Referências bibliográficas</b> .....	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>47</b>
<b>Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations</b> .....	<b>47</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>48</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>49</b>
<b>2. Material and Methods</b> .....	<b>50</b>
<b>2.1. Material</b> .....	<b>50</b>
<b>2.2. Methods</b> .....	<b>51</b>
<b>2.2.1 .Encapsulation</b> .....	<b>51</b>

2.2.2. Model-systems .....	51
2.2.3. Bixin determination .....	53
2.2.4. Microencapsulation efficiency (ME) .....	53
2.2.5. Turbidity (A550nm) .....	54
2.2.6. Solubility .....	54
2.2.7. Microstructure .....	54
3. Results and Discussion .....	55
Conclusions .....	59
Acknowledgments .....	59
References .....	59
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>63</b>
<b>Efeito da Composição do Material de Parede nas Propriedades e na Fotoestabilidade das Microcápsulas de Bixina estocadas em Gel .....</b>	<b>63</b>
1. Introdução .....	65
2. Materiais e Métodos .....	67
2.1. Material .....	67
2.2. Determinação da viscosidade das soluções de polissacarídeos .....	68
2.3. Obtenção das microcápsulas .....	68
2.4. Determinação do rendimento das microcápsulas de bixina .....	69
2.5. Caracterização das microcápsulas .....	69
2.5.1. Bixina total (BT) e bixina de superfície (BS) .....	69
2.5.2. Eficiência de microencapsulação (EM) .....	70
2.5.3. Retenção (Rt) .....	70
2.5.4. Microestrutura .....	70
2.6. Sistema-modelo .....	71
2.6.1. Determinação da atividade de água ( $a_w$ ) .....	72
2.6.2. Determinação de bixina .....	72
2.7. Quantificação de bixina .....	73
2.8. Cálculos cinéticos e análises estatísticas .....	73
3. Resultados e Discussão .....	74
3.1. Influência da composição do material de parede na viscosidade das soluções .....	74

<b>3.2. Influência da composição dos materiais de parede nas propriedades das microcápsulas.....</b>	<b>75</b>
<b>3.3. Estabilidade da bixina em sistema-modelo em gel .....</b>	<b>79</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>84</b>
<b>Referências .....</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>90</b>
<b>Mudanças de cor em maria-mole colorida com bixina microencapsulada .....</b>	<b>90</b>
<b>Palavras-chaves: Microencapsulação, bixina, maria-mole, fotodegradação, cor.....</b>	<b>91</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>92</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>94</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>94</b>
<b>2.2. Obtenção das microcápsulas .....</b>	<b>94</b>
<b>2.3.Caracterização das microcápsulas.....</b>	<b>95</b>
<b>2.4. Sistema alimentício.....</b>	<b>96</b>
<b>2.5. Determinação dos parâmetros de cor .....</b>	<b>97</b>
<b>2.6. Análise dos resultados .....</b>	<b>97</b>
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>97</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>103</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>103</b>
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>106</b>
<b>Efeito da adição de ácido ascórbico nas propriedades e cor de gel adicionado de bixina microencapsulada .....</b>	<b>106</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>108</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>110</b>
<b>2.1. Material .....</b>	<b>110</b>
<b>2.2. Preparo das microcápsulas de bixina .....</b>	<b>110</b>
<b>2.3. Caracterização das microcápsulas.....</b>	<b>110</b>
<b>2.4. Sistemas-modelo em gel .....</b>	<b>112</b>
<b>2.5. Extração de bixina e AA nos sistemas-modelo em gel.....</b>	<b>113</b>
<b>2.6. Quantificação de bixina e de AA .....</b>	<b>114</b>

<b>2.7.</b>	<b>Determinação dos parâmetros de cor .....</b>	<b>114</b>
<b>2.8.</b>	<b>Análise dos resultados .....</b>	<b>115</b>
<b>3.</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>115</b>
<b>3.1.</b>	<b>Efeito da adição do AA nas propriedades das microcápsulas .....</b>	<b>115</b>
<b>3.2.</b>	<b>Efeito da adição do AA na estabilidade da bixina em gel .....</b>	<b>117</b>
<b>3.3.</b>	<b>Degradação do ácido ascórbico .....</b>	<b>120</b>
<b>3.4.</b>	<b>Mudanças na cor do gel .....</b>	<b>122</b>
	<b>Agradecimentos .....</b>	<b>126</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>127</b>
	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>132</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>Tabela 1. Número de trabalhos sobre microencapsulação de aromas e corantes naturais pesquisados na base de dados <i>Web of science</i> em dezembro de 2008</b> .....	<b>25</b>
<b>Tabela 2. Principais estudos sobre microencapsulação de carotenóides por spray-drying, análises de caracterização das microcápsulas ou do pó e as condições utilizadas nos sistemas-modelo.</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>47</b>
<b>Table 1</b> .....	<b>52</b>
<b>Microcapsule composition, efficiency, and lifetimes for the fast (<math>\tau_F</math>) and slow (<math>\tau_S</math>) decay components, and the delay time (<math>t_s</math>) associated with the photodegradation of encapsulated bixin and the lifetime under dark conditions, <math>\tau_D</math>.</b> .....	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>63</b>
<b>Tabela 1</b> .....	<b>75</b>
<b>Viscosidade da solução do material de parede, rendimento (Rd), retenção (Rt) e eficiência do microencapsulamento (EM) das microcápsulas de bixina.</b> .....	<b>75</b>
<b>Tabela 2</b> .....	<b>81</b>
<b>Condições experimentais, intervalo tempo (<math>\Delta t</math>), constantes de velocidade (<math>k_{obs}</math>) e coeficiente de correlação (r) para degradação da bixina nos sistemas-modelo encapsulado e não encapsulado, a 21° C.</b> .....	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>90</b>
<b>Tabela 1. Parâmetros de cor CIELAB da maria-mole colorida com microcápsulas de bixina e bixina não encapsulada, estocadas no escuro e sob luz a 21° C.</b> .....	<b>100</b>
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>106</b>
<b>Tabela 1. Propriedades da microcápsulas de BIX + AA e de BIX.</b> .....	<b>115</b>
<b>Tabela 2. Velocidade de degradação (<math>k_{obs}</math>) da bixina em sistemas de gel.</b> .....	<b>119</b>
<b>Tabela 3. Parâmetros de cor CIELAB dos géis coloridos com microcápsulas de BIX, de BIX+AA, e BIX+AA não encapsulado, estocados a diferentes intensidades de luz, a 21° C.</b> .....	<b>123</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 .....	1
Figura 1. Estrutura química da bixina e da norbixina. ....	4
CAPÍTULO 2 .....	47
Fig. 1. Kinetic degradation curves of encapsulated bixin in aqueous solutions at 21 °C, (a) under illumination (700 lux), (b) in dark conditions. ....	55
Fig. 2. SEM micrographs of spray-dried microencapsulated bixin with (a) gum arabic/sucrose (95:5), (b) maltodextrin 20 DE/sucrose (80:20), (c) 100% maltodextrin 20 DE (d) maltodextrin 20 DE/Tween 80 (99.8:0.2) .....	56
CAPÍTULO 3 .....	63
Fig. 1. Gráfico de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) versus taxa de cisalhamento ( $\gamma$ ) para as soluções dos materiais de parede MD/GA <sub>1:1</sub> e MD/GA <sub>4:1</sub> . ....	74
Fig. 2. Microcápsulas de bixina (a) MD/GA <sub>1:1</sub> com aceleração de 5 Kv (b) MD/GA <sub>4:1</sub> com aceleração de 10 Kv Aumento de 1.300 X. ....	78
Fig. 3. Curvas cinéticas de degradação da bixina microencapsulada e não encapsulada em sistema gel (a) exposto a luz fluorescente (700 lux) e (b) estocado no escuro, ambos a 21 °C. ....	80
CAPÍTULO 4 .....	90
Figura 1. Mudanças nos parâmetros de cor $a^*$ e $b^*$ (A) e $C^*$ (B) em amostras de maria-mole armazenadas na presença de luz e de ar a 21 °C. ....	101
CAPÍTULO 5 .....	106
Fig. 1. Curvas cinéticas de degradação da bixina (BIX) encapsulada com ou sem (AA) e BIX+AA não encapsulado durante a exposição a 1300 (A) ou a 2100 lux (B), em gel a 21° C. ....	118
Fig. 2. Curva cinética de degradação do ácido ascórbico em microcápsulas de BIX+AA e BIX+AA não encapsulado durante estocagem a 0, 1300 e 2100 lux, em gel a 21° C. ....	121
Fig.3. Correlação da % bixina residual das microcápsulas BIX + AA (o), microcápsulas BIX (●) e BIX + AA não encapsulada (Δ) com as coordenadas colorimétricas $a^*$ (A) e $b^*$ (B), durante a exposição a 1300 lux a 21° C. ....	125

## RESUMO GERAL

A bixina foi extraída de sementes de urucum e purificada através de sucessivas cristalizações. A seguir a bixina foi encapsulada por atomização, utilizando-se como materiais de parede diferentes misturas com goma arábica (GA), maltodextrina 20 dextrose equivalente (MD) e sacarose (Sac), com ou sem o emulsificante Tween 80. Todas as soluções de materiais de parede foram preparadas com 40% de sólidos totais em “spray-dryer” operando a 180° C e diâmetro de bico injetor de 0,07 mm. As características de todas as microcápsulas foram avaliadas e a estabilidade das microcápsulas de bixina foi estudada em sistemas aquoso, gel e sólido (maria-mole), expostos a diferentes intensidades de luz. Na primeira etapa deste trabalho foram testados os seguintes materiais de parede: 95% GA+ 5% Sac, 100% maltodextrina, 99,8% maltodextrina + 0,2% Tween 80, e 80% maltodextrina+ 20% Sac para a microencapsulação de bixina. Foram determinados os seguintes parâmetros: eficiência da microencapsulação, morfologia, solubilidade das microcápsulas de bixina, além da estabilidade em sistema-modelo aquoso sob luz (700 lux) e no escuro, a 21° C na presença de ar. As microcápsulas elaboradas com 95% GA + 5% Sac ou 99,8 % maltodextrina + 0,2 % Tween 80 foram as que apresentaram melhor eficiência da microencapsulação, 86 e 75%, respectivamente e, além disso, conferiram maior estabilidade a bixina durante a exposição à luz ou na estocagem no escuro. Em todos os sistemas encapsulados expostos à luz, a bixina apresentou duas etapas de degradação, que se ajustaram a cinética de primeira ordem. Na etapa seguinte, misturas de maltodextrina e goma arábica nas proporções de 1:1 e 4:1 foram utilizadas como materiais de parede para microencapsulação de bixina. A viscosidade das soluções dos materiais de parede foi determinada, bem como as seguintes propriedades das microcápsulas: retenção após secagem, rendimento, eficiência da microencapsulação e morfologia. Foi verificado

que a solução de MD/GA<sub>1:1</sub>, de maior viscosidade ( $38,72 \pm 0,26$  cP), originou microcápsulas com maiores valores de retenção de bixina, rendimento de pó e eficiência da microencapsulação em comparação com a solução menos viscosa de MD/GA<sub>4:1</sub>. Apesar das diferenças observadas, apenas o rendimento e a eficiência do microencapsulação foram significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ). A fim de se testar a estabilidade da bixina em um sistema sólido, a degradação foi avaliada em gel exposto na presença e ausência de luminosidade, ambos na presença de ar. Neste sistema, as microcápsulas obtidas com MD/GA<sub>1:1</sub> foram as que conferiram maior estabilidade à bixina na presença e ausência de luminosidade. No gel, a cinética de degradação da bixina microencapsulada foi de ordem zero, sendo que foram observadas três etapas de degradação, enquanto que degradação da bixina não encapsulada ocorreu em apenas uma etapa. Conforme o esperado, a bixina encapsulada foi mais estável que a não encapsulada, com valores de  $k_{obs}$  aproximadamente 13 a 15 vezes menores em comparação aos respectivos sistemas com bixina não encapsulada. As bixina encapsulada com MD:GA na proporção 1:1 foi utilizada como corante de maria-mole e a alteração da cor instrumental (sistema CIELab) foi avaliada sob 1300 lux e no escuro. Visualmente, a maria-mole colorida com bixina encapsulada apresentou alaranjado mais intenso do que a colorida com bixina não encapsulado. Como esperado, a luz apresentou um efeito deletério na coloração da maria-mole, verificado pela gradual diminuição das coordenadas de cor  $a^*$  e  $b^*$ , sendo mais intenso na colorida com bixina livre do que na colorida com microcápsulas de bixina. Não foram observadas alterações do  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  na maria-mole estocada no escuro durante 130 horas. Na última etapa deste estudo foi avaliado o efeito da adição de um antioxidante natural, ácido ascórbico (AA), nas propriedades e estabilidade da bixina encapsulada com MD:GA (1:1) em gel exposto a diferentes luminosidades (0, 1300 e 2100 lux), na presença de ar a  $21 \pm 2^\circ$

C. Como controle foi utilizado gel colorido com bixina não encapsulada acrescido de AA. Além do teor de bixina, paralelamente também foi avaliada instrumentalmente a perda de cor das amostras utilizando-se o sistema CIELab. Conforme o esperado a luminosidade teve um efeito deletério na estabilidade da bixina, refletido na diminuição dos parâmetros  $a^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$ . A cinética de degradação da bixina foi de ordem zero, sendo que nos géis coloridos com microcápsulas foram observadas três etapas de fotodegradação, enquanto que nos coloridos com bixina não encapsulada foi observada apenas uma etapa. No escuro, a degradação da bixina também apresentou apenas uma etapa. Por outro lado, os teores de AA praticamente não sofreram alteração na presença de luz.

## SUMMARY

Bixin was extracted from annatto seeds and purified through cristalizations followed by encapsulation by spray-dryer. The wall materials used were different blends of gum Arabic (GA), maltodextrin 20 dextrose equivalent (MD) and sucrose (Suc), with and without emulsifier Tween 80. All the wall materials solutions were prepared with 40% total solids in a spray-dryer operating at 180° C with aspersion nozzle diameter of 0.07 mm. The characteristics of all microcapsules were evaluated and the stability of bixin microcapsules was monitored in model-systems, either in water, in gel or solid ("maria-mole"), exposed to different light intensities. In the first stage of the present study, the following wall materials were tested for bixin microencapsulation: 95% GA+ 5% Suc, 100% maltodextrin, 99.8% maltodextrin+0.2% Tween 80, and 80% maltodextrin+20% SUC. The microencapsulation efficiency and morfology were evaluated, along with the stability of the bixin microcapsules in an aqueous model-system under light (700 lux) and in the dark, both at 21° C in the presence of air. The microcapsules containing 95% GA+ 5% Suc and 99,8 % maltodextrin+0.2 % Tween 80 showed the highest encapsulation efficiency, respectively 86% and 75%, less superficial imperfections and higher stability under ligt and in the dark as compared to bixin encapsulated with maltodextrin alone or blended with sucrose. The kinetic behavior of bixin photodegradation in all encapsulated systems was composed by two first-order decays. In the next stage, blends of maltodextrin and gum Arabic at 1:1 and 4:1 proportions were used as wall materials for bixin microencapsulation. The viscosity of the wall material solutions was determined, as well as the following microcapsules properties: retention after dying, yield, microencapsulation efficiency and morfology. Bixin degradation was evaluated in gel exposed to the presence and absence of light, both under air. The MD/GA<sub>1:1</sub> solution presented the highest viscosity ( $38.72 \pm 0.26$  cP), furnishing

microcapsules with higher values of bixin retention, powder yield and microencapsulation efficiency as compared to the MD/GA<sub>4:1</sub> solution with lower viscosity. Although these differences were observed, only the yield and microencapsulation efficiency were significantly different ( $p \leq 005$ ). Bixin microcapsulated with MD/GA<sub>1:1</sub> was more stable under light or dark in the gel model-system. The degradation of both microencapsulated bixin followed zero-order kinetics, with three degradation steps, whilst not encapsulated bixin showed one degradation step. As expected, microencapsulated bixin was more stable than that not encapsulated, with  $k_{obs}$  values *ca.* 13 to 15 times lower as compared to the correspondent systems with not encapsulated bixin. Bixin encapsulated with MD:GA (1:1) was added as colorant in "maria-mole" and color parameters (CIELab) changes were evaluated under 1300 lux and in the dark. Visually, "maria-mole" samples colored with bixin microcapsules showed a more intense orange color as compared to maria-mole colored with not encapsulated bixin. As expected, the color parameters  $a^*$  and  $b^*$  decreased under light, and this decrease was higher in "maria-mole" colored with not encapsulated bixin. No changes in  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values were observed in "maria-mole" stored in the dark during 130 hours. In the last stage, the effect of addition of a natural antioxidant, ascorbic acid (AA), on the microcapsules properties and bixin stability microencapsulated with MD:GA (1:1) was evaluated in a gel system exposed to different light intensities (0, 1300 e 2100 lux) at  $21 \pm 2^\circ$  C in the presence of air. Bixin+AA, both not encapsulated, were used as control. Besides the levels of bixin, color was measured in a spetrocolorimeter using the CIElab system to evaluate the changes in the gel-systems. As expected, light was the main factor that caused loss of bixin, which was reflected on the decrease of the  $a^*$ ,  $b^*$  and  $C^*$  color parameters. The bixin degradation followed zero order kinetics, with three fotodegradation steps in the systems colored with both microcapsules, whilst not

encapsulated bixin+AA showed one degradation step. In the dark, bixin degradation occurred in only one kinetic step. On the other hand, the AA levels remained practically unchanged in the presence and absence of light.

## INTRODUÇÃO GERAL

Entre os atributos que determinam a qualidade dos alimentos, a cor é o fator que mais influencia sua aceitação por interferir diretamente na decisão do consumidor. Assim, os corantes artificiais ou naturais são adicionados aos produtos alimentícios para conferir, intensificar ou restaurar sua coloração original (Downham & Collins, 2000). Além disso, a utilização de corantes naturais nos produtos alimentícios vem se intensificando nos últimos anos, devido às exigências do mercado consumidor.

Os carotenóides são pigmentos naturais que conferem aos alimentos tons que variam do amarelo ao vermelho intenso. Além do poder corante, alguns carotenóides se destacam por apresentarem atividade pró-vitáminica A e outras funções benéficas como proteção contra certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular e fortalecimento do sistema imunológico (Krinsky & Johnson, 2005). A atividade antioxidante desses pigmentos, que combate a ação dos radicais livres e do oxigênio singlete (Morganti & Fabrizi, 2002) no organismo humano e nos alimentos, também tem sido bastante estudada pela comunidade científica nos últimos anos.

As propriedades, ações e funções dos carotenóides estão intimamente ligadas a sua estrutura, a qual apresenta um sistema de ligações duplas conjugadas que gera uma nuvem de elétrons  $\pi$  que se desloca sobre a cadeia poliênica, proporcionando a estas substâncias absorção de luz na região do visível e alta reatividade química. Como consequência desta estrutura, os carotenóides podem sofrer isomerização geométrica e oxidação durante o processamento e armazenamento de alimentos, culminando na diminuição ou perda do poder corante e da atividade biológica (Mercadante, 2008).

Assim, nos últimos anos, grande atenção tem sido dirigida aos experimentos que avaliem a estabilidade desses pigmentos em diferentes meios, bem como, às técnicas capazes de estabilizá-los. Uma das alternativas para proteger e controlar a liberação de um ingrediente de alimentos é a microencapsulação (Shahidi & Han, 1993). Nessa técnica, o ingrediente de interesse (recheio ou núcleo) é envolvido com uma camada polimérica (material de parede ou agente encapsulante) que atua como um filme protetor (Ré, 2000), diminuindo a exposição do recheio aos fatores indesejáveis do processamento e estocagem, além de permitir a liberação controlada desse ingrediente no meio e melhorar sua solubilidade em meio aquoso (Winning, 1995).

Dentre os carotenóides de grande interesse, destacam-se os extraídos do urucum, um arbusto perene originário da América do Sul, mais especificamente da região Amazônica, também cultivado em outras partes do mundo de clima tropical como a América Central, a África e a Ásia (Mercadante & Pfander, 1998). Esses pigmentos são amplamente utilizados na coloração de molhos, margarinas, snacks e queijos (Satyanarayana et al., 2003) e correspondem a cerca de 70 % dos corantes utilizados mundialmente e 90% dos utilizados no Brasil (Carvalho, 1999).

A bixina é o carotenóide majoritário do extrato de urucum, correspondendo a aproximadamente 80% dos carotenóides totais (Preston & Rickard, 1980). Como a maioria dos carotenóides, a bixina é sensível a fatores como alta temperatura, luminosidade, oxigênio e baixo pH, limitando seu emprego em alguns produtos alimentícios. Face à alta sensibilidade às condições citadas, a microencapsulação é uma alternativa que deve ser investigada com o intuito de aumentar a estabilidade da bixina durante o processamento e estocagem dos alimentos. A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura investigou a aplicação desta técnica ao  $\beta$ -caroteno ou licopeno e poucos estudaram os carotenóides de

urucum, em especial a bixina. Adicionalmente, muitos desses estudos apenas obtiveram e/ou avaliaram as propriedades das microcápsulas, sendo necessário complementá-los com estudos que avaliem a estabilidade desses encapsulados em sistemas-modelo. Geralmente nos estudos de estabilidade de carotenóides livres ou encapsulados em sistemas alimentícios e modelos, a temperatura, atividade de água e umidade relativa são os principais alvos, sendo necessário que o efeito da luz seja investigado, uma vez que, a exposição dos alimentos a luz durante o processamento e a estocagem, com o uso de embalagens transparentes, é muitas vezes inevitável e acarreta perdas significativas do conteúdo dos carotenóides devido à fotodegradação (Najar et al., 1988; Lee & Chen, 2002; Jia et al., 2007).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, P. R. N. Annatto: technological advances and perspectives. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion** 49, 71S-73S, 1999.

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

JIA, M., KIM, H. J.; MIN, D. B. Effects of soybean oil and oxidized soybean oil on the stability of  $\beta$ -carotene. **Food Chemistry**, 103, 695-700, 2007.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, 26, 459-516, 2005

LEE, M. T.; CHEN, B. H: Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. **Food Chemistry**, 78, 425-432, 2002.

MERCADANTE, A. Z. Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In **Food Colorants: Chemical and Functional Properties**. C. Socaciu (Ed.), Boca Raton: CRC Press, pp. 213-240, 2008.

MERCADANTE, A. Z., PFANDER, H. Carotenoids from annatto: A review. **Agricultural Food Chemistry**, 2, 79-91, 1998.

MORGANTI P, FABRIZI G. Protective effects of carotenoids. **Agro-Food-Industry Hi-Technology**, 13, 27-29, 2002.

NAJAR, S. V., BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effect of light, air, antioxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana L.*). **Food Chemistry**, 29, 283-289, 1988.

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

RÉ, M. I. Cápsulas inteligentes. **Ciência Hoje**, 27: 24-29, 2000.

SATYANARAYANA, A; RAO, P. G. P., RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana L.*). **Journal of Food Science and Technology Mysore**, 40: 131-141, 2003.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 33: 501-547, 1993.

WINNING, M. Micro-encapsulated colours - natural colours with improved stability. **Agro Food Industry Hi-Technology**, 6, 13-15, 1995.

## OBJETIVOS

Com base no exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar diferentes preparações de polissacarídeos para microencapsulação da bixina utilizando a técnica de spray-drying, verificar as características das microcápsulas formadas e avaliar a estabilidade das microcápsulas de bixina em diferentes sistemas.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a goma arábica, a maltodextrina e a sacarose como material de parede para microencapsulação por spray-dryer,
2. Desenvolver uma metodologia específica para determinação de bixina total e de superfície das microcápsulas,
3. Caracterizar as diferentes microcápsulas de bixina,
4. Estudar os parâmetros cinéticos da degradação da bixina encapsulada e não encapsulada em diferentes sistemas-modelo em diferentes condições de luminosidade,
5. Avaliar as mudanças de cor, através de medida instrumental, em um sistema alimentício,
6. Avaliar o efeito da adição de ácido ascórbico nas propriedades das microcápsulas e na fotoestabilidade da bixina em gel. Correlacionar os parâmetros cinéticos de degradação da bixina com as mudanças de cor do gel.

# *CAPÍTULO 1*

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. Planta do urucum

O urucum (*Bixa orellana* L.) é um arbusto perene originário da América do Sul, mais especificamente da região Amazônica, também cultivado em outras regiões do mundo de clima tropical como a América Central, a África e a Ásia (Mercadante & Pfander, 1998). No Brasil, o urucum também é conhecido vulgarmente por urucu-uva, bixa e açafroa da terra (Franco et al., 2002).

Segundo Filgueira & Peixoto (2002), a única espécie cuja identificação não gerou dúvidas foi o urucum, descrita com admirável precisão por Pedro Vaz de Caminha, na Carta enviada ao Rei de Portugal D. Manoel I, em abril de 1500:

*"Traziam alguns deles uns ouriços verdes, de árvores, que, na cor, queriam parecer de castanheiros, embora mais e mais pequenos. E eram aqueles cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagados entre os dedos, faziam tintura vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam"* (linhas 628 a 630).

No trecho citado, Caminha faz referência a uma prática que os Índios brasileiros conservam até os dias de hoje, a de tingir sua pele e artefatos com extrato extraído das sementes do urucum (Sandi Cuen & Becerra, 2003).

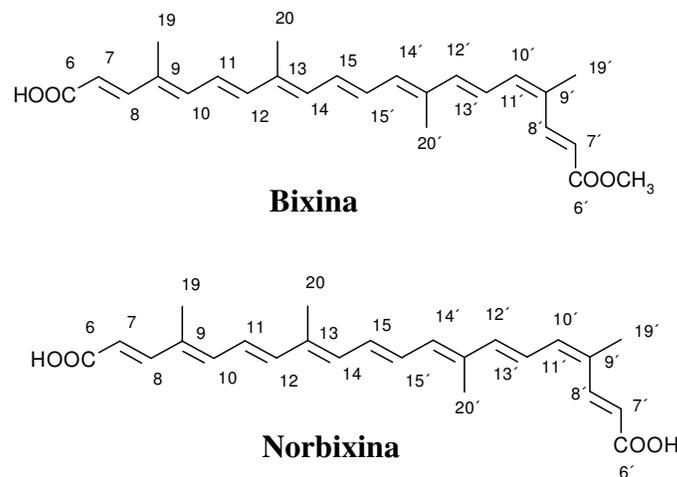
O maior produtor e exportador das sementes de urucum é o Peru, que responde por 35% da produção mundial, seguido do Brasil e do Quênia (Satyanarayana et al., 2003). Dentre os maiores consumidores das sementes ou do extrato de urucum destacam-se os Estados Unidos, Japão, países europeus como Inglaterra, França e Alemanha e ainda China, Índia, Brasil e Argentina (Sandi Cuen & Becerra, 2003).

No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de sementes de urucum no ano de 2005 foi de 13,6 mil toneladas (ton), destacando-se as regiões Sudeste, Norte e Nordeste que responderam, respectivamente, por 41, 27 e 22 % do total produzido ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)). Os principais estados produtores brasileiros são: São Paulo, Paraíba, Pará, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Piauí, Rondônia e Paraná (Toledo de Oliveira et al., 2004). Em 2005, o Estado de São Paulo foi o maior produtor com 4162 ton de sementes, ou seja, aproximadamente 30% da produção nacional, seguido de Rondônia e do Pará, com 2146 e 1410 ton, respectivamente ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

Acredita-se que as folhas e raízes do arbusto de urucum possuem várias propriedades, sendo utilizadas pela medicina popular no tratamento de disenteria, amidalite, dores pulmonares, além da aplicação como repelente, estimulante, afrodisíaco e laxante (Sandi Cuen & Becerra, 2003). Entretanto, as sementes são a principal justificativa econômica do urucuzeiro, pois servem de matéria-prima para diversos setores industriais principalmente os alimentícios, têxteis, farmacêutico e de cosméticos.

O fruto do urucuzeiro, denominado cápsula ou cachopa, contém em seu interior em média de 40 a 50 sementes por cápsula. As sementes são cobertas por um arilo polposo com tonalidade variando desde laranja ao vermelho.

Os pigmentos mais importantes das sementes do urucum são a bixina e norbixina (Figura 1). Ambos pertencem a classe dos carotenóides, sendo que, a norbixina é encontrada em pequenas quantidades na semente, e a bixina, é o principal pigmento presente, perfazendo aproximadamente 80% do total de carotenóides (Preston & Rickard, 1980).



**Figura 1.** Estrutura química da bixina e da norbixina.

O teor de bixina varia com o cultivar da planta cultivada e as condições ecológicas de cada região, podendo variar de 1 a 6% (Rebouças & São José, 1996). Segundo Franco et al (2002), o teor de bixina é um dos parâmetros utilizados para classificar a qualidade das sementes em: tipo 1 quando contém acima de 2,5 %, tipo 2 com 2,0-2,5 % e tipo 3 quando contém até 1,8 % de bixina. Para que a semente seja classificada como tipo exportação, o teor de bixina deve ser de no mínimo 2,7 % (Satynarayana et al., 2003).

Os principais cultivares de interesse para as regiões produtoras são: Peruana Paulista (São Paulo), Bico de Pato (Bahia), Piave Vermelha (Pará), Piave Vermelha Grande, Bico de Calango, e Verde Amarela (Paraíba).

O Brasil, nos últimos anos, tem obtido importantes avanços a partir dos trabalhos desenvolvidos sobre melhoramento das sementes de urucum, visando não apenas a produtividade, mas também o aumento do teor de bixina. Várias entidades como a Sociedade Brasileira de Corantes Naturais (SBCN), com sede em Vitória da Conquista, a

Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (Emepa), Universidade Federal de Viçosa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), dentre outras tem contribuído para o melhoramento genético da cultura do urucum.

Franco et al. (2002) compararam a produtividade e os teores de bixina nas seguintes cultivares de urucum: Embrapa 1 e 2, Bico de pato 20 e 22, Piave, Casca vermelha e Casca verde, cultivadas em João Pessoa (Paraíba) no ano de 2000. Após 850 dias de plantio, a produtividade ficou em torno de 550 kg/ha, enquanto que o teor de bixina variou de 1,75 a 4,00%, sendo a Embrapa 2 e 1 as cultivares que apresentaram os maiores teores, 4,00 e 3,61%, respectivamente, e a cultivar que apresentou maior produtividade foi a Bico de pato 20 com 943 Kg/ha.

## **2. Carotenóides das sementes de urucum**

Conforme mencionado anteriormente, a bixina (metil hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) é o carotenóide majoritário nas sementes de urucum. Este pigmento é um diapocarotenóide (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>), solúvel em solventes orgânicos que possui em suas extremidades um ácido carboxílico e um éster metílico (Figura 1). Esse carotenóide apresenta a peculiaridade de ter sido encontrado apenas em sementes de urucum e de apresentar como forma mais estável a configuração *cis*, diferentemente do β-caroteno que é encontrado majoritariamente em alimentos na configuração *all-trans* e está amplamente distribuído na Natureza.

A norbixina (6,6'-diapocaroteno-6,6'-ácido dióico) (Figura 1), apesar de estar presente em pequenas quantidades nas sementes de urucum, pode ser obtida durante a

extração dos pigmentos de urucum com álcali (KOH) em meio aquoso devido à saponificação da bixina. Este pigmento também é um diapocarotenóide com configuração *cis*, e quando o ácido carboxílico dos dois grupos terminais está na forma iônica, o sal de norbixina é solúvel em água.

Outros carotenóides presentes em pequena quantidade foram isolados e identificados por Mercadante et al. (1996, 1997 a e b, 1999). O carotenóide 9'-*cis*-apo-6'-licopenoato (C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>) foi isolado por cromatografia em camada delgada e por coluna aberta e identificado por meio de espectros UV-Visível e ressonância magnética nuclear (RMN) por Mercadante et al. (1996), que também confirmaram a presença de fitoeno, fitoflueno, ζ-caroteno e neurosporeno por espectrometria de massas (EM). Cinco novos apocarotenóides foram isolados por cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa e identificados por RMN: metil 8'-apo-β-carotenoato (C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>), metil 7-*cis*,9-*cis*,9'-*cis*-apo-6'licopenoato (C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>), metil 9-*cis*-apo-8'-licopenoato (C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>), metil apo- 8'-licopenoato (C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>) e metil apo-6'-licopenoato (C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>) (Mercadante et al., 1997a). Na continuação desse trabalho, o dimetil 9-*cis*-9'-*cis*-6, 6'-daipocaroteno-6-6'-dioato (C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>) e metil 9-*cis*- 10'-oxo-6,8'-diapocaroteno-6-dioato (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>) foram relatados por Mercadante et al. (1997b). Posteriormente, Mercadante et al. (1999) isolaram e identificaram três novos diapocarotenóides esterificados com geranilgeraniol: 6-geranilgeranil 8'-metil-6,8'-diapocaroteno-6,8'-dioato (C<sub>43</sub>H<sub>60</sub>O<sub>4</sub>), 6-geranilgeranil 6' metil 9-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (C<sub>45</sub>H<sub>62</sub>O<sub>4</sub>) e 6-geranilgeranil 6' metil-6, 6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (C<sub>45</sub>H<sub>62</sub>O<sub>4</sub>).

### **3. Aplicação dos corantes de urucum**

Comercialmente, as preparações de urucum estão disponíveis na forma lipo- e hidrossolúveis, como suspensões, emulsões, encapsulados ou em pó nas quais predominam a bixina e norbixina, respectivamente. Essas formulações podem ser aplicadas a massas alimentícias, produtos extrusados a base de cereais, produtos de salsicharias e de confeitaria, margarinas, carnes e produtos cárneos, molhos e condimentos, bebidas entre outros (Satyanarayana et al., 2003).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) é o órgão que regulariza o uso dos corantes alimentícios determinando em quais alimentos podem ser adicionados e os limites máximos permitidos. O MS segue as recomendações do Comitê da FAO/OMS “Joint Expert on Food Additives (JECFA)”, que nos anos 70, após uma série de estudos toxicológicos, reduziu a ingestão diária aceitável (IDA) para os extratos de urucum de 1,25 mg/kg para 0,065 mg/Kg de peso corpóreo (p.c), expressos em bixina (FAO/WHO, 1982). Na época uma das alegações, era de que pouco se conhecia sobre a composição do urucum e de suas preparações (Mercadante & Pfander, 2001). No entanto, estudos realizados na Bahia em 1998 estimaram uma ingestão potencial de bixina/norbixina na faixa de 0,097-0,14 mg/Kg de p.c. (Mascarenhas & Toledo, 1999), ou seja, bem acima da recomendada pelo MS. O consumo do urucum faz parte do hábito alimentar dos indivíduos, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e até o momento não foi observada uma relação direta entre o elevado consumo destes corantes com qualquer tipo de doença (Toledo, 1999). Após o 67º Encontro do JECFA, ocorrido em Roma em julho de 2006, os valores da IDA para os carotenóide presentes do extrato de urucum foram reavaliados sendo estabelecida uma faixa de 0 a 12 mg/Kg de p.c para bixina e de 0 a 0,6 mg/Kg de p.c para norbixina e seus sais de sódio ou potássio (FAO, 2006).

Atualmente, o MS permite o uso dos carotenóides de urucum em 10 categorias de produtos, que abrangem gelados comestíveis, balas e similares, massas alimentícias, biscoitos e produtos de panificação, cereais e/ou produtos a base de cereais, carnes, sopas, molhos e condimentos, bebidas não alcoólicas e não gaseificadas, sobremesas e preparações culinárias industriais, além de suplementos vitamínicos e/ou de minerais, em percentuais que variam de 0,001 a 0,02% bixina ou norbixina ([www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)). Contudo é na culinária doméstica, que o urucum é mais utilizado na forma de condimento popularmente conhecido como colorífico ou “colorau”, principalmente na região Nordeste ou em áreas de maior concentração da população nordestina, pela tradição no consumo deste corante natural. Segundo Franco et al. (2002), da produção brasileira de sementes de urucum, 60% destinam-se à fabricação do colorífico, sendo o restante destinado às indústrias de corantes e para exportação.

#### **4. Fotodegradação de carotenóides**

A exposição dos alimentos à luz durante o processamento ou pelo uso de embalagens transparentes é muitas vezes inevitável, entretanto pode acarretar perdas de compostos fotossensíveis, como os carotenóides. O longo sistema de ligações duplas conjugadas presente na estrutura desses pigmentos os torna susceptíveis à ação da luz acarretando perda da coloração original dos alimentos, devido à isomerização da forma *trans* para *cis*, oxidação ou degradação a compostos incolores (Pesek & Warthesen; 1990; Lee & Chen, 2002; Aman et al., 2005; Meléndez-Martínez et al., 2004; Montenegro et al., 2005).

Nos diversos estudos de fotodegradação de carotenóides em sistemas-modelo líquidos, o modelo cinético de primeira ordem foi o predominante (Pesek & Warthesen, 1987; 1988; 1990, Najar et al., 1988; Barbosa et al., 2005). Entretanto, outros modelos com o de ordem zero foi reportado por Minguez-Mosquera & Jaren-Galan (1995) na descoloração de  $\beta$ -caroteno em solventes orgânicos e o de segunda ordem, na fotodegradação da bixina em oleoresina de urucum (Balaswamy et al., 2006). Fatores como a estrutura química do carotenóide, o comprimento de onda ( $\lambda$ ) da luz monocromática, a presença e intensidade da luminosidade, a composição química e a estrutura física do meio (líquido ou sólido) influenciam na fotoestabilidade dos carotenóides (Pesek & Warthesen, 1987; Pesek & Warthesen, 1988; Najar et al., 1988; Arita et al., 2004; Milanowska & Gruszecki, 2005; Balaswamy et al., 2005, Jia et al., 2007).

Pesek & Warthesen (1987) avaliaram o efeito da estrutura química na estabilidade de carotenóides de suco de vegetais expostos a 230 ft-c (2475 lux) ou estocado no escuro, ambos a 4° C. A luz acelerou a degradação dos carotenóides e o licopeno foi mais estável a fotodegradação apresentando perda de 25%, enquanto que o  $\beta$ - e  $\alpha$ -caroteno apresentaram perda de 75%, após 4 dias de estocagem. As velocidades de degradação ( $k$ ) foram de 0,0061, 0,073 e 0,309 dias<sup>-1</sup>, para licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, respectivamente. Por outro lado, Aman et al. (2005) verificaram que a estrutura química do carotenóide não influenciou na degradação de all-*trans*-luteína e de all-*trans*- $\beta$ -caroteno em tolueno quando expostos à 3750 lux à 20 °C. Após 60 minutos de exposição à luz, o  $\beta$ -caroteno e a luteína apresentaram retenção praticamente igual, 80,6% e 80,4%, respectivamente. A luminosidade promoveu um ligeiro aumento na concentração de isômeros *cis* do  $\beta$ -caroteno e da luteína.

Pesek & Warthesen (1988) verificaram a importância da composição do meio na degradação do  $\beta$ -caroteno em dispersões de gelatina/açúcar e goma arábica/açúcar, ambas expostas a 250 ft-c (2690 lux) a 28 °C. Em goma arábica, o carotenóide apresentou  $k$  de 0,712 dias<sup>-1</sup>, enquanto que em gelatina foi de 0,042 dias<sup>-1</sup>. Além disso, na dispersão de goma arábica houve pequena formação de isômeros *cis*, enquanto que, na de gelatina foi observada formação de cerca de 40% de isômeros geométricos. Em um estudo posterior, Pesek & Warthesen (1990) avaliaram o efeito da luz na isomerização de all-*trans*- $\beta$ -caroteno em meio aquoso exposto a 2690 lux ou estocado no escuro a 28 °C. Embora tenha ocorrido isomerização *trans* para *cis* na luz e no escuro, a degradação do all-*trans*- $\beta$ -caroteno à compostos incolores foi a reação predominante sob luz, com  $k$  de 0,044 dias<sup>-1</sup>.

O efeito da intensidade da luminosidade (430 lux, 1380 lux e escuro), do tipo de atmosfera (O<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>) e da interação desses fatores na estabilidade de bixina em clorofórmio foi estudada por Najjar et al. (1988). A intensidade da luz foi o fator determinante para a degradação da bixina, pois o carotenóide foi mais estável no escuro, seguido do tratamento com 430 lux e do 1380 lux; além disso, não foi verificada influência da presença de O<sub>2</sub> na estabilidade. A cinética de degradação nos experimentos estudados foi de primeira ordem com  $k$  de  $2,4 \times 10^{-2}$  dia<sup>-1</sup> e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de 28 dias no tratamento com 430 lux e O<sub>2</sub>, enquanto que no tratamento a 1380 lux e O<sub>2</sub> o  $k$  foi de  $17,4 \times 10^{-2}$  dia<sup>-1</sup> e o  $t_{1/2}$  de 4 dias, e no controle (escuro e O<sub>2</sub>), o  $k$  foi de  $0,9 \times 10^{-2}$  dia<sup>-1</sup> e o  $t_{1/2}$  de 75 dias.

Minguez-Mosquera & Jaren-Galan (1995) estudaram a degradação do  $\beta$ -caroteno e da capsantina em diferentes solventes (ciclohexano, etanol absoluto e água), sob luz fluorescente (1000 lux) e no escuro, sob 15, 25, 35 e 45 °C. Foi observada a influência do tipo de meio nos perfis cinéticos, pois a degradação de ambos os carotenóides seguiu reação de ordem zero quando dissolvido em solventes orgânicos, enquanto que em sistema

aquoso, a degradação cinética foi de primeira ordem. A maior velocidade de degradação do  $\beta$ -caroteno ( $k = 2,564 \text{ h}^{-1}$ ) foi atingida em sistema de etanol absoluto sob luz e temperatura de  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , enquanto que no escuro nas mesmas condições a degradação foi menor ( $k = 1,362 \text{ h}^{-1}$ ). Os autores não avaliaram os produtos de degradação formados.

Anguelova & Warthesen (2000) avaliaram a estabilidade do licopeno em pós de tomate comerciais obtidos por “spray-dryer” durante o armazenamento em presença de ar. Após seis semanas de exposição à luz fluorescente (38500 lux) sob temperatura ambiente ou estocagem a  $6^\circ\text{C}$  no escuro, 60% e 70% do *all-trans*-licopeno foi preservado, respectivamente, em ambos os pós. Neste mesmo período, sob  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  no escuro restou apenas 40% do *all-trans*-licopeno. A degradação do *all-trans*-licopeno foi acompanhada do aumento no conteúdo do isômero 5,5'-*di-cis*- e de 5,6-diidroxi-diidrolicopeno (produto de oxidação), principalmente nas amostras estocadas a  $45^\circ\text{C}$  no escuro. A ordem da reação bem como o tipo de ajuste e os valores de  $k$  não foram mencionados.

Arita et al. (2004) avaliaram a fotoestabilidade de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina em lipossomas e em hexano expostos a 4036 lux por 120 minutos. A cinética de degradação apresentada pelos carotenóides estudados, em ambos os meios, foi de primeira ordem. Em lipossomas, o  $k$  não apresentou diferença significativa entre os carotenóides estudados sendo de  $9,52 \times 10^{-5}$ ;  $6,83 \times 10^{-5}$  e  $6,77 \times 10^{-5} \text{ dias}^{-1}$  para  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, respectivamente. Os autores concluíram que a presença de hidroxilas nos grupamentos terminais na  $\beta$ -criptoxantina e da zeaxantina não alterou a fotoestabilidade desses carotenóides em comparação ao  $\beta$ -caroteno. Em hexano, os carotenóides foram mais estáveis que em lipossomas, o  $\beta$ -caroteno apresentou  $k$  de  $2,50 \times 10^{-5} \text{ dias}^{-1}$ , enquanto que para a  $\beta$ -criptoxantina o  $k$  foi de  $2,15 \times 10^{-5} \text{ dias}^{-1}$ .

Milanowska & Gruszecki (2005) estudaram a degradação da *all-trans*-zeaxantina em uma mistura de etanol/éter terc-butil metílico (95:5) no escuro ou exposto a diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de luz monocromática (450, 540, 580 e 670 nm). Os autores reportaram que sob todos os  $\lambda$  houve degradação e a isomerização *trans-cis* foi a reação predominante, após 50 minutos de exposição a luz. Em todas as condições estudadas foram formados os isômeros 9-, 15- e 13-*cis*-zeaxantina, sendo o último acumulado em maior quantidade. Sob 450 nm, esta xantofila apresentou menor retenção (80,7%), com formação de 3,3 % de 9-*cis*, 1,5 % de 15-*cis* e 7,8 % de 13-*cis*-zeaxantina. Conforme o esperado, a zeaxantina foi mais estável no escuro apresentando retenção de 99,6%, e apenas 0,4% do isômero 13-*cis* foi formado. Os autores não apresentaram dados cinéticos de degradação dos carotenóides.

A influência do tipo de meio também foi observada por Balaswamy et al. (2006) para bixina que foi mais estável em oleoresina de urucum do que na forma de pó quando exposta à luz do “dia” ou estocada no escuro à 30 °C. Em todos os experimentos, a cinética de degradação do carotenóide foi de segunda ordem. Nas amostras expostas à luz, o  $k$  foi de  $0,145 \times 10^{-2}$  e de  $1,75 \times 10^{-2} \text{ dias}^{-1}$  para bixina em oleoresina e em pó, respectivamente; enquanto que no escuro, o  $k$  foi de  $0,08 \times 10^{-2} \text{ dias}^{-1}$  em oleoresina e de  $1,30 \times 10^{-2} \text{ dias}^{-1}$  no pó. Os autores justificaram que a bixina foi mais estável em oleoresina, devido à presença de uma resina protetora natural que serve de barreira para ação da luz e do  $O_2$ .

Jia et al. (2007) avaliaram o efeito da intensidade da luminosidade (1000, 2000 ou 4000 lux) na estabilidade de  $\beta$ -caroteno em iso-octano por 2 dias a 20 °C. Conforme o esperado, a perda do  $\beta$ -caroteno foi diretamente proporcional ao aumento da luminosidade,

correspondendo a 50,9%, 64,1% e 70,7% a 1000, 2000 e 4000 lux, respectivamente. Os autores não apresentaram dados cinéticos de degradação do carotenóide.

Na tentativa de minimizar a fotodegradação dos carotenóides, alternativas como a adição de ascorbil palmitato (Najar et al., 1988) ou de ácido linoleico (Matsufuji et al., 2004), restrição de O<sub>2</sub> atmosférico (Najar et al., 1988) e microencapsulação (Beatus et. al., 1985; Desobry et. al., 1997 e 1999; Lyng et al., 2005; Barbosa et al., 2005) já foram estudadas. Porém, a microencapsulação tem se destacado frente às demais, pois além de minimizar significativamente as perdas dos carotenóides, os torna dispersáveis em matrizes aquosas o que amplia sua aplicação nos produtos alimentícios (Winning, 1995).

## **5. Microencapsulação**

Apesar dos primeiros registros de tentativa de aplicação da microencapsulação terem ocorrido nos anos 30, o primeiro produto com material microencapsulado surgiu apenas em 1954, com a patente do papel de cópia sem carbono comercializado pela empresa norte-americana "National Cash Register". A idéia da patente consistia no recobrimento de papel comum por uma fina camada de microcápsulas contendo tinta incolor. À medida que as microcápsulas eram rompidas, por pressão, liberavam a tinta que, ao entrar em contato com uma segunda folha previamente banhada num revelador, produzia a cópia nos pontos pressionados (Ré, 2000). As primeiras pesquisas na área de alimentos foram iniciadas nos anos 60 pelo Instituto de Pesquisas Southwest (Estados Unidos), com a microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a oxidação e a perda de substâncias voláteis e controlar a liberação do aroma (Ré, 2000).

Atualmente, a microencapsulação é utilizada no setor alimentício, não apenas para minimizar as perdas de aromas, mas também para proteger outros ingredientes sensíveis

como ácidos graxos e óleos essenciais, aromas, oleoresinas, vitaminas, minerais, corantes naturais, microrganismos e enzimas (Desai & Park, 2005; Madene et al., 2006).

Na microencapsulação, um ou mais ingredientes de interesse (núcleo ou recheio) são envolvidos com uma camada polimérica (material de parede ou agente encapsulante), que atua como um filme protetor diminuindo sua exposição às condições adversas do processamento e estocagem. O conceito de microcápsula surgiu da idealização do modelo celular, no qual a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material na célula (Ré, 2000). Dentre as vantagens, a possibilidade de liberação gradual ou controlada do conteúdo das microcápsulas no meio, sob condições pré-estabelecidas é uma das mais importantes (Shahidi & Han, 1993). Segundo Desai & Park (2005), a liberação controlada é definida como o mecanismo no qual um ou mais ingredientes ativos microencapsulados são liberados gradualmente, no meio, a uma velocidade específica.

Para se obter uma microencapsulação eficiente deve-se selecionar corretamente o material de parede e o método de secagem a serem empregados na obtenção das microcápsulas. A escolha do método é baseada em alguns parâmetros como as propriedades químicas e físicas do ingrediente e do material de parede, o tamanho médio desejado das partículas, o mecanismo de liberação do ingrediente no meio e o custo (Ré, 1998; Desai & Park, 2005).

Métodos químicos, físicos e físico-químicos podem ser empregados para a obtenção das microcápsulas. Dentre os químicos destacam-se a co-cristalização, a polimerização interfacial e a inclusão molecular (Madene et al., 2006), e dentre os físicos, o spray-drying, o spray-chilling, o spray-cooling, o leito fluidizado, a liofilização e a extrusão (Desai &

Park, 2005). Os métodos físico-químicos mais comuns são a coacervação e o envolvimento lipossômico (Ré, 2000). Contudo industrialmente, a maioria das microcápsulas é obtida por spray-drying devido ao baixo custo do processo, disponibilidade do equipamento, boa retenção dos compostos voláteis, estabilidade do produto final e qualidade dos ingredientes encapsulados (Reineccius, 2004). Porém, sua principal limitação é o número restrito de materiais de parede compatíveis com essa técnica (Desai & Park, 2005).

### **5.1. Secagem por spray-dryer**

O primeiro uso do método da secagem por spray-drying na microencapsulação de ingredientes alimentícios foi reportado em 1950, para prevenir a degradação de óleos essenciais, bem como, para convertê-los da forma líquida para a de pó (Gouin, 2004).

As microcápsulas obtidas por spray-drying apresentam tamanho que varia de 1 a 50  $\mu\text{m}$ , enquanto que as cápsulas obtidas por outros métodos físicos como extrusão, leiteo fluidizado e *spray-chilling* apresentam tamanhos de 20-2000  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  e 20-2000  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Madene et al., 2006).

Segundo Porzio (2004) e Desai & Park (2005), as principais etapas da secagem por spray-drying são a preparação da solução a ser convertida em pó, seguida de sua homogeneização e, finalmente, a atomização na câmara de secagem do spray-dryer. Quando o ar de secagem à alta temperatura (180-230 °C) entra em contato com a solução do material de parede, ocorre a desidratação quase instantânea da gotícula e da água na câmara de secagem, na forma de névoa. A construção da câmara de secagem e as condições de operação do equipamento são ajustadas de modo a permitir a evaporação da água, sem elevar demasiadamente a temperatura do produto (Daiúto & Cereda, 2003).

A retenção do ingrediente de interesse (recheio) nas microcápsulas ocorre, principalmente, devido à diferença entre a velocidade de difusão da água e do recheio presentes nas gotículas da solução. À medida que a umidade diminui na câmara de secagem do equipamento, as gotículas do material de parede perdem água e recheio, entretanto na maioria das vezes, a velocidade de difusão do recheio é menor do que da água. Abaixo de um valor crítico de umidade, que depende da natureza do material de parede, essa diferença acentua-se. Isto acontece porque o material de parede forma uma barreira seletiva, ou seja, uma membrana permeável à água e impermeável ao recheio, que gradativamente fica retido no interior dessa membrana até a evaporação total da água (Ré, 2000; Desai & Park, 2005).

Muitos estudos têm relatado a influência das condições de secagem em spray-dryer nas propriedades e na qualidade final das microcápsulas (Gharsallaoui et al., 2007). Finney et al. (2002) avaliaram o efeito da temperatura do ar de entrada (170 e 220 °C) e do tipo de atomizador (*centrifugal wheel* ou *spray nozzle*) nas propriedades e na estabilidade de microcápsulas de óleo de laranja e amido. De forma geral, a 170° C as microcápsulas obtidas por *centrifugal wheel* ou *spray nozzle* apresentaram maior quantidade de óleo de superfície, umidade, e tamanho de partícula do que as obtidas a 220° C. Com relação ao tipo de atomizador, as características mais afetadas foram a distribuição do tamanho da partícula, porém apesar dessas diferenças, a estabilidade foi similar, pois os dois tipos de atomizadores originaram microcápsulas que garantiram uma boa proteção ao óleo de laranja. Cai & Corke (2000) reportaram que aumento da temperatura do ar de 150 para 210° C acarretou redução da umidade, da densidade aparente, higroscopicidade e da retenção após secagem em microcápsulas de betacianinas/MD. Além disso, também foi verificada a redução da retenção do corante de 88,2 para 84,5%, respectivamente após 16 semanas sob 32% de umidade.

## 5.2. Material de parede

A composição do material de parede é determinante para as características das microcápsulas, bem como para o tipo de aplicação. Segundo Ré (1998), os materiais utilizados como agentes encapsulantes de ingredientes alimentícios incluem:

- Carboidratos: amidos, maltodextrinas, xarope de milho, gomas, sacarose, carboximetilcelulose, etil-, metil-, acetil- e nitro-celulose;
- Lipídeos: cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono- e di-glicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas;
- Proteínas: glúten, caseína, isolado protéico de soro de leite (WPI), gelatina e albumina.

O material de parede ideal deve apresentar propriedade emulsificante e de formação de filme, possuir baixa viscosidade em soluções com alta concentração de sólidos, capacidade de estabilização da solução do material de parede, apresentar baixa higroscopicidade, ser de baixo custo e ser capaz de proteger o recheio das condições adversas do processamento e estocagem (Porzio, 2004; Desai & Park, 2005). Nem todos os materiais englobam todas as propriedades mencionadas, e muitas vezes para compensar a deficiência de alguma propriedade, os materiais de parede são misturados (Shahidi & Han, 1993).

Além disso, o material de parede deve ser compatível com a técnica de secagem a ser utilizada na obtenção das microcápsulas, como por exemplo, na técnica de spray-drying frequentemente utilizam-se gomas, amidos modificados e hidrolisados, xarope de milho e

sacarose, por englobarem boa parte das propriedades desejáveis e se adequarem perfeitamente a essa técnica.

Vários estudos demonstraram que a razão recheio/material de parede, viscosidade, tipo, composição, teor de sólidos, tamanho das gotículas do material de parede possuem influência nas propriedades das microcápsulas (Rosenberg et al., 1990; Hogan et al., 2001; Trindade & Grosso, 2000; Rodríguez-Huezo et al., 2004, Santos et al., 2005; Shu et al., 2006).

Rosenberg et al. (1990) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de sólidos totais (10, 20 e 30%) do material de parede na retenção de voláteis durante a obtenção de microcápsulas em spray-dryer e verificaram que o aumento da concentração de sólidos aumentou ligeiramente a retenção dos voláteis em microcápsulas de goma arábica. Rodríguez-Huezo et al. (2004) reportaram que o aumento da concentração de sólidos de 25 para 35% aumentou a eficiência da microencapsulação e a retenção de carotenóides em microcápsulas compostas por goma arábica, goma gellana e maltodextrina.

Hogan et al. (2001) verificaram a influência da razão recheio/material de parede nas propriedades de óleo de soja encapsulado com maltodextrina 28 DE/caseinato de sódio. Os autores verificaram que o aumento da razão recheio/material de parede de 0,33 para 3 reduziu a eficiência da microencapsulação de 94,1 para 76%. Shu et al. (2006) utilizando a mistura gelatina:sacarose reportaram que a razão recheio/material de parede 1/4 e 1/16 resultaram em valores similares de eficiência da microencapsulação e rendimento, aproximadamente 91 e 80%, respectivamente. Entretanto, para uma razão de 1/2 houve a redução da eficiência para 76% e do rendimento para 61%.

Santos et al. (2005) reportaram que microcápsulas de oleoresina de páprica encapsulada com goma arábica apresentaram melhor solubilidade, eficiência do encapsulamento e foram mais estáveis à condição de estocagem do que as microcápsulas de oleoresina encapsulada com amido/gelatina. O mesmo foi reportado por Trindade & Grosso (2000) que aplicaram a microencapsulação para aumentar a estabilidade da vitamina C utilizando amido ou goma arábica, como material de parede.

### **5.2.1. Goma arábica**

A goma arábica é a mais antiga e comercialmente a goma natural mais importante para microencapsulação. O seu uso data do ano 2650 antes de Cristo no Antigo Egito, pelos egípcios como adesivo durante a mumificação e na composição das tintas dos hieróglifos (Verbeken et al., 2003). Atualmente, essa goma é utilizada principalmente pela indústria alimentícia e farmacêutica, devido à sua propriedade emulsificante, de formação de filme e como agente encapsulante (Motlagh et al., 2006).

Quimicamente, a goma arábica é definida como um heteropolissacarídeo de estrutura ramificada, apresenta a cadeia principal constituída por unidades de 1,3- $\beta$ -D-galactopiranosose unidas por ligações  $\beta$ -1,6, e as cadeias laterais são formadas por 2 a 5 unidades de galactopiranosose unidas entre si por ligações  $\beta$ -1,3. A cadeia principal e as laterais podem apresentar resíduos terminais de ácido glucurônico ou de 4-O-metilglucurônico. Essa goma possui ainda 2% de proteína ligada covalentemente à estrutura do polissacarídeo através do resíduo de serina e hidroxiprolina (Dickinson, 2003).

Na microencapsulação, a goma arábica é considerada um material de parede de excelência destacando-se frente aos demais, por reunir a maioria das propriedades mencionadas anteriormente, principalmente a capacidade emulsificante (Bertolini et al.,

2001) e de formação de filme, que favorecem a estabilidade da solução encapsulante, a retenção de ingredientes após secagem, a eficiência da encapsulação, além da proteção efetiva contra a degradação (McNamee et al., 2001; Santos et al., 2005; Barbosa et al., 2005). Geralmente, esse polissacarídeo pode ser utilizado na composição do material de parede, puro ou misturado com maltodextrina ou outro amido modificado visando reduzir seu custo ou melhorar a eficiência da encapsulação de outros materiais.

Vários estudos têm demonstrado a eficiência da goma arábica frente a outros materiais de parede na proteção de diferentes ingredientes alimentícios, como as vitaminas, as oleorresinas aromáticas, os ácidos graxos essenciais, os corantes naturais, dentre outros (Trindade & Grosso, 2000; McNamee et al., 2001; Minemoto et al., 2002; Watanabe et al., 2004; Santos et al. 2006; Krishnan et al., 2005; Shaikh et al., 2006).

Trindade & Grosso (2000) verificaram que a microcápsula de goma arábica foi mais efetiva que a de mistura goma arábica/amido de arroz na proteção da vitamina C estocada a 45 °C sob umidade relativa de 60-65%.

McNamee et al. (2001) reportaram que as microcápsulas de óleo de soja com apenas goma arábica como material de parede apresentaram eficiência de encapsulação de 91,4%, enquanto que na mistura de goma arábica com glicose (1:1) esse valor foi reduzido para 74,3%. No entanto, os autores não avaliaram a estabilidade das microcápsulas.

As microcápsulas de goma arábica também foi mais efetiva na proteção de oleoresina de cardamon do que as de maltodextrina e de amido modificado, durante a estocagem a 25 °C (Krishnan et al., 2005). O mesmo foi observado por Shaikh et al. (2006) para oleorresina de pimenta preta encapsulada com goma arábica que foi mais estável do que a encapsulada com amido modificado, quando estocadas a 30 °C por 6 semanas.

A estabilidade oxidativa do ácido araquidônico encapsulado com goma arábica ou maltodextrina a 37 °C foi investigada por Watanabe et al. (2004). Os autores reportaram que a goma arábica foi mais efetiva na supressão da oxidação do que a maltodextrina. Minemoto et al. (2002) reportaram que ácido linoléico encapsulado com goma arábica também foi mais estável que o encapsulado com maltodextrina.

Santos et al. (2006) verificaram microcápsulas de carotenóides de páprica/goma arábica conferiram uma coloração mais atrativa e maior estabilidade à cor da gelatina quando comparado com gelatina colorida com carotenóides de páprica/amido.

Apesar da importância da goma arábica como material de parede, sua maior limitação é o elevado custo e a constante flutuação de seu preço (Madene et al., 2006), sendo necessário o emprego de materiais alternativos menos dispendiosos, como o amido, xarope de milho, maltodextrinas ou sacarose.

### **5.2.2. Maltodextrina**

Os amidos hidrolisados são utilizados na indústria alimentícia em variadas aplicações. Dependendo da fonte, grau de hidrólise enzimática ou ácida e também das condições empregadas durante a hidrólise pode-se obter produtos com diferentes composições, propriedades físicas e aplicações (Biliaderis et al., 1991). De forma geral, as maltodextrinas são utilizadas na indústria de alimentos na formulação de produtos desidratados (sopas e bebidas), embutidos, balas e confeitos em geral, além de achocolatados, chocolates e recheios e material de parede na microencapsulação de vários ingredientes alimentícios (Daiúto & Cereda, 2003).

As maltodextrinas são polímeros de D-glicose unidos entre si por ligações  $\alpha$ -1,4, e são obtidas através da hidrólise ácida ou enzimática do amido. Esses polissacarídeos são classificados de acordo com o seu grau de dextrose-equivalente (DE), que corresponde ao teor de açúcar redutor, calculado como o percentual de dextrose em base seca e apresentam DE intermediários entre o amido e o xarope de milho (Dokic-Baucal et al., 2004).

O grau de DE das maltodextrinas tem demonstrado relação com as propriedades e estabilidade do ingrediente encapsulado (Wagner & Warthensen, 1995; Desobry et al., 1999). Wagner & Warthensen (1995) reportaram que as microcápsulas de MD 36,5 DE foram mais efetivas na proteção do  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno de suco de cenoura do que as de 4 DE. Por outro lado, Desobry et al. (1999) verificaram que microcápsulas de MD com menor DE (4 e 15 DE) misturadas a mono e dissacarídeos redutores conferiram maior estabilidade ao  $\beta$ -caroteno em comparação a MD com 25 DE.

Outros estudos têm demonstrado que a MD tem sido bastante efetiva na proteção dos ingredientes alimentícios (Beatus et al., 1985; Cai & Corke, 2000; Barros & Stringheta, 2006). Beatus et al. (1985) avaliaram a influência dos seguintes materiais de parede: maltodextrina, goma arábica, gelatina e caseinato de sódio na estabilidade de oleorresina de páprica encapsulada e observaram que a maltodextrina foi a mais efetiva na proteção do corante.

As microcápsulas de MD (10-25 DE) ou a mistura de MD 10 DE:25 DE (1:3) conferiram maior estabilidade às betacianinas extraídas de amaranto, do que o amido ou amido modificados quando estocadas em diferentes umidades relativas (5 e 32%), conforme observado por Cai & Corke (2000).

Barros & Stringheta (2006) reportaram que material de parede composto apenas por maltodextrina foi mais efetivo que a mistura GA:MD (1:5) na proteção de antocianinas extraídas de capim gordura, durante a exposição das microcápsulas a 2500 lux em sistema-modelo aquoso com pH 2.

Diferentemente da goma arábica, a maltodextrina não apresenta propriedade emulsificante, no entanto, essa deficiência pode ser compensada utilizando-se um emulsificante secundário durante a obtenção das microcápsulas (Reineccius, 2001). Barbosa et al. (2005) reportaram que a bixina encapsulada com maltodextrina 20 DE adicionada de Tween 80 apresentou maior eficiência do encapsulamento (75%), melhor morfologia e conferiu maior estabilidade ao carotenóide em comparação à encapsulada apenas com maltodextrina 20 DE, que apresentou 54% de eficiência e microcápsulas com orifícios, fissuras e deformações.

### **5.3. Avaliação das propriedades e da qualidade das microcápsulas**

Após a obtenção das microcápsulas, algumas análises devem ser conduzidas para estudar as suas propriedades e verificar o sucesso do processo de encapsulação. Dentre as análises químicas utilizadas na caracterização das microcápsulas destacam-se a retenção após secagem, eficiência da microencapsulação e ingrediente de superfície.

A retenção (% Rt) após a secagem visa avaliar o percentual de perda de ingrediente durante o encapsulamento, a eficiência da microencapsulação (% EM) corresponde à capacidade do material de parede de “aprissonar” o recheio no interior da microcápsula e o

ingrediente de superfície (IS) indica o teor de ingrediente na superfície da microcápsula, ou seja, que não foi encapsulado (Wagner & Warthensen, 1995, Hogan et al., 2001).

A solubilidade e o rendimento do pó são também parâmetros importantes do ponto de vista tecnológico e econômico (Winning, 1995; Santos et al., 2005; Shu et al., 2006). Outro parâmetro bastante estudado é a atividade de água e/ou a umidade, que em alguns estudos, tem sido correlacionada à estabilidade e às propriedades físicas do pó encapsulado (Selim et al., 2000; Loksuwan et al., 2007; Quek et al., 2007).

A morfologia, tamanho e distribuição de partículas também são propriedades que têm sido relacionadas à manutenção da estabilidade do recheio (Desobry et al., 1997 e 1999).

A microscopia ótica (MO) e eletrônica de varredura (MEV) são comumente utilizadas para avaliar a morfologia e integridade das microcápsulas após a secagem. Fatores como o tipo, a composição do material de parede e as condições de secagem podem influenciar a morfologia e integridade das microcápsulas. A MO é um método simples, econômico e rápido, capaz de relatar as informações preliminares e básicas da estrutura das microcápsulas, enquanto que na MEV é possível a visualização dos detalhes da mesma. Observando-se por MEV, as microcápsulas formuladas com goma arábica geralmente apresentam formação de paredes contínuas, arredondadas, sem fissuras, rachaduras ou rompimentos, com presença de depressões irregulares, ou concavidades, ou achatamentos na superfície, que são características desse tipo de material (Bertolini et al., 2001; Barbosa et al., 2005). Já as microcápsulas formuladas com maltodextrina geralmente apresentam formato esférico de superfície lisa conforme descrito com DibTaxi et al. (2003). Outros tipos de microscopia, como a eletrônica de transmitância e a microscopia eletrônica laser

confocal, também já foram utilizados na caracterização das microcápsulas (Kim & Morr, 1996; Lamprecht et al., 2000 a e b).

#### 5.4. Microencapsulação de carotenóides

De acordo com levantamento da literatura (Tabela 1), observou-se que do total de 322 estudos sobre microencapsulação, 70% reportam a aplicação da técnica aos aromas, enquanto que o restante destina-se aos corantes naturais.

**Tabela 1. Número de trabalhos sobre microencapsulação de aromas e corantes naturais pesquisados na base de dados *Web of science* em dezembro de 2008.**

Ingrediente ativo	Número de trabalhos	Palavra – chave <sup>a</sup>
Aromas	226	Flavo*
Carotenóides	69	Caroten*
Antocianinas	8	Anthocy*
Betalaínas	1	Betalain*
Betacianinas	2	Betacy*
Clorofila	16	Chlorophy*
Total	322	-

<sup>a</sup> and encapsulation;  
**Fonte: *Web of science* pesquisado em dezembro de 2008**

Dos 96 trabalhos que empregaram corantes naturais, aproximadamente 72% (69 trabalhos) investigaram a microencapsulação de carotenóides, especialmente o  $\beta$ -caroteno, enquanto que os demais foram destinados as antocianinas, betalaínas, betacianina e a clorofila (Tabela 1).

Conforme mencionado anteriormente, a GA e a MD com diferentes graus de dextrose equivalente (DE), ambas puras ou em misturas, têm sido empregadas como materiais de parede para a microencapsulação de carotenóides (Wagner & Warthensen, 1995; Desobry et al., 1997 e 1999; Barbosa et al., 2005). No entanto, o uso de outros materiais como a  $\beta$ - e  $\alpha$ -ciclodextrina (Szente et al., 1998; Lyng et al., 2002),  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo/gelatina (Elizalde et al., 2002), quitosana (Bustos et al., 2003), manitol/gelatina (Sutter et al., 2007) e alginato de cálcio (Rosenberg & Lee, 2004) foram reportados.

Diversos processos de encapsulação, tais como liofilização (Desobry et al., 1997; Selim et al., 2000), cristalização (Elizalde et al., 2002), tambor rotativo (Desobry et al., 1997), inclusão molecular (Lyng et al., 2002), aco-cristalização (Szente et al., 1998) e spray-drying foram utilizados para a obtenção de microcápsulas de carotenóides.

Desobry et al. (1997) compararam o efeito de diferentes técnicas de microencapsulação (spray-drying, liofilização e tambor rotativo) na retenção e estabilidade de  $\beta$ -caroteno em microcápsulas de maltodextrina (25 DE). As microcápsulas obtidas por spray-drying foram menos estáveis às condições de estocagem do que as obtidas por tambor rotativo e liofilização.

Na microencapsulação por liofilização, o polímero polivinilpirrolidona (PVP) 40, quando comparado ao pululano e PVP360, foi mais efetivo na proteção de carotenóides de açafrão, estocados em diferentes atividades de água (Selim, 2000).

Szente et al. (1998) utilizaram diferentes tipos de ciclodextrina (CD) para estabilizar cristais de  $\beta$ -caroteno por meio da técnica da inclusão molecular. Os autores reportaram que

dentre as ciclodextrinas estudadas a  $\alpha$ -CD foi a que conferiu maior proteção ao caroteno contra a temperatura (60 °C) e a luminosidade (UV<sub>365nm</sub>).

Lyng et al. (2002) verificaram que a técnica de inclusão molecular foi eficiente na complexação da bixina com  $\alpha$ -ciclodextrinas permitindo a proteção contra luminosidade, ozônio, ar e temperatura.

Bustos et al. (2003) obtiveram microcápsulas de astaxantina e ácidos graxos insaturados utilizando quitosana como material de parede e método coacervação. Os autores reportaram que mono- e di-ésteres de astaxantina encapsulados com quitosana foram mais estáveis em comparação aos ésteres não encapsulados, em sistema-modelo aquoso na ausência de luz.

Sutter et al. (2007) reportaram que  $\beta$ -caroteno encapsulado com manitol, utilizando liofilização, apresentou um bom percentual de retenção após estocagem em diferentes umidades relativas por 21 dias. A mesma técnica foi utilizada por Elizalde et al. (2002) na microencapsulação de  $\beta$ -caroteno com  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo/gelatina e também obtiveram uma microencapsulação eficiente.

Apesar dos diferentes métodos citados já terem sido utilizados para microencapsulação de carotenóides, as microcápsulas obtidas por spray-drying representam a grande maioria dos estudos disponíveis na literatura.

A tabela abaixo apresenta uma compilação dos principais estudos de microencapsulação de carotenóides que utilizaram polissacarídeos como material de parede e a técnica de spray-drying, além das análises de caracterização e condições experimentais utilizadas para avaliar a estabilidade das microcápsulas em diferentes sistemas-modelo.

**Tabela 2. Principais estudos sobre microencapsulação de carotenóides por spray-drying, análises de caracterização das microcápsulas ou do pó e as condições utilizadas nos sistemas-modelo.**

Carotenóide	Material de parede	Caracterização do pó ou das microcápsulas	Condições do sistema-modelo	Tipo de cinética	Referência
Carotenóides de páprica (oleoresina)	MD15 DE e GA	MEV	luz néon, 35 °C, pó	segunda-ordem	Beatus et al. (1985)
$\beta$ - e $\alpha$ -caroteno (suco de cenoura)	MD (4, 15, 25 e 36,5 DE)	CS	2150 lux, 45 °C, pó	primeira-ordem	Wagner & Warthensen (1995)
$\beta$ -caroteno (sintético)	MD 25 DE	CS, morfologia e tamanho de partícula	25, 35 e 45 °C; UR: 11 e 33%, pó	primeira-ordem (2 etapas)	Desobry et al. (1997)
$\beta$ -caroteno (alga: de <i>Dunalliella salina</i> )	MD 12DE	%Rd	n.d.	n.d.	Leach et al. (1998)
$\beta$ -caroteno (sintético)	MD (4, 15 e 25 DE), glicose, frutose e galactose	CS, morfologia e tamanho de partícula, MEV	25, 35 e 45 °C; UR: 11 e 33%, pó	primeira-ordem (2 etapas)	Desobry et al. (1999)
Licopeno (goiaba)	GA e MD 20 DE	n.d.	Luz e escuro, temperatura ambiente, pó	primeira-ordem (2 etapas)	Matioli & Rodríguez-Amaya (2002)
Carotenóides de rosa mosqueta (oleoresina)	Amido e gelatina	n.d.	Escuro, 25, 40 e 55 °C, pó	pseudo primeira-ordem	Robert et al. (2003)
Carotenóides de páprica (oleoresina)	Alg-Ca	%Rt, morfologia, tamanho de partícula	4, 20 e 30 °C, aquoso	n.d.	Rosenberg & Lee (2004)
Óleo-resina (pimenta vermelha)	GA, GG, GM e MD 10 DE	%Rt, %EE, morfologia	$a_w$ (0,318), 35 °C, pó	zero ordem	Rodríguez-Huezo et al. (2004)
Bixina (urucum)	GA/Sac; MD 20 DE	%EE, morfologia, solubilidade	700 lux e escuro, 21 °C, aquoso	primeira-ordem (2 etapas)	Barbosa et al. (2005)
Carotenóides de páprica	GA e amido/gelatina	Tamanho de partícula, solubilidade, microscopia ótica e MEV	n.d.	n.d.	Santos et al. (2005)
Licopeno (cristais)	Gelatina/Sac	% Rd e % EE	Escuro, 0 °C, pó	n.d.	Shu et al. (2006)

$\beta$ -caroteno (sintético)	Amido, amido modificado, MD	Tamanho e distribuição de partículas, microscopia ótica e MEV, carotenóide total, CS, solubilidade, umidade atividade de água	n.d.	n.d.	Loksuwan et al. (2007)
Licopeno e $\beta$ -caroteno (suco de melão)	MD	Umidade, atividade de água, dissolução, colorimetria, licopeno e $\beta$ -caroteno total	n.d.	n.d.	Quek et al. (2006)
Licopeno (tomate)	GA e Sacarose	Rendimento e % EE	n.d.	n.d.	Nunes & Mercadante (2007)

**n.d.: não determinado, Alg-Ca: alginato de cálcio; a<sub>w</sub>: atividade de água; CS: carotenóide de superfície, DE: dextose equivalente; % EE: eficiência de microencapsulação; GA: goma arábica; GM: goma mesquita; GG: goma gelana; MD: maltodextrina; MEV: microscopia eletrônica de varredura; pó = microcápsulas; % Rd: Rendimento; % Rt: retenção; Sac: sacarose; UR: umidade relativa**

Carotenóides de páprica foram encapsulados com diferentes materiais de parede por Beatus et al. (1985). Dos materiais de parede testados, o que conferiu maior estabilidade aos carotenóides foi a MD 15 DE. A degradação dos carotenóides seguiu cinética de segunda ordem, com  $k$  de  $3,1 \text{ dias}^{-1}$  e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de 9 dias.

Wagner & Warthesen (1995) reportaram que o aumento do grau de dextrose equivalente da maltodextrina de 4 para 36,5 DE melhorou a estabilidade do  $\alpha$ -e  $\beta$ -caroteno durante a exposição à luz (2140 lux) a  $45^\circ\text{C}$ . Ao contrário do esperado, na luz e no escuro o  $\alpha$ -e  $\beta$ -caroteno apresentaram a mesma % de retenção, ~ 90% para MD 4 DE e 70% para MD 36,5 DE, e a cinética de degradação apresentada pelos carotenóides foi de primeira ordem. Por outro lado, Desobry et al. (1999) verificaram que microcápsulas de MD com menor DE (4 e 15) misturadas a mono e dissacarídeos redutores conferiram maior estabilidade ao  $\beta$ -caroteno em comparação a MD 25 DE, em sistema-modelo em pó a 25, 35 e  $45^\circ\text{C}$  sob 11 e 33% de umidade relativa do ar. A adição de mono e dissacarídeos à MD reduziu o tamanho dos poros da rede de MD e limitou a difusão do oxigênio, protegendo o  $\beta$ -caroteno. Em todas as condições experimentais, o  $\beta$ -caroteno apresentou cinética de primeira ordem com duas etapas de degradação. As microcápsulas foram caracterizadas através da determinação de carotenóide total e de superfície, tamanho de partícula e morfologia por MEV.

A obtenção da biomassa seca de *Dunalliella salina* foi realizada em spray-dryer estudando-se os seguintes parâmetros: percentual de sólidos contidos na alimentação (4,5% e 8,8% sem encapsulante e 15,4% com maltodextrina 12 DE e goma arábica na proporção de 3,5:1), temperatura de entrada do ar de 200 e  $265^\circ\text{C}$  e temperatura do ar na saída de 110 e  $120^\circ\text{C}$  (Leach et al., 1998). Os autores reportaram que foi observada perda de  $\beta$ -caroteno

apenas quando utilizada concentração de 15,4% de sólidos, mesmo com a variação da temperatura de entrada e saída do ar. O maior rendimento de microencapsulação (98%) foi também obtido nestas condições, entretanto a eficiência não foi reportada.

Matioli & Rodríguez-Amaya (2002) avaliaram a estabilidade de licopeno encapsulado com GA ou GA/MD 20 DE estocado sob luz fluorescente (intensidade de luminosidade não informada) ou no escuro à temperatura ambiente. A cinética de degradação apresentada pelo licopeno encapsulado com os materiais estudados foi de primeira ordem com 2 etapas de degradação. A mistura GA/MD foi mais eficiente na proteção do licopeno em comparação a GA. Os autores não realizaram caracterização das microcápsulas.

Robert et. al. (2003) reportaram que a gelatina conferiu maior estabilidade aos principais carotenóides de rosa mosqueta (*trans*- $\beta$ -caroteno, *trans*-licopeno e *trans*-rubixantina) quando comparado ao amido. A estabilidade das microcápsulas foi avaliada a 25, 35 e 45 °C no escuro e a cinética apresentada pelos carotenóides foi de pseudo-primeira ordem. Em amido, todos os carotenóides apresentaram a mesma velocidade de degradação, enquanto que em gelatina o *trans*- $\beta$ -caroteno foi o mais estável.

Rodríguez-Huezo et al. (2004) verificaram o efeito da % sólidos totais (ST) da solução encapsulante nas propriedades e na estabilidade de microcápsulas de carotenóides de pimenta vermelha. De forma geral, o aumento da % ST na solução de polissacarídeos (goma arábica, goma gelana, goma mesquita e maltodextrina 10 DE) de 25 para 35% melhorou a %Rt, %EE e morfologia das microcápsulas de óleo-resina de carotenóides de pimenta-vermelha. Contudo, os carotenóides encapsulados com 25% de ST apresentaram

maior estabilidade quando estocados a 35 °C sob  $a_w$  de 0,318 por 30 dias. A cinética de degradação apresentada pelos carotenóides foi de ordem zero.

Rosemberg & Lee (2004) avaliaram a estabilidade de carotenóides de páprica, na forma livre e encapsulada com alginato de sódio, em sistema aquoso a 4, 20 e 30 °C sob luz e no escuro. Conforme o esperado, a estabilidade dos carotenóides na forma encapsulada foi bem maior do que na livre. Após 30 dias de estocagem foram observadas perdas de carotenóides de apenas 11 e 15 % a 20 e 30 °C, respectivamente. Os autores não mencionaram qual a intensidade de luminosidade utilizada no estudo e nem os parâmetros cinéticos de degradação dos carotenóides. As microcápsulas foram caracterizadas através da % Rt, MEV e distribuição do tamanho de partícula.

Santos et al. (2005) encapsularam oleoresina de páprica com goma arábica e amido. Para caracterizar as microcápsulas os autores utilizaram solubilidade, distribuição e tamanho de partícula e MEV. A distribuição do tamanho de partículas apresentou comportamento unimodal, com tamanho médio de 16,0 e 20,3  $\mu\text{m}$  para as microcápsulas produzidas com goma arábica e amido/gelatina, respectivamente. Portanto, foi possível microencapsular oleoresina de páprica pelo método de atomização, com os dois agentes encapsulantes testados e as temperaturas utilizadas na microencapsulação também foram adequadas. A análise da morfologia das microcápsulas deu indícios de que a oleoresina estaria mais protegida quando encapsulada em goma arábica e as microcápsulas apresentaram tamanhos dentro da faixa obtida para este tipo de processo e excelente solubilidade.

Barbosa et al. (2005) reportaram que as microcápsulas com melhor morfologia e %EE foram as que conferiram maior estabilidade à bixina encapsulada com as seguintes

preparações de polissacarídeos: GA/Sac, MD 25 DE/0,02 % Tween 80 e MD 25 DE. O estudo de estabilidade da bixina foi realizado em sistema aquoso na ausência e na presença de luz fluorescente (700 lux), ambos a 21 °C. As microcápsulas compostas por GA/Sac e MD 25 DE/0,02 % Tween 80 foram as que apresentaram melhor morfologia e também as que conferiram maior estabilidade a bixina durante a fotodegradação. De forma geral, a fotodegradação da bixina seguiu cinética de primeira ordem sendo que a degradação apresentou mais de uma etapa.

Shu et al. (2006) obtiveram microcápsulas de licopeno utilizando diferentes misturas de gelatina e sacarose como materiais de parede. Tanto a %Rd do pó como a %EE foram afetadas pela proporção gelatina/sacarose empregada na composição do material de parede. De forma geral, as condições que empregaram gelatina/sacarose (3:7), temperatura e pressão do spray-drying 190° C e 40 MPa respectivamente, apresentaram maiores %Rd e %EE. Adicionalmente, também foi avaliada a estabilidade das microcápsulas de licopeno e do licopeno não encapsulado no escuro a 0 °C, e conforme o esperado, o licopeno microencapsulado foi mais estável. Os autores não apresentaram dados cinéticos de degradação do licopeno nas condições de estocagem.

Amido natural de tapioca, amido modificado de tapioca e maltodextrina foram testados como material de parede na microencapsulação de  $\beta$ -caroteno utilizando a técnica de spray-drying (Loksuwan et al., 2006). Na caracterização das microcápsulas foi utilizado o tamanho e a distribuição de partículas, a microscopia ótica e a MEV, carotenóide total e de superfície, solubilidade, umidade e atividade de água. As microcápsulas de maltodextrina foram as mais solúveis em água fria seguida das de amido modificado e de amido. Em relação ao teor de caroteno total, o amido modificado foi que apresentou maior teor (82%), seguido do amido nativo (68%) e da maltodextrina (46%). O maior teor de

caroteno de superfície foi observado nas microcápsulas de amido natural seguido das de maltodextrina e das de amido modificado. Os autores não realizaram estudos de estabilidade das microcápsulas.

Quek et al. (2006) encapsularam suco de melão com diferentes concentrações de maltodextrina (3 e 5%) utilizando diferentes temperaturas de secagem no spray-dryer (145, 155, 165 e 175 °C). As microcápsulas foram caracterizadas através de colorimetria, atividade de água, umidade, solubilidade e teor de licopeno e  $\beta$ -caroteno. Os autores reportaram que de forma geral, as microcápsulas compostas de 5% de maltodextrina apresentaram melhores propriedades do que as compostas por 3% de maltodextrina. O aumento da temperatura de entrada contribuiu para a redução da umidade e solubilidade das microcápsulas obtidas, sendo que as microcápsulas compostas por 5% maltodextrina a 145 °C foram as mais solúveis. Além disso, foi observada correlação entre os parâmetros colorimétricos luminosidade (*L*) e hue (*h*) e a perda do licopeno e do  $\beta$ -caroteno. O aumento da temperatura de secagem acarretou maiores perdas dos carotenóides, a 145 °C o teor de licopeno e de  $\beta$ -caroteno no pó foi de 954 e de 31  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente, enquanto que a 175 °C esses valores foram de 724 e 23  $\mu\text{g/g}$ . Segundo os autores, analisando as características dos encapsulados obtidos, o pó apresentou menor alteração de cor, boa solubilidade, atividade de água e umidade, além de teores ideais de carotenóides quando utilizou-se temperatura de 155 °C. Os autores não realizaram estudos de estabilidades dos carotenóides das microcápsulas.

Nunes & Mercadante (2007) encapsularam licopeno por spray-dryer utilizando goma arábica/sacarose como material de parede. A eficiência do encapsulamento por variou de 94 a 96% e o rendimento médio foi de 51%. As microcápsulas apresentaram

formas irregulares, porém sem falhas ou aberturas na superfície. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que o material de parede estudado foi promissor para encapsular o licopeno. Nesse trabalho não foi realizado o estudo de estabilidades das microcápsulas.

Cabe destacar que os resultados sobre microencapsulação de carotenóides são muitas vezes difíceis de serem avaliados e comparados, pois alguns dos parâmetros de encapsulamento não são reportados na maioria dos estudos (Tabela 2). O rendimento obtido no encapsulamento não foi mencionado nos trabalhos de Wagner & Warthesen (1995); de Desobry et al. (1999) e de Barbosa et al. (2005). A eficiência do processo de encapsulamento não foi reportada por Chen & Tang (1998), Leach et al. (1998) e Robert et al. (2003). No trabalho de Matioli & Rodriguez-Amaya (2002) nenhum dos dois parâmetros citados foi avaliado (Tabela 2). Com relação à estabilidade, muitos dos estudos citados não avaliaram a estabilidade do carotenóide, como o de Santos et al. (2005), Lokuwan et al. (2006), Quek et al. (2006) e Nunes e Mercadante (2007). Além disso, apenas Beatus et al. (1985), Wagner & Warthensen (1995), Matioli & Rodríguez-Amaya (2002), Barbosa et al. (2005) avaliaram o efeito da luminosidade na estabilidade dos carotenóides encapsulados.

#### **5.4.1. Aplicação da colorimetria nos estudos de estabilidade de carotenóides microencapsulados**

O estudo da estabilidade da cor de produtos alimentícios tem grande importância, pois o impacto visual causado pela cor geralmente se sobrepõe ao causado por outros atributos dos alimentos, sendo este, o primeiro critério aplicado pelo consumidor para a aceitação ou rejeição de um determinado produto. Se a cor não for atraente, apesar dos

demais atributos (aspecto e forma) de aparência e o odor o serem, dificilmente o alimento será ingerido ou pelo menos provado (Ferreira, 1991). Assim, vários trabalhos relatam o uso da colorimetria para acompanhar a estabilidade dos ingredientes encapsulados, inclusive na avaliação da alteração da cor dos carotenóides encapsulados (Winning, 1995, Desobry et al., 1997; Elizalde et al., 2002; Santos et al., 2004; Prado et al., 2006; Sutter et al., 2006).

Geralmente, a componente  $a^*$  tem sido utilizada para descrever a degradação dos carotenóides encapsulados em diferentes tipos de sistemas-modelo, uma vez que esse parâmetro corresponde ao componente vermelho da cor (Elizalde et al., 2002; Santos et al., 2004; Prado et al., 2006; Sutter et al., 2006).

Elizalde et al. (2002) avaliaram a alteração de cor, utilizando sistema CIELab, de  $\beta$ -caroteno encapsulado com matriz de trealose/gelatina estocado em diferentes  $a_w$  e verificaram que a coordenada de cor  $a^*$  foi a que melhor se correlacionou com a degradação do carotenóide. O mesmo foi reportado por Santos et al. (2004) para fotodegradação de carotenóides de páprica encapsulados com goma arábica ou amido utilizando o sistema HunterLab. Prado et al. (2006) utilizaram o sistema CIELab para descrever a perda de cor de  $\beta$ -caroteno nas superfície de microcápsulas com PVP-40 estocados em diferentes UR a 25 °C. Os autores reportaram que o parâmetro colorimétrico  $a^*$  foi o que representou melhor a degradação  $\beta$ -caroteno durante a estocagem.

Sutter et al. (2006) também reportaram que a coordenada de cor  $a^*$  foi a que melhor se correlacionou com a degradação do  $\beta$ -caroteno na superfície de microcápsulas manitol/gelatina submetido a diferentes UR a 25° C. Além disso, Desobry et al. (1997) reportaram que os parâmetros  $L^*$  e  $a^*$  do sistema Hunter foram os que melhor descreveram

a degradação do  $\beta$ -caroteno da superfície de microcápsulas de compostas por MD, estocadas em diferentes umidades relativas.

## 6. Referências bibliográficas

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 4 de 24 de novembro de 1999 <<http://www.anvisa.gov.br>>.

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**, 53:9512-8, 2005.

ANGUELOVA, T., WARTHESEN, J. Degradation of lycopene,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene during lipid peroxidation. **Journal of Food Science**, 65, 71-75, 2000.

ARITA, S., OTSUKI, K., OSAKI, K., MURATA, Y., SHIMOISHI, Y. TADA, M. Reduction in photostability by the esterification of  $\beta$ -cryptoxanthin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 68, 451-453, 2004.

BALASWAMY K, RAO, P. G. P., SATYANARAYANA, A.; RAO, D. G. Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie - Food Science and Technology**, 39, 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**, 38: 989–994, 2005.

BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulamento de antocianinas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** (Online), v. 36, p. 273-279, 2006.

BEATUS, Y.; RAZIEL, A.; ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J. Spray-drying microencapsulation of paprika oleoresin. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie - Food Science and Technology**, 18, 28–34, 1985.

BERTOLINI, A. C.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 780 – 785, 2001.

BILIADERIS, C.G., GALLOWAY, G. Crystallization behavior of amylose-V complexes: structure-property relationships. **Carbohydrate Research**, 189, 31-48, 1991.

BUSTOS, R.; ROMO, L.; YANEZ, K.; DAZ, G; ROMO, C. Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. **Journal of Food Engineering**, 56, 289-293, 2003.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, 65, 1248-1252, 2000.

CHEN, B. H.; TANG, Y. C. Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 2312–2318, 1998.

DAIUTO, E.R.; CEREDA, M.P. **Amido como suporte na desidratação por atomização e em microencapsulamento**. In: CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. (Cord). *Tecnologia, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Sul Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill, v. 3, cap 168, p.449-473, 2003.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, 23, 1361-1394, 2005.

DESOBRY, S. A.; NETTO, F. M.; LABUZA, T. P. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for  $\beta$ -carotene encapsulation and preservation. **Journal of Food Science**, 62, 1158 – 1162, 1997.

DESOBRY, S.; NETTO, F. M.; LABUZA, T. P. Influence of maltodextrin system at an equivalent 25 DE on encapsulated beta-carotene loss during storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, 23: 39-55, 1999.

DIB TAXI, C. M. A.; DE MENEZES, H. C.; SANTOS, A. B.; GROSSO, C. R. F. Study of the microencapsulation of camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice. **Journal of microencapsulation**, 20, 443-44, 2003.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence of the properties of dispersed systems, **Food Hydrocolloids**, 17, 25–39, 2003.

DOKIC-BAUCAL, L; DOKIC, P.; JAKOVLJEVIC, J. Influence of different maltodextrins on properties of O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, 18, 233-239, 2004.

ELIZALDE, B. E; HERRERA, M. L.; BUERA, M. P. Retention of  $\beta$ -carotene encapsulated in a trehalose-based matrix as affected by water content and sugar crystallization. **Journal of Food Science**, 67, 3039-3045, 2002.

FAO/WHO. 1982. Food and Nutrition Paper 25. Rome. p. 22.

FAO/WHO. 2006. Food and Nutrition. Paper 7. Rome. p. 2

FERREIRA, V. L. P. 1991. **Colorimetria em alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 43 p.

FILGUEIRAS T. S., PEIXOTO A. L. Flora e vegetação do Brasil na Carta de Caminha. **Acta Botanica Brasilica**, 16, 263-272, 2002.

FINNEY, J.; BUFFO, R.; REINECCIUS, G. A. Effects of Type of Atomization and Processing Temperatures on the Physical Properties and Stability of Spray-dried Flavors. **Journal of Food Science**, 67, 1108 – 1114, 2002.

FRANCO, C. F. de O.; SAO JOSE, A. R.; SILVA, F. C. P.; CAZE FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; FONTINELLI, I. S. C. **Urucuzeiro: Agronegócios de corantes naturais**. João Pessoa: EMEPA-PB, 2002.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, 40, 1107–1121, 2007.

GOUIN S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Food Science and Technology**, 15, 330-347, 2004.

HOGAN, S. A., MCNAMEE, B. F., O'RIORDAN, E. D., O'SULLIVAN, M. Microencapsulating Properties of Whey Protein Concentrate 75. **Journal of Food Science**, 66, 675 – 680, 2001.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br); acessado 10/12/2008.

JIA, M., KIM, H. J.; MIN, D. B. Effects of soybean oil and oxidized soybean oil on the stability of  $\beta$ -carotene. **Food Chemistry**, 103, 695-700, 2007.

KIM, Y. D; MORR, C. V. Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Spray-Dried Orange Oil Emulsion Particles. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, 44, 1314–1320, 1996

KRISHNAN, S, KSHIRSAGAR, A., C, SINGHAL, R. S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydrate polymers**, 62, 309-315, 2005.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 49, 1-9, 2000 a.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, Structural analysis of microparticles by confocal laser scanning microscopy. **AAPS PharmSciTech**, 1, 10-19, 2000 b.

LEACH, G., OLIVEIRA, G., MORAIS, R. Spray drying of *Dunaliella salina* to produce a  $\beta$ -carotene rich powder. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 20, 82–85, 1998.

LEE, M. T.; CHEN, B. H: Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. **Food Chemistry**, 78:425–432, 2002.

LOKSUWAN, J. Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. **Food Hydrocolloids**, 21, 928-935, 2007.

LYNG, S. M.; PASSOS, M.; FONTANA, J. D. Bixin and  $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. **Process Biochemistry**, 40, 865-872, 2005.

MASCARENHAS, J. M. O.; TOLEDO, M. C. F. **Potential intake of annatto extracts in Brazil**. Book of Abstracts of the Institute of Food Technologists Annual Meeting, Chicago, IL, USA, 1999.

MADENE, A., JACQUOT, M., SCHER, J., DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release-a review. **International Journal of Food Science & Technology**, 41, 1 – 21, 2006.

MATIOLI, G; RODRÍGUEZ-AMAYA, D. Licopeno encapsulado com goma arábica e maltodextrina: Estudo da estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, 5, 197-203, 2002.

MATSUFUJI, H.; CHINO, M; MITSUHARUI, T. Effects of paprika pigments on oxidation of linoleic acid stored in the dark or exposed to light. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 3601-3605, 2004.

MCNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Effects of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 3385-3388, 2001.

MELÉNDEZ-MARTINNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Stability of carotenoid pigments in foods. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 54, 209-215, 2004.

MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: A review. **Agricultural and Food Chemistry**, 2: 79-91, 1998.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; PFANDER, H.; BRITON, G. Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. **Phytochemistry**, 41: 1201-1203, 1996.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana L.*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45: 1050-1054, 1997a.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana L.*) seeds. **Phytochemistry**, 46: 1379-1383, 1997b.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana L.*) seeds. **Phytochemistry**, 52: 135-139, 1999.

MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. **Ciência Tecnologia de Alimentos** 21, 193-196, 2001.

MILANOWSKA, J; GRUSZECKI, W. I. Heat-induced and light-induced isomerization of the xanthophyll pigment zeaxanthin. **Journal Photochemistry Photobiology B**, 80: 178-86, 2005.

MINEMOTO, Y.; HAKAMATA K.; ADACHI S.; MATSUNO R. Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic or maltodextrin by spray-drying. **Journal of Microencapsulation**, 19, 181-189, 2002.

MINGUEZ-MOSQUERA M. I.; JAREN-GALAN M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. **Journal of Science Food Agricultural**, 67, 153-161, 1995.

MOTLAGH, S., RAVINES, P., KARAMALLAH, K. A., MA, Q. The analysis of Acacia gums using electrophoresis. **Food Hydrocolloids**, 20, 848-854, 2006.

MONTENEGRO, M. A., RIOS, A. O., NAZARENO, M.A., MERCADANTE, A. Z., BORSARELLI, C. D.. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 367 – 373, 2005.

NAJAR, S. V., BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effect of light, air, antioxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana L.*). **Food Chemistry**, 29: 283-289, 1988.

NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 50, 893-900, 2007.

PESEK, C. A.; WARTHESEN, J. J. Photodegradation of carotenoids in a vegetable juice system. **Journal of Food Science**, 53, 744-746, 1987.

PESEK, C. A.; WARTHESEN, J. J. Characterization of the photodegradation of beta-carotene in aqueous model systems. **Journal of Food Science**, 53, 1517-1520, 1988.

PESEK, C. A.; WARTHESEN, J. J. Kinetic model for photoisomerization and concomitant photodegradation of  $\beta$ -carotenes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 38, 1313 – 1315, 1990.

PORZIO, M. Flavor encapsulation: A convergence of science and art. **Food Technology**, 58, 40-47, 2004.

PRADO, S.M., BUERA M.P, ELIZALDE, B.E. Structural collapse prevents  $\beta$ -carotene loss in a super-cooled polymeric matrix. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 79–85, 2006.

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

QUEK, S. Y., CHOK, N. N., SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, 46, 386-392, 2007.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying technology**, 16, 1195-1236, 1998.

RÉ, M. I. Microencapsulação: tecnologia que atribui propriedades inteligentes a materiais ativos. **Ciência Hoje**, 27, p. 24 - 29, 2000.

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista, 1996. 42p.

REINICCIUS, G.A. Multiple-core encapsulation – the spray drying of food ingredients. In: P. Vilstrup, Editor, *Microencapsulation of Food Ingredients*, Leatherhead Publishing, Surrey, 151–185, 2001.

ROBERT, P.; CARLSSON, R. M.; ROMERO, N. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. **Journal of the American oil Chemists Society**, 80: 1115-1120, 2003.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E; PEDROZA-ISLAS, R.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; BERISTAIN, C. I.; VERNON-CARTER, E. J. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. **Journal of Food Science**, 69: 351-359, 2004.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 36, 1288-1294, 1990.

ROSENBERG, M.; LEE, S.J. Water-insoluble, whey protein-based microspheres prepared by an all-aqueous process. **Journal of Food Science**, 69: FEP 50-58, 2004.

SANDI CUEN, M. P.; BECERRA, R. El achiote. **Biodiversitas - Boletín de la Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad**. 46: 7-11, 2003.

SANTOS, A. B.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25: 322-326, 2005.

SATYANARAYANA, A; RAO, P. G. P., RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana L.*). **Journal of Food Science and Technology Mysore**, 40: 131-141, 2003.

SELIM, K.; TSIMIDOU, M.; BILIADERIS, C. G. Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. **Food Chemistry**, 71: 199-206, 2000.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 33, 501-547, 1993.

SHAIKH, J., BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**, 94, 105-110, 2006.

SHU, B.; YU, W.; ZHAO, Y.; LIU, X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, 76, 664 – 669, 2006.

SUTTER, S. C.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E.  $\beta$ -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. **International Journal of Pharmaceutics**, 332, 45-54, 2007.

SZENTE, L.; MIKUNI, K.; HASHIMOTO, H.; SZEJTLI, J. Stabilization and solubilization of lipophilic natural colorants with cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena Molecular Recognition in Chemistry**, 32, 81-89, 1998.

TOLEDO, M. C. de F. Regulamentação de uso de corantes naturais. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 49: 67S-70S, 1999.

TOLEDO DE OLIVEIRA, T., NAJEM, T. J.; ROCHA DA COSTA, M.; MARCIANO DA COSTA, L.; MAGALHÃES, N. M, STRINGHETA, P. C. , QUEIROGA DE LIMA, E; KLING DE MORAES, G. H. , DA SILVA, V. H. Propriedades biológicas de los tintes naturales. **ARS Pharmaceutica**, 45: 5-20, 2004.

TRINDADE, M.A; GROSSO C.R.F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. **Journal of Microencapsulation**, 17, 169-176, 2000.

VERBEKEN, D.; DIERCKX, S., DEWETTINCK, K. Exudate gums: occurrence, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63, 10-2, 2003.

WAGNER, L. A.; WARTHESEN, J. J. Stability of spray-dried encapsulated carrots carotenes. **Journal of Food Science**, 60, 1048 – 1053, 1995.

WATANABE, Y., FANG, X., ADACHI, S., FUKAMI, H., MATSUNO, R. Oxidation of 6-O-arachidonoyl L-ascorbate microencapsulated with a polysaccharide by spray-drying **Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology**, 37, 395-400, 2004.

WINNING, M. Micro-encapsulated colours - natural colours with improved stability. **Agro Food Industry Hi-Technology**, 6, 13-15, 1995.

## *CAPÍTULO 2*

### **LIGHT STABILITY OF SPRAY-DRIED BIXIN ENCAPSULATED WITH DIFFERENT EDIBLE POLYSACCHARIDE PREPARATIONS**

**Artigo publicado na revista "Food Research International" 38, 1073-1077, 2005.**

## **Abstract**

Bixin, a carotenoid extracted from annatto seeds, was encapsulated by spray-drying with gum arabic or maltodextrin, and the stability was evaluated in aqueous solution both under illumination or in the dark at 21 °C. As expected, the microcapsules containing emulsifier, such as gum arabic or maltodextrin+Tween 80, showed the highest encapsulation efficiency, respectively 86 and 75%, and also less superficial imperfections and higher stability than bixin encapsulated with maltodextrin alone or blended with sucrose. The kinetic behavior of bixin photodegradation in all encapsulated systems was composed by two first-order decays, due to the presence of bixin outside and inside the microcapsules. Bixin encapsulated with gum arabic was 3 to 4 times more stable than that encapsulated with maltodextrin. In all systems, greater bixin stability (< two orders of magnitude) was observed in the dark than under illuminated conditions. In addition, 10-times greater bixin stability was observed for encapsulated solutions as compared to the non-encapsulated systems in the absence of light.

*Keywords:* Bixin; Microencapsulation; Photodegradation; Kinetics; Microstructure

## 1. Introduction

Annatto (*Bixa orellana* L.), known as urucum in Brazil, is a small tree native to the Central and South American rain forests and these days is cultivated in many countries in South and Central America, Africa and Asia. The tree produces clusters of fruits covered by flexible thorns, which contain red seeds inside them from which an orange-red dye is extracted. The annatto colorants are used to color a wide range of foods, such as dairy products, bakery products, fish, soft drinks, meat products, snack foods and powdered dry mixes (Preston & Rickard, 1980).

More than 80% of the total pigments in the seeds coat consists of the carotenoid bixin, 6-methyl hydrogen 9'*cis*-6,6'-diapocarotene-6,6'-dioate (Preston & Rickard, 1980). The long system of conjugated double bonds present in the structure of bixin is responsible for the red color, but also for the poor stability of the molecule under processing and storage conditions such as high temperature, light and oxygen (Najar, Bobbio, & Bobbio, 1988; Scotter, Wilson, Appleton, & Castle, 1998; Montenegro, Rios, Nazareno, Mercadante, & Borsarelli, 2004).

One of the alternatives used to improve carotenoid stability is the microencapsulation technique, which entraps a sensitive ingredient inside a coating material. The structure formed around the microencapsulated substance (core) is called the wall. Of the techniques available for microencapsulation, spray-drying, a well-known technology in the food industry, is the most commonly used. The wall materials most frequently used include gums, maltodextrins of different dextrose equivalent (DE), some proteins and their blends, and these have a strong influence on the stability and solubility of the core ingredient.

Of four different blended wall materials (maltodextrin 15 DE, gum arabic, gelatin and sodium caseinate), maltodextrin was found to be the most effective in protecting the

carotenoids from paprika oleoresin (Beatus, Raziell, Rosenberg, & Kopelman, 1985). Desobry, Netto, and Labuza (1999) reported that greater  $\beta$ -carotene stability was achieved using maltodextrin 4 DE (blended with sugar) as compared to maltodextrin 15 (blended with sugar) and 25 DE (alone). On the other hand, carrot juice, containing  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, showed greater stability when encapsulated with maltodextrin 36.5 DE than with 4, 15 and 25 DE (Wagner & Warthesen, 1995). In these studies, spray-drying was used to encapsulate the carotenoids. Using freeze-drying for encapsulation, the polymer polyvinylpyrrolidone (PVP) 40 showed, as compared to pullulan and PVP360, the most protective effect on saffron carotenoids (Selim, Tsimidou, & Biliaderis, 2000).

Since the bixin molecule is shorter and more polar than  $\beta$ -carotene and information on bixin encapsulation is rare, the objectives of this study were (1) evaluate the effect of encapsulation with two polysaccharides on bixin stability and (2) correlate the microcapsule morphology and encapsulation efficiency with the rate of bixin degradation, using an aqueous system under light.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Material*

Bixin crystals were prepared from annatto seeds by extraction with ethyl acetate and crystallization procedures according to Rios and Mercadante (2004), showing purity of 94% as determined by high performance liquid chromatography-photodiode array detector. The gum arabic, maltodextrin (20 DE) and sucrose used were food grade. All other reagents were analytical or chromatographic grades.

## 2.2. Methods

### 2.2.1 .Encapsulation

All the microcapsules were prepared by dissolving bixin crystals (0.04 g) in 20 ml ethanol, which was added to the polysaccharide solutions (180 ml water) achieving 40% of soluble solids in the proportions shown in Table 1. The solution was vigorously homogenized at 1200 rpm for 30 min at room temperature and maintained under slow agitation during spray-drying. The spray-drier (Lab Plant SD-04, United Kingdom) was operated at an air flow rate of 30 ml/min, entrance and exit air temperatures of 180°C and 130°C, respectively, air pressure of 5 kgf/cm<sup>2</sup> and aspersion nozzle diameter of 0.7 mm. The microcapsules were immediately stored in the freezer.

### 2.2.2. Model-systems

The bixin microcapsules or crystals were added to distilled water solutions containing 0.5% potassium sorbate to avoid fungal proliferation. The solutions were homogenized and immediately distributed into tubes with no headspace and stored under fluorescent light (*ca.* 700 lux) or in the dark at 21 ± 2°C.

In order to compare the influence of the different wall materials on bixin stability, two sets of experiments were carried out standardizing the amount of bixin microcapsules at 0.02 g powder/ml (trial 1) or of a bixin concentration in the solution at *ca.* 0.3 µg bixin/ml (trial 2). In the case of non-encapsulated systems, 0.3 µg/ml of bixin crystal was used (Table 1).

Table 1

Microcapsule composition, efficiency, and lifetimes for the fast ( $\tau_F$ ) and slow ( $\tau_S$ ) decay components, and the delay time ( $t_s$ ) associated with the photodegradation of encapsulated bixin and the lifetime under dark conditions,  $\tau_D$ .

System <sup>a</sup>		ME <sup>b</sup> %	WS <sup>c</sup> s	Trial 1						Trial 2					
				[Bix] <sub>0</sub> μg/ml	$\tau_F$ h	$\tau_S$ h	$t_s$ h	$\tau_D$ h	Turbidity <sup>d</sup>	[Bix] <sub>0</sub> μg/ml	$\tau_F$ h	$\tau_S$ h	$t_s$ h	$\tau_D$ h	Turbidity <sup>d</sup>
<b>Encapsulated</b>															
<b>1</b>	95% GA + 5% SUC	86.4	183	14.35	3.3	66	74	12000	1.009	0.297	4.3	245	40	8300	0.067
<b>2</b>	80% MD + 20% SUC	42.2	65	0.160	3.5	47	27	1400	0.003	0.299	1.1	44	72	1800	0.005
<b>3</b>	100% MD + 0% SUC	54.0	64	0.538	1.2	30	27	2700	0.091	0.317	1.0	13	6	1220	0.079
<b>4</b>	99.8% MD + 0.2% Tween	75.1	106	0.650	3.4	81	4	2800	0.110	0.265	2.5	52	4	2500	0.088
<b>Non-encapsulated</b>															
<b>5</b>	0.2% Tween	-	-	0.310	4.0	n.d.	n.d.	300	0.076	0.270	4.4	n.d.	n.d.	230	-
<b>6</b>	99.8% MD + 0.2% Tween	-	-	0.278	4.0	n.d.	n.d.	280	0.076	0.303	6.9	n.d.	n.d.	290	-

<sup>a</sup>GA: gum arabic, SUC: sucrose, MD: maltodextrin 20 DE. <sup>b</sup>Microencapsulation efficiency. <sup>c</sup>Water solubility. <sup>d</sup>Turbidity at 550 nm.

### 2.2.3. Bixin determination

For the total bixin (TB) determination, 1 g of bixin microcapsule containing maltodextrin or 10 ml of microcapsule solution, was homogenized with 20 ml water in a Vortex for 1 min, followed by exhaustive extraction of bixin with dichloromethane (total of 40 ml). When gum arabic was used as the wall material, 10 ml methanol also had to be added to the water.

Surface bixin (SB) was determined by direct extraction of 1 g of bixin microcapsule with 5 ml dichloromethane in a Vortex for 30 s, followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. After phase separation, the liquid phase containing the bixin was collected and filtered through a Millipore membrane (0.22  $\mu\text{m}$ ).

Bixin, dissolved in dichloromethane, was quantified in a spectrophotometer at 470 nm, using absorptivity ( $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) of 2826 (Lara, 1984). The determination of the bixin level in the microcapsules was carried out in triplicate, whereas the monitoring of the stability in the model-systems was conducted in duplicate. The coefficient of variation values were lower than 3% in all analyses.

### 2.2.4. Microencapsulation efficiency (ME)

ME was calculated according to McNamee, O'Riordan, and O'Sullivan (2001), as shown in equation 1.

$$\% \text{ ME} = \frac{(\text{TB} - \text{SB})}{\text{TB}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

#### *2.2.5. Turbidity (A550nm)*

For all model-systems, the turbidity was determined by measuring the absorbance of the initial solution in a spectrophotometer at 550 nm according to the method of Lee, Shim, Bae, Cha, Park, and Lee (2003). Measurements were made against distilled water and the experiments were performed in triplicate. The coefficient of variation values were lower than 1% in all analyses.

#### *2.2.6. Solubility*

The powder solubility in water was determined according to Santos (2003). The mixture of the powder in the water solution (0.4% w/v) was gently stirred until solid solubilization. The powder was considered soluble when the time of solubilization was not greater than 5 min. The time necessary for complete microcapsule solubilization was recorded. This determination was conducted in triplicate.

#### *2.2.7. Microstructure*

The morphology of the microcapsules was evaluated by scanning electronic microscopy (SEM) (JEOL, T-30 model, Japan) using an acceleration voltage of 10 kV. The encapsulated samples were fixed in stubs containing a double-faced adhesive metallic tape and coated with gold in a Balzers evaporator (SCD 050, Austria) for 240 s, with a current of 40 mA.

### 3. Results and Discussion

According to equation 2, the kinetic plots for the photodegradation of bixin in encapsulated systems 1 to 4 were composed of two first-order decays, Figure 1a,

$$[\text{Bix}]_t = [\text{Bix}]_0 \{A \exp(-t/\tau_F) + B \exp(-t/\tau_S)\} \quad (\text{eq } 2)$$

where  $A$  and  $B$  are the pre-exponential factors, and  $\tau_F$  and  $\tau_S$  are the lifetimes of the fast and slow decay components, respectively. Table 1 shows the lifetime values  $\tau_i$ , together with the delay time for the beginning of the slower decay,  $t_s$ , as observed for systems 1 to 4. A similar behavior was reported by Desobry, Netto, and Labuza (1997) for the degradation of  $\beta$ -carotene encapsulated in maltodextrin.

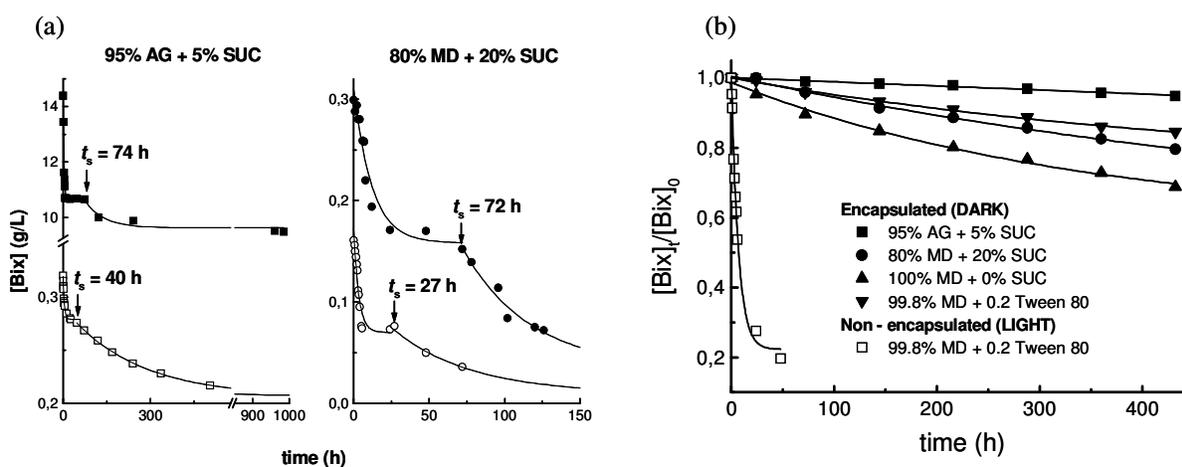


Fig. 1. Kinetic degradation curves of encapsulated bixin in aqueous solutions at 21 °C, (a) under illumination (700 lux), (b) in dark conditions.

As indicated in Figure 1a and Table 1, the  $t_s$  values were dependent on both the wall material used for encapsulation and the initial bixin concentration. In blended preparations of AG or MD with sucrose, increasing the initial bixin concentration increased the  $t_s$ .

The lower stability of the bixin encapsulated in systems 2 and 3 showed a direct correlation with the reduced encapsulation efficiency and greater solubility of the microcapsule in water observed for these systems, although it was not dependent on the turbidity in aqueous medium (Table 1). This fact can be attributed to the lack of emulsifying properties and low film-forming capacity of the maltodextrins, which also affected the morphology of the microcapsules (Figure 2), presenting a more heterogeneous form with a greater amount of surface imperfections, despite their spherical form with a smooth surface, typical of maltodextrin capsules (Dib Táxi, Menezes, Santos, & Grosso, 2003). These imperfections could also have contributed to the shorter shelf life of the microencapsulated bixin when exposed to illumination in the model system.

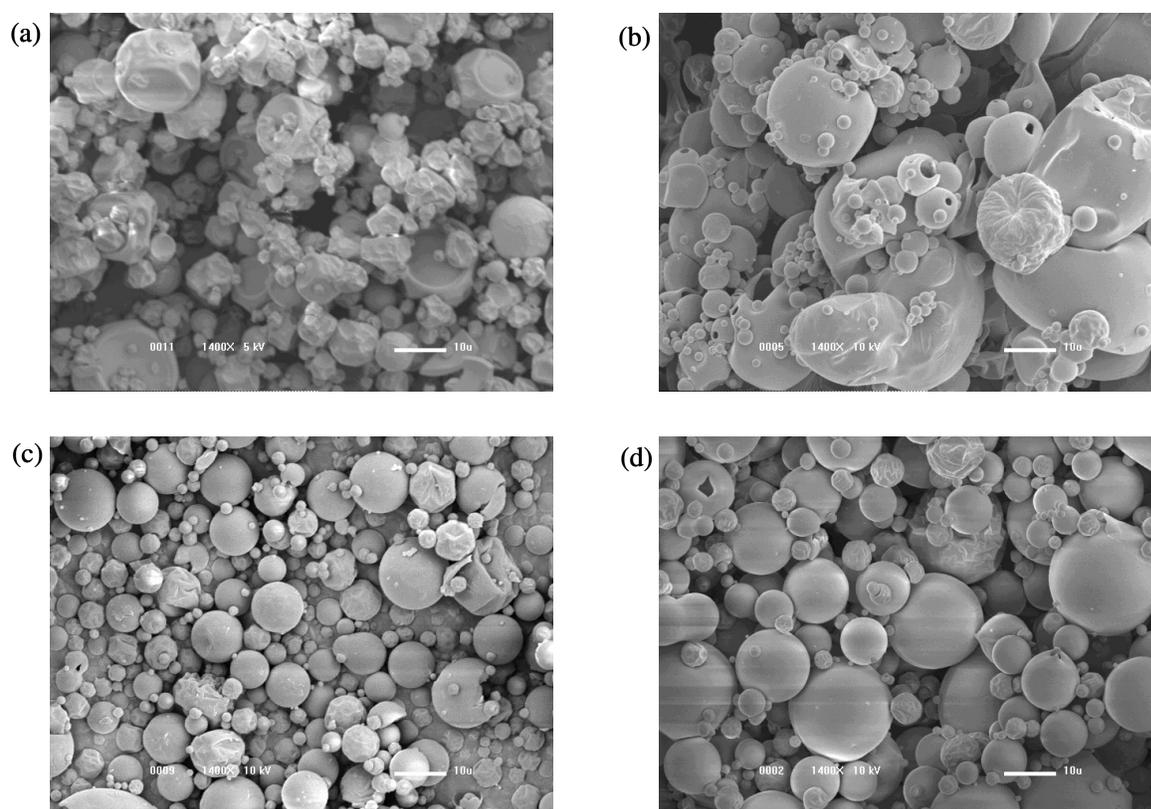


Fig. 2. SEM micrographs of spray-dried microencapsulated bixin with (a) gum arabic/sucrose (95:5), (b) maltodextrin 20 DE/sucrose (80:20), (c) 100% maltodextrin 20 DE (d) maltodextrin 20 DE/Tween 80 (99.8:0.2).The magnification of all micrographs was 1,400.

Since the addition of the emulsifier Tween 80 to the maltodextrin (system 4) increased the encapsulation efficiency by 33 and 21%, as compared, respectively, to systems 2 and 3 (maltodextrin without emulsifier), the lifetime of the fast decay observed in S4 doubled as compared to those from S2 and S3. It is interesting to note that when sucrose was replaced by the surfactant Tween 80 the  $t_s$  was short, as for the bixin encapsulated in 100% maltodextrin (system 3). The microcapsules from system 4 showed a spherical form with less superficial imperfections (Figure 2d) than those encapsulated in maltodextrin alone. The greater turbidity and lower solubility in water of the microcapsules from system 4 (Table 1) could also have contributed to a reduced exposition of the bixin to photodegradation.

The microcapsule composed of gum arabic (system 1) was more stable to photodegradation than that composed of maltodextrin + Tween (system 4). This was probably due to the structure of the gum arabic, which is a highly branched heteropolymer of sugars, glucuronic acid and a small amount of protein covalently linked to the carbohydrate chain, that is a well-known film-forming and acts as an excellent emulsifier for non-polar substances (Dickinson, 2003). As a consequence, of the wall compositions studied, gum arabic presented the highest encapsulation efficiency. This result is in agreement to Minemoto, Hakamata, Adachi, and Matsuno (2002) who reported that the linoleic acid emulsions prepared with gum arabic were more stable than those formulated with maltodextrin in the presence or absence of emulsifiers (Tween 20, Tween 85 and Span 20), with a consequently greater encapsulation efficiency for gum arabic.

The microcapsules containing gum arabic (Figure 2a) showed superficial indentations and an irregular form, as well as a lack of cracks and breakages, which ensured greater protection of the ingredient. This morphology was also observed by Bertolini, Siani, and

Grosso (2001) in microcapsules of monoterpenes using gum arabic as the wall material. The indented surface of the microcapsules made with gum arabic can be attributed to drying by spray-drying, which causes shrinkage of the particles during the drying and cooling stages (Sheu & Rosenberg, 1998; Pedroza-Islas, Vernon-Carter, Dúran-Domínguez, & Trejo-Martínez, 1999).

The photodegradation kinetics of the non-encapsulated bixin systems showed a single exponential decay, with lifetimes very similar to those observed for the fast component of the photodegradation of the encapsulated systems (Table 1).

Figure 1b shows the kinetic curves for the degradation of encapsulated bixin under dark conditions as compared to the photodegradation of bixin in a non-encapsulated system. In all systems, the degradation of encapsulated bixin under dark condition was too slow to assure a first-order behavior. However, the comparison of the initial degradation rates at different initial bixin concentrations (trials 1 and 2) allowed for the confirmation of a first-order process. The lifetime values under dark conditions,  $\tau_D$ , are presented in Table 1. As for photodegradation, bixin encapsulated with gum arabic was 3 to 4 times more stable than that encapsulated with maltodextrin. This could have been due to the greater access of oxygen to bixin encapsulated in maltodextrin or bixin degradation at the surface.

In all systems, greater bixin stability (< two orders of magnitude) was observed in the dark than under illuminated conditions. In addition, 10-times greater bixin stability was observed for encapsulated solutions as compared to the non-encapsulated systems in the absence of light.

The above results also agreed with previous reports about bixin photostability in organic solvents (Najar et al., 1988) and incorporated into microcrystalline cellulose (Glória, Vale, & Bobbio, 1995).

## Conclusions

The kinetic behavior for the photodegradation of encapsulated bixin can be interpreted as a function of two types of bixin molecules hosted in the microencapsulated structure of systems 1 to 4. According to this model, one type of bixin molecule decays rapidly, independent of the wall material and the initial bixin concentration, with an average lifetime of  $\langle \tau_F \rangle = 3.8 \pm 3.0$  h. This value is similar to those observed for the single decay in the non-encapsulated systems 5 and 6, under illumination. Therefore, the fast decay component should result from the photodegradation of the bixin molecules associated with the surface of the microcapsules, where the carotenoid molecules are highly exposed to the surrounding environment. In turn, the slower decay component should correspond to the degradation of bixin molecules incorporated into the microcapsules. Thus, these bixin molecules are more protected from both oxidative and photochemical degradation.

## Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Funding Agency (CNPq) and DSM Nutritional Products (Switzerland) for their financial support. C.D.B thanks CONICET and Fundación Antorchas of Argentina for financial support.

## References

Beatus, Y., Raziell, A., Rosenberg, M., & Kopelman, I .J. (1985). Spray-drying microencapsulation of paprika oleoresin. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 18, 28-34.

- Bertolini, A. C., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2001). Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 780-785.
- Desobry, S. A., Netto, F. M., & Labuza, T. P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for  $\beta$ -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, *62*, 1158-1162.
- Desobry, S., Netto, F. M., & Labuza, T. P. (1999). Influence of maltodextrin system at an equivalent 25 DE on encapsulated beta-carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, *23*, 39-55.
- Dickson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, *17*, 25-39.
- Dib Taxi, C. M. A., Menezes, H. C., Santos, A. B., & Grosso, C. R. F. (2003). Study of the microencapsulation of camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice. *Journal of Microencapsulation*, *20*, 443-448.
- Glória, M. B. A., Vale, S. R., & Bobbio, P. A. (1995). Effects of water activity on the stability of bixin in annatto extract microcrystalline cellulose model system. *Food Chemistry*, *52*, 389-391.
- Lara, W. H. (1987). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios. Padrões de Identidade e Qualidade (pp.117). São Paulo, Brazil.
- Lee, K. Y., Shim, J., Bae, I. Y., Cha, J., Park, C. S., & Lee, H. G. (2003). Characterization of gellan/gelatin mixed solutions and gels. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, *36*, 795-802.

- McNamee, B. F., O'Riordan, E. D., & O'Sullivan, M. (2001). Effects of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 3385-3388.
- Minemoto, Y., Hakamata, K., Adachi, S., & Matsuno, R. (2002). Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic or maltodextrin by spray-drying. *Journal of Microencapsulation*, *19*, 181-189.
- Montenegro, M. A., Rios, A. O., Nazareno, M.A., Mercadante, A. Z., & Borsarelli, C. D. (2004). Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 367 – 373.
- Najar, S. V., Bobbio, F. O., & Bobbio, P.A. (1988). Effects to light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). *Food Chemistry*, *29*, 283-289.
- Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E. J., Dúran-Domínguez, C., & Trejo-Martínez, S. (1999). Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation – I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Research International*, *32*, 367-374.
- Preston, H. D., & Rickard, M. D. (1980). Extraction and chemistry of annatto. *Food Chemistry*, *5*, 47-56.
- Rios, A. O., & Mercadante, A. Z. (2004). Aplicação de CLAE para acompanhar a cristalização e otimização das condições de extração e saponificação de bixina em “snacks” extrusados. *Revista Alimentos e Nutrição* (submitted).
- Scotter, M. J., Wilson, L. A., Appleton, G. P., & Castle, L. (1998). Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and

colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 1031-1038.

Santos, A. B. (2003). Encapsulação de oleoresina de paprica por atomização em goma arábica e em aglomerados porosos de amido/gelatina: estabilidade e aplicação. PhD Thesis. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.(pp. 1-171). Campinas, Brazil.

Selim, K., Tsimidou, M., & Biliaderis, C. G. (2000). Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chemistry*, *71*, 199-206.

Sheu, T. Y., & Rosenberg, M. (1998). Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science*, *63*, 491-494.

Wagner, L. A., & Warthesen, J. J. (1995). Stability of spray-dried encapsulated carrots carotenes. *Journal of Food Science*, *60*, 1048 - 1053.

## *CAPÍTULO 3*

### **EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MATERIAL DE PAREDE NAS PROPRIEDADES E NA FOTOESTABILIDADE DAS MICROCÁPSULAS DE BIXINA ESTOCADAS EM GEL**

**Manuscrito em preparação para ser submetido à revista “Food Chemistry”**

## Resumo

A bixina, extraída de sementes de urucum, foi encapsulada por spray-dryer utilizando maltodextrina (MD) e goma arábica (GA), nas proporções 1:1 (MD/GA<sub>1:1</sub>) ou 4:1 (MD/GA<sub>4:1</sub>), como materiais de parede. As microcápsulas de MD/GA<sub>1:1</sub> apresentaram maior rendimento, retenção e eficiência do microencapsulamento. Com relação a morfologia, as microcápsulas estudadas apresentaram formatos que variaram em função da composição do material de parede, ambas com paredes contínuas e superfície sem fissuras, orifícios ou injúrias na superfície. A estabilidade da bixina encapsulada com os diferentes materiais de parede foi avaliada em gel na presença ou ausência de luminosidade a 21° C, sob O<sub>2</sub>. A cinética de fotodegradação da bixina foi de ordem zero, sendo que em microcápsulas foram observadas três etapas de degradação, enquanto que no sistema com a bixina não encapsulada, apenas uma. De forma geral, as microcápsulas de MD/GA<sub>1:1</sub> conferiram maior estabilidade à bixina do que as MD/GA<sub>4:1</sub>, tanto na presença como na ausência de luminosidade. Conforme o esperado, a bixina encapsulada foi mais estável que a não encapsulada, com  $k_{obs}$  aproximadamente 13 a 15 vezes menores em comparação aos respectivos não encapsulados.

**Palavras-chave:** Microencapsulamento; bixina; goma arábica; maltodextrina; viscosidade; fotoestabilidade; sistema-modelo em gel

## 1. Introdução

O urucueiro (*Bixa orellana* L.) é um arbusto perene originário da América do Sul, mais especificamente da região amazônica, também cultivado em outras regiões do mundo de clima tropical como a América Central, a África e a Ásia (Mercadante & Pfander, 1998). Das sementes do urucum é obtido um extrato de coloração avermelhada, do qual a bixina corresponde a 80% do total de carotenóides (Preston & Rickard, 1980).

Os carotenóides do urucum são amplamente utilizados na indústria de alimentos na coloração de molhos, bebidas, sobremesas, margarinas e queijos ([www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)). Entretanto, a presença de um longo sistema de ligações duplas conjugadas na estrutura desses pigmentos, os torna susceptíveis à alta temperatura, luminosidade, oxigênio e baixo pH, limitando seu emprego em alguns produtos alimentícios. Dentre os fatores citados, a temperatura tem sido alvo de vários estudos de estabilidade dos carotenóides, inclusive da bixina (Scotter, Castle, & Appleton, 2001; Rios, Borsarelli, & Mercadante, 2005). Porém, a exposição dos alimentos à luz durante o processamento e/ou pelo uso de embalagens transparentes é muitas vezes inevitável e também pode acarretar perdas significativas do conteúdo dos carotenóides devido à fotodegradação (Najar, Bobbio, & Bobbio, 1988; Pertersen, Wiking & Stapelfeld, 1999, Calvo & Santa-María, 2008).

Uma das alternativas para minimizar as perdas dos carotenóides nos alimentos é a microencapsulação, técnica na qual, o ingrediente de interesse (núcleo ou recheio) é envolvido com uma camada polimérica (material de parede ou agente encapsulante) diminuindo sua exposição aos fatores indesejáveis do processamento e da estocagem. Barbosa, Borsarelli e Mercadante (2005) reportaram que a bixina encapsulada foi 10 vezes mais estável que a não encasulada, quando submetida à exposição à luz em sistema-modelo aquoso. O mesmo foi observado por Rosenberg e Lee (2004) para oleoresina de páprica

encapsulada que após 30 dias de estocagem em meio aquoso apresentou aproximadamente 10 % de degradação, enquanto que na forma não encapsulada, apresentou aproximadamente 85% de perda.

Tradicionalmente, a goma arábica (GA) e a maltodextrina (MD), ambas puras ou em misturas, têm sido empregadas como materiais de parede na microencapsulação de carotenóides (Wagner & Wathenser, 1995; Desobry, Netto & Labuza, 1999; Barbosa et al., 2005) e a influência de suas características, como a viscosidade (Zilberboim, Kopelman & Talmon, 1986; Loksuwan, 2007), o grau de dextrose equivalente (DE) da MD e a composição do material de parede nas propriedades ou na estabilidade dos carotenóides encapsulados foi investigada em alguns estudos (Wagner & Warthensen, 1995; Desobry et al., 1999; Barbosa et al., 2005).

Zilberboim et al. (1986) reportaram que soluções mais viscosas de goma arábica misturada a diferentes biopolímeros apresentaram maiores retenção e eficiência do microencapsulamento de carotenóides de páprica. Por outro lado, Loksuwan (2007) verificaram que a solução de material de parede mais viscosa (amido modificado de mandioca) apresentou maior  $\beta$ -caroteno de superfície que as de amido de mandioca convencional ou de maltodextrina, com menor viscosidade. Com relação à estabilidade, Wagner e Warthensen (1995) reportaram que as microcápsulas de MD 36,5 DE foram mais efetivas na proteção de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno de suco de cenoura do que as de 4 DE quando estocadas no escuro ou expostas à luz (2150 lux) em sistema em pó a 45 °C na presença de O<sub>2</sub>. Ao contrário do esperado, a degradação dos carotenos ( $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno) foi bastante similar na luz e no escuro, com perdas de 90% em microcápsulas de MD 4 DE e de 70% em microcápsulas de MD 36,5 DE, após 8 semanas de estocagem. O comportamento cinético em todas as condições estudadas foi de primeira ordem. Desobry et al. (1999)

verificaram que microcápsulas de MD com menor DE (4 e 15 DE) misturadas a mono- e dissacarídeos redutores conferiram maior estabilidade ao  $\beta$ -caroteno em comparação a MD 25 DE (controle), em sistema em pó a 25, 35 e 45 °C sob 11 e 33% de umidade relativa (UR) do ar. Não foi observada influência da UR na degradação do  $\beta$ -caroteno e o carotenóide foi mais estável quando encapsulado com MD 4 DE e glicose, apresentando tempo de meia - vida ( $t_{1/2}$ ) de 87 semanas a 25 °C.

Microcápsulas de GA/sacarose (95:5) foram mais efetivas na prevenção da fotodegradação da bixina do que as de MD 20 DE/sacarose, MD 20 DE/tween 80 ou MD 20 DE (Barbosa et al., 2005). Os experimentos foram realizados em sistema-modelo aquoso a 700 lux ou na ausência de luminosidade, ambos a 21 °C /O<sub>2</sub> e de forma geral, o tipo de cinética seguido pela bixina nas condições estudadas foi de primeira ordem com uma ou duas etapas de degradação.

Considerando que, além de influenciar a estabilidade do recheio, a composição do material de parede está diretamente relacionada às propriedades importantes das microcápsulas como morfologia, solubilidade e liberação controlada do recheio, os objetivos deste trabalho foram (1) avaliar o efeito da viscosidade de dois materiais de parede na retenção, eficiência da microencapsulação, rendimento e morfologia das microcápsulas de bixina e (2) correlacionar estas propriedades com a estabilidade das microcápsulas de bixina em sistema-modelo de gel.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Material**

Os cristais de bixina foram obtidos das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.), de acordo com Rios e Mercadante (2004), por extração com acetato de etila e cristalizações

sucessivas com etanol até obter pureza de aproximadamente 94%. A goma arábica (GA) (INSTANTGUM C IRX 40642 - Colloides Naturels Brasil) e a maltodextrina (MD) 20 DE (MOR REX 1920 - Corn Products Brasil), ambas de grau alimentício, foram utilizadas como materiais de parede no encapsulamento. O agar (Merck) foi utilizado como base dos sistemas-modelo.

## **2.2. Determinação da viscosidade das soluções de polissacarídeos**

A viscosidade das soluções de polissacarídeos foi determinada em viscosímetro Brookfield (Brookfield Engineering Laboratory Inc.). O intervalo da taxa de cisalhamento variou de 0 a  $100\text{ s}^{-1}$  e todas as determinações foram feitas em duplicata a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **2.3. Obtenção das microcápsulas**

Os polissacarídeos MD e GA, nas proporções 1:1 (MD/GA<sub>1:1</sub>) ou 4:1 (MD/GA<sub>4:1</sub>), ambos a 40% p/v, foram solubilizados em 180 mL de água destilada ( $60^{\circ}\text{ C}$ ) sob aquecimento ( $70^{\circ}\text{ C}$ ) e agitação, até total dissolução dos sólidos. Após as soluções de polissacarídeos atingirem  $30^{\circ}\text{ C}$ , a bixina (0,04 g de cristais) previamente dissolvida em 20 mL de etanol, com auxílio de ultrassom, foi adicionada vagarosamente sob agitação à solução contendo os polissacarídeos. Cada solução foi homogeneizada vigorosamente a 1200 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente, e submetida à secagem em spray-dryer (Lab Plant SD-04, United Kingdom). Durante a secagem, a solução foi mantida sob agitação com barra magnética em placa para assegurar maior homogeneidade. As condições de operação do spray-dryer foram: diâmetro do bico injetor de 0,7mm, vazão de saída do ar de 30 mL/min, temperatura de entrada e de saída do ar de 180 e  $117^{\circ}\text{ C}$ , respectivamente, e pressão do ar de  $5\text{ kgf/cm}^2$ . Após a secagem, as microcápsulas de MD/GA<sub>1:1</sub> e MD/GA<sub>4:1</sub> foram imediatamente estocadas em garrafas de vidro, em atmosfera de  $\text{N}_2$  e estocadas em

freezer (-20° C). Com objetivo de minimizar possíveis variações inerentes ao processo de secagem, cada amostra de bixina microencapsulada foi composta pela mistura do pó proveniente de dois processos de encapsulamento.

#### **2.4. Determinação do rendimento das microcápsulas de bixina**

O rendimento (% Rd) do pó foi determinado utilizando-se a massa total de sólidos antes da microencapsulação (MSA) e a massa total de sólidos obtidos após a microencapsulação (MSD), conforme Nunes e Mercadante (2007), equação 1.

$$\%Rd = \frac{MSD}{MSA} \times 100 \quad \text{eq. 1}$$

#### **2.5. Caracterização das microcápsulas**

##### *2.5.1. Bixina total (BT) e bixina de superfície (BS)*

Para determinação de bixina total e de superfície foi utilizado o método descrito por Barbosa et al. (2005). Para a bixina total, 1 g de microcápsula foi solubilizada em 20 mL de água destilada e agitada por 1 minuto em vórtex até total dissolução. A extração exaustiva do carotenóide foi realizada em um funil de separação contendo 15 mL de diclorometano (DCM). Após agitação do conteúdo e separação de fases, a fração orgânica contendo a bixina foi coletada. Duas outras extrações consecutivas foram feitas com a adição de mais 15 mL e 10 mL de DCM, respectivamente, agitando a mistura no próprio funil de separação e coletando em cada uma delas, a fração orgânica contendo a bixina. Todas as fases orgânicas coletadas foram misturadas e concentradas em evaporador rotatório (T < 30° C) até aproximadamente 10 mL.

Para determinação da bixina de superfície, 1g de microcápsula foi agitada com 5 mL de DCM em vórtex por 30 segundos, e em seguida centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos (Fanem – Modelo 206 BL). Após a separação das fases, a fração alaranjada contendo o carotenóide foi coletada e filtrada em membrana de Millipore (0,22 µm). A membrana foi lavada com DCM até totalizar um volume de aproximadamente 10 mL. As determinações de BT e BS das microcápsulas foram realizadas em triplicata.

#### 2.5.2. Eficiência de microencapsulação (EM)

A EM foi calculada segundo McNamee, O’Riordan e O’Sullivan (2001) utilizando-se o valor de Bixina total (BT) e de superfície (BS), conforme a equação 2.

$$\%EM = (BT - BS) / BT \times 100 \quad \text{eq. 2}$$

#### 2.5.3. Retenção (Rt)

A retenção (Rt) da bixina nas microcápsulas durante a secagem em spray-dryer foi determinada segundo Zilberboim, Kolpeman e Taylor (1986), considerando a quantidade de bixina na solução do material de parede antes da secagem (BMP) e após a secagem (BT= bixina total), conforme a equação 3.

$$\%Rt = \frac{BT}{BMP} \times 100 \quad \text{eq. 3}$$

#### 2.5.4. Microestrutura

A morfologia das microcápsulas foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura, segundo Santos, Fávaro-Trindade e Grosso (2005). As microcápsulas foram

fixadas em cilindros metálicos com fita carbono dupla face e recobertas com ouro operando a 40 mA por 75 segundos em um evaporador Balzer (SCDS-50). A análise de microestrutura foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no microscópio JEOL JSM-T300, com aceleração de voltagem de 10 ou 5 kv e aumento de 1300 a 2500 vezes.

## **2.6. Sistema-modelo**

O gel (0,5 % p/v) foi preparado dissolvendo-se agar em água destilada (80 °C) sob aquecimento (105 °C), que após 5 minutos de ebulição foi resfriado até atingir 45 °C. As microcápsulas de bixina em água ou bixina solubilizada em uma pequena quantidade de etanol (não encapsulada), foram resfriadas a 5 °C, e em seguida adicionados ao agar (45 °C), sob agitação com barra magnética em placa. O conservante sorbato de potássio (0,5 % p/v) foi adicionado durante o preparo do gel de todos os sistemas-modelo para evitar a proliferação de fungos. A concentração inicial do carotenóide foi de aproximadamente 0,3 µg/g de gel em todos os sistemas. Após homogeneização, as soluções foram distribuídas em tubos de vidro transparentes com tampa de rosca de volume sem espaço livre. Nos sistemas onde foi adicionada bixina não encapsulada, o agar foi formulado com MD e GA nas mesmas proporções das microcápsulas de MD/GA <sub>1:1</sub> e MD/GA <sub>4:1</sub>, a fim de minimizar possíveis diferenças na composição do meio dos sistemas estudados. Além disso, o emulsificante tween 80 (0,2 % p/v) também foi adicionado a esses sistemas para evitar a separação de fases.

Todos os tubos foram estocados em geladeira (10 °C) protegidos da luz por 15 horas, antes de serem expostos à luz ou estocados no escuro. A seguir, alguns tubos foram colocados em estantes localizadas entre duas lâmpadas brancas fluorescentes (32 W),

resultando em uma luminosidade média incidente de 700 lux, enquanto que o restante foi estocado na ausência de luminosidade (escuro), ambos a temperatura ambiente ( $21 \pm 2$  °C).

Em todos os sistemas-modelo, a concentração de bixina ( $\mu\text{g/g}$  de gel) foi determinada no tempo zero e periodicamente até aproximadamente 25 % de retenção da concentração inicial do carotenóide. Foram feitas duas repetições de cada experimento descrito na Tabela 1, totalizando 8 experimentos expostos à luz e 8 estocados no escuro.

#### *2.6.1. Determinação da atividade de água ( $a_w$ )*

A  $a_w$  das soluções dos sistemas de gel foi determinada por leitura direta no equipamento Decagon 3 TE (Aqualab) a 25 °C. Todas as determinações foram feitas em duplicata. A calibração do equipamento foi realizada com soluções de NaCl 6,0 M ( $a_w = 0,760 \pm 0,003$ ), KCl 5,0 M ( $a_w = 0,984 \pm 0,003$ ) e água destilada ( $a_w = 1,000 \pm 0,003$ ).

#### *2.6.2. Determinação de bixina*

A extração da bixina foi realizada em almofariz macerando-se 15 g do gel com celite e acetona gelada (10 °C) por 5 minutos. O conteúdo foi filtrado a vácuo em funil de vidro sinterizado e a fração orgânica contendo o carotenóide foi coletada e transferida para um funil de separação contendo diclorometano (DCM). Água destilada foi adicionada lentamente ao conteúdo do balão e após a separação das fases, a fração inferior alaranjada foi coletada. Foram feitas três extrações utilizando 15, 10 e 5 mL de DCM e um volume total de água de 750 mL. As frações alaranjadas foram misturadas e concentradas até aproximadamente 10 mL, em evaporador rotatório ( $T < 30$  °C).

A determinação do teor de bixina nos sistemas-modelo em gel foi realizada em duplicata, misturando-se o conteúdo de três tubos de ensaio, para minimizar o efeito da diferença de intensidade da luz.

## 2.7. Quantificação de bixina

A quantificação da bixina total (BT), de superfície (BS) e do sistema-modelo foi realizada determinando-se a absorvância em espectrofotômetro (Shimatzu – Minispectrophotometer 1220), no UV-visível, no comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) utilizando como solvente diclorometano e absorvidade ( $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) de 2826 (Lara, 1984).

Em todos os experimentos foram determinados o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ), a estrutura fina e a intensidade do pico *cis* dos espectros UV-visível da bixina. A estrutura fina (%III/II) foi determinada traçando uma linha reta no valor mínimo entre os picos de maior comprimento de onda (III) e o pico designado de  $\lambda_{\max}$  (II), e após a medição da altura destes picos realizou-se o cálculo em porcentagem de altura pico III sobre altura do pico II. A intensidade do pico *cis* (% $A_B/A_{II}$ ) foi determinada a partir da linha de base do espectro medindo a altura do pico de  $\lambda_{\max}$  (II) e a altura da banda de absorção a 285 nm conhecida como pico *cis* e calculando a porcentagem de altura do pico *cis* ( $A_B$ ) sobre pico II ( $A_{II}$ ).

## 2.8. Cálculos cinéticos e análises estatísticas

As análises estatísticas e cálculos dos parâmetros cinéticos foram determinados utilizando o software Origin 5.0.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Influência da composição do material de parede na viscosidade das soluções

De acordo com a Fig. 1, observou-se que as soluções de MD/GA<sub>1:1</sub> e MD/GA<sub>4:1</sub> apresentaram comportamento newtoniano, uma vez que as tensões e taxas ( $\gamma$ ) de cisalhamento variaram linearmente, obedecendo a Lei de Newton da viscosidade ( $\mu$ ):

$$\tau = \mu \dot{\gamma}.$$

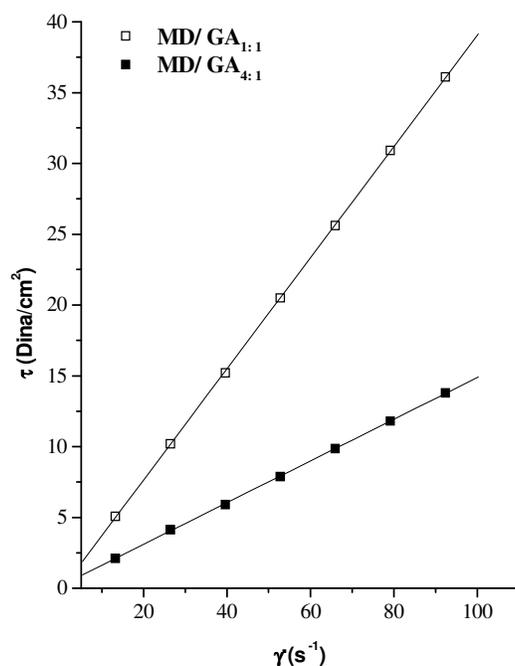


Fig. 1. Gráfico de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) versus taxa de cisalhamento ( $\gamma$ ) para as soluções dos materiais de parede MD/GA<sub>1:1</sub> e MD/GA<sub>4:1</sub>.

A solução de MD/GA<sub>1:1</sub> apresentou maior ângulo de inclinação que a de MD/GA<sub>4:1</sub> em decorrência de sua maior viscosidade, ocasionada pela menor quantidade de MD. Essa diferença no % de MD nas formulações dos materiais de parede estudados resultou em soluções com viscosidades que diferiram estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ), conforme a

Tabela 1. Comportamento semelhante foi observado por Cho e Park (2003), que verificaram que a redução da proporção de MD na a mistura MD 15 DE/GA de (9:1) para (1:1), resultou no aumento de 5 vezes no valor da viscosidade.

### 3.2. Influência da composição dos materiais de parede nas propriedades das microcápsulas

A solução de MD/GA<sub>1:1</sub>, com maior viscosidade ( $38,72 \pm 0,26$  cP), originou microcápsulas com maior retenção de bixina, rendimento de pó e eficiência de microencapsulamento em comparação com a solução menos viscosa de MD/GA<sub>4:1</sub> (Tabela 1). Apesar das diferenças observadas, apenas o rendimento e a eficiência do microencapsulamento foram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) influenciados pelo aumento da % GA na formulação do material de parede (Tabela 1).

Tabela 1  
Viscosidade da solução do material de parede, rendimento (Rd), retenção (Rt) e eficiência do microencapsulamento (EM) das microcápsulas de bixina.

Sistema	Composição <sup>a</sup>	Viscosidade 25 °C, (cP) <sup>b,c</sup>	% Rd <sup>b,c</sup>	% Rt <sup>b,c</sup>	% EM <sup>b,c</sup>
1	microcápsula de bixina MD/GA <sub>1:1</sub>	$38,7 \pm 0,3a$	$60 \pm 2a$	$85 \pm 2a$	$89 \pm 3a$
2	microcápsula de bixina MD/GA <sub>4:1</sub>	$15,1 \pm 0,4b$	$54 \pm 2b$	$83 \pm 3a$	$81 \pm 3b$

<sup>a</sup> (MD/GA<sub>x,y</sub>), onde MD: maltodextrina 20 DE; GA: Goma arábica, x,y (subscrito)= proporção de MD e GA utilizada na formulação do material de parede, respectivamente.

<sup>b</sup>Média  $\pm$  desvio padrão de três determinações.

<sup>c</sup>Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si a  $p \leq 0,05$ .

O rendimento (% Rd) é uma propriedade influenciada pelas condições de secagem, *design* e material do equipamento de spray-dryer utilizado na microencapsulação. No presente trabalho, o Rd médio do pó foi de  $60 \pm 2$  para MD/GA<sub>1:1</sub> e de  $54 \pm 2$  para MD/GA<sub>4:1</sub> (Tabela 1). O maior rendimento de microcápsulas com MD/GA<sub>1:1</sub> foi devido a GA ser um polissacarídeo que apresenta menor higroscopicidade que a MD, reduzindo a retenção de partículas nas paredes da câmara de secagem do spray-dryer. Nunes e Mercadante (2007) obtiveram rendimento de 51% no processo de encapsulamento de licopeno com uma mistura de GA/Sacarose (4:1) como material de parede, em condições similares de secagem e o mesmo modelo de spray-dryer (Lab Plant SD-04) utilizado no presente trabalho. Shu et al. (2006) utilizaram spray-dryer, do modelo Model G8 Spray Dryer, na encapsulação de licopeno e verificaram que o aumento da proporção de gelatina/sacarose de (1:9) para (3:7) resultou no aumento do rendimento de 80,3% para 91,1%. No entanto, o rendimento reduziu para 77,7 e 78,7 %, quando a proporção de gelatina:sacarose foi de (4:6) e (1:1), respectivamente. Nestes trabalhos os autores não determinaram a viscosidade dos materiais de parede mencionados.

No presente trabalho não foi observada diferença estatística da % de retenção da bixina após secagem das duas formulações dos materiais de parede estudados (Tabela 1). O valor médio de 85% obtido no presente estudo foi similar ao observado por Rodríguez-Huezo, Pedroza-Islas, Prado-Barragán, e Beristain (2004), que obtiveram Rt máxima de 84,8% para oleorresina de carotenóides encapsulada com uma mistura de diferentes biopolímeros e ao reportado por Desobry, Netto, e Labuza (1997) com ~ 89 de % Rt durante a secagem de  $\beta$ -caroteno com maltodextrina 25 DE. Apesar de no presente trabalho não ter sido verificada influência da viscosidade na retenção de bixina, foi verificado que o aumento da viscosidade da solução do material de parede, de 280 cP para 600 cP, resultou

no aumento da Rt de 65% para 85% de carotenóides de páprica em microcápsulas de GA (Zilberboin et al., 1986).

Com relação à eficiência da microencapsulação (EM), as microcápsulas de bixina com MD/GA<sub>1:1</sub> apresentaram 89% de EM, enquanto que as de MD/GA<sub>4:1</sub> apresentaram 81%. Essa diferença pode ser justificada, pela viscosidade da solução de material de parede que influencia a movimentação das correntes no interior das gotículas atomizadas afetando a retenção do recheio no interior das microcápsulas durante a secagem no spray-dryer. Se a viscosidade for abaixo da ideal, pode ocorrer uma mistura interna nas gotículas durante a secagem, acarretando a formação de uma película superficial semipermeável e perda do recheio. À medida que a viscosidade se aproxima da faixa ideal, esse problema é minimizado e conseqüentemente ocorre aumento da EM do recheio nas microcápsulas (Rosenberg, Kolpeman, & Talmon 1990). Assim, pode-se concluir que o aumento da viscosidade dos materiais de parede estudados, se aproximou da faixa considerada ideal, uma vez as EM foram superiores a 80% (Tabela 1).

Os resultados de %EM do presente trabalho foram similares aos reportados em outros estudos de carotenóides encapsulados utilizando a técnica de spray-dryer. Barbosa et al. (2005) reportaram EM de 86% para bixina encapsulada com goma arábica/sacarose (95:5). Shu et al. (2006) obtiveram EM máxima de 82,2% para licopeno encapsulado com gelatina/sacarose (3:7), enquanto que oleoresina de carotenóides encapsulada com diferentes tipos de biopolímeros apresentou 87,5 % (Rodríguez-Huezo et al., 2004). Por outro lado, valores de EM mais elevados (94-96%) foram reportados para microcápsulas de licopeno compostas por goma arábica/sacarose (4:1) (Nunes & Mercadante, 2007).

A morfologia das microcápsulas obtidas por spray-dryer é uma propriedade dependente da composição do material de parede e do processo de secagem. De forma

geral, as microcápsulas de MD/GA<sub>1:1</sub> e MD/GA<sub>4:1</sub> apresentaram paredes contínuas, com superfície sem fissuras, orifícios ou injúrias (Fig. 2A e 2B) sugerindo que a temperatura empregada no processo de secagem estava ajustada adequadamente aos materiais estudados (Rosenberg & Young, 1993).

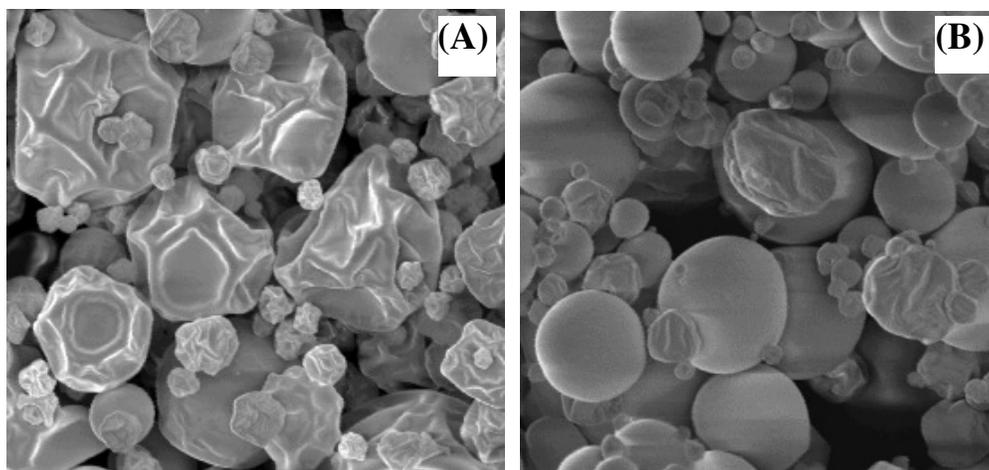


Fig. 2. Microcápsulas de bixina (a) MD/GA<sub>1:1</sub> com aceleração de 5 Kv (b) MD/GA<sub>4:1</sub> com aceleração de 10 Kv. Aumento de 1.300 X.

Adicionalmente, a morfologia das microcápsulas foi influenciada pela composição do material de parede, pois as microcápsulas de MD/GA<sub>1:1</sub> (Fig. 2 A) apresentaram maior quantidade de microcápsulas com superfície dentada, depressões irregulares e concavidades, típicas de GA. Essa morfologia também foi observada em microcápsulas de oleoresina de páprica (Santos, Fávaro-Trindade, & Grosso, 2005) e de bixina (Barbosa et al., 2005), ambas formuladas apenas com GA. O aparecimento das concavidades e a superfície dentada, pode ser atribuída a velocidade de secagem, as propriedades viscoelásticas do material de secagem (Teixeira, Andrade, Farina, & Rocha-Leão, 2004) e ao encolhimento das partículas durante as etapas de secagem e resfriamento no spray-dryer (Sheu & Rosenberg, 1998). Por outro lado, o aumento da % MD na composição do material

de parede (MD/GA<sub>4:1</sub>) contribuiu para a predominância de microcápsulas com formato esférico (Fig. 2B), característico de microcápsulas composta somente por MD (DibTaxi, Menezes, Santos, & Grosso, 2003) ou por misturas de MD/sacarose (Barbosa et al., 2005). Teixeira et al. (2004) observaram que a mistura de MD e GA (1:1) apresentou microcápsulas com formato esférico e com superfície dentada e que o aumento de GA na formulação contribuiu para a predominância de microcápsulas dentadas.

Com base nos valores de rendimento, retenção, eficiência de encapsulamento e morfologia observada nas microcápsulas obtidas no presente estudo, pode-se concluir que os materiais de parede e processo de secagem escolhidos foram adequados para microencapsulação da bixina.

### **3.3. Estabilidade da bixina em sistema-modelo em gel**

Como os valores de  $a_w$  (0,997-0,998) dos sistemas modelos estudados não apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ), logo foi desconsiderada a influência deste parâmetro na degradação da bixina nos sistemas estudados. Os perfis cinéticos de degradação da bixina encapsulada e não encapsulada na luz e no escuro podem ser observados na Fig. 3A e 3B. De forma geral, verificou-se que a bixina encapsulada foi mais estável que a não encapsulada tanto na presença como na ausência de luminosidade (Fig. 3A e 3B).

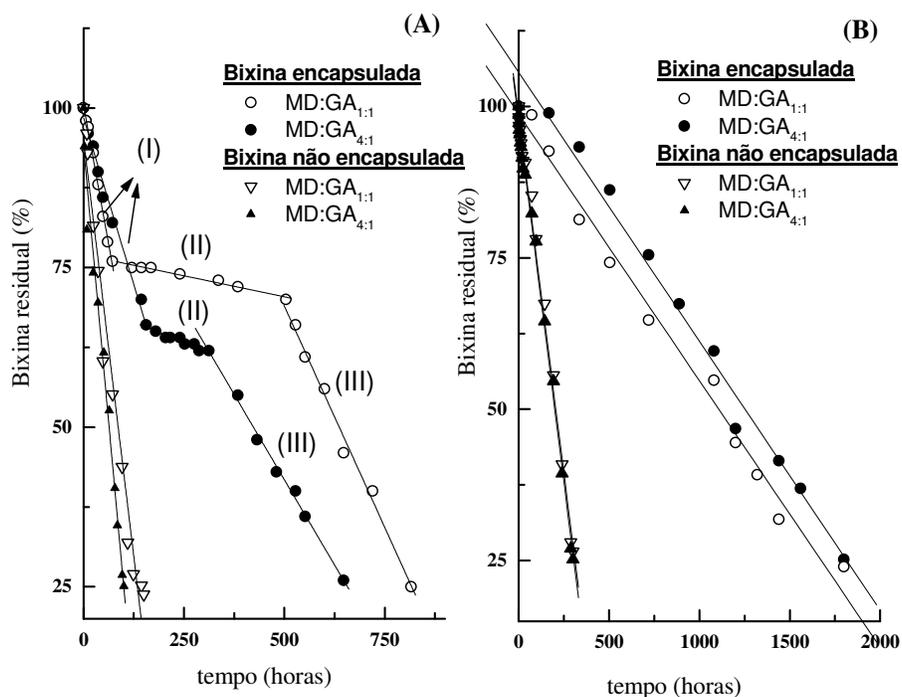


Fig. 3. Curvas cinéticas de degradação da bixina microencapsulada e não encapsulada em sistema gel (a) exposto a luz fluorescente (700 lux) e (b) estocado no escuro, ambos a 21 °C.

Sob luminosidade (Figura 3 A), o comportamento cinético da bixina encapsulada com os materiais estudados apresentou três etapas de degradação (I, II, III), enquanto que nos sistemas não encapsulados e em todos os sistemas estocados no escuro, a degradação apresentou apenas uma etapa (Fig. 3A e 3B). Independentemente desta diferença de comportamento, a degradação seguiu cinética de ordem zero.

Na etapa I, a constante de velocidade de degradação ( $k_{obs}$ ) da bixina foi de  $148,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/g h}^{-1}$  para MD/GA<sub>1:1</sub> ( $r = 0,99$ ) e de  $208,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/g h}^{-1}$  para MD/GA<sub>4:1</sub> ( $r = 0,98$ ) (Tabela 2). A etapa II, para ambos os materiais de parede foi caracterizada por um patamar de estabilidade, no qual a velocidade de degradação da bixina foi menor em comparação

com a etapa I, com  $k_{obs}$  de  $13,2 \times 10^{-3} \mu\text{g/g h}^{-1}$  ( $r = 0,98$ ) e de  $24,8 \times 10^{-3} \mu\text{g/g h}^{-1}$  ( $r = 0,99$ ) para MD/ GA<sub>1:1</sub> e MD/ GA<sub>4:1</sub>, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2

Condições experimentais, intervalo tempo ( $\Delta t$ ), constantes de velocidade ( $k_{obs}$ ) e coeficiente de correlação ( $r$ ) para degradação da bixina nos sistemas-modelo encapsulado e não encapsulado, a 21° C.

Sistem a	Composição <sup>a</sup>	[Bix] <sub>0</sub> <sup>b,c</sup>	Sistema-modelo	$\Delta t$ (h) <sup>d</sup>	$k_{obs}$ ( $\mu\text{g/g h}^{-1}$ )	$r$
1	microcápsula de bixina MD/GA <sub>1:1</sub>	0,288 ± 0,001	Gel na luz			
			I	72	$148,3 \times 10^{-3}$	0,99
			II	264	$13,2 \times 10^{-3}$	0,98
			III	312	$138,5 \times 10^{-3}$	0,99
		0,288 ± 0,001	Gel no escuro	-	$44,4 \times 10^{-3}$	0,99
2	microcápsula de bixina MD/GA <sub>4:1</sub>	0,283 ± 0,020	Gel na luz			
			I	144	$208,3 \times 10^{-3}$	0,98
			II	156	$24,8 \times 10^{-3}$	0,96
			III	264	$106,9 \times 10^{-3}$	0,99
				0,288 ± 0,001	Gel noescuro	-
3	bixina não encapsulada	0,282 ± 0,003	Gel + MD/GA <sub>1:1</sub>			
			luz	-	$551,6 \times 10^{-3}$	0,99
		0,279 ± 0,001	escuro	-	$235,2 \times 10^{-3}$	0,99
4	bixina não encapsulada	0,283 ± 0,002	Gel + MD/GA <sub>4:1</sub>			
			luz	-	$690,6 \times 10^{-3}$	0,99
		0,282 ± 0,001	escuro	-	$238,5 \times 10^{-3}$	0,99

<sup>a</sup>(MD/GA<sub>x,y</sub>), onde MD: maltodextrina 20 DE; GA: Goma arábica, x,y (subscrito)= proporção de MD e GA utilizada na formulação do material de parede, respectivamente.

<sup>b</sup>Média ± desvio padrão de três determinações.

<sup>c</sup>[Bix]<sub>0</sub>: Concentração inicial de bixina ( $\mu\text{g/g}$ ).

<sup>d</sup> $\Delta t$ : Intervalo de duração de cada etapa em horas (h)

Os intervalos de duração de cada etapa de degradação variaram entre os materiais de parede estudados (Figura 3A). Na etapa I, o  $\Delta t$  para a bixina microencapsulada com MD/GA<sub>1:1</sub> foi metade do observado para a microencapsulada com MD/GA<sub>4:1</sub> (Tabela 1). Esse comportamento pode ser explicado pela menor quantidade de bixina de superfície (11 %) presente nas microcápsulas de MD/GA<sub>1:1</sub>, que correspondeu a aproximadamente a

metade da quantidade de bixina de superfície (19%) das microcápsulas de MD/ GA<sub>4:1</sub>. A duração da etapa II foi de 264 e 156 horas para MD/GA<sub>1:1</sub> e MD/GA<sub>4:1</sub>, respectivamente, enquanto que, na etapa III o  $\Delta t$  foi de 312 horas para bixina microencapsulada com MD/GA<sub>1:1</sub> e de 264 h para a encapsulada com MD/GA<sub>4:1</sub> para que a bixina de ambas microcápsulas degradassem 75%.

Comparando os materiais de parede, verificou-se que para ambos a etapa I apresentou  $k_{obs}$  que ligeiramente maior que a etapa III, sendo que nas microcápsulas MD/GA<sub>4:1</sub> apresentou maior diferença entre as etapas (Tabela 2).

Modelos cinéticos com mais de uma etapa de degradação já foram reportados nos estudos de degradação de carotenóides microencapsulados por spray-dryer (Desobry et al., 1997 e 1999; Matioli & Rodríguez-Amaya, 2002; Barbosa et al., 2005). Duas etapas de degradação ajustadas a cinética de primeira ordem, sendo a primeira com maior velocidade de reação e a segunda mais lenta foram reportadas para  $\beta$ -caroteno encapsulado apenas com MD 25 DE (Desobry et al., 1997) ou com a mistura de MD 25 DE com mono e dissacarídeos redutores (Desobry et al., 1999), em sistemas-modelo em pó submetidos a diferentes umidades relativas. Em ambos os estudos, os autores justificaram que a etapa de maior velocidade correspondeu a degradação do  $\beta$ -caroteno de superfície, enquanto que, a de menor velocidade a degradação correspondeu a degradação do carotenóide encapsulado. Duas etapas de primeira ordem também foram reportadas na fotodegradação de bixina encapsulada com preparações de polissacarídeos GA/sacarose e MD/Tween 80, em sistemas-modelo aquosos (Barbosa et al., 2005). Na fotodegradação do licopeno encapsulado com GA ou com GA/MD 25 DE, em sistema-modelo em pó também foram observadas duas etapas, no entanto, a degradação do carotenóide seguiu cinética de segunda ordem (Matioli & Rodríguez-Amaya, 2002).

Comparando as duas misturas, as microcápsulas de MD/GA<sub>1:1</sub> conferiram maior estabilidade à bixina do que as de MD/GA<sub>4:1</sub> (Figura 3A), apresentando 25% de quantidade residual após 816 horas de exposição a luminosidade. Esse comportamento pode ser justificado pelo maior % de GA que destaca-se por ser um excelente emulsificante e por apresentar capacidade de formar filme (McNamee et al., 2001; Dickinson, 2003), propriedades capazes de proteger a bixina durante a estocagem. Esse comportamento já foi previamente reportado por Barbosa et al. (2005) que verificaram que a mistura GA/sacarose foi mais efetiva que MD pura, MD/sacarose e MD/Tween 80 na proteção da bixina durante a exposição a luz em sistema-modelo aquoso. Watanabe, Fang, Adachi, Fukami, e Matsuno et al. (2004) reportaram que ácido araquidônico apresentou estabilidade 19 vezes maior em microcápsulas de GA do que em MD. Por outro lado, Matioli e Rodríguez-Amaya (2002) avaliaram a estabilidade de licopeno encapsulado com GA ou GA/MD 20 DE (2:3) estocado sob luz fluorescente e concluíram que a mistura GA/MD foi mais eficiente na proteção do licopeno.

Como era esperado, ocorreu maior degradação da bixina nos sistemas não encapsulados expostos à luz quando comparados com os sistemas com microcápsulas de bixina (Figura 2A e Tabela 2). Verificou-se também que o valor de  $k_{obs}$  da bixina em meio com gel + MD/GA<sub>1:1</sub> foi menor do que em meio gel + MD/GA<sub>4:1</sub> (Tabela 2), indicando que o maior percentual de GA no meio foi fundamental na estabilidade do carotenóide, provavelmente devido ao aumento da dispersabilidade do carotenóide no meio, ocasionada provavelmente por sua excelente capacidade emulsificante (McNamee et al., 2001).

A luz foi um fator decisivo na degradação da bixina, pois a bixina apresentou maior estabilidade em todos os sistemas estudados no escuro quando comparados aos respectivos experimentos expostos a luz. Além disso, a microencapsulação favoreceu a estabilidade da

bixina, pois a bixina encapsulada foi mais estável que a não encapsulada tanto no escuro como no sistema exposto à luz (Figura 3B). A bixina não encapsulada apresentou  $k_{obs}$  aproximadamente 13 a 15 vezes maiores em comparação aos respectivos sistemas encapsulados (Tabela 2). O efeito negativo da luminosidade na estabilidade dos carotenóides encapsulados (Wagner & Warthensen, 1995; Rosenberg & Lee, 2004; Barbosa et al., 2005) já foi amplamente discutido em diversos estudos.

A ação da luz sobre os carotenóides promove o rompimento de sua cadeia ou do cromóforo e formação de compostos incolores, bem como catalisa a isomerização. No presente estudo, durante todos os experimentos estudados, não foi observada alterações nas características espectrais da bixina (formato do pico,  $\lambda_{max}$ , estrutura fina e intensidade do pico *cis*), sugerindo que a reação preferencial da degradação do carotenóide exposto à luz ou estocado no escuro foi a compostos incolores. A luz também não ocasionou alteração do formato do espectro e do  $\lambda_{max}$  durante a fotodegradação de extrato de urucum em solução tampão citrato/caseinato (Pertersen et al., 1999). No entanto, para o  $\beta$ -caroteno submetido as mesmas condições ocorreu a isomerização *trans* para *cis* como a reação preferencial constatada pelo aparecimento de nova banda de absorção a 349 nm e um pequeno deslocamento hipsocrômico no  $\lambda_{máx}$ . (Pertersen et al., 1999). Barbosa et al. (2005) sugeriram a degradação da bixina encapsulada a compostos incolores em sistema-modelo aquoso submetido a 700 lux.

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Doutorado concedida a Maria Ivone M J Barbosa, e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

## Referências

Anvisa (1999), *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, Resolução nº 4 de 24 de novembro de 1999 <<http://www.anvisa.gov.br>>. acessado 10-12-2008.

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.

Calvo, M. M & Santa-Maria, G. (2008). Effect of illumination and chlorophylls on stability of tomato carotenoids. *Food Chemistry*, 107, 1365–1370.

Cho, Y. H & Park, J. (2003). Evaluation of process parameters in the O/W/O multiple emulsion method for flavor encapsulation. *Journal of Food Science*, 68, 534-538.

Desobry, S. A.; Netto, F. M. & Labuza, T. P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for  $\beta$ -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62, 1158 - 1162.

Desobry, S.; Netto, F. M. & Labuza, T. P. (1999). Influence of maltodextrin system at an equivalent 25 DE on encapsulated beta-carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 23, 39-55.

Dib Taxi, C. M. A.; Menezes, H. C.; Santos, A. B. & Grosso, C. R. F. (2003). Study of the microencapsulation of camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice. *Journal of Microencapsulation*, 20, 443– 448.

Lara, W. H. (1984), *Monografrafia corantes naturais para fins alimentícios. Padrões de Identidade e Qualidade*. São Paulo:Brasil,. 117pp.

- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928-935.
- Matioli, G & Rodríguez-Amaya, D. (2002). Licopeno encapsulado com goma arábica e maltodextrina: Estudo da estabilidade. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5: 197-203.
- McNamee, B. F.; O'Riordan, E. D. & O'Sullivan, M. (2001). Effects of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3385-3388.
- Mercadante, A. Z. & Pfander, H. (1998). Carotenoids from annatto: A review. *Agricultural Food Chemistry*, 2, 79-91.
- Najar, S.V., Bobbio, F.O. & Bobbio, P.A. (1988). Effect of light, air, antioxidants and pro-oxidants on Annatto extracts (*Bixa orellana* L.). *Food Chemistry*, 29, 283-289.
- Nunes, I. L. & Mercadante (2007). Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 893-900.
- Pertersen, M.; Wiking, L. & Stapelfeld, H. (1999). Light sensitivity of two colorants for Cheddar cheese. Quantum yields for photodegradation in an aqueous model system in relation to stability of cheese in illuminated display. *Journal of Dairy Research*, 66, 599-607.
- Pesek, C. A. & Warthesen, J.J. (1988). Characterization of the photodegradation of beta-carotene in aqueous model systems. *Journal of Food Science*, 53, 1517-1520.
- Preston, H.D. & Rickard, M.D. (1980). Extraction and chemistry of annatto. *Food Chemistry*, 5, 47-56.

- Ribeiro, H.S., Ax, K & Schubert, H. (2003), Stability of lycopene emulsions in food systems. *Journal of Food Science*, 68, 2730-2734.
- 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 po CLAE. *Revista Alimentos e Nutrição* 15, 203-213.
- Rios, A.O.; Borsarelli, C.D. & Mercadante, A. Z. (2005). Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2307-2311.
- Rodríguez-Huezo, M.. E; Pedroza-Islas, R.; Prado-Barragán, L. A.; Beristain, C.I. & Vernon-Carter, E.J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69, 351-359.
- Rosenberg, M. & Young, S. (1993). Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milk fat-structure evaluation. *Food Structure*, 12, 31-41.
- Rosenberg, M.; Kopelman, I. J. & Talmon, Y. (1990). Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1288 - 1294
- Rosenberg, M. & Lee, S.J. (2004). Water-insoluble, whey protein-based microspheres prepared by an all-aqueous process. *Journal of Food Science*, 69, FEP 50-58.
- Santos, A.B.; Fávaro-Trindade, C.S & Grosso, C.R.F. (2005). Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 322-326.
- Scotter, M. J.; Wilson, L. A.; Appleton, G. P. & Castle, L. (1998). Analysis of annatto (Bixa orellana) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and

colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1031 – 1038.

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.

Sheu, T. Y & Rosenberg, M. (1998). Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science*, 63, 491-494.

Shu, B.; Yu, W.; Zhao, Y. & Liu X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray – drying. *Journal of Food Engineering*, 76, 664 – 669.

Szente, L.; Mikuni, K.; Hashimoto, H. & Szejtli, J. (1998). Stabilization and solubilization of lipophilic natural colorants with cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena Molecular Recognition in Chemistry*, 32, 81-89.

Teixeira, M. I.; Andrade, L. R.; Farina, M. & Rocha -Leão, M. H. M . (2004). Characterization of short chain fat acids microcapsules produced by spray drying.. *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems*, 24, 653-658.

Wagner, L. A. & Warthesen, J. J. (1995). Stability of spray-dried encapsulated carrots carotenes. *Journal of Food Science*, 60, 1048 - 1053.

Watanabe, Y.; Fang, X.; Adachi, S.; Fukami, H. & Matsuno, R. (2004). Oxidation of 6-O-arachidonoyl L-ascorbate microencapsulated with a polysaccharide by spray-drying. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 395-400.

Zilbermoin, R., Kopelman, I. J. & Talmon, Y. (1986). Microencapsulation by a dehydrating liquid: Retention of paprika oleoresin and aromatic esters. *Journal of Food Science*, 51, 1301- 1306.

# *CAPÍTULO 4*

## **MUDANÇAS DE COR EM MARIA-MOLE COLORIDA COM BIXINA MICROENCAPSULADA**

**Manuscrito em preparação para ser submetido à revista “LWT - Food Science and Technology”**

## Resumo

A bixina foi encapsulada com uma mistura de goma arábica e maltodextrina (1:1) e utilizada como corante em maria-mole tendo sua estabilidade avaliada sob 0 e 1300 lux. O rendimento, a retenção e a eficiência da microencapsulação de bixina foram, respectivamente, de  $61 \pm 1\%$ ,  $88 \pm 2$  e  $86 \pm 2\%$ . Visualmente, a maria-mole colorida com bixina encapsulada apresentou alaranjado mais intenso do que a amostra colorida com bixina não encapsulada. Esta diferença visual foi confirmada pelos valores iniciais significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) dos parâmetros CIELAB vermelho ( $a^*$ ), amarelo ( $b^*$ ) e saturação da cor ( $C^*$ ) do sistema contendo o corante não encapsulado. Como esperado, a luz apresentou um efeito deletério na coloração da maria-mole, sendo mais intenso na colorida com bixina livre do que na colorida com microcápsulas de bixina. Durante a exposição a 1300 lux, ocorreu gradual diminuição das coordenadas de cor  $a^*$  e  $b^*$ , indicando degradação da bixina nas diferentes condições estudadas. Na estocagem de maria-mole no escuro, durante 130 horas, não foram observadas alterações nos valores dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

**Palavras-chaves:** Microencapsulação, bixina, maria-mole, fotodegradação, cor

## 1. Introdução

Dos atributos que determinam a qualidade dos alimentos, a cor é o fator que mais influencia sua aceitação por interferir diretamente na decisão do consumidor. Assim, os corantes artificiais ou naturais são adicionados aos produtos alimentícios para conferir, intensificar ou restaurar sua coloração original (Downhan & Collins, 2000). Dentre os corantes amplamente utilizados na indústria de alimentos, destacam-se os carotenóides extraídos do urucum, especialmente a bixina e a norbixina. Esses pigmentos são utilizados principalmente na coloração de molhos, margarinas, snacks e queijos (Satyanarayana et al., 2003) e correspondem a cerca de 70 % dos corantes utilizados mundialmente e 90% dos utilizados no Brasil (Carvalho, 1999). Entretanto, a presença de um longo sistema de ligações duplas conjugadas na cadeia desses pigmentos, os torna sensíveis à degradação frente a fatores como alta temperatura, luminosidade, oxigênio e baixo pH limitando seu emprego em alguns produtos alimentícios.

Nos últimos anos, a microencapsulação tem sido utilizada para minimizar a degradação de vários compostos naturais, dentre eles os carotenóides. Nessa técnica, o ingrediente de interesse (recheio) é envolvido com uma camada polimérica (material de parede) reduzindo sua exposição aos fatores indesejáveis do processamento, transporte e estocagem (Ré, 1998).

Vários trabalhos reportaram o uso da colorimetria na caracterização e no monitoramento da estabilidade da cor de carotenóides encapsulados em diferentes sistemas-modelo (Winning, 1995, Desobry et al., 1997; Elizalde et al, 2002; Santos et al., 2006; Prado et al., 2006; Sutter et al., 2006). A colorimetria ou análise instrumental da cor utiliza os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , que correspondem a luminosidade (0 a 100), variação da dimensão de vermelho/verde ( $+a^*$  e  $-a^*$ ) e da dimensão do amarelo/azul ( $+b^*$  e  $-b^*$ ),

respectivamente. Geralmente, a componente  $a^*$  da cor tem sido o parâmetro que melhor tem descrito a degradação dos carotenóides encapsulados em diferentes tipos de sistemas-modelo (Elizalde et al., 2002; Santos et al., 2004 e 2006; Prado et al., 2006; Sutter et al., 2006). Elizalde et al. (2002) avaliaram a alteração de cor, utilizando sistema CIELab, de  $\beta$ -caroteno encapsulado com matriz de trealose/gelatina estocado em diferentes atividades de água ( $A_w$ ) e verificaram que a coordenada  $a^*$  foi a que melhor se correlacionou com a degradação deste carotenóide. O mesmo foi reportado por Santos et al. (2006) para fotodegradação de carotenóides de páprica encapsulados com goma arábica ou amido utilizando o sistema HunterLab e por Prado et al. (2006) que utilizaram sistema CIELab para descrever a perda de cor de  $\beta$ -caroteno encapsulado com PVP-40 estocados em diferentes UR à 25 °C. Além disso, Sutter et al. (2006) reportaram que a coordenada  $a^*$  foi a que melhor se correlacionou com a degradação do  $\beta$ -caroteno na superfície de microcápsulas manitol/gelatina submetidas a diferentes umidades relativas (UR) a 25° C. Desobry et al. (1997) reportaram que os parâmetros  $L$  e  $a$  do sistema Hunter foram os que melhor descreveram a degradação do  $\beta$ -caroteno da superfície de microcápsulas de bixina estocadas em diferentes UR à temperatura de 25 e 35 °C.

Apesar da estabilidade da bixina microencapsulada ter sido avaliada em sistema-modelo aquoso (Barbosa et al., 2005), ainda não foram encontrados outros estudos sobre a estabilidade desse carotenóide, principalmente em um sistema alimentício comercial. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a perda de cor de maria-mole colorida com bixina encapsulada e não encapsulada utilizando os parâmetros de cor do CIELab.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Material

Os cristais de bixina foram obtidos de sementes de urucum (*Bixa orellana* L) de acordo com Rios & Mercadante (2004), por extração com acetato de etila e cristalizações sucessivas com etanol até obter pureza de aproximadamente 94%. A pureza dos cristais foi determinada em HPLC com detector por arranjos de diodo. Os materiais de parede empregados foram a goma arábica (GA) (INSTANTGUM C IRX 40642 - Colloides Naturels Brasil) e a maltodextrina 20 DE (MD) (MOR REX 1920 - Corn Products Brasil), ambos de grau alimentício. A matriz alimentícia utilizada para avaliar a estabilidade da bixina foi maria-mole em pó da marca ROYAL, embalagem de 50g, constituída por açúcar, gelatina, caseína hidrolisada, aromatizante e acidulante ácido fumárico.

### 2.2. Obtenção das microcápsulas

As microcápsulas foram obtidas de acordo com Barbosa et al. (2005). A GA e a MD (1:1) foram solubilizadas em 180 mL de água destilada (60° C) e mantidas sob aquecimento (70 °C) e agitação com barra magnética, até total dissolução, perfazendo uma solução com 40% p/v. Os cristais de bixina (0,04 g) previamente dissolvidos em 20 mL de etanol foram adicionados a solução de polissacarídeos (30 °C). A solução foi homogeneizada a 1200 rpm por 30 minutos e submetida à secagem em spray-drier (Lab Plant SD-04). As condições de operação utilizadas durante a secagem foram: diâmetro do bico injetor de 0,7 mm; vazão de saída, temperatura de entrada e pressão do ar de 30 mL/min, 180 °C e 5 kgf/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Após a secagem, as microcápsulas foram estocadas em garrafas de vidro e

acondicionadas em freezer (-20 °C). Cada amostra de encapsulado foi composta pela mistura do pó obtido após duas secagens em atomizador.

### 2.3. Caracterização das microcápsulas

As análises de caracterização das microcápsulas foram realizadas de acordo com Barbosa et al. (2005). Para determinação de bixina total (BT), 1 g de microcápsula foi solubilizada em 20 mL de água destilada e agitada por 1 minuto em vórtex até total dissolução. A extração exaustiva do carotenóide foi realizada em um funil de separação contendo 15 mL de diclorometano (DCM). Após agitação, a fração orgânica foi coletada e foram realizadas mais duas extrações consecutivas com a adição de mais 15 mL e 10 mL de DCM, respectivamente. Todas as frações orgânicas foram misturadas e concentradas em rotaevaporador (T < 30 °C) até aproximadamente 10 mL.

Para determinação da bixina de superfície (BS), 1g de microcápsula foi agitada com 5 mL de DCM em vórtex por 30 segundos, e em seguida centrifugada (Fanem – Modelo 206 BL) a 3000 rpm por 10 minutos. A solução fração alaranjada contendo o carotenóide foi coletada, filtrada em membrana Millipore (0,22 µm), a qual foi lavada com DCM até totalizar um volume de aproximadamente 10 mL.

A determinação de BT e BS foi realizada em triplicata.

O rendimento (% Rd) do pó foi determinado de acordo com a equação (1) onde: MSA = massa total de sólidos antes da microencapsulação (g) e MSD = massa total de sólidos obtidos após a microencapsulação (g), conforme Nunes e Mercadante (2007).

$$\% \text{ Rd} = \frac{\text{MSD}}{\text{MSA}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

A retenção (% Rt) da bixina nas microcápsulas durante a secagem em spray-dryer foi determinada segundo Zilberboim et al. (1986), considerando a quantidade de bixina na solução do material de parede antes da secagem (BMP) e após a secagem (BT= bixina total). .

$$\% Rt = \frac{BT}{BMP} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

A eficiência de microencapsulação (% EM) foi calculada de acordo com a equação 3, segundo McNamee et al. (2001), onde BT= Bixina total e BS= Bixina de superfície.

$$\% EM = \frac{(BT - BS)}{BT} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

#### 2.4. Sistema alimentício

Os cristais de bixina (controle) previamente solubilizados em etanol ou a bixina encapsulada (BE) foram adicionados diretamente à mistura do pó de maria-mole (MM) e a água, e o preparo foi realizado de acordo com as normas do fabricante, resultando na MM-controle e MM-BE, respectivamente. Na formulação da MM-controle também foi adicionada a mesma quantidade de GA e MD contidas no material de parede das microcápsulas, a fim de minimizar possíveis diferenças na composição dos sistemas. As amostras de MM-controle e MM-BE foram distribuídas em placas de Petri, com 5 cm de diâmetro e estocadas em geladeira por 1 hora à 4 °C, antes de serem expostas à luz (1300 lux) ou estocados no escuro, ambos a 20 ± 1 °C. A concentração inicial de bixina nos sistemas estudados foi de aproximadamente 0,3 µg/g de MM e os experimentos foram realizados em duplicata.

## 2.5. Determinação dos parâmetros de cor

As mudanças de cor nas MM foram medidas utilizando-se o colorímetro Color Quest XE (Hunter Lab, Reston, Estados Unidos) equipado com um iluminante D65 e ângulo do observador de 10°. O  $L^*$  (luminosidade) e as coordenadas cromáticas  $a^*$  (componente vermelho - verde) e  $b^*$  (componente amarelo – azul) foram obtidas no tempo zero e final de cada experimento. Estes parâmetros foram utilizados para calcular a saturação de cor (croma,  $C^*$ ), o ângulo de tonalidade cromática (hue,  $h$ ) e a diferença global da cor ( $\Delta E^*$ ) usando as equações de (4) - (6).

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Equação (4)}$$

$$h = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{Equação (5)}$$

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Equação (6)}$$

## 2.6. Análise dos resultados

Análise de variância (ANOVA) dos resultados experimentais foram realizadas utilizando-se o software Origin 5.0.

## 3. Resultados e discussão

O rendimento (% Rd), a retenção (% Rt) e a eficiência da microencapsulação (% EM) das microcápsulas de bixina foram, respectivamente, de  $61 \pm 1\%$ ,  $88 \pm 2\%$  e  $86 \pm 2\%$ . O rendimento é um parâmetro industrial de bastante importância, que está diretamente relacionado ao *design* do “spray-dryer”, enquanto que a retenção e a eficiência estão relacionadas com a natureza química do recheio e do material de parede. O valor observado

no presente trabalho foi mais elevado do que 51%, reportado por Nunes & Mercadante (2007), que utilizaram uma mistura de GA/Sacarose (4:1) no mesmo spray-dryer e condições de atomização similares a do presente trabalho.

A retenção (% Rt) após secagem quantifica o teor de ingrediente de interesse remanescente do processo de secagem em spray-dryer, sendo um indicativo importante de perda durante o processo de obtenção das microcápsulas. A Rt de bixina observada no presente trabalho foi similar a observada por Rodríguez-Huezo et al. (2004), que obtiveram Rt máxima de 84,8% para oleoresina de carotenóides encapsulados com a mistura de diferentes de gomas e por Desobry et al. (1997), que reportaram retenção de 89% durante a secagem de  $\beta$ -caroteno com maltodextrina 25 DE. Zilberboim et al. (1986) reportaram 85% de retenção para carotenóides de páprica encapsulados com GA.

A EM obtida neste estudo foi similar a observada por Wagner & Warthesen (1995) que reportaram 89% para  $\alpha$ -caroteno e 87% para  $\beta$ -caroteno utilizando maltodextrina 4 DE, e mais elevados que 62% para encapsulamento de *trans*- $\beta$ -caroteno com maltodextrina 25 DE (Desobry et al., 1997) e 78% utilizando a mistura maltodextrina 4 DE e glicose (Desobry et al., 1999). Barbosa et al. (2005) reportaram 86% de EM para bixina encapsulada com goma arábica/sacarose (95:5), enquanto que com maltodextrina, a eficiência foi de 54%, aumentando para 75% com a adição de um emulsificante (Tween 80).

Visualmente as marias-moles estudadas apresentaram diferença em sua coloração inicial, pois as coloridas com bixina encapsulada (MM-BE) apresentaram alaranjado mais intenso do que as coloridas com bixina não encapsulado (MM-controle). Esta diferença visual foi confirmada pelos valores iniciais significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) dos parâmetros CIELAB vermelho ( $a^*$ ), amarelo ( $b^*$ ) e saturação da cor ( $C^*$ ) do sistema

contendo o corante não encapsulado (Tabela 1). Por outro lado, observou-se que a luminosidade inicial e final na MM-BE e MM-controle não apresentou diferença significativa a  $p \leq 0,05$  (Tabela 1), sugerindo que a maria-mole não se tornou turva e que a luminosidade transmitida permaneceu sempre a mesma durante estocagem (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros de cor CIELAB da maria-mole colorida com microcápsulas de bixina e bixina não encapsulada, estocadas no escuro e sob luz a 21° C.

Luminosidade	Maria - mole	<i>L*</i>		<i>a*</i>		<i>b*</i>		<i>h<sub>ab</sub></i>		<i>C*</i>		$\Delta E^*$
		0 h	55 h/ 130 h	0 h	55 h/ 130 h	0 h	55 h/ 130 h	0 h	55 h/ 130 h	0 h	55 h/ 130 h	
1300 lux	BIX encapsulada	81±3aA	80±2aA	11±1aA	8±0bB	28±1aA	20±0bB	69	71	30	22	9
	BIX não encapsulada	83±2aA	84 ±2aA	9±1aA	2 ±0bD	25±1aB	5±0bD	70	73	27	5	21
Escuro	BIX encapsulada	81±2aA	80±2aA	11±2aA	12±1aA	29±3aA	31±2aA	69	69	31	30	2
	BIX não encapsulada	82±0aA	81±1aA	7±1aB	5±0bC	20±2aB	18±1aC	71	75	21	19	3

BIX: bixina.

Média ± desvio padrão de cinco determinações.

Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si a  $p \leq 0,05$  (efeito do tempo de estocagem)

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si a  $p \leq 0,05$  (efeito do tipo de sistema)

Como esperado, a exposição à luz afetou de forma negativa a cor das amostras de maria-mole coloridas com bixina na forma livre ou na encapsulada (Tabela 1). No sistema exposto a luminosidade, os valores de  $a^*$  e  $b^*$  (Figura 1A), ou seja, respectivamente o vermelho e amarelo da cor, diminuíram com o tempo de exposição à luz, devido à degradação da bixina, um carotenóide alaranjado. Os valores das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  após a exposição a luz diferiram estatisticamente a  $p \leq 0,05$  (Tabela 1). Esta descoloração pode ser também verificada pela diminuição da intensidade cromática ( $C^*$ ) (Figura 1B), o que tornou a cor da maria-mole mais pálida e com deslocamento para uma cor mais amarelada (aumento do  $h_{ab}$ ), após 55 horas de exposição a 1300 lux (Tabela 1).

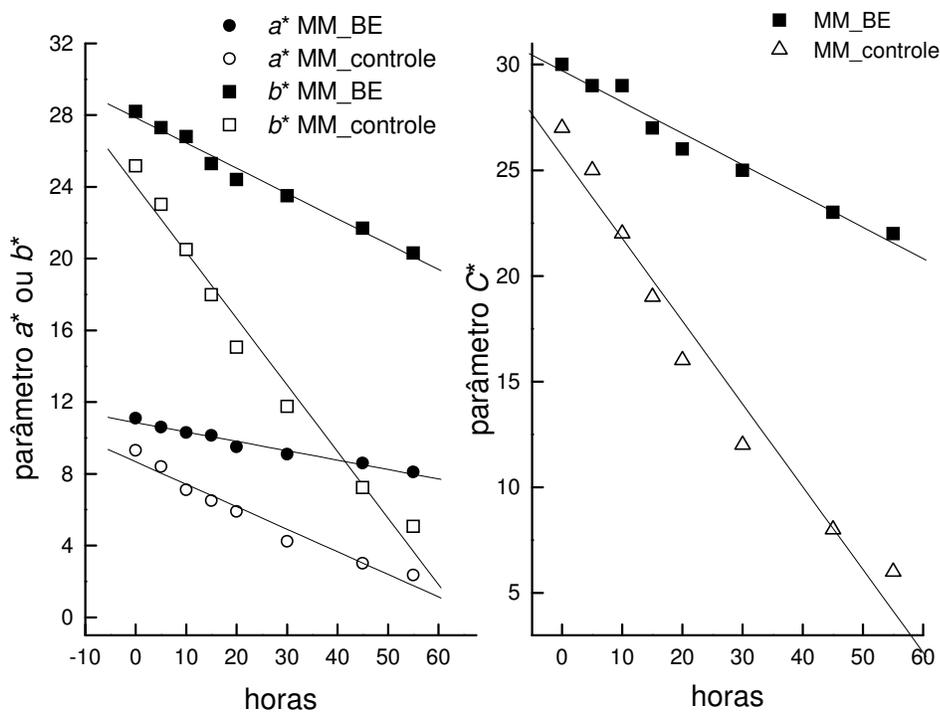


Figura 1. Mudanças nos parâmetros de cor  $a^*$  e  $b^*$  (A) e  $C^*$  (B) em amostras de maria-mole armazenadas na presença de luz e de ar a 21 °C.

A MM-controlada colorida com bixina não encapsulada foi a mais afetada pela luminosidade, pois apresentou maior decréscimo de  $a^*$  e de  $b^*$  (Figura 1A) que resultou na maior diminuição do  $C^*$  (Figura 1B) e maior deslocamento do  $h_{ab}$  (Tabela 1), quando comparada a MM-BE. Esse comportamento pode ter ocorrido devido à menor estabilidade da bixina nessa condição. Os sistemas estocados no escuro apresentaram menores variações de  $C^*$  e  $h_{ab}$  (Tabela 1), pois nessa condição os carotenóides geralmente apresentam maior estabilidade.

A correlação da alteração dos parâmetros colorimétricos com a degradação dos carotenóides encapsulados em diferentes condições de estocagem já foi reportada por Desobry et al. (1997), Elizalde et al. (2002), Padro et al. (2006) e Sutter et al. (2006). Segundo Desobry et al. (1997),  $L^*$  e  $a^*$  foram os parâmetros que melhor se correlacionaram com a retenção de  $\beta$ -caroteno da superfície das microcápsulas de maltodextrina em diferentes umidades relativas. No entanto, apenas o parâmetro  $a^*$  foi o que melhor descreveu a degradação do  $\beta$ -caroteno de superfície em microcápsulas estocadas em diferentes umidades relativas e atividade água (Elizalde et al., 2002; Padro et al., 2006; Sutter et al., 2006).

A maior alteração do  $\Delta E^*$  foi observada nas amostras de maria-mole expostas à luz, sendo que a colorida com bixina não encapsulada apresentou valor mais elevado, seguido da colorida com bixina encapsulada e das estocadas no escuro (Tabela 1). Considerando que valores de  $\Delta E^* > 2$  indicam que a mudança de cor já pode ser perceptível visualmente, a descoloração que ocorreu na maria-mole na estocagem sob luz ( $\Delta E^* > 8$ ) e na colorida com bixina não encapsulada estocada no escuro ( $\Delta E^*=3$ ) pode ser verificada pelo consumidor (Tabela 1).

Em resumo, os resultados do presente estudo mostram que mistura de maltodextrina e goma arábica associada ao método de encapsulação por spray-dryer originaram microcápsulas com elevados rendimento (61%), retenção (88%) e eficiência do microencapsulamento (86%). Além disso, a microencapsulação pode ser uma boa alternativa para a proteção de carotenóides, pois retardou a descoloração da bixina na presença de luz em um sistema-alimentício. Durante a exposição a luz, os parâmetros de cor  $a^*$  e  $b^*$  foram os que apresentaram maior redução.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela bolsa de Doutorado concedida a Maria Ivone M J Barbosa e suporte financeiro.

### **Referências bibliográficas**

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, p. 989–994.

Carvalho, P. R. N. Annatto: technological advances and perspectives. (1999). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49: 71S-73S.

Desobry, S. A., Netto, F. M.; Labuza, T. P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for  $\beta$ -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62, p. 1158-1162.

Desobry, S.; Netto, F. M.; Labuza, T. P. (1999). Influence of maltodextrin system at an equivalent 25 DE on encapsulated beta-carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 23, p. 39-55.

Downham, A.; Collins, P. Colouring our foods in the last and next millennium.(2000). *International Journal of Food Science and Technology*, 35, p. 5-22.

Elizalde, B. E; Herrera, M. L.; Buera, M. P. (2002). Retention of  $\beta$ -carotene encapsulated in a trehalose-based matrix as affected by water content and sugar crystallization. *Journal of Food Science*, 67, p. 3039-3045.

Nunes, I. L., & Mercadante (2007). Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 893-900.

McNamee, B. F.; O'Riordan, E. D., & O'Sullivan, M. (2001). Effects of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3385-3388.

Prado, S. M., Buera M. P.; Elizalde, B. E. (2006). Structural collapse prevents beta-carotene loss in a supercooled polymeric matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, p. 79-85.

Ré, M. I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying technology*, 16, p. 1195-1236.

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 po CLAE. *Revista Alimentos e Nutrição* 15, 203-213.

Rodríguez-Huezo, M., E; Pedroza-Islas, R.; Prado-Barragán, L. A.; Beristain, C.I., & Vernon-Carter, E.J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69, 351-359.

Santos, A. B., Ferreira, V. L.; Grosso, C. R. F. (2004). Microcápsulas: Uma alternativa viável-Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação: óleo-resina de páprica. *Biocologia, Ciência & Desenvolvimento*, 2, 26-30.

Santos, A. B.; Fávaro – Trindade, C. S.; Grosso, C. R. F. (2006) Funcionalidade da oleoresina de paprika microencapsulada com goma arábica e amido / gelatina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, p. 351-354.

Satyanaraya, A; Rao, P. G. P., Rao, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). (2003). *Journal of Food Science and Technology Mysore*, 40, p. 131-141.

Sutter, S. C.; Buera, M. P; Elizalde, B. E. (2006).  $\beta$ -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion, *International Journal of Pharmaceutics*, In Press, Corrected Proof, Available online 22 September 2006.

Wagner, L. A. & Warthesen, J. J. (1995). Stability of spray-dried encapsulated carrots carotenes. *Journal of Food Science*, 60, 1048 - 1053.

Winning, M. (1995). Micro-encapsulated colours – Natural colours with improved stability. *Agro. Food. Industry High Technology*, 52, 13-15, 1995.

Zilbermoin, R., Kopelman, I. J., & Talmon, Y. (1986). Microencapsulation by a dehydrating liquid: Retention of paprika oleoresin and aromatic esters. *Journal of Food Science*, 51, 1301- 1306.

## *CAPÍTULO 5*

### **EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NAS PROPRIEDADES E COR DE GEL ADICIONADO DE BIXINA MICROENCAPSULADA**

**Manuscrito em preparação para ser submetido à revista “LWT - Food Science and Technology”**

## Resumo

A viabilidade do emprego da bixina, como corante em gel foi avaliada através da determinação de sua estabilidade sob as seguintes luminosidades: 0, 1300 e 2100 lux. Os géis foram coloridos com microcápsulas de bixina (BIX) ou de bixina e ácido ascórbico (BIX+ AA), enquanto que, o gel colorido com bixina não encapsulada foi utilizado como controle. A degradação da bixina seguiu uma cinética de ordem zero em todas as condições de luminosidades estudadas, sendo que sob 1300 e 2100 lux, a bixina microencapsulada apresentou três etapas de degradação, enquanto que no escuro foi observada apenas uma etapa. Como esperado, a luz apresentou um efeito deletério na estabilidade da bixina, sendo mais intenso para os géis coloridos com bixina livre do que os coloridos com microcápsulas de BIX + AA ou de BIX. Sob 1300 lux, a bixina apresentou 25% de retenção após aproximadamente 212 e 220 horas, respectivamente nos géis com microcápsulas BIX + AA e microcápsulas BIX. O mesmo percentual foi alcançado após 33 horas na solução etanólica (controle). Com aumento da luminosidade para 2100 lux, após 124 e 128 horas observou-se aproximadamente 25% de retenção do carotenóide nos géis coloridos com microcápsulas BIX+AA e microcápsulas BIX, respectivamente, enquanto que na solução etanólica, o mesmo percentual foi observado após 23 horas. Em todos os sistemas, ocorreu gradual diminuição das coordenadas de cor  $a^*$  e  $b^*$ , que pode ser associada à degradação da bixina nas diferentes condições estudadas.

*Palavras-chave:* Bixina; Microencapsulação; Gel; Ácido ascórbico; Fotodegradação; Cor

## 1. Introdução

O urucum (*Bixa orellana* L.) é um arbusto perene originário da América do Sul, mais especificamente da região amazônica, sendo também cultivado em outras regiões de clima tropical, como a América Central, a África e a Ásia (Mercadante & Pfander, 1998). O maior produtor e exportador das sementes de urucum é o Peru, que responde por 35% da produção mundial, seguido do Brasil e do Quênia (Satyanarayana, Prabhakara & Rao, 2003). Das sementes do urucum é extraído um extrato rico em carotenóides, sendo a bixina (metil hidrogênio 9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) correspondente a 80% do total de pigmentos (Mercadante & Pfander, 1998).

Os carotenóides de urucum são utilizados na coloração de sucos, produtos de confeitaria, margarina, sorvete, queijos, molhos, cereais e snacks ([www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)). No Brasil, a maior aplicação é na produção do colorífico (*colorau*), um condimento utilizado na coloração de carnes, principalmente na Região Norte e Nordeste. Além disso, esses pigmentos são potenciais substitutos de corantes sintéticos como o amarelo tartrazina, um azocorante, amplamente utilizado em alimentos e cosméticos e que está associado a reações alérgicas como asma, bronquite, rinite, náusea, broncoespasmos, urticária, eczema e dor de cabeça (Elhkim et al., 2007).

Devido às ligações duplas conjugadas, os carotenóides possuem alta reatividade, tornando-os susceptíveis à isomerização geométrica, oxidação ou degradação a compostos incolores. Vários estudos têm citado a luminosidade como um dos principais fatores responsáveis pela isomerização *trans*↔*cis* ou pela degradação dos carotenóides a produtos incolores (Lee & Chen, 2002; Meléndez-Martínez, Vicario & Heredia, 2004; Limbo, Torri & Piergiovanni, 2007).

Na tentativa de minimizar as perdas desses pigmentos, alternativas como a adição de antioxidantes naturais ou sintéticos foram avaliadas em diversos estudos (Najar, Bobbio & Bobbio, 1988; Orset, Leach, Morais & Young, 1999; Matsufuji, Chino & Takeda, 2004). Dentre os antioxidantes, o ácido ascórbico (AA) ou vitamina C é de grande interesse, pois pode ser encontrada naturalmente em diversas frutas e vegetais ricos em carotenóides. Além disso, o AA pode ser adicionado intencionalmente como acidulante, antioxidante ou na fortificação de sucos, molhos e sorvetes. O efeito positivo da adição do AA na estabilidade dos carotenóides já foi observada para o  $\beta$ -caroteno durante a exposição a 35 °C por 30 dias (Yen, Shihe & Chang, 2008), para carotenóides totais em suco de laranja fortificado com AA estocados por 7 semanas de estocagem a 4,5 °C (Choi, Kim & Lee, 2002) e para carotenóides de suco de maracujá suplementado com AA e estocado a 37 °C por 28 dias (Talcott, Percival, Pittet-Moore & Celoria, 2003).

Além do uso de antioxidantes, a microencapsulação também tem sido utilizada com sucesso na estabilização do  $\beta$ -caroteno, carotenóides de páprica e bixina (Desobry, Netto & Labuza, 1997 e 1999; Rosenberg & Lee, 2004; Barbosa, Borsarelli & Mercadante, 2005).

Considerando a importância econômica dos carotenóides de urucum para o Brasil e a necessidade de aumentar sua estabilidade durante o processamento e estocagem dos produtos alimentícios, o objetivo do presente trabalho foi: (1) avaliar o efeito da adição do ácido ascórbico (AA) nas propriedades da bixina microencapsulada; (2) avaliar a estabilidade das microcápsulas bixina + AA em gel exposto a diferentes intensidades de luminosidades e (3) correlacionar a perda de bixina com a variação dos parâmetros de cor CIElab nos sistemas estudados.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Material*

A bixina foi extraída de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) com acetato de etila, seguido de duas cristalizações sucessivas com etanol até obter pureza de aproximadamente 94% (Rios & Mercadante, 2004). O ácido ascórbico (AA) (Merck) foi utilizado como antioxidante, e como material de parede foram usados goma arábica (GA) (INSTANTGUM C IRX 40642 - Colloides Naturels Brasil) e maltodextrina 20 dextrose equivalente (MD) (MOR REX 1920 - Corn Products Brasil), ambos de grau alimentício. O agar (Merck) foi utilizado como gel para os sistemas-modelos.

### *2.2. Preparo das microcápsulas de bixina*

Foram preparadas microcápsulas de bixina com AA (BIX+ AA) ou apenas de bixina (BIX), utilizando-se 40 mg de cristais de bixina e 200 mg de ácido ascórbico, conforme a metodologia descrita por Barbosa et al. (2005). Uma mistura de GA e MD (1:1) foi utilizada como material de parede contendo 40% (p/v) de sólidos. Foi utilizado o spray-dryer (Lab Plant SD-04), com as seguintes condições: diâmetro do bico injetor de 0,7 mm; vazão de saída, temperatura de entrada e pressão do ar de 30 mL/min, 180 °C e 5 kgf /cm<sup>2</sup>, respectivamente. Após a secagem, as microcápsulas foram estocadas em garrafas de vidro e acondicionadas em freezer (-20 °C). Cada amostra de microencapsulado foi composta pela mistura do pó obtido de duas secagens no spray-dryer.

### *2.3. Caracterização das microcápsulas*

Para determinação de bixina total (BT), 1 g de microcápsula foi solubilizada em 20 mL de água destilada e agitada por 1 minuto em vórtex até total dissolução. A extração

exaustiva do carotenóide foi realizada em um funil de separação contendo 15 mL de diclorometano (DCM). Após agitação, a fração orgânica foi coletada e foram realizadas mais duas extrações consecutivas com a adição de mais 15 mL e 10 mL de DCM, respectivamente. Todas as frações orgânicas foram misturadas e concentradas em rotaevaporador ( $T < 30^{\circ} \text{C}$ ) até aproximadamente 10 mL.

Para determinação da bixina de superfície (BS), 1g de microcápsula foi agitada com 5 mL de DCM em vórtex por 30 segundos, e em seguida centrifugada (Fanem – Modelo 206 BL) a 3000 rpm por 10 minutos. A solução fração alaranjada contendo o carotenóide foi coletada, filtrada em membrana Millipore (0,22  $\mu\text{m}$ ), a qual foi lavada com DCM até totalizar um volume de aproximadamente 10 mL.

A determinação de BT e BS foi realizada em triplicata.

O rendimento (% Rd) do pó foi determinado de acordo com a equação (1) onde: MSA = massa total de sólidos antes da microencapsulação (g) e MSD = massa total de sólidos obtidos após a microencapsulação (g), conforme Nunes e Mercadante (2007).

$$\% \text{ Rd} = \frac{\text{MSD}}{\text{MSA}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

A retenção (Rt) da bixina nas microcápsulas durante a secagem em spray-dryer foi determinada segundo Zilberboim, Kolpeman & Taylor (1986), considerando a quantidade de bixina na solução do material de parede antes da secagem (BMP) e após a secagem (BT= bixina total).

$$\% \text{ Rt} = \frac{\text{BT}}{\text{BMP}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

A eficiência de microencapsulação (EM) foi calculada de acordo com a equação 3, segundo McNamee, O'Riordan & O'Sullivan (2001), onde BT= Bixina total e BS= Bixina de superfície.

$$\% EM = \frac{(BT - BS)}{BT} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

#### 2.4. *Sistemas-modelo em gel*

Para avaliar a estabilidade da bixina foram preparados três sistemas em gel colorido com microcápsulas de BIX + AA, microcápsulas de BIX e com uma solução etanólica de BIX + AA em água (controle). O gel foi preparado com agar (0,5%) previamente solubilizado em água (80° C) e aquecido gradativamente até ebulição, sob agitação. Após 5 minutos, o gel foi resfriado a ~45° C e as microcápsulas de BIX + AA ou BIX dispersas em água (5° C) foram adicionadas ao meio. No sistema controle, a solução etanólica de BIX e a solução aquosa de AA foram adicionados diretamente ao gel. Todos os géis estudados apresentaram concentração inicial de bixina e de AA de 0,3 µg/g e 15 mg/g gel, respectivamente. O conservante benzoato de sódio (0,5% p/v) foi adicionado a todos os sistemas para evitar a proliferação de fungos e o emulsificante Tween 80 (0,2% p/v) apenas nos sistemas com bixina não encapsulada (controle).

Todos os géis foram distribuídos em placas de Petri transparentes, com 5 cm de diâmetro, que foram estocadas em geladeira (10 °C) protegidas da luz por 15 horas. Após este período, as placas foram expostas a intensidades de luminosidade de aproximadamente 1300 e 2100 lux a 20 ± 1 °C. Apenas as placas do gel colorido com microcápsulas BIX + AA ou com a solução de BIX + AA foram estocadas no escuro (0 lux), em uma sala livre

de outras fontes de luminosidade a  $20 \pm 1$  °C. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Em todos os géis, a concentração de bixina foi determinada no tempo zero e periodicamente até aproximadamente 75% de degradação.

### 2.5. *Extração de bixina e AA nos sistemas-modelo em gel*

A extração da bixina foi realizada em almofariz macerando-se 15 g do gel agar com celite e acetona gelada (10 °C) por 5 minutos, seguido de filtração a vácuo em funil de vidro sinterizado. O filtrado foi transferido para um funil de separação, adicionou-se 15 mL de DCM e 40 mL de água destilada. Após agitação e separação das fases, a fração inferior alaranjada foi coletada e foram realizadas mais duas extrações da bixina residual do filtrado. As soluções de DCM contendo bixina foram misturadas, adicionado sulfato de sódio anidro para retirada da água residual, e em seguida concentrada até aproximadamente 10 mL, em rotoevaporador ( $T < 30$  °C).

Para a determinação do teor de AA foi utilizado o método de Benassi & Antunes (1988). O gel (5 g) foi macerado com solução extratora (ácido oxálico 2%) em almofariz por 2 minutos. O conteúdo foi filtrado a vácuo em funil de Buchner e a fração contendo o AA foi coletada para posterior quantificação de acordo com o item 2.7.

A extração de bixina e do AA foi realizada em duplicata, misturando-se o conteúdo de três placas, para minimizar o efeito da diferença de intensidade de luz das lâmpadas.

## 2.6. *Quantificação de bixina e de AA*

A quantificação da bixina dos géis, BT e BS foi realizada em espectrofotômetro (Shimatzu – Minispectrophotometer 1220) na região do UV-visível, utilizando como solvente o DCM e absorvidade ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) de 2826 (Lara, 1984).

A quantificação do AA foi realizada com 2,6-diclorofenol indofenol-sódico (DCFI) de acordo como o método da AOAC (1984), modificado por Benassi & Antunes (1988). O filtrado contendo o AA (20 mL) foi diluído com ácido oxálico 2% em balão volumétrico (50 mL). Uma alíquota de 10 mL foi titulada com solução de DCFI 0,01%, previamente padronizada com solução padrão de ácido ascórbico, até a coloração rósea persistir por no mínimo 15 segundos. A titulação do AA foi realizada em triplicata. O teor de AA foi expresso em mg/g de gel.

## 2.7. *Determinação dos parâmetros de cor*

As mudanças de coloração nos géis foram medidas utilizando-se o colorímetro Color Quest XE (Hunter Lab, Reston, Virgínia) equipado com um iluminante D65 e ângulo do observador de 10°. Os parâmetros  $L^*$  (luminosidade) e coordenadas cromáticas  $a^*$  (componente vermelho - verde) e  $b^*$  (componente amarelo – azul) foram obtidos no tempo zero e final de cada experimento. Estes parâmetros foram utilizados para calcular a saturação de cor (croma,  $C^*$ ), o ângulo de tonalidade cromática (hue,  $h$ ) e a diferença global da cor ( $\Delta E^*$ ) usando as equações de (4) a (6).

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Equação (4)}$$

$$h^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{Equação (5)}$$

$$\Delta E^* = \left[ (\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 \right]^{1/2} \quad \text{Equação (6)}$$

## 2.8. Análise dos resultados

Análise de variância (ANOVA) dos resultados experimentais, as curvas e os parâmetros cinéticos de degradação da bixina e AA foram determinados utilizando-se o software Origin 5.0.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Efeito da adição do AA nas propriedades das microcápsulas

Na Tabela 1 estão apresentados o rendimento (Rd), a retenção (Rt) e a eficiência do microencapsulamento (EM) das microcápsulas de BIX + AA e de BIX.

Tabela 1. Propriedades da microcápsulas de BIX + AA e de BIX.

Microcápsulas	%Rd	% Rt	% EM
BIX + AA	59,5 ± 0,7 a	90,3 ± 0,9 a	97,6 ± 0,8 a
BIX	60,4 ± 1,4 a	87,7 ± 1,2 b	87,6 ± 1,2 b

BIX: bixina, AA: ácido ascórbico; Rd: rendimento, Rt: retenção, EM: eficiência de microencapsulação

Os valores são média ± desvio padrão de três determinações.

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si a  $p \leq 0,05$ .

Cabe mencionar, que o rendimento do processo é altamente dependente do *design* do “spray-dryer”, enquanto que a retenção e a eficiência estão relacionadas com a natureza

química do recheio e do material de parede. O rendimento (Rd) médio das microcápsulas BIX + AA e das compostas apenas por BIX não diferiu estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ), demonstrando que a adição de AA não afetou esse parâmetro. Esses valores foram mais elevados do que 51%, reportado por Nunes & Mercadante (2007), que utilizaram uma mistura de GA/Sacarose (4:1) no mesmo spray-dryer e condições de atomização similares a do foi devido à utilização de uma alta temperatura de entrada do ar que pode ter contribuído para uma maior caramelização e aderência da sacarose no equipamento. Por outro lado, Leach et al. (1998) reportaram rendimento superior (98%) ao encontrado neste estudo, no processo de obtenção da biomassa seca de *Dunalliella salina* utilizando MD 12 DE/GA (3,5:1) como materiais de parede, em spray-dryer de outro fabricante (Niro Atomizer Mobile Minor Unit, Copenhagen, Dinamarca) e temperatura de entrada do ar de 200 ou 265°C e temperatura do ar na saída de 110 ou 120°C.

Os valores de EM obtido neste estudo foram similares aos observados em outros estudos de microencapsulação de carotenóides, como por exemplo, eficiência de 89% para  $\alpha$ -caroteno e de 87% para  $\beta$ -caroteno utilizando maltodextrina 4 DE (Wagner & Warthesen, 1995), e mais altos que 62% para encapsulamento de *trans*- $\beta$ -caroteno com maltodextrina 25 DE (Desobry et al., 1997) e 78% utilizando a mistura maltodextrina 4 DE e glicose (Desobry et al., 1999). Eficiência máxima (86%) no encapsulamento de bixina foi atingida com a utilização de goma arábica/sacarose (95:5) em trabalho de Barbosa et al. (2005), enquanto que com maltodextrina a eficiência foi de 54%, aumentando para 75% com a adição de um emulsificante (Tween 80).

O efeito da adição de AA foi mais significativo na retenção (Rt) e na eficiência de microencapsulação (EM) das microcápsulas estudadas, que apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$  (Tabela 1). A adição do AA às microcápsulas contribuiu para o

aumento da Rt da bixina, provavelmente por o AA ser um potente antioxidante, que minimizou as perdas da bixina durante a secagem em spray-dryer. Comportamento similar foi reportado com o uso dos antioxidantes BHT e TBHQ que aumentaram a retenção de  $\beta$ -caroteno durante a secagem da microalga *Dunaliella salina* por spray-dryer; no entanto, perdas acentuadas do caroteno foram observadas quando tocoferol ou acetato de tocoferol foram utilizados (Orset et al., 1999). No presente trabalho, a adição de AA resultou em um aumento de aproximadamente 10% no valor de EM (Tabela 1).

### 3.2. *Efeito da adição do AA na estabilidade da bixina em gel*

Nos géis coloridos, os perfis cinéticos da fotodegradação da bixina microencapsulada foram semelhantes nas duas intensidades de luz investigadas, com três etapas distintas que seguiram cinética de ordem zero. Por outro lado, a degradação da bixina não encapsulada ocorreu em apenas uma etapa, também de ordem zero (Figura 1 A e B). A adequação do modelo cinético pode ser verificada pelos altos valores de correlação,  $r > 0,96$  para todas as regressões.

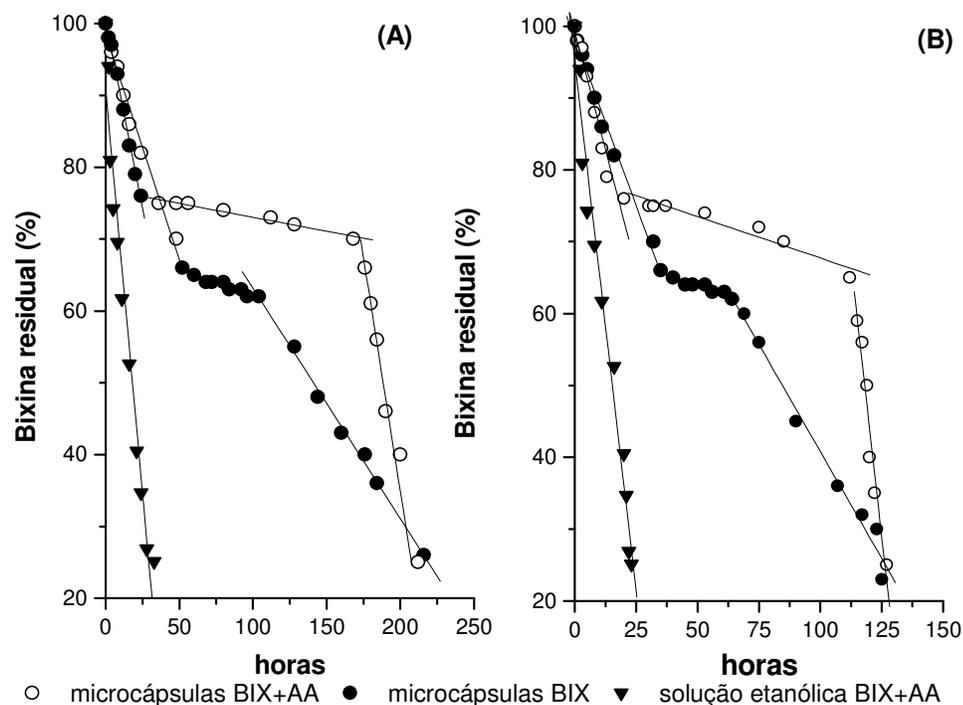


Fig. 1. Curvas cinéticas de degradação da bixina (BIX) encapsulada com ou sem (AA) e BIX+AA não encapsulado durante exposição a 1300 (A) ou a 2100 lux (B), em gel a 21° C.

A presença de 3 etapas durante a fotodegradação da bixina encapsulada sugere que inicialmente pode ter ocorrido a fotodegradação da bixina presente na superfície, mais exposta à luminosidade/O<sub>2</sub> seguida da gradual degradação do carotenóide que estava no interior da microcápsulas, conforme reportado por Desobry et al. (1999) para microcápsulas de β-caroteno sob diferentes umidades relativas ou para microcápsulas de licopeno (Matioli & Rodriguez-Amaya, 2002) e bixina encapsulada (Barbosa et al., 2005) submetidas a luminosidade.

Cinética de ordem zero foi reportada para degradação de oleoresina de pimenta vermelha encapsulada com uma mistura de gomas (gelana, arábica e mesquita)/MD 10 DE

em diferentes atividades de água ( $a_w$ ), no entanto, a degradação ocorreu em apenas uma etapa (Rodríguez-Huezo, Pedrosa-Islas, Prado-Barra, Beristain & Vernon-Carter, 2004). Por outro lado, vários trabalhos reportaram que a degradação dos carotenóides encapsulados apresenta cinética de primeira ordem com duas etapas distintas, a primeira com elevada velocidade seguida de um período com velocidade de degradação mais lenta (Desobry et al., 1997 e 1999; Wagner & Warthesen 1995; Barbosa et al., 2005).

A presença do AA não afetou de forma significativa a estabilidade da bixina, tendo em vista que, os valores das constantes de degradação ( $k_{obs}$ ) da bixina principalmente nas etapas I e II foram similares nos géis com ou sem o antioxidante, sob 1300 e 2100 lux (Tabela 2).

Tabela 2. Velocidade de degradação ( $k_{obs}$ ) da bixina em sistemas de gel.

Sistemas	Luminosidade	$k_{obs}$ ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )		
		etapa I	etapa II	etapa III
BIX + AA não encapsulada	0 lux	239,2	n.a.	n.a.
	1300 lux	835,9	n.a.	n.a.
	2100 lux	850,7	n.a.	n.a.
Microcápsulas BIX	1300 lux	100,4	76,9	295,3
	2100 lux	100,3	79,2	409,6
Microcápsulas BIX + AA	0 lux	42,5	n.a.	n.a.
	1300 lux	98,4	69,7	95,2
	2100 lux	98,3	69,8	150,4

BIX: bixina, AA: ácido ascórbico, n.a: não apresentou estas etapas.

No entanto, pode-se verificar que a adição do AA afetou principalmente o  $k_{obs}$  da etapa III, pois as microcápsulas sem AA apresentaram valores de  $k_{obs}$  cerca de 3 vezes maiores do que as microcápsulas de BIX + AA, tanto a 1300 lux como a 2100 lux (Tabela

2). As demais etapas de degradação (I e II) apresentaram valores de  $k_{obs}$  bastante similares na presença e ausência de AA (Tabela 2).

O efeito protetor do AA já foi reportado em carotenóides de páprica durante estocagem a temperatura ambiente ou refrigeração, em sistema-modelo aquoso (Biacs, Czinkotai & Hoschke, 1992), para licopeno, licoxantina e  $\beta$ -caroteno de tomate estocados a 25° C (Biacs, & Daood, 2000), para carotenóides de suco de laranja fortificados com 30 mg/100 mL de AA (Choi, Kim & Lee, 2002) e para  $\beta$ -caroteno em fatias de cenoura estocadas a 35°C (Yen, Shihe & Chang, 2008).

Como esperado, a estabilidade da bixina nas microcápsulas BIX + AA ou de BIX foi maior do que a BIX não encapsulada nas duas condições de luminosidade estudadas, comprovada pelos menores valores de  $k_{obs}$  observados nos géis coloridos com as microcápsulas (Tabela 2). Este comportamento já foi encontrado por Barbosa et al. (2005) para bixina e por Bustos, Romo, Yáñez, Díaz & Romo (2003) para astaxantina, ambas em sistemas encapsulado e não encapsulado em meio aquoso.

De forma geral, o aumento da luminosidade afetou de forma negativa a estabilidade da bixina, tanto na forma livre ou na encapsulada, no gel (Tabela 2). O efeito negativo da luminosidade na estabilidade dos carotenóides encapsulados já foi amplamente discutido em diversos estudos (Wagner & Warthensen, 1995; Rosenberg & Lee, 2004; Barbosa et al., 2005).

### 3.3. Degradação do ácido ascórbico

No presente estudo, a cinética de degradação do AA foi de primeira ordem em todos os géis estudados (Figura 2). Resultados similares foram observados em bebida isotônica de

açaí fortificada com AA exposta a 800 lux (De Rosso & Mercadante, 2007) e em néctar de *blackcurrant* (Inversen, 1999).

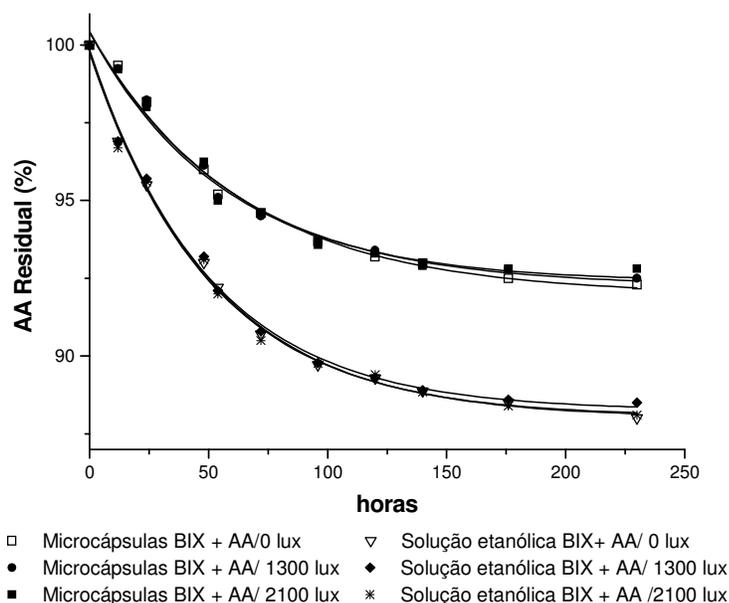


Fig. 2. Curva cinética de degradação do ácido ascórbico em microcápsulas de BIX+AA e BIX+AA não encapsulado durante estocagem a 0, 1300 e 2100 lux, em gel a 21° C.

Nas condições de estocagem avaliadas, praticamente não ocorreu degradação de AA. Os géis coloridos com microcápsulas BIX+ AA expostos a 0, 1300 e 2100 lux apresentaram % AA residual de ~ 92,3%, 92,5% e 92,8%, respectivamente em relação à quantidade inicial (Figura 2). Os géis coloridos com solução etanólica de BIX + AA apresentaram % AA residual ligeiramente menor, sendo aproximadamente 88%, durante 230 horas nas condições de luminosidades estudadas (Figura 2).

Esse comportamento indica que a presença de O<sub>2</sub> durante a estocagem foi mais deletéria para estabilidade do AA do que a luminosidade, enquanto que para a bixina, o

sinergismo entre luminosidade/O<sub>2</sub> afetou muito mais sua estabilidade. Comportamento similar foi descrito por Maeda, Pantoja, Yuyama & Chaar (2007) que também reportaram que a luminosidade não afetou de forma significativa o teor de AA de néctar de camu-camu, e por Solomon, Svanberg & Sahlström (1995) que não verificaram efeito significativo da luz fluorescente (2000 lux) no teor de AA de suco de laranja reconstituído, pasteurizado e envasado em embalagens Tetra-Brik, e em garrafas de vidro, durante 52 dias.

Nos géis coloridos com microcápsulas, os  $k_{obs}$  do AA foram bastante similares ( $\sim 0,05 \text{ h}^{-1}$ ) durante a exposição a 1300 e 2100 lux, e no escuro a velocidade de degradação foi de  $0,042 \text{ h}^{-1}$ . Nos géis coloridos com BIX + AA não encapsulados, os  $k_{obs}$  foram similares ( $\sim 0,08 \text{ h}^{-1}$ ) em todas as luminosidades estudadas.

#### 3.4. *Mudanças na cor do gel*

Visualmente os géis estudados apresentaram diferença em sua coloração inicial, pois os sistemas coloridos com as microcápsulas de BIX+AA ou de BIX apresentaram alaranjado mais intenso do que os coloridos com BIX+AA não encapsulado (solução etanólica). Esta diferença visual foi confirmada pelos valores iniciais significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) dos parâmetros CIELAB vermelho ( $a^*$ ), amarelo ( $b^*$ ) e saturação da cor ( $C^*$ ) do sistema contendo o corante não encapsulado (Tabela 3). Por outro lado, observou-se que a luminosidade inicial e final dos géis coloridos com bixina encapsulada ou não encapsulada não apresentou diferença significativa a  $p \leq 0,05$  (Tabela 3), indicando que o gel não se tornou turvo e que a luminosidade transmitida por esses géis permaneceu sempre a mesma.

Tabela 3. Parâmetros de cor CIELAB dos géis coloridos com microcápsulas de BIX, de BIX+AA, e BIX+AA não encapsulado, estocados a diferentes intensidades de luz, a 21° C.

Sistemas	Luminosidade	$a^*$		$b^*$		$L^*$		$C^*$		$h_{ab}$		$\Delta E^*$
		0 h	230h	0 h	230 h	0 h	230 h	0 h	230 h	0 h	230 h	230 h
BIX+AA	0 lux	9±1 aB	7±0 b	35±1 aB	31±1 b	80±1 aA	79±2 a	36	31	76	79	4
não encapsulada	1300 lux	9±1 aB	2±0 b	35±1 aB	21±2 b	81±1 aA	80±1 a	36	21	76	85	16
	2100 lux	9±0 aB	2±1 b	35±1 aB	17±1 b	81±2 aA	78±2 a	36	17	76	89	21
Microcápsulas	1300 lux	12±2 aA	4±1 b	41±3 aA	30±1 b	82±1 aA	80±3a	43	30	74	82	14
BIX	2100 lux	12±1a A	3±0 b	41±2 aA	25±0 b	81±1 aA	78±2 a	43	25	74	86	19
Microcápsulas	0 lux	12±1 aA	11±0 a	41±2 aA	40±1 a	81±2 aA	80±1 a	43	41	72	77	2
BIX+AA	1300 lux	13±1 aA	5±1 b	41±2 aA	30±1 b	80±2 aA	79±3 a	43	30	73	81	13
	2100 lux	12±2 aA	3±1 b	41±1 aA	24± 1b	80±3 aA	81±2 a	43	24	73	86	19

BIX: bixina, AA: ácido ascórbico.

Média ± desvio padrão de cinco determinações.

Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si a  $p \leq 0,05$  (efeito do tempo de estocagem)

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si a  $p \leq 0,05$  (efeito do tipo de sistema)

Santos, Fávaro-Trindade & Grosso (2006) observaram diferenças nos valores iniciais de  $a^*$  (sistema HunterLab), em gelatinas elaboradas com as mesmas quantidades de oleoresina de páprica encapsulada com goma-arábica ou com amido. Pesek & Warthesen (1988) reportaram diferenças nos valores de  $L$ ,  $a$ ,  $b$ , determinados em colorímetro Gardner, em géis de gelatina/sacarose ou goma arábica/sacarose formulados com a mesma quantidade de  $\beta$ -caroteno (10  $\mu\text{g/mL}$ ).

Comparando-se os géis coloridos com bixina encapsulada com ou sem AA, nas diferentes condições de luminosidade, verificou-se que a adição do antioxidante não afetou a coloração inicial, uma vez que esses não apresentaram diferença estatística entre as coordenadas colorimétricas iniciais (Tabela 3). Além disso, os valores finais de  $a^*$  e  $b^*$  também foram iguais nos géis coloridos com estas duas microcápsulas. Esse resultado mostra que a adição do antioxidante à formulação não interferiu na coloração inicial, como também, não favoreceu a retenção de cor (Tabela 3). Os valores semelhantes de intensidade de cor ( $C^*$ ) e cor global ( $\Delta E^*$ ) confirmam este fato.

Como esperado, o aumento da luminosidade afetou de forma negativa a cor dos géis coloridos com bixina na forma livre ou na encapsulada (Tabela 3). Em todos os sistemas, os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ , ou seja, o vermelho e amarelo da cor foram os que apresentaram maior alteração durante a exposição à luz, devido à degradação da bixina, um carotenóide alaranjado. O aumento de luminosidade para 2100 lux acentuou a perda de cor de todos os géis estudados. Esta descoloração pode ser também verificada pela diminuição da intensidade cromática ( $C^*$ ) à medida que a intensidade de luz aumentou, com deslocamento para uma cor mais amarelada (aumento do  $h_{ab}$ ). O gel colorido com bixina não encapsulada foi o mais afetado pela luminosidade quando comparado aos coloridos com microcápsulas, provavelmente devido à menor estabilidade da bixina nessa condição.

Considerando que valores de  $\Delta E^* > 2$  indicam que a mudança de cor já pode ser perceptível visualmente, a descoloração que ocorreu nos géis na estocagem sob luz ( $\Delta E^* > 13$ ) pode ser verificada pelo consumidor.

As mudanças nos valores das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  foram significativamente correlacionadas com o teor de bixina durante estocagem dos géis (Fig. 3 A e Fig. 3B), com coeficientes de correlação ( $r^2$ ) variando entre 0,97 e 0,98. Este fato evidencia a correlação entre as cores vermelho e amarelo com a presença de bixina.

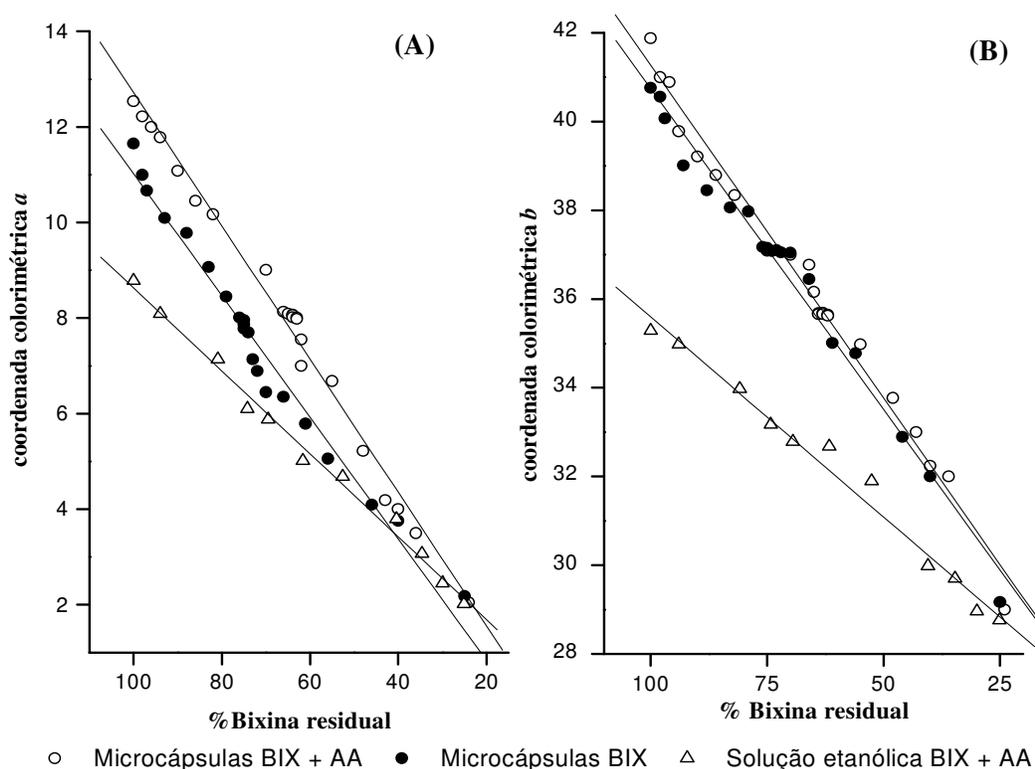


Fig.3. Correlação da % bixina residual das microcápsulas BIX + AA (○), microcápsulas BIX (●) e BIX + AA não encapsulada (△) com as coordenadas colorimétricas  $a^*$  (A) e  $b^*$  (B), durante a exposição a 1300 lux a 21° C.

A maioria dos estudos reportou que o parâmetro colorimétrico  $a^*$  (vermelho) do sistema CIElab ou Hunterlab foi o que descreve melhor a perda de cor de carotenóides encapsulados em diferentes sistemas-modelo, como por exemplo  $\beta$ -caroteno encapsulado com matriz de trealose/gelatina estocado em diferentes atividades de água (Elizalde, Herrera & Buera, 2002), carotenóides de páprica encapsulados com goma arábica ou amido (Santos, Fávaro-Trindade & Grosso, 2006) e  $\beta$ -caroteno encapsulado com PVP-40 (Sutter, Buera & Elizalde, 2007). Além disso, Desobry et al. (1997) reportaram que os parâmetros  $L$  e  $a$  do sistema Hunter foram os que melhor descreveram a degradação do  $\beta$ -caroteno da superfície de microcápsulas de MD estocadas em diferentes umidades relativas (UR) à temperatura de 25 e 35 °C.

Pesek & Warthesen (1988) reportaram uma boa correlação ( $r^2$  de 0,97) entre o parâmetro colorimétrico  $b$  e a perda do  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno de suco de cenoura durante a fotodegradação.

Em resumo, os resultados do presente estudo mostram que o método de encapsulação por spray-dryer foi uma boa alternativa para a proteção de carotenóides, e que a adição de um antioxidante natural, como AA, não retarda a descoloração da bixina na presença de luz. Os parâmetros de cor  $a^*$  e  $b^*$  podem ser utilizados para acompanhar a degradação de bixina em sistemas gelificados.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Doutorado concedida a Maria Ivone M. J. Barbosa e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

## Referências

- Anvisa (1999), Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 4 de 24 de novembro de 1999 <<http://www.anvisa.gov.br>>.acessado 10-12-2008.
- AOAC. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C., 1984. p. 844-845.
- Barbosa M.I.M.J.; Borsarelli, C.D., & Mercadante, A.Z. (2005). Light stability of spray-dryer bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, 38, 989–994.
- Benassi, M. T., & Antunes, A. J. (1988). A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 31, 507-51.
- Biacs, P. A., Czinkotai, B., & Hosch, A. (1992). Factors affecting stability of colored substances in paprika powders. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 363-367.
- Biacs, P. A., & Daood, H. G. (2000). Lipooxygenase-catalysed degradation of carotenoids from tomato in the presence of antioxidant vitamins. *Biochemical Society Transactions*, 28, 839-845.
- Bustos R.; Romo L.; Yanez K.; Daz G.; & Romo C. (2003) Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. *Journal of Food Engineering*, 56, 289-293.
- Choi, M.H., Kim, G.H., & Lee, H.S. (2002). Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, 35, 753–759.

De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chemistry*, 103, 935-943.

Desobry, S. A.; Netto, F. M., & Labuza, T. P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for  $\beta$ -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62, 1158 - 1162.

Desobry, S.; Netto, F. M., & Labuza, T. P. (1999). Influence of maltodextrin system at an equivalent 25 DE on encapsulated beta-carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 23, 39-55.

Elhkim, M. O.; Héraud, F.; Bemrah, N.; Gauchard, F.; Lorino, T.; Lambré, C.; Frémy, J. M.; & Poul, J.-M. (2007). New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine: An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47, 308-316.

Elizalde, B. E; Herrera, M. L.; Buera, M. P. (2002). Retention of  $\beta$ -carotene encapsulated in a trehalose-based matrix as affected by water content and sugar crystallization. *Journal of Food Science*, 67, p. 3039-3045.

Iversen, C.K. (1999). Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content, *Journal Food Science*, 64, 37–41

Lara, W. H. (1984), Monografrafia corantes naturais para fins alimentícios. Padrões de Identidade e Qualidade. São Paulo: Brasil, 117pp.

Leach, G., Oliveira, G., & Morais, R., (1998). Spray drying of *Dunaliella salina* to produce a  $\beta$ -carotene rich powder. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 82–85.

- Lee, M. T.; & Chen, B. H. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*, 78, 425-432.
- Limbo, S., Torri, L., Piergiovanni, L. (2007). Light-induced changes in an aqueous  $\beta$ -carotene system stored under halogen and fluorescent lamps, affected by two oxygen partial pressures. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 55, 5238-5245.
- Maeda, R. N., Pantoja, L.; Yuyama, L. K. O; Chaar, J. M. Estabilidade de ácido ascórbico e antocianinas em néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 313-316.
- Matioli, G.; Rodriguez-Amaya, D. (2002). Licopeno Encapsulado em goma arábica e maltodextrina: estudo da estabilidade. *Brazilian Journal Food Technology*, 5:197-203.
- Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M., & Takeda, M. (2004). Effects of paprika pigments on oxidation of linoleic acid stored in the dark or exposed to light. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3601-3605.
- Meléndez-Martínez, A. J.; Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Stability of carotenoid pigments in foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 54, 209-215.
- Mercadante, A. Z., & Pfander, H. (1998). Carotenoids from annatto: A review. *Agricultural Food Chemistry*, 2, 79-91.
- Najar, S.V., Bobbio, F.O., & Bobbio, P.A. (1988). Effect of light, air, antioxidants and pro-oxidants on Annatto extracts (*Bixa orellana* L.). *Food Chemistry*, 29, 283-289.
- Nunes, I. L., & Mercadante (2007). Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 893-900.

Orset, S.; Leach, G. S., Morais, R., & Young, A. J. (1999). Spray-drying of the microalga *Dunaliella salina*: Effects on carotene content and isomer composition. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 47, 4782 -4790.

Ré, M.I. (2000). Microencapsulação: tecnologia que atribui propriedades inteligentes a materiais ativos. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, p. 24-29.

Rios, A. O., & Mercadante. A. Z. (2005). Aplicação de CLAE para acompanhar a cristalização e otimização das condições de extração e saponificação de bixina em “snacks” extrusados. *Revista Alimentos e Nutrição* (submetido).

Rodríguez-Huezo, M., E; Pedroza-Islas, R.; Prado-Barragán, L. A.; Beristain, C.I., & Vernon-Carter, E.J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69, 351-359.

Rosenberg, M., & Lee, S.J. (2004). Water-insoluble, whey protein-based microspheres prepared by an all-aqueous process. *Journal of Food Science*, 69, 50-58.

Santos, A. B; Fávaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2005). Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 322-326.

Santos, A. B; Fávaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2006). Funcionalidade da oleoresina de páprica microencapsulada em goma-arábica e amido de arroz/gelatina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 351-354.

Satyanarayana, A., Prabhakara, P.G. R., & Rao, D.G. (2003). Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 40, 131–141.

Solomon, O., Svanberg, U., & Sahlström, A (1995). Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8°C. *Food Chemistry*, 53, 363-368.

Talcott, S. ; Percival, S. S. ; Pittet-Moore, J ; Celoria, C. (2003). Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 935-941•

Wagner, L. A., & Warthesen, J. J. (1995). Stability of spray-dryer encapsulated carrots carotenes. *Journal of Food Science*, 60, 1048 - 1053.

Yen, Y. H, Shih, C. H, & Chang, C. H. (2008) Effect of adding ascorbic acid and glucose on the antioxidative properties during storage of dried carrot. *Food Chemistry* 107, 265–272.

## CONCLUSÃO GERAL

A obtenção de bixina encapsulada utilizando-se materiais de parede com propriedades emulsificantes foi bem sucedida, originando microcápsulas com formatos característicos dos materiais utilizados e características morfológicas adequadas como: paredes contínuas, com superfície sem fissuras, orifícios ou injúrias, indicando que a temperatura do spray-dryer utilizada no processo de secagem (180 °C) estava ajustada adequadamente aos materiais estudados. Além disso, o uso de materiais com propriedades emulsificantes também favoreceu outras propriedades importantes das microcápsulas, tais como retenção do recheio durante a secagem, alta eficiência do microencapsulamento, rendimento e a proteção a bixina durante a exposição à luminosidade ou no escuro.

Os testes em sistema-modelo aquoso indicaram que a luminosidade afetou de forma significativa a estabilidade da bixina encapsulada ou livre (controle), quando comparado aos sistemas estocados no escuro. Comparando microcápsulas de 95% goma arábica (GA)+ 5% sacarose (Sac), 100% maltodextrina, 99,8 % maltodextrina + 0,2 % Tween 80, e 80% maltodextrina+ 20% Sac, verificou-se que as elaboradas com 95% GA+ 5% Sac ou 99,8 % maltodextrina + 0,2% Tween 80 foram as que apresentaram melhor eficiência do microencapsulação, 86 e 75%, respectivamente e, além disso, conferiram maior estabilidade a bixina durante a exposição a luz (700 lux) ou na estocagem no escuro. Em todos os sistemas aquosos adicionados de bixina microencapsulada e expostos à luz, a bixina apresentou duas etapas de degradação, que se ajustaram a cinética de primeira ordem.

A bixina encapsulada com mistura de maltodextrina e goma arábica na proporção de 1:1 (MD/GA<sub>1:1</sub>), originou microcápsulas com maior retenção de bixina, rendimento de pó e eficiência da microencapsulação em comparação com a solução menos viscosa composta por maltodextrina e goma arábica (4:1) (MD/GA<sub>4:1</sub>). As microcápsulas MD/GA<sub>1:1</sub> foram as que conferiram maior estabilidade à bixina na presença e ausência de luminosidade em sistema de gel. A cinética de degradação da bixina microencapsulada em sistema gelificado foi de ordem zero, sendo que foram observadas três etapas de degradação, enquanto que a degradação da bixina não encapsulada ocorreu em apenas uma etapa.

A mistura de maltodextrina e goma arábica (1:1) associada ao método de encapsulação por spray-dryer originaram microcápsulas de bixina com elevados rendimento, retenção e eficiência do microencapsulamento. Além disso, esse material de parede também foi uma boa alternativa para a proteção de bixina utilizada como corante de maria-mole quando comparado a maria-mole colorida com bixina não encapsulada.

A adição do AA nas microcápsulas de bixina não afetou a cor inicial dos géis estudados, bem como a perda da bixina na presença de luz. Independente da luminosidade, o AA encapsulado com bixina apresentou cinética de degradação de primeira ordem e sua exposição a condições mais severas de luminosidade (700 e 1300 lux) não afetou sua estabilidade. Em todos os sistemas, ocorreu gradual diminuição das coordenadas CIELab de cor  $a^*$  e  $b^*$ , que pode ser associada linearmente à degradação da bixina nas diferentes condições estudadas.