



## **Sistemas Corantes de $\beta$ -caroteno Baseados em Partículas Lipídicas Sólidas**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

**Amarilis Santos de Carvalho**

Orientadores

**Professora Doutora Maria Filomena F. Barreiro (IPB)**

**Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira (IPB)**

**Professor Doutor Odinei Hess Gonçalves (UTFPR/CM)**

**Bragança**

**2019**

*“Quando nada parecer dar certo, verei o cortador de pedras martelando sua rocha por cem vezes, sem que uma única rachada apareça. Mas na centésima primeira martelada verei a pedra se abrindo em duas partes, e eu saberei que não foi aquela que conseguiu isto, mas todas as que vieram antes.”*

*Jacob Rus (1849-1914)*

*“Um gênio é 1% de inspiração e 99% de transpiração”*

*Thomas Edison (1847- 1931)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, que estiveram sempre presentes em meus momentos de alegria e de dificuldade me deram abrigo e fortaleza para seguir sempre em frente, com um passo de cada vez.

Aos meus pais, Nilma Santos de Carvalho e Marcos Antônio de Carvalho e ao meu querido irmão Rafael Santos de Carvalho, que não mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui, vocês são meu alicerce, hoje olhando para trás mal consigo imaginar o lugar de onde viemos e onde hoje estou, sei que sem o apoio de vocês nada disso seria possível. À toda a família Carvalho e a família Santos, eu não poderia fazer parte de uma família melhor do que esta que Deus me deu.

Ao meu querido namorado André da Rocha Zanzarini, que sempre me apoiou incondicionalmente e não foi diferente quando surgiu a oportunidade de cursar este mestrado em outro continente, obrigada meu anjo, por ser esse companheiro que me ajuda a crescer a cada dia.

Às minhas orientadoras do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Maria F. Barreiro e Isabel C.F.R. Ferreira e Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Odinei Hess Gonçalves, por todo apoio e aprendizagem que recebi durante essa jornada.

Agradeço a todos os professores que tive ao longo da minha vida, precisei de cada um deles para chegar aonde estou. Em especial aos professores da UTFPR-CM, Fernanda Vitória Leimann e Manuel Plata Oviedo que foram sempre muito solícitos para comigo em momentos que precisei e às professoras Ângela Maria Gozzo, Ailey Ap. C. Tanamati e Márcia Geraldo Perdoncini por me despertarem o gosto pela área acadêmica, é visível a satisfação que vocês têm em serem professoras. Aos professores do IPB deixo meu carinho por se mostrarem sempre tão abertos a receber a nós alunos de dupla diplomação, em especial a professora Elsa Ramalhosa por este bom humor contagiante que carrega consigo.

Às investigadoras Isabel Fernandes e Stephany Rezende que sempre estiveram disponíveis para esclarecer todas as minhas dúvidas e me auxiliar nos árduos trabalhos de laboratório e me ensinarem a nunca desistir. À toda equipe do CIMO que contribuiu para

a execução deste trabalho, em especial à Eliana Pereira e Cristina Caleja, eu desejo muito sucesso para vocês, obrigada por toda atenção, comprometimento e incentivo.

Aos meus queridos amigos Iara Rodrigues, Ana Paula Sousa, Giovana Stangherlin, Carla Roana, Adenilson Rudke e Felipe Rocha que fizeram parte da minha vida na UTFPR-CM, sou muito grata por ter cada um de vocês na minha vida e a todos os amigos que Bragança me proporcionou, cada um de vocês é especial.

Agradeço a todos os envolvidos na criação e manutenção do programa de Dupla Diplomação acordado entre a UTFPR e o IPB, este programa me fez crescer e perceber o quão grande é a diversidade entre as culturas e que cada uma delas tem algo de bom a oferecer. É um prazer poder dizer que vivenciei nestas duas universidades de alto reconhecimento.

Enfim, quero agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse realizar este trabalho, agradeço pelas orações, pelas palavras de carinho e por tantos momentos de alegria.

CIMO (UID/AGR/00690/2019) financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e FEDER no âmbito do Programa PT2020. Laboratório Associado LSRE-LCM (UID/EQU/50020/2019) financiado pela FCT/MCTES (PIDDAC). Este trabalho é financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto Norte-01-0247-FEDER-024479 projeto Mobilizador ValorNatural.



## RESUMO

A tendência pela utilização de corantes naturais em substituição dos corantes sintéticos vem crescendo dia-a-dia devido aos benefícios que estes apresentam para a saúde. Contudo, é um grande desafio para a indústria obter sistemas baseados em corantes naturais que sejam estáveis, obter produtos com bons rendimentos e isentos de toxicidade, quando se visa à sua aplicação em matrizes alimentares. Existem diversas técnicas para a estabilização de corantes, como por exemplo a encapsulação, que consiste em revestir o corante com uma matriz protetora à escala micro/nanométrica conferindo assim proteção e maior vida útil. Com o objetivo de produzir sistemas corantes para aplicação em matrizes alimentares, neste trabalho foi selecionado o corante natural  $\beta$ -caroteno, que fornece diversos benefícios para saúde tais quais, atividade antioxidante e atividade pró-vitamínica A. Foram comparados diferentes processos de micro/nanoencapsulação, nomeadamente spray congealing, homogeneização de alta pressão (HAP) e dispersão a quente. As vantagens e desvantagens de utilização de cada uma das técnicas foi avaliada e discutida. Os produtos obtidos foram caracterizados por microscopia ótica (MOP), microscopia electrónica (SEM) e tamanho de partícula (dispersão de luz). Finalmente foi realizado o teste numa matriz alimentar amplamente consumida e apreciada pelo consumidor (maionese), a fim de avaliar a sua capacidade de solubilidade, de coloração e de estabilidade durante um tempo de armazenamento de 15 dias. Com os resultados obtido foi possível relacionar o tamanho das partículas com seu poder de coloração e estabilidade. Foi evidente a melhor solubilidade das micropartículas produzidas pelo método de dispersão a quente contendo 3% de emulsionante, assim como a sua capacidade de coloração, permitindo atingir a tonalidade pretendida. Os resultados obtidos permitiram também constatar a estabilidade da cor e dos parâmetros nutricionais avaliados na mistura, ao fim de 15 dias de armazenamento a 6°C.

**Palavras-chave:** Corantes naturais; Estabilização; Homogeneização de alta pressão; Dispersão a quente; *Spray congealing*; Aplicações alimentares.

## ABSTRACT

The trend towards the use of natural colorants as substitutes for the synthetic ones has been increasing daily due to the benefits they present to health. However, it is a major challenge for the industry to maintain stable systems based on natural colorants, in order to obtain products at good yields and free of toxicity, when it is aimed their application in food matrices. There are a number of techniques for stabilizing colorants, some referred as encapsulation processes, which consist in coating the colorant at micro/nanometric scale with a protective film thus affording protection and longer shelf-life. In order to produce colorant systems for application in food matrices, the natural colorant  $\beta$  carotene was selected, which provides several health benefits such as antioxidant activity and pro-vitamin A activity. Two different processes of micro/nanoencapsulation will be tested i) high pressure homogenization and ii) spray congealing technique. The product of these two techniques will be evaluated concerning the colorant power that will be correlated with the obtained particle size obtained. Finally, tests will be performed in food matrices. The present work intends to make the bibliographic review to support the theme and define the main methodologies to be applied. The obtained products will be characterized by optical microscopy (MOP), electron microscopy (SEM) and particle size (light scattering). Finally, the test will be carried out on a food matrix widely consumed and appreciated by the consumer (mayonnaise), in order to evaluate its solubility, staining and stability during a storage time of 15 days. With the results obtained it was possible to relate the size of the particles with their staining power and stability. The best solubility of the microparticles produced by the hot dispersion method containing 3% emulsifier, as well as its coloring ability, was evident, allowing the desired shade to be achieved. The results also showed the stability of the color and the nutritional parameters evaluated in the mixture, after 15 days of storage at 6°C

**Key-words:** Natural colorants; Stabilization; High-pressure homogenization; Spray congealing; Food applications.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE EQUAÇÕES</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS GERAIS .....	1
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 ADITIVOS ALIMENTARES .....	3
2.1.1 CORANTES .....	6
2.1.2 Corantes artificiais .....	7
2.1.3 Corantes naturais .....	8
2.2 CAROTENOIDES .....	9
2.2.1 $\beta$ -Caroteno.....	11
2.3 SISTEMAS DE PROTEÇÃO PARA ESTABILIDADE DE CORANTES.....	12
2.3.2 Desenvolvimento de micro/nanopartículas lipídicas sólidas .....	14
2.3.3 <i>Spray congealing</i> .....	14
2.3.4 Homogeneizador de alta pressão .....	15
2.3.5 Dispersão a quente.....	15
2.4 CERAS .....	16
2.4.1 Cera de Abelha .....	17
2.5 EMULSIONANTES .....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1. MATERIAIS .....	21
3.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO B-CAROTENO.....	21
3.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS LIPÍDICAS-SÓLIDAS .....	22
3.3.1 Produção das partículas por HAP .....	22
3.3.3 Produção das partículas pelo método de dispersão a quente.....	25
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PRODUZIDAS.....	26
3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	27
3.4.3 Difração a laser.....	28
3.4.4 Análise das partículas por FTIR.....	29
3.5 INCORPORAÇÃO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS NUM PRODUTO ALIMENTAR ...	30
3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COR DA MISTURA DESENVOLVIDA COM A COLORAÇÃO PRETENDIDA .....	31

3.7	DETERMINAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL DA MISTURA DESENVOLVIDA COM A COLORAÇÃO PRETENDIDA .....	35
3.7.1	Determinação do teor de proteínas .....	35
3.7.2	Determinação do teor de cinzas.....	36
3.7.3	Determinação do teor lipídico .....	37
3.7.4	Determinação de hidratos de carbono e valor energético .....	37
3.7.5	Perfil em açúcares livres .....	38
3.7.6	Perfil em ácidos gordos.....	39
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
4.1	TERMOGRAVIMETRIA DO B-CAROTENO .....	42
4.2	MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR <i>SPRAY-CONGEALING</i> . .....	43
4.3	MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR HAP .....	43
4.4	MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR DISPERSÃO A QUENTE .....	45
4.5	ANÁLISE DA DISFRAÇÃO A LASER .....	47
4.6	ANÁLISE DA MEV .....	51
4.7	ANÁLISE FTIR.....	52
4.8	COLORAÇÃO NA MATRIZ ALIMENTAR .....	55
4.9	VALOR NUTRICIONAL DA MATRIZ ALIMENTAR CONTENDO O SISTEMA CORANTE SELECIONADO .....	56
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>63</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Percentual de corantes utilizados na indústria de alimententos. ....	7
<b>Figura 2:</b> Fontes de betacaroteno.....	10
<b>Figura 3:</b> Estrutura do $\beta$ -caroteno.....	11
<b>Figura 4:</b> Conformações das micropartículas.....	12
<b>Figura 5:</b> Produção de mel e cera de abelha.....	17
<b>Figura 6:</b> Cera de abelha comercial branqueada.....	19
<b>Figura 7,</b> Esquemática das emulsões.....	19
<b>Figura 8:</b> Estrutura do Tween 80 .....	20
<b>Figura 9:</b> TG 209 Tarsus Netzsch.....	22
<b>Figura 10:</b> Dispersão sendo realizada com agitador de pás e banho de óleo termostático .....	24
<b>Figura 11:</b> Homogeneizador de Alta Pressão .....	24
<b>Figura 12:</b> Sistema da filtragem das emulsões .....	25
<b>Figura 13:</b> Solubilização do corante na cera fundida; dispersão a quente; separação por decantação .....	26
<b>Figura 14:</b> Microscópio Nikon Ni-U .....	27
<b>Figura 15:</b> MEV Phenom Pro .....	28
<b>Figura 16:</b> Malvern Mastersizer 3000 equipado com uma unidade de dispersão Hydro MV .....	29
<b>Figura 17:</b> Espectrômetro de Laboratório FITR Versátil MB3000 .....	29
<b>Figura 18:</b> Coordenadas tridimensionais obtidas por $L^*$ , $a^*$ e $b^*$ .....	31
<b>Figura 19:</b> Amostra controle (T0 dias) .....	32
<b>Figura 20:</b> Misturas obtidas através da incorporação do $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 1,25 mg de $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 0 dias. ....	32
<b>Figura 21:</b> Misturas obtidas através da incorporação do $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 5 mg de $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 0 dias.....	33
<b>Figura 22:</b> Misturas obtidas através da incorporação do $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 10 mg de $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 0 dias.....	33
<b>Figura 23:</b> Amostra controle (T15 dias) .....	33

<b>Figura 24:</b> Misturas obtidas através da incorporação do $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 1,25 mg de $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 15 dias. ....	34
<b>Figura 25:</b> Misturas obtidas através da incorporação do $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 5 mg de $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 15 dias. ....	34
<b>Figura 26:</b> Misturas obtidas através da incorporação do $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 10 mg de $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 15 dias. ....	34
<b>Figura 27:</b> Procedimento experimental para a determinação do teor em proteínas usando um sistema de macro-Kjeldahl. ....	36
<b>Figura 28:</b> Mufla.....	36
<b>Figura 29:</b> Aparelho de Soxhlet.....	37
<b>Figura 30:</b> Procedimento experimental para a determinação do perfil de açúcares livres. ....	39
<b>Figura 31:</b> Sistema de GC-FID (cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização por chama) para a determinação do perfil de ácidos gordos. ....	40
<b>Figura 32:</b> Termograma obtido por TG para o $\beta$ -caroteno. ....	42
<b>Figura 33:</b> Partículas produzidas com cera de abelha por spray-congealing. ....	43
<b>Figura 34:</b> Emulsão antes e após HAP.....	44
<b>Figura 35:</b> Estrutura das partículas após passagem no HAP (1% tween80). Ampliação de 200X.....	45
<b>Figura 36:</b> Observação em MOP das partículas obtidas por dispersão a quente.....	46
<b>Figura 37:</b> Distribuição em volume e número para as amostras 0,0% e 0,5%.....	49
<b>Figura 38:</b> Distribuição em volume e número para as amostras 1,0% e 3,0%.....	50
<b>Figura 39:</b> Morfologia das partículas lipídicas produzidas pelo método da dispersão a quente para os diferentes teores de emulsionante (0,0 0,5, 1,0 e 3,0%). ....	52
<b>Figura 40:</b> FITR tween80, $\beta$ -caroteno e cera de abelha.....	53
<b>Figura 41:</b> FTIR $\beta$ -caroteno encapsulado .....	53
<b>Figura 42:</b> FITR iteração entre os compostos. ....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Corantes Artificiais, respetivo código de identificação internacional, coloração que apresenta, respetivos valores de Ingestão Diária Admissível (IDA) e Limite Máximo..	4
<b>Tabela 2:</b> Corantes naturais, suas principais fontes e coloração	9
<b>Tabela 3:</b> Carotenoides e suas principais fontes	10
<b>Tabela 4,</b> Técnicas de Encapsulação de compostos ativos.	13
<b>Tabela 5:</b> Compostos presentes na Cera de Abelha. Fonte: Adaptado de Barros et al., 2009.	18
<b>Tabela 6:</b> Ensaio HAP.	23
<b>Tabela 7:</b> Formulações para o método de Dispersão a Quente	25
<b>Tabela 8:</b> Descrição da incorporação das partículas, anteriormente obtidas, em maionese comercial.	30
<b>Tabela 9:</b> Análise de tamanho de partícula	47
<b>Tabela 10:</b> Parâmetros de cor (CIE $L^*a^*b^*$ ) medidos na amostra de maionese controlo e da mistura obtida por adição de micropartículas corantes.	56
<b>Tabela 11:</b> Composição nutricional da amostra de maionese controlo e da mistura obtida por adição de micropartículas corantes (g/100g peso fresco)	57
<b>Tabela 12:</b> Composição do perfil de ácidos gordos da amostra de maionese controlo e da mistura obtida por adição de micropartículas corantes (% relativa)	59

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1:</b> Equação para determinação de hidratos de carbono .....	37
<b>Equação 2:</b> Equação para determinação da energia total em KCal .....	38
<b>Equação 3:</b> Equação para determinação da energia total em KJ .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>μL</b>	Microlitros
<b>μm</b>	Micrometros
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DTG</b>	Termogravimetria derivada
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>GC</b>	Cromatografica Gasosa
<b>GC-FID</b>	Cromatografia gasosa com detetor por ionização de chama
<b>HAP</b>	Homogeneizador de alta pressão
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>HPLC-RI</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetor de índice de refração
<b>IDA</b>	Índice de ingestão diária
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varrimento
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MLS</b>	Micropartículas lipídicas sólidas
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MOP</b>	Microscopia óptica
<b>MUFA</b>	Ácidos gordos monoinsaturados
<b>NLC</b>	Partículas lipídicas nanoestruturadas
<b>NLS</b>	Nanopartículas lipídicas sólidas
<b>PUFA</b>	Ácidos gordos polinsaturados

<b>SD</b>	Desvio padrão
<b>SFA</b>	Ácidos gordos saturados
<b>T0 dias</b>	Tempo zero dias - imediatamente após aplicação na matriz alimentar
<b>T15 dias</b>	Tempo 15 dias - 15 dias após a incorporação na matriz alimentar.
<b>TG</b>	Termogravimetria

# 1 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

O trabalho visa produzir micro/nanopartículas lipídicas sólidas tendo como foco o desenvolvimento de sistemas corantes para aplicação na área alimentar. Neste estudo serão utilizadas e comparadas as seguintes técnicas de preparação das partículas lipídicas, (i) homogeneizador de alta pressão (HAP) e (ii) técnica de dispersão a quente. Os produtos obtidos serão observados quanto ao tamanho e uniformidade das partículas. As nano/micropartículas da melhor técnica avaliada serão incorporadas a uma matriz alimentar (maionese), após a incorporação serão realizados testes colorimétricos para selecionar a matriz que apresentar melhor uniformidade de coloração e estabilidade nos tempos 0 e 15 dias, esta terá seu perfil nutricional quantificado.

## 1.1 Objetivos Gerais

Desenvolver sistemas de corantes baseados em processos de encapsulação recorrendo ao uso de nanopartículas lipídicas sólidas, tendo em vista a sua aplicação na área alimentar.

## 1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- (i) Selecionar um corante natural com disponibilidade comercial e efetuar a sua caracterização. No presente estudo foi selecionado o  $\beta$ -caroteno;
- (ii) Selecionar as ceras (ceras simples ou misturas de ceras) e definir os sistemas de micro/nanoencapsulação. No presente estudo foi selecionada a cera de abelha;
- (iii) Avaliar diferentes técnicas para a produção das partículas lipídicas, spray congealing, homogeneização de alta pressão (HAP) e dispersão a quente. No presente trabalho será dada ênfase à utilização de técnicas alternativas ao *spray congealing*;

(iv) Testar os produtos mais promissores em matrizes alimentares a selecionar de acordo com os objetivos do projeto Valor Natural. No presente trabalho selecionou-se a incorporação em maionese;

(v) Incorporação das distintas micropartículas obtidas anteriormente, em amostras de maionese comercial e avaliação do poder e estabilidade de coloração em dois tempos de prateleira: imediatamente após a incorporação das micropartículas e após 15 dias de armazenamento (a 6°C).

(vi) Realização de estudos de avaliação nutricional (proteínas, cinzas, gordura, hidratos de carbono, valor energético e perfil em açúcares livres e ácidos gordos) nas amostras controlo e na mistura desenvolvida, em dois tempos: imediatamente após a incorporação das micropartículas e após 15 dias de armazenamento (a 6°C).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aditivos Alimentares

De forma geral, é possível distinguir os “ingredientes” dos “aditivos” utilizados na formulação dos alimentos. Os “ingredientes” são considerados como as substâncias básicas da formulação enquanto os “aditivos” correspondem às substâncias complementares, presentes em pequenas quantidades e que se destinam à preservação da integridade do alimento ou à introdução de determinadas características específicas, como no caso dos corantes, que conferem uma coloração diferente da natural. Os “aditivos” são substâncias ou compostos, dotados ou não de valor nutricional, introduzidas na composição alimentar, com a finalidade de impedir ou reduzir gradualmente as alterações naturais típicas dos compostos orgânicos ou, ainda, conferir ou intensificar o aroma, cor e sabor do alimento, com o objetivo de modificar ou manter seu estado físico (Prado & Godoy, 2003).

O Codex Alimentarius, órgão que regulamenta normas internacionais para os alimentos, definiu no ano de 1995 a Norma Geral para os Aditivos Alimentares, que foi revista no ano de 2018. Esta norma define “Aditivos Alimentares” como (FAO, 2018) :

*“qualquer substância que não é consumida normalmente como alimento, nem é usada como ingrediente básico em alimentos, sem ou com baixo valor nutricional, e cuja adição intencional ao alimento para fins tecnológicos (incluindo organoléptico) na sua fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento, é razoavelmente previsível e resultará (direta ou indiretamente), por si só ou seus subprodutos, num componente do alimento ou num elemento que afeta suas características. Esta definição não inclui ‘contaminantes’ ou substâncias adicionadas ao alimento para manter ou melhorar as qualidades nutricionais”.*

Com base no conhecimento dos efeitos da ingestão diária de aditivos alimentares, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS), realizaram uma convenção para estipular limites máximos para a ingestão diária dos mesmos. Os aditivos foram classificados e nomeados através de um código de identificação internacional; este código é precedido da letra E e seguido por um conjunto de três dígitos, sendo o conjunto iniciado pelo número 1 referente a corantes, o iniciado pelo número 2 a conservantes, pelo número

3 a antioxidantes ou reguladores de acidez, pelo número 4 a espessantes, estabilizadores, gelificantes e emulsionantes, pelo número 5 a reguladores de pH e antiaglomerantes, pelo número 6 a intensificadores de sabor e os iniciados pelo número 9 são outros aditivos que não se encaixam nos códigos anteriores. A **Tabela 1** descreve os códigos de classificação de alguns dos corantes mais utilizados na indústria de alimentos assim como o limite máximo de ingestão diária.

**Tabela 1:** Corantes Artificiais, respetivo código de identificação internacional, coloração que apresenta, respetivos valores de Ingestão Diária Admissível (IDA) e Limite Máximo.  
(Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2009).

Nome do Corante	Código de identificação	Coloração	IDA (mg/kg de peso corpóreo)	Limite máximo (mg/100g)
Amaranto	E123	Magenta	0,5	10
Amarelo Crepúsculo	E110	Laranja	2,5	10
Azorrubina	E122	Vermelho	4	5
Azul Brilhante	E133	Azul turquesa	10	30
Azul patente V	E131	Azul	15	30
Eritrosina	E127	Rosa	0,1	5
Indigotina	E132	Azul royal	5	30
Ponceau 4R	E124	Cereja	4	10
Verde Rápido	E143	Verde mar	10	30
Vermelho 40	E129	Vermelho alaranjado	7	30
Tartrazina	E102	Amarelo limão	7,5	30

Dentre os vários tipos de aditivos, destacam-se (Honorato et al., 2013):

Acidulantes: são substâncias que aumentam a acidez ou conferem um sabor ácido aos alimentos e bebidas. Também influenciam a conservação microbológica dos alimentos. Dentre os diversos acidulantes usados no processamento de alimentos destacam-se os ácidos orgânicos tais como o ácido cítrico e ácidos inorgânicos como o ácido fosfórico (Aun et al., 2011).

Antioxidantes: são usados principalmente para retardar e/ou evitar a oxidação das gorduras, interrompendo a sua peroxidação nas fases de iniciação ou propagação. São utilizados principalmente em carnes, óleos, alimentos fritos, curas, laticínios, assados e extrusados (Baines & Seal, 2012).

Aromatizantes: fazem parte do grupo de aditivos que conferem características sensoriais ao produto. São substâncias ou compostos capazes de melhorar ou conferir aroma e sabor característico; podem ter origem natural ou sintética (Msagati, 2013).

Corantes: são agentes utilizados para alterar ou conferir cor aos alimentos, com o fim de aumentar a sua atratividade para os consumidores (Honorato et al., 2013).

Conservantes: a preservação dos alimentos pode ser conseguida através da utilização de aditivos químicos, ou através de processos físicos e biológicos, como refrigeração, secagem, congelamento, aquecimento e irradiação. Quando os alimentos não podem ser submetidos a estas técnicas, é necessário o uso de conservantes (Food Ingredients, 2011).

Edulcorantes: são substâncias utilizadas como alternativa ao açúcar tradicional. Alguns destes adoçantes, vulgarmente chamados de “edulcorantes intensos”, proporcionam um sabor doce intenso, sem incrementar a quantidade de calorias total ou parcial (alguns apresentam um baixo poder calórico). Devido à sua capacidade adoçante superior, são usualmente incorporados em pequenas quantidades. Como exemplos de edulcorantes intensos temos: acesulfame-K, aspartame, ciclamato, sacarina, taumatina e a neohesperidina (Food Ingredients, 2013).

Espessantes e Estabilizantes: a funcionalidade dos emulsionantes e/ou estabilizantes consiste no retardamento da precipitação de partículas sólidas dispersas, a diminuição das taxas de formação de gotas de óleo e espuma, a prevenção da agregação de partículas dispersas, prevenção da sinérese de sistemas gelificados contendo óleos e retardamento da coalescência de gotas de óleo (Milani & Malek, 2014).

Umectantes: São compostos hidrofílicos que quando adicionados ao alimento mantêm o nível da humidade e retardam a desidratação total (Richter & Lannes, 2007).

A maioria dos aditivos utilizados na indústria de alimentos é de origem sintética. No entanto, nas últimas décadas tem sido registado um aumento da sensibilidade dos consumidores a vários destes compostos utilizados como aditivos, o que tem resultado no aumento do interesse por produtos derivados de fontes naturais. Assim, os aditivos naturais, tem conquistado uma quota de mercado correspondente aos consumidores que possuem alguma intolerância aos sintéticos e também a outros que procuram um estilo de vida mais saudável (Carocho et al., 2014).

### 2.1.1 Corantes

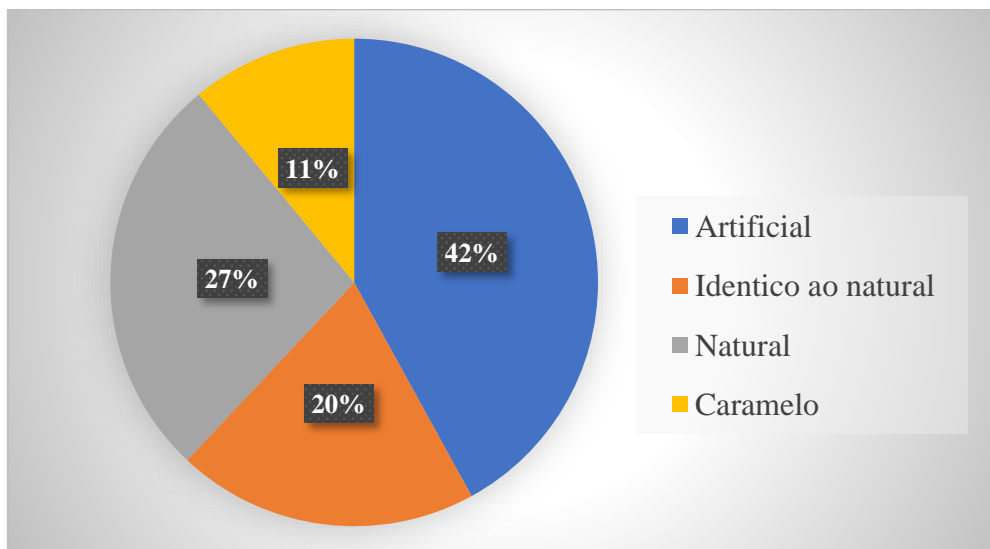
Os aditivos alimentares destinados a influenciar a cor dos alimentos denominam-se de corantes. Mais precisamente, definem-se os corantes alimentares como qualquer substância que confere, intensifica ou restaura a cor do alimento (Aditivos & Ingredientes, 2009). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – órgão brasileiro), descreve corantes como substâncias ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de um alimento ou bebida (Resolução RDC no 44 2009).

A percepção fisiológica dos seres humanos envolve os 5 sentidos através dos quais os estímulos externos são percebidos e classificados positiva ou negativamente, influenciando emocionalmente as tomadas de decisões (Lindstrom, 2005). Neste sentido, a visão representa o primeiro contato entre consumidor e o produto e, talvez por isso, o sentido que maior influência tem na sua aceitação. Foi relatado que 87% dos sentidos humanos são despertados pela visão (Aditivos & Ingredientes, 2009). Portanto, a cor pode promover comportamentos e sentimentos no consumidor. Desta forma, pode-se concluir que a cor dos alimentos influencia diretamente a decisão do consumo, ou não, do alimento observado (Amsteus et al., 2015).

Os corantes alimentares são utilizados principalmente para tornar os alimentos mais atrativos (Hutchings, 2011). De uma maneira geral, os corantes utilizados nos alimentos, são constituídos por misturas de vários ingredientes, tais como sais inorgânicos e compostos voláteis. Os corantes alimentares são classificados em três grandes grupos; corantes naturais, que se referem aos que são obtidos a partir de fontes naturais; corantes idênticos aos naturais, que embora sintetizados industrialmente, mimetizam os naturais; e corantes artificiais que são obtidos sinteticamente. O corante caramelo é naturalmente obtido pela reação de Maillard (Msagati, 2013).

Existem vários estudos que comprovam a toxicidade de alguns corantes sintéticos, sendo que em alguns casos a sua ingestão pode resultar em deformações em recém-nascidos, distúrbios cardíacos e desenvolvimento de doenças cancerosas. Com o avanço das pesquisas neste campo, muitos corantes foram sendo desenvolvidos e o seu uso tem vindo a ser monitorado pela indústria de alimentos. Atualmente o percentual dos

vários tipos de corantes utilizados é o relatado na **Figura 1** (Aditivos & Ingredientes, 2013).



**Figura 1:** Percentual de corantes utilizados na indústria de alimentos.  
(Fonte: Adaptado de Aditivos & Ingredientes, 2013).

### 2.1.2 Corantes artificiais

Os corantes artificiais, são produtos resultantes de processos químicos nos quais as moléculas capazes de conferir cores aos alimentos (grupos cromóforos), são quimicamente sintetizadas. Os mais conhecidos são a tartazina e a carmosina. Os corantes pertencentes a este grupo são maioritariamente hidrofílicos, permitindo a sua adição diretamente ao alimento, sendo esta uma das vantagens para a utilização destes produtos à escala industrial, economizando tempo e diminuindo os custos de processo (Msagati, 2013).

Estudos recentes têm vindo a mostrar que alguns corantes sintéticos estão associados a sintomas de alergias e até mesmo a mutações genéticas. Quando consumidos com frequência apresentam efeitos crónicos, principalmente no caso dos compostos azo. A clivagem das ligações azo, durante a digestão, proporciona a formação de aminas aromáticas que possuem efeitos mutagénicos e carcinogénicos conhecidos. Nos mamíferos, a redução dos corantes azo em aminas é principalmente atribuída à atividade bacteriana nas zonas anaeróbicas do trato gastrointestinal inferior. Porém outros órgãos,

em especial o fígado e os rins, também podem reduzir os corantes azoicos (Elbanna et al., 2017).

### 2.1.3 Corantes naturais

Os corantes naturais, são compostos provenientes de principalmente de fontes tais como vegetais ou animais, e alguns podem ser produzidos por fungos e bactérias. Uma das suas maiores desvantagens está relacionada com a instabilidade em diferentes condições de pH, calor ou luz. Esta limitação contrasta com a elevada estabilidade dos corantes sintéticos (Hutchings, 2011).

Os corantes de origem natural incluem diferentes pigmentos, tais como as antocianinas que possuem coloração que varia do vermelho ao azul e estão presentes em frutos maduros nomeadamente, cerejas, morangos e uvas, em vegetais como cebolas, couves e em algumas sementes. Outra família corresponde às betaninas, que proporcionam a cor vermelha característica da beterraba. Existe ainda a coloração caramelo, que é naturalmente obtida através do aquecimento catalítico de hidratos de carbono. O carmim, é um corante obtido a partir do ácido carmínico extraído dos insetos cochinha. Há também uma gama de corantes pertencentes ao grupo dos carotenoides: os  $\beta$ -carotenos por exemplo bixinas, norbixina, luteína ou extrato de anato; e os licopenos, luteínas como por exemplo xantofila e cantaxantina; entre outros. A principal fonte do corante verde é a clorofila e a clorofilina. A curcumina é outro corante natural, sendo o principal pigmento da cúrcuma e confere a cor amarela (Msagati, 2013).

Em síntese, existe uma vasta gama de corantes naturais com elevado potencial de utilização na indústria de corante e de corantes aplicados a alimentos. No entanto, a sua utilização requer muitas vezes procedimentos de estabilização que permitam manter a sua capacidade corante em diferentes condições de temperatura, pH e presença de outras substâncias. Adicionalmente, muitas vezes é necessário proceder à sua compatibilização com matrizes hidrofílicas dado o seu carácter maioritariamente hidrofóbico. Na **Tabela 2**, estão reunidos os principais corantes naturais, respetivas fontes e coloração típica que apresentam.

Alguns corantes naturais possuem propriedades benéficas para a saúde, tais como atividade antioxidante que combate os radicais livres presentes no organismo

retardando o envelhecimento e prevenindo doenças degenerativas como o cancro, arteriosclerose, artrite reumática, entre outras (Souza 2012). Outro dos benefícios está ligado à capacidade que alguns destes poderem atuar como precursores na produção de vitaminas. No caso dos carotenoides destaca-se, para além do efeito antioxidante, a função pró-vitáminica A (Naves, 1998).

**Tabela 2:** Corantes naturais, suas principais fontes e coloração.  
(Fonte: Adaptado de Msagati, 2013).

<b>Corante Natural</b>	<b>Fonte Natural</b>	<b>Coloração Típica</b>
<b>Antocianinas</b>	Berinjela, moranga, uva, açaí, maçã, repolho roxo, flores,	Vermelho, Rosa, Violeta, Roxo, Azul, Verde e Amarelo
<b>Carotenoides</b>	Cenoura, pimentão vermelho, tomate, urucum	Amarelo, Laranja e Vermelho
<b>Betalainas</b>	Beterraba, beganville	Azul, Roxo e Vermelho
<b>Curcumina</b>	Açafrão	Amarelo
<b>Carmin</b>	Cochonila – <i>Sactylapius coccus</i> Costa	Vermelho e Violeta
<b>Bixina/Norbixina</b>	Urucum	Amarelo, Laranja e Vermelho
<b>Clorofila</b>	Frutos / folhas	Verde e Amarelo
<b>Licopeno</b>	Tomate, goiaba, mamão, melancia	Vermelho
<b>Caramelo</b>	Aquecimento catalítico de hidratos de carbono	Caramelo, marrom, bege
<b>Monascus</b>	Fungos do género <i>Monascus</i>	Alaranjado a Vermelho

## 2.2 Carotenoides

Os carotenoides são compostos químicos tetraterpénicos lipossolúveis, de coloração que varia do amarelo ao vermelho. São encontrados quase exclusivamente no reino vegetal, existindo na natureza mais de 600 formas de carotenoides e destes, cerca de 60 estão presentes em alimentos (vegetais e frutas). Os carotenoides apresentam-se também como antioxidantes. Alguns dos carotenoides também atuam como precursores da vitamina A. Os seis principais são os licopenos,  $\beta$ -carotenos,  $\alpha$ -carotenos,  $\beta$ -criptoxantinas, luteínas e zeaxantinas (Lafrenière et al., 2018), e suas principais fontes estão descritas na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Carotenoides e suas principais fontes.  
(Fonte: Adaptado de Lafrenière et al., 2018).

Carotenoide	Alimentos Fontes
Luteína	Espinafre, brócolis, milho, damascos e nectarinas
Zeaxantina	Espinafre, brócolis, milho, damascos e nectarinas
$\beta$ -criptoxantina	Laranjas, mamões, nectarinas
$\alpha$ -caroteno	Legumes e frutas de coloração alaranjada, vegetais verde-escuros, como espinafre, ervilha, feijão
$\beta$ -caroteno	Legumes e frutas de coloração alaranjada, vegetais verde-escuros, como espinafre, ervilha, feijão
Licopeno	Tomates e produtos derivados

Entre os carotenoides naturais citados na **Tabela 3**, o  $\beta$ -caroteno que, além da origem natural pode ser quimicamente sintetizado, classifica-se como “idêntico ao natural”, sendo amplamente usado na indústria de alimentos. Adicionalmente, dos 50 diferentes carotenoides que podem ser metabolizados em vitamina A, o  $\beta$ -caroteno é o que possui a maior atividade pró- vitamínica A (Krinsky & Johnson, 2005). Algumas fontes de  $\beta$ -caroteno são mostradas na **Figura 2**.



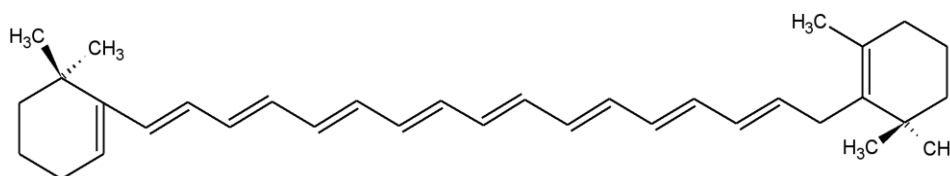
**Figura 2:** Fontes de betacaroteno.

(Fonte: Disponível em <https://www.todamateria.com.br/vitamina-a/>. Consultado em 04/01/19).

### 2.2.1 $\beta$ -Caroteno

O  $\beta$ -caroteno é um pigmento natural de coloração amarelo-alaranjada, sendo o de maior abundância dentro do grupo dos carotenoides. Encontra-se especialmente em frutos de cor amarelo-alaranjada e em vegetais folhosos de cor verde escura, nos quais a sua presença é mascarada pela clorofila que existe nos cloroplastos das estruturas das folhas. Há fortes evidências que apontam para o facto de uma dieta rica em frutas e vegetais contendo  $\beta$ -caroteno estar relacionada com a redução do risco de cancro, especialmente o de pulmão. Estudos em animais comprovaram ainda que o  $\beta$ -caroteno é capaz de inibir lesões hepáticas pré-neoplásicas e lesões neoplásicas, sobretudo em modelos de carcinogénese de pele (Naves, 1998).

O  $\beta$ -caroteno apresenta uma estrutura química contendo ligações duplas altamente conjugadas com um centro de simetria, que configura o seu carácter altamente hidrofóbico. A estrutura de poli-eno altamente conjugada é responsável pela coloração amarelo e laranja devido à absorção da luz na região visível (Kohno et al., 2016). A **Figura 3** apresenta a estrutura do  $\beta$ -caroteno. Devido à ausência de toxicidade, às suas funções biológicas benéficas e pelo facto de possuir alto poder de coloração, o  $\beta$ -caroteno tem vindo a ser amplamente utilizado como corante na indústria de alimentos.



**Figura 3:** Estrutura do  $\beta$ -caroteno.

(Fonte: Adaptado de Kohno et al., 2016).

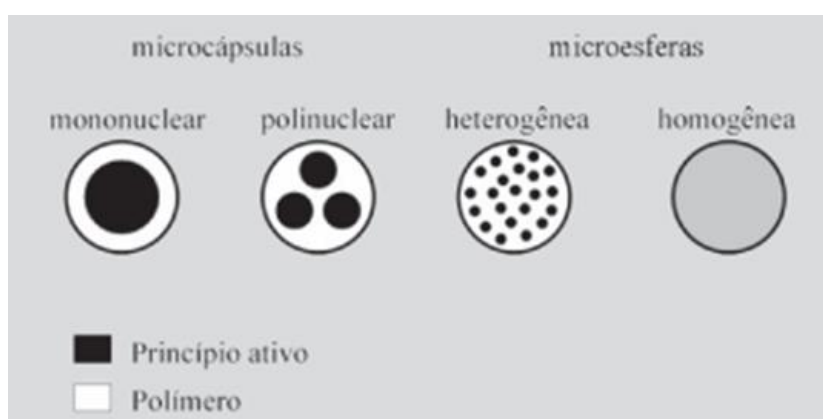
Apesar da sua natureza hidrofóbica, as suas ligações conjugadas são reativas pelo que é pouco resistente à oxidação. Na presença de outros compostos contendo ligações duplas conjugadas, o  $\beta$ -caroteno sofre degradação oxidativa quando exposto ao ar, perdendo facilmente a sua cor, especialmente se o efeito ocorrer sob efeito da luz. Devido a esta instabilidade a sua utilização requer a adoção de procedimentos de estabilização de forma a viabilizar o seu uso, nomeadamente a sua incorporação em alimentos (Kohno et al., 2016).

## 2.3 Sistemas de Proteção para Estabilidade de Corantes

Existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para a estabilização e proteção de corantes. Entre estas destaca-se a encapsulação, a qual consiste em envolver a substância de interesse, numa cápsula ou dispersa-la numa matriz (Azeredo, 2005).

No processo de encapsulação, uma camada fina de um material polimérico é sobreposta ao composto ativo (micro/nanocápsulas), ou este é disperso numa matriz do material polimérico (micro/nanoesferas) afim de protegê-lo das condições ambientais e assim aumentar seu tempo de prateleira. Dependendo do procedimento a ser utilizado, as partículas resultantes podem apresentar-se em escalas diferentes: micro ou nano. Esta diferença de dimensão pode interferir posteriormente nos resultados de aplicação em matrizes alimentares quanto ao tempo de vida útil (Santos et al., 2006).

Após o processo de microencapsulação, a estrutura das micropartículas formadas deve-se apresentar sólida, com forma esférica e dimensões entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ . O tipo de processo usado para a encapsulação pode influenciar na conformação das micropartículas que podem apresentar a estruturas representada na **Figura 4** (Silva et al., 2003).



**Figura 4:** Conformações das micropartículas.  
(Fonte: Adaptado de Silva et al., 2003).

Na **Tabela 4** estão reunidas algumas técnicas utilizadas em procedimentos de encapsulação de compostos ativos, destacando-se algumas das vantagens e desvantagens associadas ao processo em causa.

**Tabela 4,** Técnicas de Encapsulação de compostos ativos.  
(Fonte: Adaptado de Ganesan & Narayanasamy, 2017).

<b>Técnica</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Homogeneização por alta pressão (HAH)</b>	Dispersão muito eficaz, escalável, disponível comercialmente, se feito a frio não induz na degradação do composto ativo	Processo que consome muita energia, se feito a quente degrada o composto ativo.
<b>Técnica de microemulsão</b>	Baixo consumo de energia; teoricamente estável	Requer trabalho de formulação intensivo, e produz baixa concentração de nanopartículas.
<b>Método de emulsificação e evaporação de solvente</b>	Tamanho de partícula pequeno ( $\leq 24$ nm); Sistema de baixa viscosidade; Baixo consumo de energia; Adequado para compostos termolábeis.	Baixo grau de dispersão; Instabilidade de emulsão; Insolubilidade dos lípidos em solventes orgânicos; Procedimento de remoção do solvente adicional; problema de toxicidade (solvente residual)
<b>Método de Injeção de Solvente / Deslocamento por Solvente</b>	Manipulação fácil e processo de produção rápido, os lípidos dissolvem-se no solvente miscível de água por exemplo etanol, metanol, acetona sem utilizar um instrumento sofisticado (por exemplo, homogeneizador de alta pressão).	Não reportado
<b>Emulsificação por membranas</b>	Produção em larga escala; Facilidade de uso; Bom controle do tamanho; neste caso, a fase lipídica é forçada através dos poros da membrana. para formar pequenas gotículas. Sob refrigeração à temperatura ambiente, essas gotículas recristalizam formando as nanopartículas lipídicas.	Entupimento da membrana
<b>Técnica de coacervação</b>	Adequado para fármacos lipofílicos (por solubilização na solução micelar após coacervação), não utiliza solvente, não necessita de técnicas sofisticadas, simples para ampliar escala.	Não é adequado para princípios ativos sensíveis ao pH

### 2.3.2 Desenvolvimento de micro/nanopartículas lipídicas sólidas

A primeira geração de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foi desenvolvida mais ou menos em paralelo pelo Prof. Rainer H. Müller e Dr. Jörg-Stefan Luck no início dos anos 90. A segunda geração de nanopartículas lipídicas foi desenvolvida a partir de 2000, sendo estas partículas lipídica nanoestruturadas (NLC). As nanopartículas lipídicas podem ser derivadas de nanoemulsões substituindo o lipídio líquido (óleo) por um lipídio sólido (cera) (Muller, 2007).

As partículas lipídicas sólidas, podem ser preparadas através de diversas técnicas, tais como demonstrado na **Tabela 4**, e no contexto deste trabalho pretende-se aplicar duas das técnicas: i) Homogeneizador de Alta Pressão e ii) Dispersão a Quente, em alternativa à técnica de *spray-congealing*. Seguidamente, faz-se um breve descrição das técnicas.

### 2.3.3 *Spray congealing*

O "*Spray Congealing*" ou spray/pulverização por resfriamento, é uma operação unitária onde um fluxo de gás suficientemente frio entra em contato com as gotículas do líquido fundido na câmara de pulverização, removendo energia destas e proporcionando a sua solidificação. Esta transição de estado de líquido para sólido, é denominada por congelamento.

O processo pode ser dividido em 4 fases:

- I) Atomização do lípido ou mistura de lípidos fundidos contendo a substância ativa;
- II) Contato das gotículas com o gás de resfriamento;
- III) Solidificação das gotículas gerando as partículas;
- IV) Separação das partículas do gás, usualmente por precipitação.

Entre as vantagens desta técnica podemos citar a não utilização de solventes, o facto de as micropartículas produzidas serem esféricas, densas e uniformes. Adicionalmente, o processo pode ser realizado em operação contínua ou em modo batch tanto em escala laboratorial como industrial, e é um processo ambientalmente amigável.

As microesferas estão normalmente prontas para uso sem necessidade adicional de pós-processamento (por exemplo, secagem secundária, granulação, moagem, peletização) (Winters et al., 2013).

#### **2.3.4 Homogeneizador de alta pressão**

A homogeneização a alta pressão realizada a quente utiliza os seguintes passos: primeiro o composto ativo é dissolvido ou disperso no lípido fundido, sendo de seguida adicionado a uma solução contendo tensoativos e misturado. Seguidamente esta pré-emulsão é colocada no homogeneizador. Após completar os ciclos de homogeneização, a mistura é resfriada, solidificando assim o lípido e originando a NLS, (Attama et al., 2006).

A técnica de homogeneização de alta pressão realizada a frio consiste na dissolução ou dispersão do composto/substância ativa no lípido fundido, arrefecimento da mistura (por exemplo utilizando gelo seco ou nitrogênio líquido), solidificando-a. O sólido é moído até se tornar um pó que é então misturado à uma solução contendo tensoativos sendo seguidamente submetido à homogeneização (Demirel et al., 2001).

Esta técnica apresenta diversas vantagens quando comparada com demais métodos, dado que não requer a utilização de solventes orgânicos, possui tempo de produção reduzido e os homogeneizadores de alta pressão são amplamente utilizados na indústria. A técnica ainda pode ser aplicada a quente ou a frio, (Pardeike et al., 2009).

#### **2.3.5 Dispersão a quente**

A técnica de dispersão a quente, assim como as demais técnicas descritas anteriormente, baseia-se em princípios da termodinâmica, da transferência de calor e de massa que permitem através da manipulação de três fatores principais, a temperatura, o tempo e a agitação mecânica, conceder aos materiais estudados novas estruturas.

Essa técnica consiste em fundir a cera e homogeneizá-la a quente com o composto ativo e então dispersa-la em um solvente a uma temperatura superior à do seu ponto de fusão sob agitação mecânica por tempo o suficiente para formar micropartículas

de cera em suspensão. Essa solução é então resfriada rapidamente afim de que as micropartículas congelem, ou seja solidifiquem, em tamanhos muito pequenos (Milanovic et al., 2010; Swarbrick, 2016).

## 2.4 Ceras

Seguidamente descrevem-se alguns tipos de ceras de interesse para os processos descritos e selecionadas também dada a sua utilização emergente em aplicações alimentares.

A cera de farelo de arroz, possui as mais diversas aplicações na indústria, desde aplicações em fármacos, cosméticos, alimentos e até mesmo na indústria do couro e seu desempenho é similar ao da cera de carnaúba. A sua composição é uma mistura de ésteres de ácidos gordos e C22 C24 e C34. A cera bruta tem seu ponto de fusão entre 75 e 79°C enquanto a cera branqueada entre 81 e 83°C. Apesar de ser uma cera comestível, a falta de um procedimento padrão para a purificação da cera de farelo de arroz limita a sua aplicação especialmente em produtos alimentares, visto que os procedimentos de branqueamento utilizam substâncias tóxicas que podem gerar resíduos químicos não desejáveis. Outra inconveniência é o elevado ponto de fusão que requer equipamentos específicos para sua manipulação (Vali et al., 2005).

A cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é considerada um resíduo da indústria sucro-alcooleira, sendo o potencial de produção desta cera bastante elevado nos países produtores. A temperatura de fusão é elevada, oscilando entre 80,9 e 81,7°C. Os ácidos gordos das ceras de cana são principalmente os saturados de cadeia normal e longa, com uma predominância do ácido palmítico (C16:0) e octacosanóico (C28:0). Apresenta álcoois gordos saturados de 24 a 34 carbonos (Vieira, 2003). Sendo o Brasil responsável por 48% das exportações de cana-de-açúcar, é o país onde há maior disponibilidade comercial deste tipo de cera (FAO, 2017).

A cera de carnaúba, é obtida da *Copernícea Prunífera*, é um composto de massa molecular elevada, de 500 a 900 Da. O ponto de fusão da cera de carnaúba é alto, está entre 79,2 °C e 84,2 °C (Batista et al., 2010). É uma cera reconhecida como substância segura para ingestão humana (Resolução – RDC n.o 2 2007). É permitida a adição de cera

de carnaúba em embalagens destinadas a entrar em contato com alimentos ou matérias-primas para alimentos (Resolução – RDC n.o 123 2001).

A cera escolhida para a realização deste trabalho foi a de abelha, por ser comestível, ter uma faixa de fusão adequada e por já ter sido apresentada como bom agente encapsulante em trabalhos anteriores (Carvalho, 2018; Mazur, 2017; Sorita 2018). Esta vai ser descrita em maior detalhe na secção seguinte.

#### 2.4.1 Cera de Abelha

A cera de abelha é um dos produtos da apicultura. É uma cera natural e biodegradável. Esta cera é produzida pelas *Anthophilas*, comumente conhecidas como abelhas. As operárias com idade entre 12 e 18 dias possuem 8 glândulas cerígenas localizadas em seu abdômen por onde é secretada a cera. Calcula-se que para a produção de 1 Kg de cera, as abelhas precisam consumir aproximadamente 6 Kg de mel (SEBRAE, 2015).

As escamas de cera geradas pelas glândulas cerígenas são conduzidas através das patas das abelhas até à boca onde são mastigadas, esta mastigação promove a adição de proteínas que são responsáveis pela dureza do favo sendo um processo que auxilia na moldagem da cera no interior da colmeia. Para que a operária seja capaz de moldar a cera, é necessário uma temperatura de aproximadamente 35°C que é a temperatura natural do metabolismo da abelha, a humidade existente na colmeia, produzida pela respiração da colónia e da desidratação do néctar, promove uma quantidade de aproximadamente 0,2% de água na cera (Barros et al., 2009). A **Figura 5** é referente a produção de mel e cera de abelha.



**Figura 5:** Produção de mel e cera de abelha.

(Fonte: Disponível em: <http://www.boticasparque.pt/dados.php?ref=abelhas>. Consultado em 05/01/2019).

Dependendo da subespécie da *Anthophila*, da idade da cera e das condições climáticas em que foi produzida, sua composição pode variar. A composição básica da cera de abelha inclui hidrocarbonetos, ácidos gordos livres, mono/di/triésteres, hidróximonoésteres, hidróxipoliésteres, monoésteres de ácidos gordos de acordo com a **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Compostos presentes na Cera de Abelha.  
(Fonte: Adaptado de Barros et al., 2009).

<b>Composto</b>		<b>M/M</b>
Hidrocarbonetos	Alcanos	12,80%
	Alcenos	2,90%
<b>Total de hidrocarbonetos</b>		<b>14 a 16 %</b>
Ácidos Gordos Livres		12 A 15 %
Ésteres	Monoésteres	40,80%
	Hidroximono-Ésteres	9,20%
	Diesteres	7,40%
<b>Total de Ésteres</b>		<b>57 A 67 %</b>
<b>Álcoois Gordos Livres</b>		<b>1%</b>

De acordo com a variação de compostos, a cera também tem a sua coloração diversificada. Para fins comerciais, a cera de abelha passa por tratamentos de branqueamento, que pode ser feito pela exposição a luz solar ou pela lavagem com produtos químicos, tais como: peróxido de hidrogênio, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ou ainda a combinação destes. É recomendada a utilização de carvão ativado após os processos de branqueamento utilizando químicos, afim de filtrar possíveis substâncias residuais (Barros et al., 2009). A **Figura 6** é referente a uma porção de cera de abelha branqueada.

A densidade da cera varia entre 0,960 e 0,987 g/cm<sup>3</sup> e o ponto de fusão entre 60 e 65°C. Por ser um composto lípido, é insolúvel em água. Apresenta solubilidade em óleos voláteis, éter, clorofórmio e benzeno (Huertas et al., 2009).

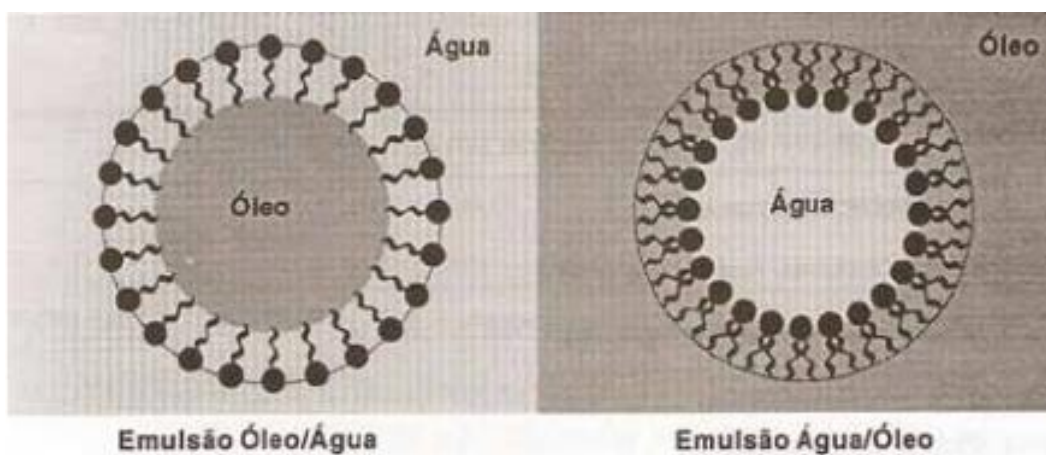
A cera de abelha por apresentar comportamento hidrofóbico, requer a utilização de um agente emulsionante para possibilitar a preparação de uma emulsão cera/água.



**Figura 6:** Cera de abelha comercial branqueada.  
(Fonte: Disponível em <https://hadalavanda.pt/produto/cera-de-abelha-branca/>. Consultado em 05/01/2019).

## 2.5 Emulsionantes

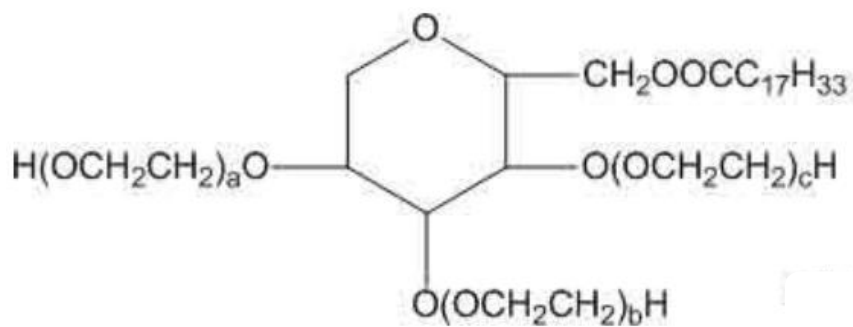
Os emulsionantes não iônicos são compostos orgânicos capazes de contribuir para a estabilidade de uma emulsão devido à sua estrutura anfifílica. Essa estrutura é caracterizada por ser constituída por duas partes, uma parte lipofílica e outra parte hidrofílica (Tharp's & Yong, 2012). A parte lipofílica do composto corresponde, geralmente, a uma cadeia alquílica longa, enquanto que a parte hidrofílica consiste num grupo dissociável ou em grupos hidroxilados comportando-se como apresentado nas **Figuras 7** (Food Ingredients, 2013).



**Figura 7,** Esquematização das emulsões.  
(Fonte: Disponível em <http://www.revista-fi.com/materias/324.pdf>. Consultado em 04/01/2019).

Existem diversos tipos de emulsionantes, tanto naturais quanto sintéticos. São catalogados de acordo com a sua hidroafinidade sendo esta classificação denominada de “Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico” (EHL) e é ordenada numericamente de 1 a 20. Quanto maior o seu valor de EHL, mais hidrofílico é o emulsionante.

O emulsificante escolhido para este trabalho foi o Tween 80, cujo o EHL é 15. É um líquido amarelo claro, viscoso e não tóxico. É facilmente solúvel em água, solúvel em etanol, óleo vegetal, acetato de etilo, metanol e insolúvel em óleo mineral. A representação da sua estrutura química é apresentada na **Figura 8** (Iro Group INC 2018).



**Figura 8:** Estrutura do Tween 80.  
(Fonte: Adaptado de Iro Group INC, 2018).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este capítulo dedica-se a descrever os materiais utilizados para a realização do trabalho, assim como as técnicas de processamento e caracterização utilizadas, bem como os locais onde foram feitas.

#### **3.1. Materiais**

O  $\beta$ -caroteno (99,0% de pureza) foi adquirido à Sigma-Aldrich. A cera de abelha (100% de pureza, Acros Organics) foi utilizada como o encapsulante lipídico, o emulsionante utilizado foi o Tween 80 (Panreac Química S.L.U).

Para analisar os efeitos em matrizes alimentares lipofílicas selecionou-se a maionese. Esta foi adquirida em um supermercado local e sua composição é 80% óleo de colza, 6% gema de ovo pasteurizada e outros compostos em menor quantidade: vinagre de álcool, açúcar, sal sementes de mostarda, ácido cítrico e EDTA de cálcio dissódico.

Para a realização das análises nutricionais na amostras de maionese controlo e na mistura desenvolvida foram usados: acetonitrilo (99,9%), n-hexano (95%), etanol absoluto (99,9%) e acetato de etilo (99,8%), todos de grau HPLC e adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). Por outro lado, a mistura padrão de referência de éster metílico de ácidos gordos (FAME) 37 (padrão 47885-U) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), bem como os isómeros dos ácidos gordos individuais e açúcares (D(-)-frutose, D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose, D(+)-rafinose pentahidrato e D(+)-melezitose). O tratamento da água foi feito através de um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

#### **3.2 Análise Termogravimétrica do $\beta$ -caroteno**

O corante  $\beta$ -caroteno foi caracterizado por análise termogravimetria (TG/DTG) para conhecer a sua estabilidade à temperatura e limitar temperaturas de trabalho.

A análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento NETZSCH modelo TG 209 F3 Tarsus (Selb, Alemanha) nas condições descritas por (Castro-Cabado et al., 2016). Para tal, uma alíquota de  $\beta$ -caroteno foi aquecida em cadinho de alumina de 30 a 600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min sob fluxo de azoto de 20L/min. Os termogramas foram obtidos em software Netzsch Proteus – Thermal Analysis, versão 5.2.1. A **Figura 9** é referente ao equipamento que foi utilizado para esta análise.



**Figura 9:** TG 209 Tarsus Netzsch.

### **3.3 Produção e Caracterização das Partículas Lipídicas-Sólidas**

Nesta etapa foram produzidas partículas lipídicas de  $\beta$ -caroteno por duas técnicas diferentes, nomeadamente homogeneização a alta pressão e dispersão a quente, como alternativa à técnica de spray congealing previamente utilizada no trabalho de Sorita (2018), que foi aqui utilizada como referência. Foram analisadas as duas técnicas, a fim de perceber as vantagens e desvantagens de cada uma delas do ponto de vista produtivo e sua influência no tamanho de partícula obtido o que terá impacto no poder corante do produto desenvolvido.

#### **3.3.1 Produção das partículas por HAP**

Inicialmente foi seguido o procedimento descrito em (Swarbrick 2016) para preparação de uma pré-emulsão para ser passada pelo HAP. A técnica consistiu em fundir

a cera num banho termostático, separadamente aquecer a água a 40°C, adicionar o emulsionante na água (Tween80), deitar a cera fundida na solução e agitar imediatamente com auxílio do ultraturrax (Modelo Unidrive X1000 Homogeneizer Drive da CAT Scientific) a 11000 rpm por 5 minutos (Azeredo, 2005; Silva et al., 2014). No entanto, ao entrar em contato com a água, a cera solidificou rapidamente, impossibilitando a homogeneização. Para que tal possa ocorrer é necessário que a temperatura do solvente, neste caso a água, seja superior à temperatura de fusão da cera (Paradkar et al., 2003). Devido ao facto de o ultraturrax disponibilizado não suportar temperaturas elevadas, a etapa do ultraturrax foi adaptada para um agitador de pás Eurostar 40 (IKA®) com capacidade até 2000 rpm. Foi adaptada uma tampa de papel em alumínio para evitar perda de massa por evaporação da solução durante a agitação a quente. Após o período de agitação esperou-se o resfriamento da solução para que a mesma fosse passada pelo HAP, filtrada e seca. Foram realizados diversos ensaios até se obter pré-emulsões aptas a serem passadas pelo HAP, todas condições utilizadas nos ensaios estão descritas no Apêndice A desta dissertação. Na **Tabela 6** pode-se observar as condições de ensaio que passaram pelo HAP.

**Tabela 6:** Ensaios HAP.

Ensaio	Tween 80 (%)	Água (mL)	Cera (g)	Corante (g)
5	6	70	10	0,12
7	7	70	10	0,12
10	5	70	10	0,12
15	1	70	10	0,12

Foram pesadas dez gramas de cera e fundidas com auxílio de um banho de óleo termostático (NAHITA modelo 602/6). Paralelamente foram medidos 70 mL de água, adicionados com Tween 80 na quantidade requerida em porcentagem em relação ao total da solução (**Tabela 6**) e aquecidos numa placa de aquecimento com agitação.

Após a cera ter sido fundida, foi adicionado o corante betacaroteno, numa proporção de 1,2% em relação à cera, tendo-se agitado até à solubilização total do corante. Seguidamente, a solução de água com o emulsionante foi introduzida num banho de óleo a 90°C e o agitador de pás introduzido para agitação. A cera fundida com o corante foi então vertida sobre essa solução e o agitador de pás acionado para 2000 rpm e,

seguidamente resfriadas em banho de gelo até se obter uma temperatura de 12°C. As amostras foram então filtradas por um sistema de filtração a vácuo, formado por um funil de Buchner, filtro de membrana de fibra de vidro, kitassato, mangueira e bomba de vácuo. As partículas retidas no filtro foram recolhidas e colocadas a secar em local protegido da luz.

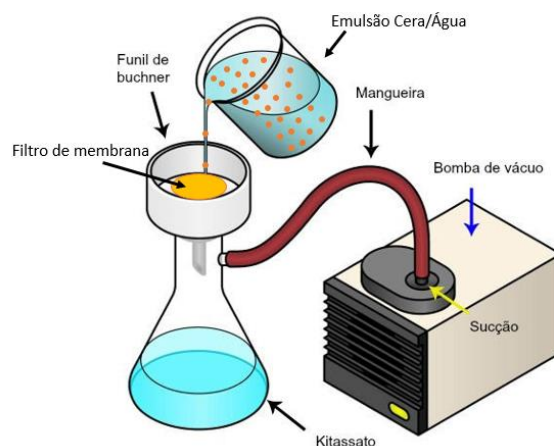
A **Figura 10** demonstra a etapa do procedimento da pré-emulsão, antes da homogeneização a alta pressão enquanto que a **Figura 11** é referente ao homogeneizador de alta pressão utilizado na preparação das amostras, a **Figura 12** representa o sistema de filtração.



**Figura 10:** Dispersão sendo realizada com agitador de pás e banho de óleo termostaticado



**Figura 11:** Homogeneizador de Alta Pressão



**Figura 12:** Sistema da filtração das emulsões  
Fonte: Autora

### 3.3.3 Produção das partículas pelo método de dispersão a quente

A metodologia de dispersão a quente foi baseada na dispersão da cera fundida com o corante em uma solução de água quente contendo diversas concentrações de emulsificante e então rapidamente resfriada afim de melhorar a estabilização (Milanovic et al. 2010). Entretanto o resfriamento final foi realizado com banho de gelo e não pela introdução de gelo na solução.

A produção das micropartículas de cera foi efetuada utilizando um agitador de pás modelo Eurostar 40 (IKA®) e um sistema de aquecimento constituído por uma placa de aquecimento e banho de óleo termostatizado (NAHITA modelo 602/6). Definiram-se quatro formulações para produção das micropartículas, conforme descrito na **Tabela 7**, onde o teor de emulsificante utilizado variou entre 0 e 3% (m/m), com base no volume total da formulação.

**Tabela 7:** Formulações para o método de Dispersão a Quente

Ensaio	Massa dos compostos (g)			
	Cera de abelha	Água	$\beta$ -caroteno	Tween 80
<b>0,00%</b>	10,00	70,00	0,12	0,00
<b>0,50%</b>	10,00	70,00	0,12	0,40
<b>1,00%</b>	10,00	70,00	0,12	0,80
<b>3,00%</b>	10,00	70,00	0,12	2,40

O procedimento adotado consistiu no aquecimento da cera a 90 °C, sendo seguida da adição e dissolução do corante sob agitação. Em simultâneo, o emulsificante Tween 80 foi dissolvido em água a 90 °C. Após esta etapa, a solução de cera e corante foi adicionada à solução aquosa sob agitação mecânica a 2000 rpm. Ao longo desta etapa foram retiradas alíquotas nos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos para análise do tamanho e morfologia das micropartículas por microscopia ótica, tendo como objetivo otimizar o tempo de agitação que permite obter o menor tamanho médio. Após decorrido o tempo de emulsificação da cera em água, a mistura foi arrefecida em banho de gelo, de forma a promover a solidificação da cera e a formação das micropartículas. Na etapa final as micropartículas foram recuperadas por decantação utilizando uma ampola. Seguidamente foram lavadas com água destilada e decantadas novamente. Após a recolha foram armazenadas num dessecador. A **Figura 13** exemplifica algumas das etapas do procedimento descrito.



**Figura 13:** Solubilização do corante na cera fundida; dispersão a quente; separação por decantação (da esquerda para direita).

### 3.4 Caracterização das Partículas Lipídicas Sólidas Produzidas

As partículas obtidas foram caracterizadas quanto à morfologia (microscopia ótica (MOP)). A partir dos resultados obtidos, as micropartículas obtidas pela técnica mais adequada ao processo (técnica de dispersão a quente), nomeadamente por conduzir a partículas com menor diâmetro e maior uniformidade, foram também observadas por

microscopia eletrônica de varrimento (MEV), quanto ao tamanho de partícula por dispersão laser e também analisadas por FTIR.

### 3.4.1 Microscopia óptica (MOP)

O equipamento disponível para a análise de MOP é um microscópio Nikon Ni-U com capacidade para ampliações de 40, 100, 200 e 400 vezes. Durante os ensaios de microencapsulação para as três técnicas diferentes, foram feitas observações em microscópio ótico em todas as etapas afim de verificar o comportamento das micropartículas de acordo com as condições a que foram submetidas. A **Figura 14** é referente ao microscópio disponibilizado para as análises.



**Figura 14:** Microscópio Nikon Ni-U

### 3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia de eletrônica de varrimento é uma ferramenta para a caracterização microestrutural de objetos sólidos. Um microscópio eletrônico de varrimento (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio ótico

convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca. Devido às suas cargas, os elétrons podem ser focalizados por campos eletrostáticos ou eletromagnéticos permitindo assim características essenciais necessárias a um microscópio de alta resolução. Os MEVs permitem, para a maioria dos materiais sólidos, conservar a profundidade de campo e a observação de superfícies rugosas. (Dedavid et al., 2007). O MEV utilizado foi um Phenom Pro (Thermo Fisher Scientific, Dillenburgstraat, The Netherlands) conforme representa a **Figura 15**.



**Figura 15:** MEV Phenom Pro (Thermo Fisher Scientific, Dillenburgstraat, The Netherlands) (Fonte: Disponível em <https://www.phenom-world.com/desktop-scanning-electron-microscopes/phenom-pro> Consultado em. 01 jul 2019).

### 3.4.3 Difração a laser

O tamanho médio das partículas das dispersões foi determinado por difração laser utilizando um equipamento Malvern Mastersizer 3000 equipado com uma unidade de dispersão Hydro MV (Malvern), utilizando água como solvente. As distribuições de tamanhos em volume e em número obtidas correspondem às distribuições médias calculadas a partir de cinco medições consecutivas para cada amostra. A **Figura 16** é referente ao equipamento descrito.



**Figura 16:** Malvern Mastersizer 3000 equipado com uma unidade de dispersão Hydro MV (Malvern) (Fonte: Disponível em [https://www.malvernpanalytical.com/br/products/product-range/mastersizer-3000/?gclid=EAIaIQobChMI4JKEysan4wIVZRbTCh0wQoREAAAYASAAEgKQG\\_D\\_BwE](https://www.malvernpanalytical.com/br/products/product-range/mastersizer-3000/?gclid=EAIaIQobChMI4JKEysan4wIVZRbTCh0wQoREAAAYASAAEgKQG_D_BwE). Consultado em 04 jul 2019).

#### 3.4.4 Análise das partículas por FTIR

A análise de FTIR foi efetuada para avaliar a presença do corante no interior das micropartículas juntamente com a influência do Tween. Para este efeito utilizou-se um equipamento da marca ABB Inc. modelo MB3000 (Quebec, Canadá) em modo de operação ATR (Refletância Total Atenuada), utilizando um acessório equipado com um cristal de diamante. As análises foram efetuadas utilizando uma resolução de  $16\text{ cm}^{-1}$ , com co-adição de 32 scans, na gama de  $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos e tratados com o software Horizon MB versão 3.4. A **Figura 17** é referente ao equipamento descrito.



**Figura 17:** Espectrômetro de Laboratório FTIR Versátil MB3000 (Fonte: Disponível em <https://new.abb.com/products/measurement-products/analytical/ft-ir-and-ft-nir-analyzers/laboratory-spectrometers/mb3000>. Consultado em 04 jul 2019).

### 3.5 Incorporação das Partículas Produzidas num Produto Alimentar (Maionese Comercial)

Após a produção das partículas pelas três técnicas descritas, foram selecionadas as micropartículas produzidas por dispersão a quente com a finalidade de proceder à incorporação numa matriz alimentar - maionese comercial.

A fim de realizar os ensaios de incorporação de forma a validar a melhor micropartícula a ser introduzida em maionese, foram divididas 16 porções de maionese (25 g), onde foram adicionadas diferentes quantidades de  $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas mencionadas anteriormente, de acordo com a seguinte tabela (**Tabela 8**).

**Tabela 8:** Descrição da incorporação das partículas, anteriormente obtidas, em maionese comercial.

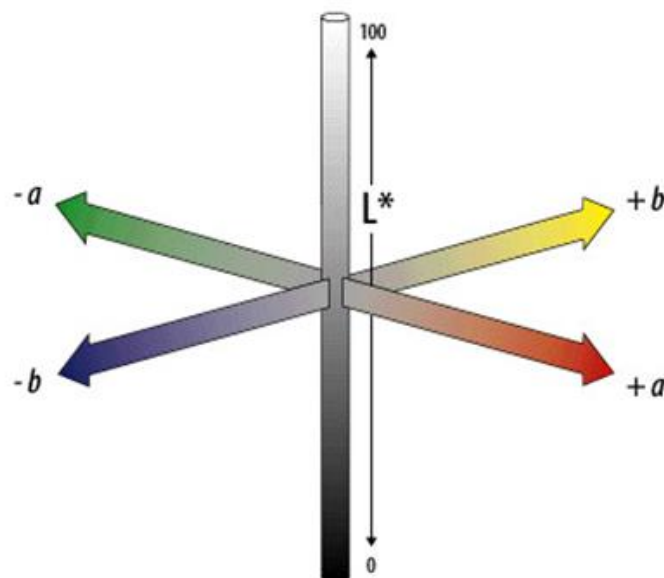
	Sistema Corante (mg)	Maionese (mg)
<b>Controlo</b>	0	25,09
<b><math>\beta</math>-Caroteno puro</b>	1,25	25,06
	5,00	25,09
	10,00	25,11
	104,80	25,11
<b>0,0%</b>	416,90	25,06
	832,90	25,08
	104,90	25,02
<b>0.50%</b>	416,80	25,14
	832,20	25,09
	104,00	25,02
<b>1,0%</b>	416,00	25,05
	832,00	25,06
	104,60	25,04
<b>3,0%</b>	416,80	25,04
	832,00	25,06

### 3.6 Avaliação dos Parâmetros de Cor da Mistura Desenvolvida com a Coloração Pretendida

A análise dos parâmetros de cor foi realizada em todas as amostras descritas na tabela 8, com o objetivo de relacionar o tamanho da partícula, com a solubilidade, parâmetros de cor obtidos e estabilidade ao longo de 15 dias.

A medição da cor das amostras foi realizada utilizando um colorímetro (modelo CR-400; Konica Minolta Sensing, Inc., Tóquio, Japão) acoplado a um adaptador para materiais granulosos (modelo CRA50), seguindo uma metodologia previamente descrita por Roriz et al. (2017).

O valor das coordenadas tridimensionais CIE  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , foram obtidas num sistema computadorizado com um iluminante tipo C e um diafragma de diâmetro 8 mm, sendo que, para o processamento dos dados, recorreu-se ao software Spectra Magic Nx (versão CM-S100W 2.03.0006, Konica Minolta, Japão). Relativamente às coordenadas tridimensionais obtidas,  $L^*$  representa a luminosidade,  $a^*$  representa a cromaticidade num eixo do verde (-) a vermelho (+), e  $b^*$  representa a cromaticidade num eixo do azul (-) ao amarelo (+), como ilustrado na **Figura 18**.

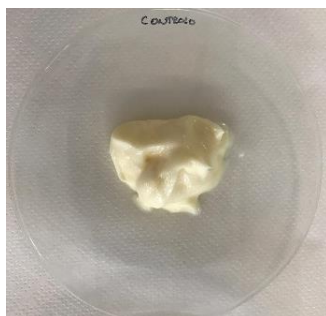


**Figura 18:** Coordenadas tridimensionais obtidas por  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$

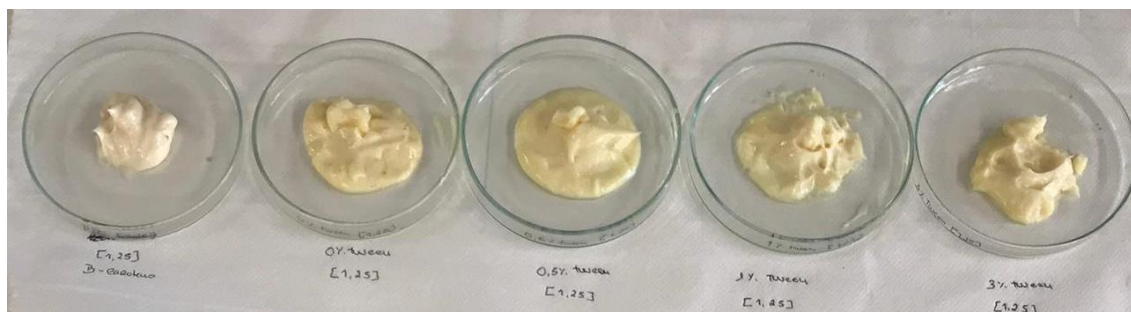
(Fonte: Disponível em <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/170416/1/Parte-4-cap-1-Colorimetria>. Consultado em 04 jul 2019).

Para a avaliação da cor, retiraram-se 3 porções equitativas de cada mistura referida na tabela 8 e foram feitas leituras em 3 pontos distintos para cada porção, considerando-se os valores médios. Previamente e após a análise, o colorímetro foi calibrado com um padrão branco (Spectra Magic NX Instruction Manual, Konica Minolta Sensing, Inc., 2009, Japão).

Após a incorporação das partículas lipídicas na maionese foi selecionada a amostra que exibiu as melhores características de cor e maior solubilidade. Posteriormente, na amostra que apresentou essas qualidades foram realizados vários ensaios de avaliação de cor e valor nutricional (teor em proteínas, cinzas, gordura, hidratos de carbono, energia e perfil em açúcares e ácidos gordos) ao longo de dois tempos de prateleira, nomeadamente logo após o processo de incorporação (T0 dias) e após 15 dias de armazenamento no frio (T15 dias), de forma a observar a influência das micropartículas ao longo do tempo. Estes resultados foram sempre comparados com uma amostra controlo (sem adição das partículas corantes). As **Figuras de 19 a 26** são referentes a essas análises.



**Figura 19:** Amostra controlo (T0 dias)



**Figura 20:** Misturas obtidas através da incorporação do  $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 1,25 mg de  $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 0 dias. (Da esquerda para a direita).



**Figura 21:** Misturas obtidas através da incorporação do  $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 5 mg de  $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 0 dias. (Da esquerda para a direita).



**Figura 22:** Misturas obtidas através da incorporação do  $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 10 mg de  $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 0 dias. (Da esquerda para a direita).



**Figura 23:** Amostra controle (T15 dias)



**Figura 24:** Misturas obtidas através da incorporação do  $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 1,25 mg de  $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 15 dias. (Da esquerda para a direita).



**Figura 25:** Misturas obtidas através da incorporação do  $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 5 mg de  $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 15 dias. (Da esquerda para a direita).



**Figura 26:** Misturas obtidas através da incorporação do  $\beta$ -caroteno puro e das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3%), com uma concentração de 10 mg de  $\beta$ -caroteno/25g de maionese, no tempo 15 dias. (Da esquerda para a direita).

Após a avaliação dos parâmetros de cor em todas as amostras acima descritas, foi selecionada para avaliação nutricional, a amostras que apresentou a coloração

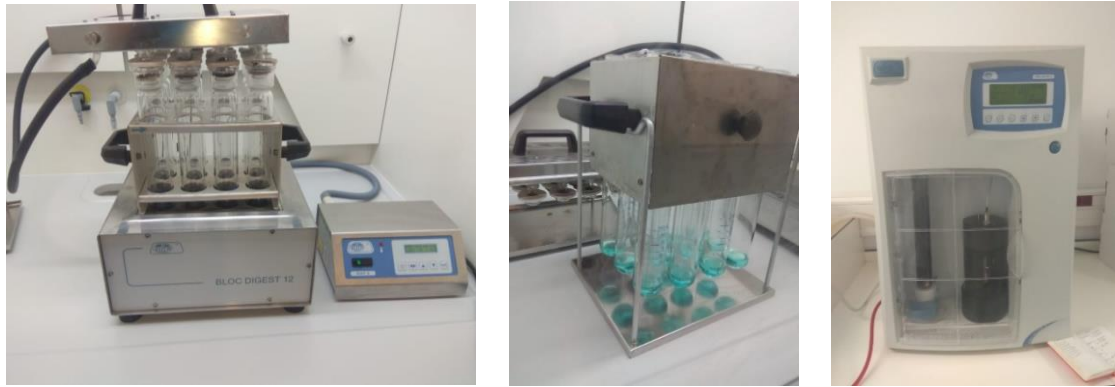
pretendida (amarelo) e melhor facilidade de solubilidade das micropartículas. A matriz alimentar que apresentou os aspectos pretendidos foi a que recebeu as micropartículas lipídicas sólidas contendo 3,0% de Tween 80, na concentração de 5mg de  $\beta$ -caroteno/25g de maionese comercial.

### **3.7 Determinação do Valor Nutricional da Mistura Desenvolvida com a Coloração Pretendida**

A avaliação nutricional foi realizada pela determinação do teor em proteínas, cinzas, gordura, hidratos de carbono e energia, utilizando as metodologias oficiais de análise (AOAC 2016). Foi também avaliado o perfil em açúcares livres e ácidos gordos através de técnicas cromatográficas, nomeadamente cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI) e cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização por chama (GC-FID), respectivamente.

#### **3.7.1 Determinação do teor de proteínas**

O teor em proteínas ( $N \times 6,68$ ) foi obtido pelo método macro-Kjeldahl, o qual se baseia na quantidade de azoto presente na amostra. Para tal, é adicionado ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) à amostra (0,5 g) ocorrendo, desta forma, a digestão da matéria orgânica e, conseqüente, formação de um sal inorgânico, o sulfato de amónio  $(NH_4)_2SO_4$ , no qual é retido o azoto. Em seguida, alcaliniza-se a solução por adição de hidróxido de sódio (NaOH), que potencia a libertação de azoto na forma de amoníaco,  $NH_3$ . O amoníaco é, em seguida, destilado e recolhido numa solução de ácido conhecido, neste caso,  $H_2SO_4$  (0,1 M). Por fim, é feita uma titulação com NaOH (0,1 M), utilizando um indicador vermelho de metilo, que permite quantificar o azoto presente na amostra. A **Figura 27** é referente ao macro-Kjedahl utilizado.



**Figura 27:** Procedimento experimental para a determinação do teor em proteínas usando um sistema de macro-Kjeldahl.

### 3.7.2 Determinação do teor de cinzas

As cinzas são resíduos inorgânicos que permanecem no alimento após o processo de incineração da matéria orgânica de uma amostra, define-se então que o valor referente as cinzas é aproximadamente a quantidade total de minerais presentes na amostra. Alguns minerais porém, podem ser volatilizados durante a metodologia, como é o caso por exemplo do  $KCO_3$  e  $NaCO_3$ , portanto não é um método 100% eficaz porém é muito próximo da quantificação real de minerais presentes na amostra (Figueiredo 2007). A **Figura 28** é referente a uma mufla.

Para a obtenção do teor em cinzas, fez-se uma incineração a  $550 \pm 15$  °C durante 12 horas.



**Figura 28:** Mufla.

(Fonte: Disponível em <http://www.dentsply.com.br/bulas/diretory/m/manual-forno-vulcan.pdf>. Consultado em 22 jun. 2019).

### 3.7.3 Determinação do teor lipídico

O teor em gordura total foi determinado através da extração de uma massa conhecida de amostra (3 g), num aparelho de Soxhlet, para a qual se utilizou como solvente de extração o éter de petróleo, a uma temperatura de aproximadamente 80°C, durante 7 horas. A **Figura 29** é referente ao Soxhlet utilizado.



**Figura 29:** Aparelho de Soxhlet

### 3.7.4 Determinação de hidratos de carbono e valor energético

Os hidratos de carbono foram calculados por diferença (**Equação 1**), enquanto que a valor energético foi determinado de acordo com a **Equação 2 e 3**, em KCal e KJ, respectivamente, apresentada abaixo.

$$\textit{Hidratos de carbono} = 100 - (\textit{gproteínas} + \textit{glipídeos} + \textit{gcinzas})$$

**Equação 1:** Equação para determinação de hidratos de carbono

$$\text{Energia (KCal)} = 4 \times (g\text{proteínas} + g\text{hidratos de carbono}) + (9 \times g\text{gordura})$$

**Equação 2:** Equação para determinação da energia total em KCal

$$\text{Energia (KJ)} = \text{energia (Kcal)} \times 4,19$$

**Equação 3:** Equação para determinação da energia total em KJ

### 3.7.5 Perfil em açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito anteriormente por Barros et al. (2013).

A amostra (1 g) foi enriquecida com melezitose (utilizada como padrão interno, 25 mg/mL) e a extração foi efetuada com 40 mL de uma solução etanólica (80/20, v/v), num banho a 80 °C (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha), durante 1 hora e 30 min, com agitação a cada 15 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante obtido foi centrifugado (centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) a 5000 rpm durante 10 minutos e transferido para um balão de vidro para evaporar a fração etanólica, recorrendo-se ao evaporador rotativo (Büchi R- 210, Flawil, Suíça) (60 °C, pressão reduzida). A fase aquosa foi lavada 3 vezes com éter dietílico (10 mL), tendo sido, seguidamente, os restos do mesmo evaporados. Ao resíduo seco obtido, foi adicionada água até perfazer um volume final de 5 mL e filtrou-se 1,5 mL do mesmo (filtros de nylon - 0,2 µm, Whatman) para um vial, para posterior análise do perfil em açúcares num sistema de HPLC-RI.

O sistema de HPLC encontra-se equipado com uma bomba (Knauer, Sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, Maryland, EUA) e um detetor de índice de refração (Knauer Smartline 2300). A separação cromatográfica foi obtida

através de uma coluna Eurospher 100-5 NH2 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Knauer), que operou a uma temperatura de 35 °C (7971 R Grace).

Como fase móvel foi usado acetonitrilo/água desionizada (70:30; v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 10  $\mu$ L. Para a identificação dos compostos, recorreu-se ao software Clarity 2,4 Software (DataApex), com o qual se compararam os tempos de retenção relativos dos picos da amostra, com padrões conhecidos. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em grama de composto por 100 g de massa fresca. A **Figura 30** é referente aos procedimentos para determinação de açúcares livres.



**Figura 30:** Procedimento experimental para a determinação do perfil de açúcares livres.

### 3.7.6 Perfil em ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Pereira et al. (2012).

Ao extrato lipídico obtido previamente por extração em Soxhlet, foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno, na proporção 2:1:1 (v/v/v) e a mistura permaneceu num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha) a 50 °C (com agitação de 160 rpm) durante aproximadamente 12 h. Após retirar os tubos do banho e, com o intuito de potenciar a separação de fases, foi adicionada água desionizada (3 mL) na mistura e, posteriormente, para recuperação dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foi adicionado éter dietílico (3 mL); ambos os passos com agitação em vórtex. Após a separação das fases, transferiu-se o sobrenadante para um vial, no qual se adicionou previamente sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante. Por último, filtrou-se o mesmo através de filtros de nylon (0,2  $\mu$ m; Whatman; Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, EUA) para um vial de 15 mL, para posterior análise num sistema de GC-FID.

O perfil de ácidos gordos foi obtido através de um sistema de GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor split/splitless, um detetor de ionização de chama (FID, 260 °C) e uma coluna Zebron-Kame (30 m x 0,25 mm ID x 0,20 µm df; Phenomenex, Lisboa, Portugal). O programa de temperatura aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 100°C, durante 2 min; aumento progressivo da temperatura: 10°C/min até 140°C; 3°C/min até 190°C; 30°C/ min até 260°C que permaneceu durante 2 min. O gás de transporte utilizado foi o hidrogénio com um caudal de 1,1 mL/min, medido a 100°C. A injeção split (1:50) foi realizada a 250°C, onde foi injetado 1 µL da amostra. A **Figura 31** é referente ao sistema GC-FID.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos de FAME das amostras com padrões conhecidos. Para o processamento dos resultados, recorreu-se ao software CSW 1,7 (DataApex 1,7, Praga, República Checa) e estes foram expressos em percentagem relativa (%) para cada ácido gordo detectado.



**Figura 31:** Sistema de GC-FID (cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama) para a determinação do perfil de ácidos gordos.

### **3.8 Análise Estatística**

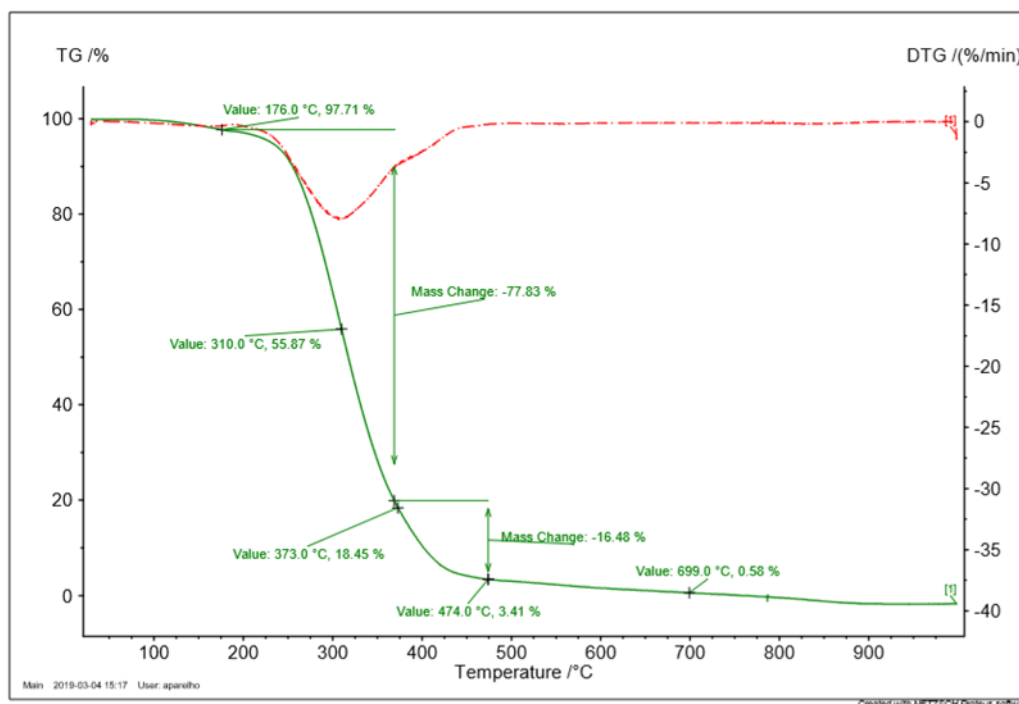
Os ensaios descritos foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos no formato  $\text{media} \pm \text{desvio padrão (SD)}$ . Os dados foram analisados através do teste ANOVA, com o intuito de determinar as diferenças significativas entre as amostras, com  $p\text{-value} = 0,05$  (SPSS v. 23.0; IBM Corp., Armonk, Nova Iorque, EUA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Termogravimetria do $\beta$ -caroteno

A **Figura 32** apresenta o termograma obtido por TG para o  $\beta$ -caroteno. Da análise do termograma verifica-se que a amostra começa a degradar à temperatura de 176,0°C. Adicionalmente, e dado que a esta temperatura a massa da amostra é de 97,71%, comprova o facto deste corante ser bastante hidrofóbico (ausência de água, a qual apresenta degradação até 100°C). Aos 310 °C mais de 50% encontra-se por degradar, indicando uma forte estabilidade à temperatura. À temperatura de 474 °C verifica-se a degradação quase total da amostra (resíduo de 3,41%). Os valores observados nesta análise são condizentes com os valores encontrados em trabalhos realizados previamente por Assunção (2016) e Peinado et al. (2016)

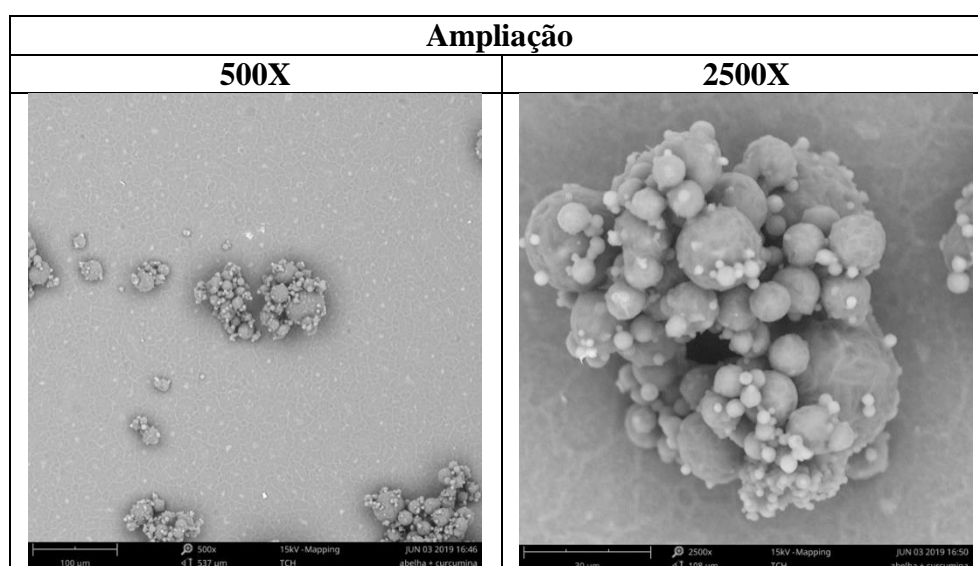
Diante dessa análise é possível afirmar que o  $\beta$ -caroteno é bastante resistente à temperatura podendo passar por processos térmicos durante a microencapsulação e/ou processamento.



**Figura 32:** Termograma obtido por TG para o  $\beta$ -caroteno.

## 4.2 Micropartículas Produzidas por *Spray-congealing*.

Neste trabalho não foram produzidas partículas por *spray-congealing* tendo-se tomado por referência o trabalho de Sorita (2018). De acordo com análises MEV feitas posteriormente à realização do trabalho citado foi possível verificar, para o sistema baseado na cera de abelha e utilizando curcumina como corante (condições que servem de modelo ao presente trabalho, já que o tamanho das partículas depende do tamanho do nozzle), que as partículas obtidas são maioritariamente de dimensão elevada (acima dos 10  $\mu\text{m}$ ). Assim, no contexto deste trabalho a obtenção de partículas de menor dimensão constitui uma vantagem. A figura 33 é referente a imagens dos micropartículas produzidas por Sorita (2018).



**Figura 33:** Partículas produzidas com cera de abelha por *spray-congealing*.  
(Fonte: Sorita, 2018)

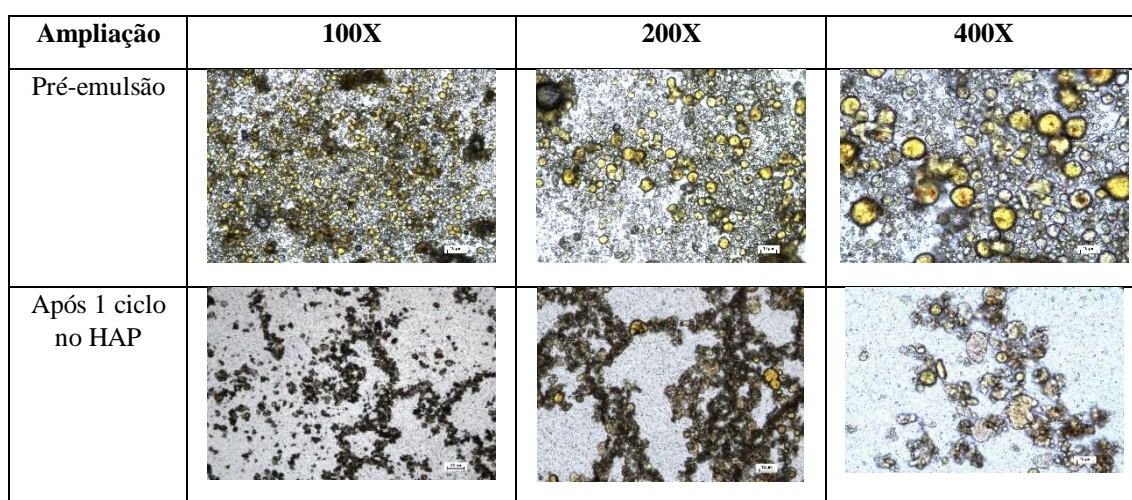
## 4.3 Micropartículas Produzidas por HAP

O apêndice B mostra os resultados dos experimentos testados para todos os ensaios realizados para execução da homogeneização a alta pressão.

Após o primeiro ensaio, algumas tentativas da utilização do ultraturrax conforme descrito na metodologia, percebeu-se a desvantagem de sua utilização e seguiu-se alternativamente ao agitador de pás, mantendo a temperatura na faixa de 90°C e resfriamento lento.

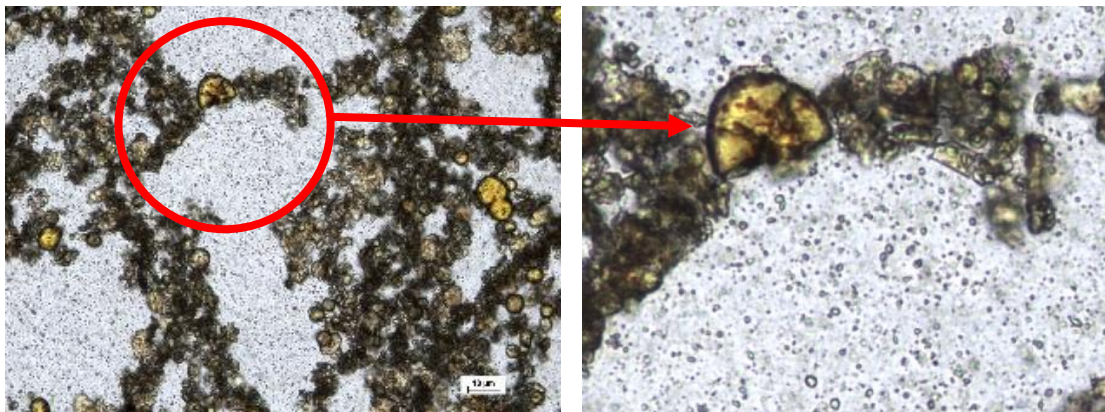
Dos ensaios 2 ao 4, percebeu-se uma formação de pasta sobrenadante durante o resfriamento lento das emulsões, então nos testes a seguir, após a homogeneização a quente, a solução foi resfriada rapidamente. O resfriamento rápido após a formação da emulsão apresentaram melhores resultados de estabilização das micropartícula em trabalhos desenvolvidos anteriormente (Gangurde et al., 2015; Silva, 2014). O resfriamento foi feito em banho de gelo e água até a temperatura de 12°C afim de estabilizar/solidificar as partículas formadas e evitar aglomeração das mesmas.

Após o resfriamento rápido as amostras que apresentaram boa estabilidade (amostras 5, 7, 10 e 15) foram destinadas ao HAP. Inicialmente a proposta seria analisar a amostra passando por 3, 6 e 9 ciclos no HAP, entretanto algumas partículas que provocaram o entupimento do sistema permitindo no máximo 1 ciclo para as amostras 5 e 15 e 3 ciclos para as amostras 7 e 10, as partículas aglomeraram devido a pressão exercida pelo equipamento causando entupimento e impedindo a realização de mais ciclos. É encontrado na literatura que algumas vezes a pressão na homogeneização a alta pressão e o número de ciclos, pode provocar um efeito reverso, invés das partículas terem seu tamanho reduzido, elas passar a ser aglomeradas umas nas outras devido a coalescência que é provocada pela alta energia cinética das partículas (Mehnert 2001; Müller et al., 2002; Wissing et al., 2004). A **Figura 34** apresenta imagens na escala de 10µm para comparar as emulsões com 1% de tween antes e após a passagem pelo HAP, pode-se observar a aglomeração das partículas e algumas estruturas quebradas ou deformadas.



**Figura 34:** Emulsão antes e após HAP

Observou-se diferença na intensidade de coloração após a passagem pelo HAP. Ao observar as estruturas no microscópio óptico confirmou-se que algumas micropartículas foram rompidas após a HAP e parte do corante foi então dispersado no solvente. Outra parte das micropartículas aglomerarem gerando a hipótese desse método não ser eficaz para lípidos sólidos. A **Figura 35** mostra algumas partículas aglomeradas e uma delas rompidas, perdendo sua função encapsulante.

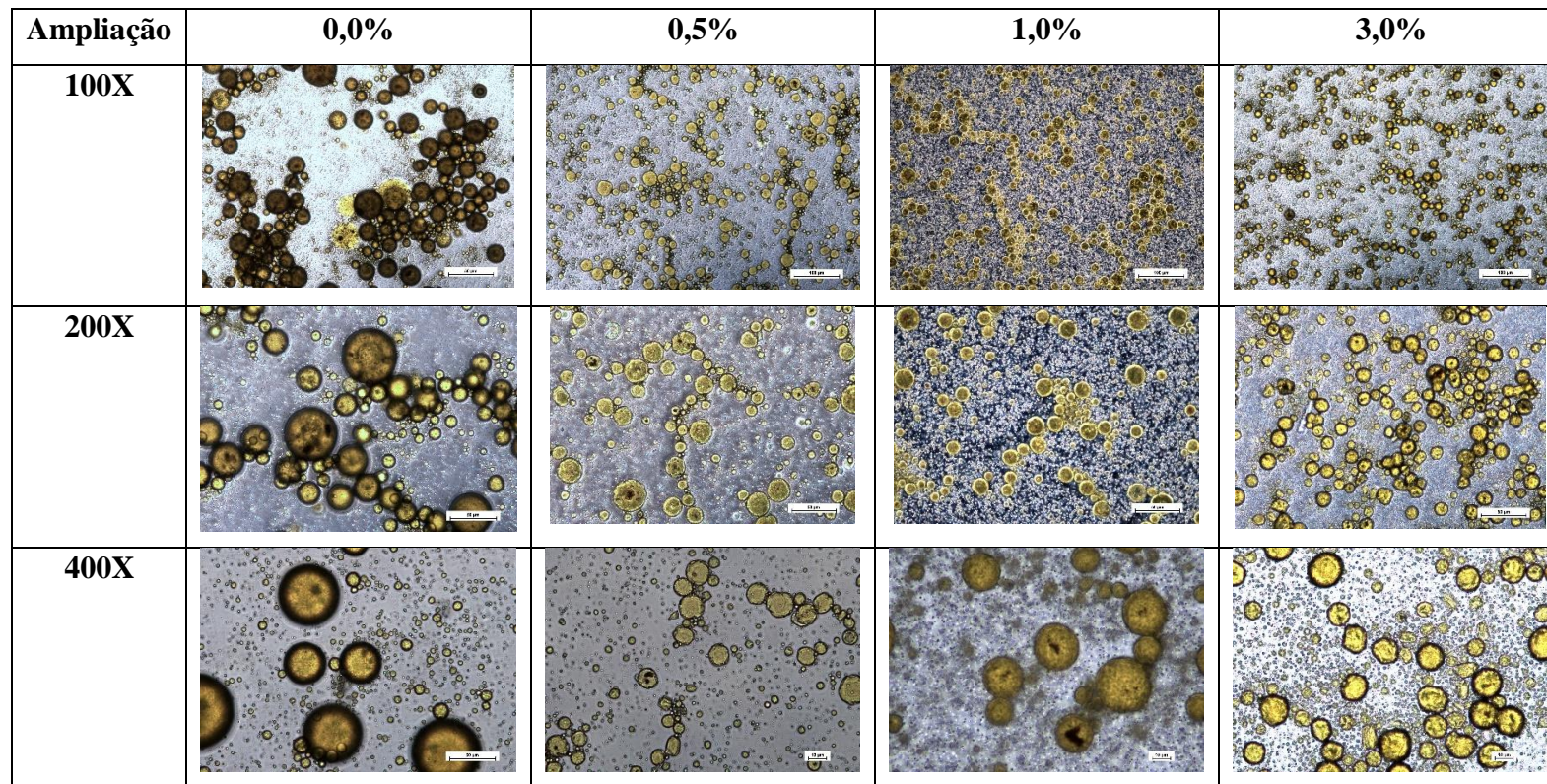


**Figura 35:** Estrutura das partículas após passagem no HAP (1% tween80). Ampliação de 200X.

#### 4.4 Micropartículas Produzidas por Dispersão a Quente

Em alternativa aos métodos citados anteriormente, prosseguiu-se com a metodologia de dispersão a quente, para a qual obtiveram-se melhores resultados em relação ao tamanho, conformação de partícula e homogeneidade das mesmas, comparativamente aos métodos baseado em HAP e Spray-congealing. A **Figura 36** compara as observações dos tamanhos de partículas para as formulações.

Para melhor análise dos resultados das amostras produzidas por essa técnica, foi realizada a análise de Dispersão a Laser afim de quantificar a média de distribuição e do volume dessas partículas, a análise em MEV para observar com maior detalhamento as estruturas formadas e o FITR para observar as interações entre os componentes.



**Figura 36:** Observação em MOP das partículas obtidas por dispersão a quente.

## 4.5 Análise da Disfração a Laser

A análise do tamanho das micropartículas permitiu obter as distribuições médias em número e em volume e os respetivos percentis D10, D50 e D90, calculados com base em cada distribuição, estando descritos na **Tabela 9**.

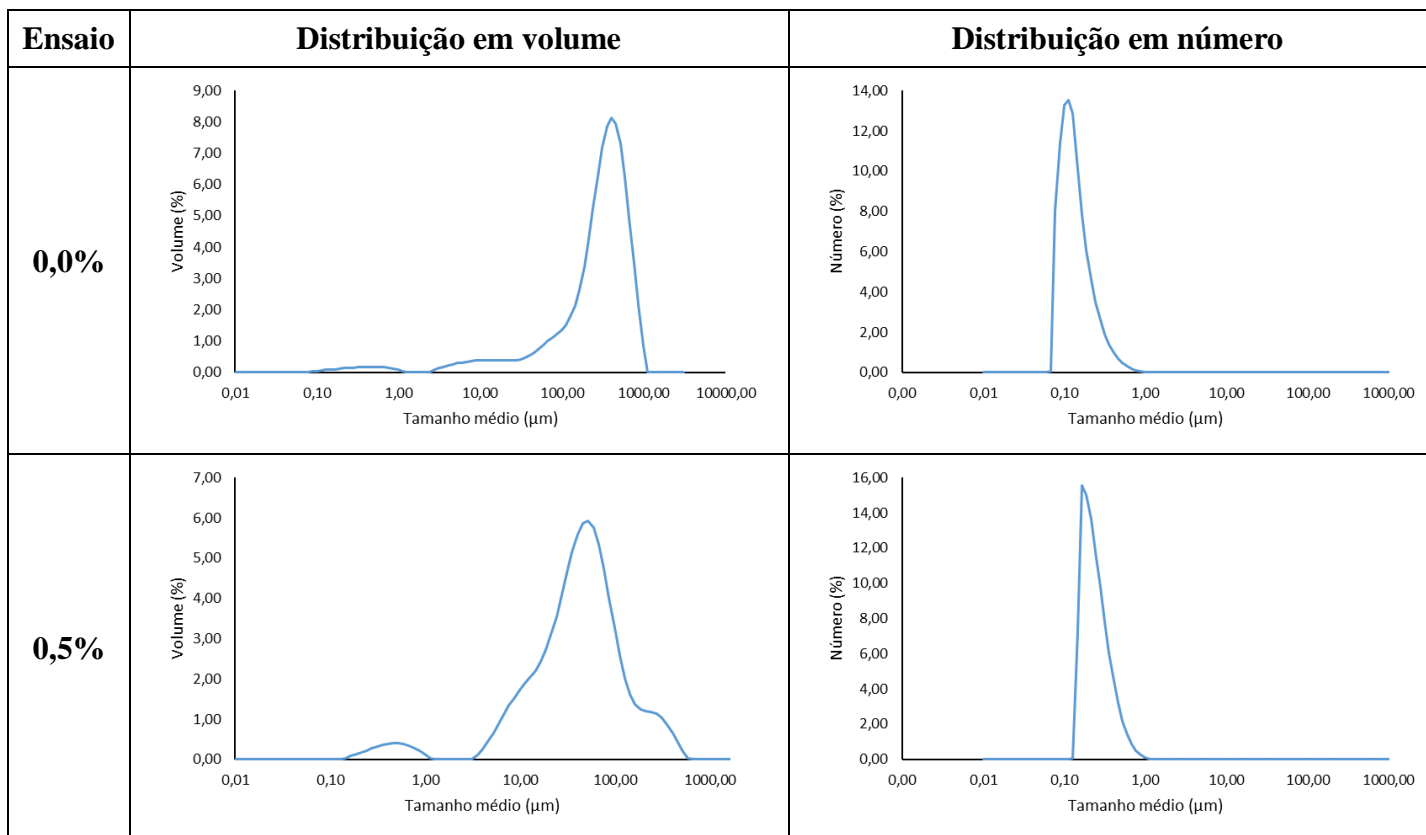
Analisando as distribuições em volume (**Tabela 9**), verifica-se que todas as amostras apresentam distribuições multimodais ou aproximadamente multimodais (presença de vários picos). O tamanho médio das partículas corresponde ao valor de D50 e indica que o maior tamanho observado foi 344  $\mu\text{m}$ , tendo sido registado para a amostra identificada como 0,0%, enquanto o menor tamanho foi de 10,80  $\mu\text{m}$ , tendo sido obtido para amostra 3,0%. Analisando estes resultados com base nos diferentes teores de emulsionante testados, observou-se uma diminuição dos tamanhos das micropartículas com o aumento da percentagem de Tween 80 de 0 para 3,0%. Este resultado é expectável dado que o aumento do teor de emulsionante facilita a formação de gotas de pequena dimensão durante a formação da fase dispersa (Kheradmandnia et al., 2010).

**Tabela 9:** Análise de tamanho de partícula

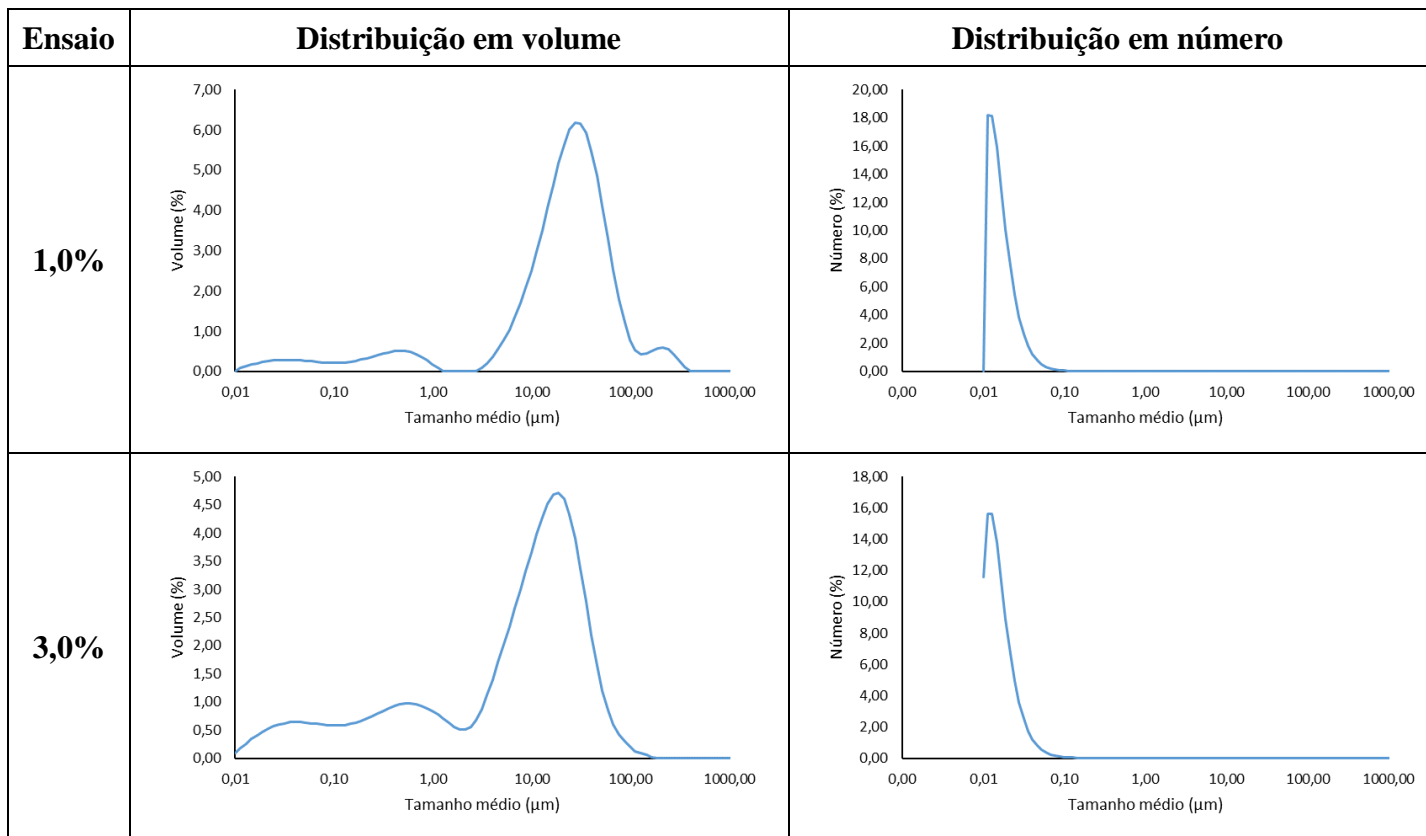
Ensaio	Distribuições	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )
0,0%	Volume	46,90 $\pm$ 2,95	344,00 $\pm$ 4,10	690,00 $\pm$ 3,09
	Número	0,11 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,05
0,5%	Volume	9,45 $\pm$ 0,35	46,00 $\pm$ 0,78	154,00 $\pm$ 2,50
	Número	0,17 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,02
1,0%	Volume	0,84 $\pm$ 0,04	25,50 $\pm$ 0,15	69,50 $\pm$ 1,25
	Número	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
3,0%	Volume	0,12 $\pm$ 0,00	10,80 $\pm$ 0,15	36,20 $\pm$ 0,80
	Número	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00

Relativamente às distribuições em número (**Tabela 9**), todas as amostras apresentam distribuições unimodais. O maior tamanho médio (valor de D50) (0,24  $\mu\text{m}$ ) foi registado para a amostra 0,5% enquanto o menor (0,02  $\mu\text{m}$ ) foi obtido para as amostras 1,0% e 3,0%. O tamanho inferior (0,14  $\mu\text{m}$ ) registado para a amostra 0,0% na distribuição

em número, evidencia a presença de uma grande quantidade de micropartículas de pequenas dimensões. Apesar disto, a conformação multimodal da distribuição em volume mostra a presença de algumas micropartículas de grande dimensão, evidenciando a heterogeneidade do tamanho desta amostra. As **Figuras 37** e **38** são referentes a distribuição em volume e número das micropartículas produzidas pelo método de dispersão a quente, contendo 0,0 0,5 1,0 e 3,0% de emulsionante.



**Figura 37:** Distribuição em volume e número para as amostras 0,0% e 0,5%



**Figura 38:** Distribuição em volume e número para as amostras 1,0% e 3,0%.

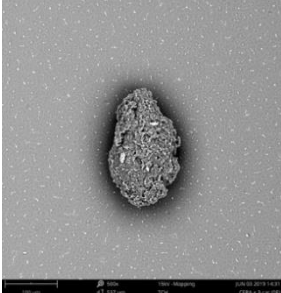
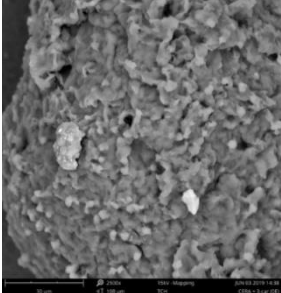
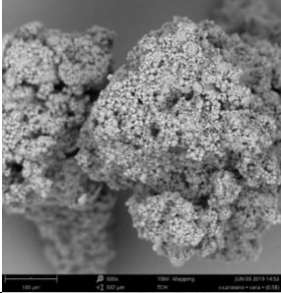
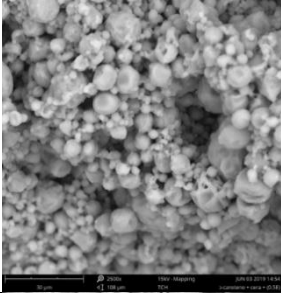
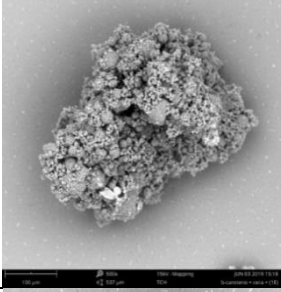
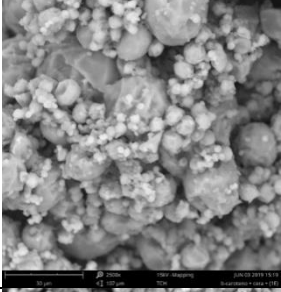
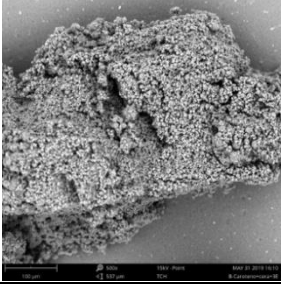
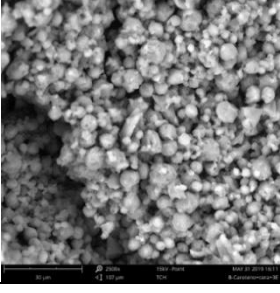
#### 4.6 Análise da MEV

A **Figura 39** mostra a análise de MEV feita às partículas produzidas para duas ampliações (500 e 2500X). As amostras analisadas corresponderam às micropartículas produzidas pela técnica de dispersão a quente, nomeadamente as partículas sem emulsionante e as produzidas com emulsionante na proporção de 0,5%, 1,0% e 3,0%.

A MEV permitiu avaliar estas amostras quanto à sua morfologia. Independentemente da formulação testada, todas as amostras apresentaram micropartículas esféricas de tamanho variado, bem como alguma aglomeração parcial. O aspecto negativo da presença de aglomeração é que esta pode afetar na determinação da distribuição de tamanhos e respetivo tamanho médio conforme citado por Savolainen et al. (2002).

No presente trabalho a utilização de emulsionante, em particular no caso do teor mais elevado, fez com que as partículas apresentassem boa dispersibilidade em água.

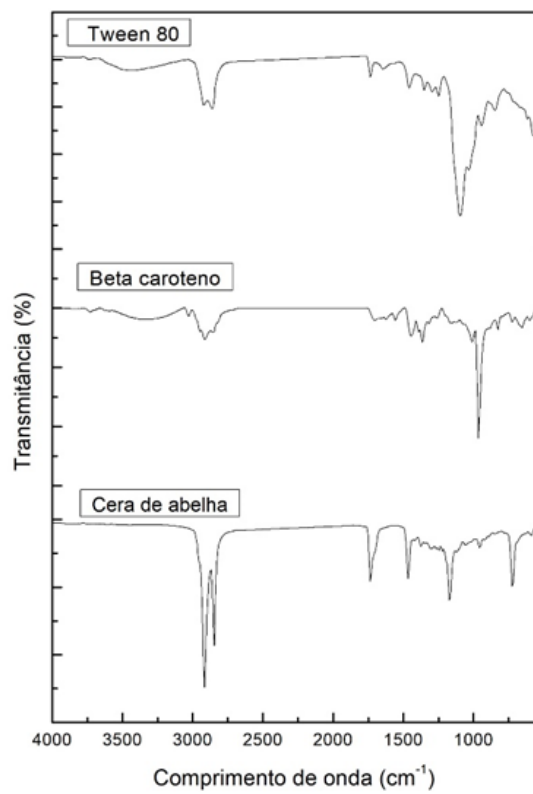
Quanto à diferença de estrutura apresentada pelas partículas analisadas e sabendo que a função do emulsionante é compatibilizar as fases polares com apolares, este consegue incorporar-se na estrutura do lipídeo podendo interferir no processo de solidificação da cera, verificando-se ainda que, quanto maior a quantidade de tensoativo, melhor a continuidade e homogeneidade das partículas (Eldem et al., 1991). Esta afirmação pode ser comprovada nas imagens da **Figura 41**, nomeadamente na amostra sem emulsionante onde se observam micropartículas de tamanho superior e com características de aglomeração mais pronunciadas, sendo difícil fazer a sua dispersão posterior. Há medida que a quantidade de emulsionante aumenta, as micropartículas parecem estar mais separadas e com formato esférico mais definido apresentando melhor dispersibilidade em água.

Amostra	Ampliação	
	500X	2500X
0,0%		
0,5%		
1,0%		
3,0%		

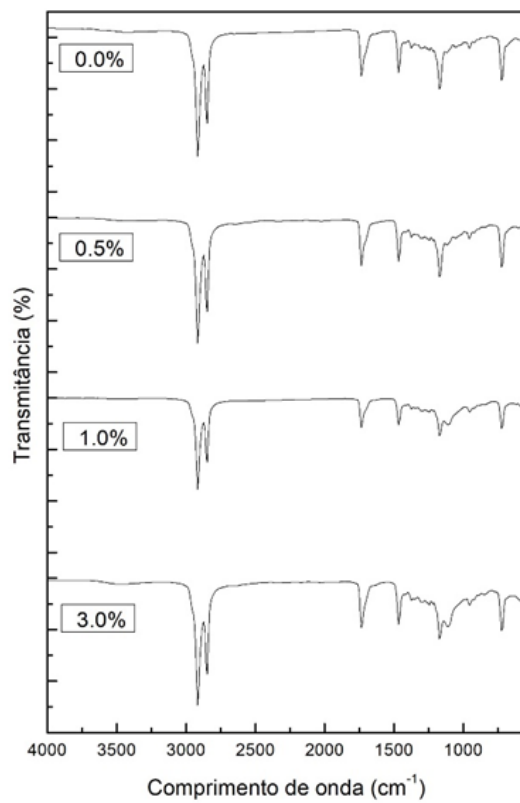
**Figura 39:** Morfologia das partículas lipídicas produzidas pelo método da dispersão a quente para os diferentes teores de emulsificante (0,0 0,5, 1,0 e 3,0%).

#### 4.7 Análise FTIR

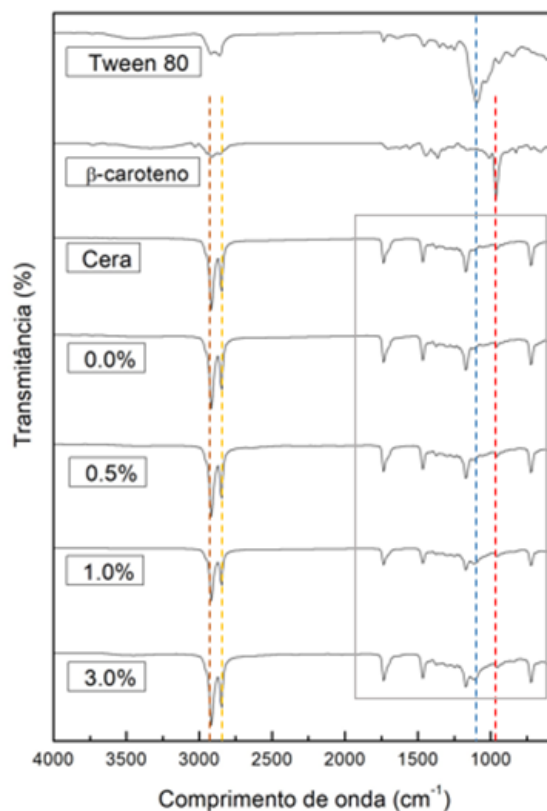
As amostras analisadas foram o Tween 80,  $\beta$ -caroteno, cera de abelha e as micropartículas produzidas sem emulsificante, e contendo 0,5%, 1,0 %e 3,0% de emulsificante, sendo referidas como 0,0 %; 0,5%; 1,0% e 3,0%. As **Figuras 40 a 42** são referentes às análises FTIR.



**Figura 40:** FTIR tween80,  $\beta$ -caroteno e cera de abelha



**Figura 41:** FTIR  $\beta$ -caroteno encapsulado



**Figura 42:** FITR iteração entre os compostos.

Analisando os espectros obtidos para os componentes puros, verifica-se que:

- Para o Tween 80 observou-se um pico a  $3433\text{ cm}^{-1}$ , sendo característica da presença de grupos hidroxilo (OH). Para além deste, foram também identificadas vibrações a  $2920$  e  $2860\text{ cm}^{-1}$  sendo associadas às vibrações das ligações  $\text{CH}_2$ , enquanto a  $1737\text{ cm}^{-1}$ , foi registada a vibração associada à ligação  $\text{C}=\text{O}$ . O pico localizado a  $1092\text{ cm}^{-1}$  está relacionado com a vibração éster ( $-\text{COOH}$ ). As mesmas características foram identificadas no trabalho de Liu et al. (2015).
- Para o  $\beta$ -caroteno, as principais vibrações identificadas em  $2914$  e  $1361\text{ cm}^{-1}$  são associadas ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação  $\text{C}-\text{H}$ , enquanto a  $965\text{ cm}^{-1}$  é identificada a vibração do grupo trans  $-\text{CH}=\text{CH}$  (Silva et al., 2017).
- No caso da cera de abelha, observaram-se dois picos característicos, onde o primeiro é identificado a  $2913\text{ cm}^{-1}$  associado ao estiramento assimétrico dos grupos  $\text{CH}$  e o segundo em  $2843\text{ cm}^{-1}$  é relacionado com o estiramento simétrico desta ligação,

sendo característica dos alcanos. A 1735 e 1463  $\text{cm}^{-1}$  são identificadas as vibrações das ligações C=O enquanto a 1170  $\text{cm}^{-1}$  é registada a vibração C-O dos grupos éster. Entre 710-730  $\text{cm}^{-1}$  destaca-se a vibração característica dos CH associadas às cadeias longas de hidrocarbonetos, corroborando a análise realizada por Svečnjak et al. (2015).

- Analisando os espectros das micropartículas (0,0; 0,5; 1,0 e 3,0%) verifica-se a presença dos picos característicos da cera de abelha entre 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ , juntamente com as vibrações das ligações C=O a 1735 e 1463  $\text{cm}^{-1}$ , e com o pico do grupo C-O do éster a 1170  $\text{cm}^{-1}$ . Para além destes, são também identificados os picos característicos do  $\beta$ -caroteno, referentes ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H (2914 e 1361  $\text{cm}^{-1}$ ) e a presença de vibração relacionada ao alceno (trans -CH = CH, 965  $\text{cm}^{-1}$ ). A presença do emulsionante é notada através das vibrações éster a 1092  $\text{cm}^{-1}$ , sendo esta apenas visível nos espectros das micropartículas 1,0 e 3,0%.

#### 4.8 Coloração na Matriz Alimentar

Considerando a importância do aspeto exterior num produto alimentar, os parâmetros de cor, nomeadamente  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (intensidade da cor vermelha) e  $b^*$  (intensidade da cor amarela), foram avaliados na amostra controlo e na maionese com micropartículas que apresentou a tonalidade visualmente pretendida, assim como, onde se evidenciou melhor solubilidade das partículas incorporadas. Não obstante, foram também realizadas medições de cor ao fim de 15 dias de armazenamento a frio (6°C), com a finalidade de avaliar a influência do tempo de armazenamento nos parâmetros de cor. Os resultados estão presentes na **Tabela 10**.

A medição realizada imediatamente após a mistura das partículas com a maionese (tempo 0 dias) revelou uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), em todos os parâmetros de cor avaliados ( $L^*, a^*, b^*$ ), comparativamente com a amostra controlo (maionese comercial). Visualmente a mistura obtida apresentou uma tonalidade amarela, apresentando para o parâmetro  $L^*$  valores de  $90,8 \pm 0,5$  e para os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  valores de  $15,1 \pm 0,2$  e  $80,7 \pm 0,6$ , respectivamente; enquanto que, a amostra controlo revelou valores de  $L^*, a^*$  e  $b^*$  de  $98,8 \pm 0,6$ ;  $-2,6 \pm 0,2$  e  $23,1 \pm 0,9$ , respetivamente.

Após 15 dias de armazenamento, continua a ser notória a diferença de cor entre a amostra controlo ( $L^* = 97,7 \pm 1,5$ ;  $a^* = -1,7 \pm 0,2$  e  $b^* = 26,1 \pm 0,8$ ) e a mistura ( $L^* = 91,0 \pm 0,7$ ;  $a^* = 15,9 \pm 0,2$  e  $b^* = 81,1 \pm 0,2$ ).

Fazendo uma comparação entre tempos de prateleira, na amostra controlo verificou-se que ao fim do tempo de armazenamento apenas o parâmetro  $L^*$  se manteve ( $97,7 \pm 1,5$ ), tendo havido um aumento estatisticamente significativo nos parâmetros  $a^*$  ( $-1,7 \pm 0,2$ ) e  $b^*$  ( $26,1 \pm 0,8$ ), o que se traduz numa leve alteração de tonalidade. No que concerne à mistura desenvolvida (mistura das partículas com a maionese), o parâmetro  $L^*$  ( $91,0 \pm 0,7$ ) não evidenciou alterações significativas, assim como o parâmetro  $b^*$  ( $81,1 \pm 0,2$ ); aumentando apenas os valores de  $a^*$  ( $15,9 \pm 0,2$ ).

Para melhor percepção das tonalidades da amostra controlo e da mistura desenvolvida, os respetivos valores CIE foram convertidos em RGB através de um programa (<<http://www.easyrgb.com/en/convert.php>>).

**Tabela 10:** Parâmetros de cor (CIE  $L^*a^*b^*$ ) medidos na amostra de maionese controlo e da mistura obtida por adição de micropartículas corantes. Os valores são apresentados em média  $\pm$  desvio padrão

	<b>Controlo T0 dias</b>	<b>Cor RGB</b>	<b>Controlo T15 dias</b>	<b>Cor RGB</b>	<b>Mistura T0 dias</b>	<b>Cor RGB</b>	<b>Mistura T15 dias</b>	<b>Cor RGB</b>
$L^*$	98,8 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>		97,7 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>		90,8 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>		91,0 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	
$a^*$	-2,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>		-1,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>		15,1 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>		15,9 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>	
$b^*$	23,1 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>		26,1 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>		80,7 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>		81,1 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas entre a coloração ( $p < 0,05$ ).

Tendo em conta a literatura disponível, não foram encontrados estudos de incorporação de ingredientes corantes à base de  $\beta$ -caroteno na maionese, conferindo, desta forma, novidade ao presente estudo.

#### 4.9 Valor Nutricional da Matriz Alimentar Contendo o Sistema Corante Selecionado

Os resultados referentes à avaliação do valor nutricional (gordura, proteínas, cinzas, hidratos de carbono, açúcares livres e energia) da amostra controlo de maionese e

da mistura desenvolvida estão presentes na **Tabela 11**. No tempo 0 dias, a amostra controle (maionese) e a mistura obtida não revelaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros analisados. O mesmo aconteceu após 15 dias de armazenamento, onde também não se verificaram alterações do valor nutricional.

Tendo em conta os resultados obtidos, foi evidente que os macronutrientes presentes em maior quantidade foram as gorduras, mostrando valores que oscilam de  $81,4 \pm 0,4$  a  $82 \pm 2$  g/100 g; seguido do teor em hidratos de carbono ( $15 \pm 1$  a  $16,8 \pm 0,5$  g/100g). O teor proteico apresentou valores consideravelmente baixos, oscilando entre  $0,95 \pm 0,07$  e  $1,4 \pm 0,1$  g/100g; assim como a concentração em cinzas ( $0,916 \pm 0,005$  a  $0,92 \pm 0,01$  g/100g). Em relação aos hidratos de carbono os valores oscilaram entre  $15 \pm 1$  e  $16,8 \pm 0,5$  g/100g, com destaque para a sacarose que apresentou uma concentração entre  $2,05 \pm 0,01$  e  $2,10 \pm 0,01$  g/100g. Em geral, o valor energético oscila entre  $803 \pm 3$  e  $808 \pm 8$  KCal/100.

**Tabela 11:** Composição nutricional da amostra de maionese controle e da mistura obtida por adição de micropartículas corantes (g/100g massa fresca). Os valores são apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

	Controlo T0 dias	Controlo T15 dias	Mistura T0 dias	Mistura T15 dias
<b>Gorduras (g/100g)</b>	81,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	81,4 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
<b>Proteínas (g/100g)</b>	0,98 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,99 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,98 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
<b>Cinzas (g/100g)</b>	0,918 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,916 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,917 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,92 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>Hidratos de carbono (g/100g)</b>	16,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	16,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	15,6 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
<b>Sacarose (g/100g)</b>	2,20 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	2,05 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	2,05 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
<b>Energia (KCal/100g)</b>	804,3 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	803 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	807 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	808 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
<b>Energia (KJ/100g)</b>	3369 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	3365 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	3382 $\pm$ 39 <sup>a</sup>	3369 $\pm$ 3 <sup>a</sup>

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas entre o parâmetro nutricional avaliado ( $p < 0,05$ ).

Vários estudos foram já realizados, a fim de determinar a composição nutricional de maionese, assim como a incorporação de ingredientes corantes, particularmente antocianinas como citado por Gorji et al. (2016). No entanto ainda não foram encontrados estudos que descrevam a incorporação de micropartículas corantes à base de  $\beta$ -caroteno, tornando o presente trabalho de investigação uma inovação.

Rashed et al. (2017) estudou a composição nutricional de várias amostras de maionese comerciais, através de métodos oficiais de análise (AOAC). Os resultados evidenciaram valores concordantes com os obtidos no presente estudo relativamente ao teor proteico ( $1,09 \pm 0,1$  g/100g). No entanto, os restantes nutrientes evidenciaram alguma discrepância. Relativamente aos hidratos de carbono e cinzas apresentam valores mais elevados ( $37,88 \pm 9,06$  g/100g e  $1,57 \pm 0,13$  g/100g, respetivamente) e em gordura concentrações mais baixas ( $30,76 \pm 9,12$  g/100g). O mesmo acontece nos açúcares livres detectados nas amostras de maionese comercial, onde foram identificadas mais três açúcares livre, tais como a frutose ( $1,40 \pm 0,2$  g/100g), a glucose ( $1,71 \pm 0,31$  g/100g) e a maltose ( $0,18 \pm 0,18$  g/100g). Contudo a molécula maioritária é a sacarose ( $5,58 \pm 1,23$  g/100g), tal como acontece no presente estudo.

Também o Instituto de Metabolismo e Nutrição (IMEN, 2011), lançou um dossier técnico-científico, onde expõe a composição nutricional de várias amostras de maionese comerciais fornecidas por 3 laboratórios reconhecido pela Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS). Os resultados revelaram uma composição nutricional rica em gordura ( $32,89 \pm 0,56$  g/100g), e com baixo teor em proteínas ( $0,73 \pm 0,12$  g/100g) e hidratos de carbono ( $6,50 \pm 0,79$  g/100g). O teor calórico apresentou valores de  $325,46 \pm 4,02$  KCal/100g.

Estas discrepâncias de resultados, comparativamente com o presente estudo podem ser explicadas devido às diferentes formulações na preparação das distintas maioneses, podendo incluir diferentes ingredientes e procedimentos de preparação.

A composição individual dos ácidos gordos (com valores superiores a 1%), bem como o conteúdo de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados da amostra controlo de maionese e da mistura desenvolvida estão presentes na **Tabela 12**.

Esta análise permitiu a identificação de dezessete ácidos gordos, tendo-se destacado como maioritários o ácido oleico (C18:1n9) e o ácido linoleico (C18:2n6) em todas as amostras estudadas. Estas foram as únicas moléculas onde se verificaram alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as distintas amostras estudadas (maionese controlo e na mistura obtida), o que pode ser explicado devido à composição lipídica das micropartículas incorporadas na amostra.

Diversos ensaios clínicos e estudos prospectivos mostraram que uma ingestão alta de ácido oleico, pode melhorar os fatores de risco cardiovascular associados ao

diabetes mellitus tipo 2 e à síndrome metabólica, ou seja, hipertensão arterial, sobrepeso e obesidade, hiperglicemia, resistência à insulina, inflamação, e alterações pró-trombóticas (Watson e Preedy 2019).

Também o ácido linoleico é um ácido gordo essencial, uma vez que, não tendo o organismo capacidade para os sintetizar, tem de ser obtido através da dieta. Para além disso, é precursor de diversas substâncias com importantes funções no organismo, nomeadamente precursor de uma importante cascata de síntese de outras moléculas importantes, como por exemplo o ácido araquidónico, que por sua vez é substrato da cicloxigenase, lipoxigenase e enzimas do citocromo P450, os quais são geradores de eicosanóides e mediadores de resolução da inflamação, com inúmeras funções fisiológicas (Anez-Bustillos et al., 2018; Tallima e Ridi, 2018).

Relativamente à composição em ácidos gordos saturados (SFA) as concentrações obtidas variaram entre  $8,00 \pm 0,01$  e  $8,05 \pm 0,01$  %, não evidenciando diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as amostras controlo e as misturas nos tempos 0 e 15 dias. O mesmo não aconteceu com os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), onde o teor obtido foi ligeiramente diferente, mas significativo ( $p < 0,05$ ) aquando da comparação da amostra controlo com a mistura obtida.

Tendo em conta o tempo de armazenamento, foi evidente que em nenhum dos casos (amostra controlo e mistura obtida) se observou alteração da composição em ácidos gordos provocados pelo tempo de armazenamento.

**Tabela 12:** Composição do perfil de ácidos gordos da amostra de maionese controlo e da mistura obtida por adição de micropartículas corantes (% relativa). Os valores são apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

	Controlo T0 dias	Controlo T15 dias	Mistura T0 dias	Mistura T15 dias
<b>C16:0</b>	4,813 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	4,81 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	4,89 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	4,860 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>
<b>C18:0</b>	1,97 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,969 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	1,96 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,95 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
<b>C18:1n9</b>	61,68 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	61,66 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	61,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	62,09 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
<b>C18:2n6</b>	20,28 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	20,35 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	19,86 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	19,86 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>C18:3n3</b>	8,27 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	8,27 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	8,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	8,30 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>C20:1</b>	1,037 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	1,039 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	1,04 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,04 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
<b>SFA</b>	8,04 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	8,025 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	8,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	8,00 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>MUFA</b>	63,27 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	63,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	63,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	63,7 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
<b>PUFA</b>	28,69 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	28,7 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	28,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	28,328 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>

C16:0 ácido palmítico; C18:0 ácido esteárico; C18:1n9 ácido oleico; C18:2n6 ácido linoleico; C18:3n3 ácido alfa- linolénico; C20:1 ácido eicosanóico; SFA: ácidos gordos saturados; MUFA: ácidos gordos monoinsaturados; PUFA: ácidos gordos polinsaturados.

Também o perfil de ácidos gordos foi anteriormente estudado por outros autores. Rashed et al. (2017) levou a cabo um estudo onde foi realizada a avaliação dos

ácidos gordos em várias amostras de maionese. Os resultados evidenciaram que o ácido gordo maioritário foi o ácido palmítico (C16:0) com valores de 10.02 g/100g, assim como uma concentração elevada de ácidos gordos saturados (SFA;  $12.49 \pm 6.85$  g/100g) e polinsaturados (PUFA;  $10.38 \pm 3.22$  g/100g).

O Instituto de Metabolismo e Nutrição (IMEN, 2011), também revelou a composição nutricional de várias amostras de maionese comerciais no que concerne à concentração em ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, evidenciando-se estes últimos como os maioritários, com um teor de 17,9 g/100g.

Tal como referido anteriormente na avaliação de outros parâmetros nutricionais, as discrepâncias nos resultados obtidos no presente estudo e em estudos anteriores deve-se a possíveis diferenças nas formulações de preparação da maionese.

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o desempenho de três técnicas de produção de partículas lipídicas tendo por base o mesmo material de parede e a proteção do corante  $\beta$ -caroteno. Foram trabalhadas duas técnicas, a homogeneização de alta pressão e a dispersão a quente como alternativa à técnica de *spray-congealling* testada por Sorita (2018). Posteriormente, a técnica que conduziu a melhores resultados foi alvo de um estudo mais aprofundado, nomeadamente quanto à caracterização das partículas lipídicas obtidas e estudos de aplicação em alimentos complementados com análises de colorimetria e composição nutricional.

A técnica de *spray-congealling* apresentou bons resultados conforme verificado no trabalho de Sorita (2018). Contudo, o tamanho das microesferas foi considerado elevado para a aplicação pretendida (desenvolvimento de novas soluções corantes). No caso da homogeneização de alta pressão (HAP), a análise microscópica das micropartículas lipídicas revelou que esta não foi eficiente para a sua produção, conforme observado no registo efetuado. As partículas rompiam ou eram deformadas conforme o número de ciclos de HAP aplicados, levando à perda do corante encapsulado para o solvente, afetando assim na capacidade de coloração do produto final. Outro defeito observado foi o da aglomeração de algumas micropartículas que perderam o aspecto de microesferas e passaram a apresentar aspecto de clusters de partículas. A técnica que conseguiu proporcionar menor tamanho de partícula foi a técnica de dispersão a quente tendo os tamanhos médios e a distribuição em número e volume bastante uniformes.

Uma vez selecionada a técnica de dispersão a quente como a melhor para a obtenção de micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha, 4 formulações contendo 0,0; 0,5; 1,0 e 3,0% de Tween 80 foram incorporados em maionese afim de verificar sua aplicabilidade numa matriz alimentar. As amostras foram então avaliadas quanto à sua coloração levando em consideração os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  nos tempos 0 e 15 dias, mostrando a boa capacidade do processo de microencapsulação, uma vez que no tempo 15 dias os parâmetros  $L^*$  (representa a luminosidade) e  $b^*$  (representa a cromaticidade num eixo do azul (-) ao amarelo (+)) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas, enquanto que o parâmetro  $a^*$  (representa a cromaticidade num eixo do verde (-) a vermelho (+)) apresentou diferença significativa indicando um aumento de intensidade na coloração vermelha. Este resultado pode confirmar a capacidade das

formulações desenvolvidas libertarem de forma gradual o composto ativo, neste caso o corante  $\beta$ -caroteno, otimizando o tempo de prateleira do produto. Verificou-se ainda que as micropartículas lipídicas sólidas que conduziram a uma melhor dispersão foram aquelas que continham maior quantidade de emulsificante (3% de Tween 80 em relação à solução total).

Para a avaliação nutricional, foi escolhida a amostra que apresentou melhor capacidade de solubilidade e a coloração pretendida (amarelo). As micropartículas lipídicas incorporadas continham 3,0% de emulsificante. A sua incorporação foi feita em uma concentração de 5 mg de corante  $\beta$ -caroteno em 25 g maionese comercial.

Tendo em conta a composição nutricional, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a amostra controlo e a mistura obtida na maioria dos parâmetros avaliados, com exceção do perfil de ácidos gordos, o qual revelou um aumento estatisticamente significativo relativamente ao teor de ácido oleico na mistura obtida pela incorporação das micropartículas corantes. Esse resultado pode ser considerado promissor, uma vez que esse ácido gordo é essencial e responsável por diversos processos bioquímicos que ocorrem no organismo, estando associado à melhoria de fatores de risco de alguns quadros clínicos.

Como sugestão para trabalhos futuros seria interessante avaliar a biodisponibilidade da vitamina A nas amostras uma vez que a presença de  $\beta$ -caroteno implica positivamente neste fator. Adicionalmente, realizar a análise sensorial da matriz alimentar.

## APÊNDICE A

Ensaio	Tween (%)	Ultraturrax	Agit. de Pás a Quente	Agit. de Pás a Frio	HAP (Ciclos)
1	3	5 min	-	-	-
2	3	-	20 min	-	-
3	5	-	20 min	-	-
4	6	-	20 min	-	-
5	6	-	20 min	Até 12°C	1
6	7	-	20 min	Até 12°C	-
7	7	-	20 min	Até 12°C	3
8	5	-	20 min	Até 12°C	-
9	5	-	20 min	Até 12°C	-
10	5	-	20 min	Até 12°C	3
11	3	-	5 min	Até 12°C	-
12	3	-	10 min	Até 12°C	-
13	3	-	15 min	Até 12°C	-
14	3	-	20 min	Até 12°C	-
15	1	-	5 min	Até 12°C	1
16	1	-	10 min	Até 12°C	-
17	1	-	15 min	Até 12°C	-
18	1	-	20 min	Até 12°C	-
19	1	-	5 min	Até 12°C	-
20	0	-	5 min	Até 12°C	-
21	1	-	5 min	Até 12°C	-
22	0	-	5 min	Até 12°C	-

## APÊNDICE B

Ensaio	Resultado observado
1	A cera congelou rapidamente, dificultando a emulsão. Houve separação de fases e as partículas sólidas ficaram muito grande. Esse experimentou descartou a utilização do ultraturrax
2	Separação de fases impedindo a passagem no HAP
3	Separação de fases impedindo a passagem no HAP
4	Separação de fases impedindo a passagem no HAP
5	Aglomerção após 1 passagem pelo HAP com consequente entupimento do equipamento, perda de coloração
6	Baixa separação de fases (apenas no dia seguinte)
7	Perda de coloração, 3 ciclos no HAP
8	Baixa separação de fases
9	Aglomerção na 1 passagem pelo HAP com consequente entupimento do equipamento, perda de coloração
10	Perda de coloração, 3 ciclos no HAP
11	Separação de fases impedindo a passagem no HAP
12	Separação de fases impedindo a passagem no HAP
13	Separação de fases impedindo a passagem no HAP
14	Separação de fases impedindo a passagem no HAP
15	Aglomerção após 1 passagem pelo HAP com consequente entupimento do equipamento, perda de coloração
16	Baixa separação de fases
17	Baixa separação de fases
18	Aglomerção das partículas com formação de filme
19	Aglomerção das partículas com formação de filme
20	Não houve aglomerção; separação de fases instantânea impedindo a passagem no HAP
21	Aglomerção das partículas
22	Não houve aglomerção; separação de fases instantânea impedindo a passagem no HAP

## 6 REFERÊNCIAS

- Aditivos & Ingredientes*. 2009. “Os Corantes Alimentícios.” 62. [http://aditivosingredientes.com.br/upload\\_arquivos/201602/201602045730000454331253.pdf](http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201602/201602045730000454331253.pdf).
- Aditivos & Ingredientes*. 2013. “Corantes Naturais”. [http://aditivosingredientes.com.br/upload\\_arquivos/201605/2016050689485001464187667.pdf](http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201605/2016050689485001464187667.pdf).
- Amsteus, M., S., Al-Shaabani, M. W., Sjöqvist S. 2015. “International Journal of Business and Social Science.” *Colors in Marketing: A Study of Color Associations and Context (in) Dependence*.
- Anez-Bustillos, L. Dao D. T., Fell, G. L., Baker, M. A., Gura, M. K., Bistran, B. R. 2018. “Redefining Essential Fatty Acids in the Era of Novel Intravenous Lipid Emulsions.” *Clinical Nutrition* 37(3): 784–89.
- AOAC International, and George W. Latimer, eds. 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20th Edition. Gaithersburg, Md: AOAC International.
- Assunção, L. S. 2016. “Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Poliméricas Ricas em Beta-caroteno Obtidas pela Técnica de Deslocamento de Solvente.” Universidade Federal Da Bahia Faculdade De Farmácia Programa De Pós-Graduação Em Ciência De Alimentos. [http://www.pgalimentos.far.ufba.br/sites/pgalimentos.far.ufba.br/files/dissertacao\\_larissa\\_assuncao.pdf](http://www.pgalimentos.far.ufba.br/sites/pgalimentos.far.ufba.br/files/dissertacao_larissa_assuncao.pdf).
- Attama, A. A., Schicke B. C., Muller-Goymann C.C. 2006. “Further Characterization of Theobroma Oil–Beeswax Admixtures as Lipid Matrices for Improved Drug Delivery Systems.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64(3): 294–306.
- Aun, M. V., Mafra, C., Philippi, J. C., Kalil, J., Agondi, R. C., Motta, A. A. 2011. “Aditivos Em Alimentos.” *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 34(5): 177–87.
- Azeredo H. M C. 2005. “Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos.” *Alimentos e Nutrição* 16(1): 89–97.

- Baines, D., Seal, R. 2012. “Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings”. 1st ed. © Woodhead Publishing.
- Barros, A. I. R. N. A., Nunes F. H. F. M., Costa, M. M. F. 2009. “Manual de Boas Práticas Na Produção de Cera de Abelha.” (FNAP – Federação Nacional dos Apicultores de Portugal). [http://fnap.pt/web/wp-content/uploads/documento\\_cnt\\_projectos\\_139.pdf](http://fnap.pt/web/wp-content/uploads/documento_cnt_projectos_139.pdf).
- Barros, L., Pereira, E., Calhella R. C., Dueñas M., Carvalho A. M., Santos-Buelga C., Ferreira I. C. F.R., 2013. “Bioactivity and Chemical Characterization in Hydrophilic and Lipophilic Compounds of *Chenopodium Ambrosioides* L.” *Journal of Functional Foods* 5(4): 1732–40.
- Batista, A. R. F., Brito E. S., Ricardo N. M. P. S., Cabral. E. C., Eberlin M. N., Pilau E. J., Gozzo F. C. 2010. “Análise Do Perfil Químico e Físico Da Cera de Carnaúba.” <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/882299/1/RE10137.pdf>
- Carocho, M., Barreiro M. F., Morales P., Ferreira I. C. F. R. 2014. “Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives: Adding Molecules to Food, Pros and Cons” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4): 377–99.
- Carvalho, A. B. 2018. “Ureia de Liberação Lenta Microencapsulada com Cera de Abelha na Dieta de Ruminantes.” Mestrado. Universidade Federal de Campina Grande. [http://www.cstr.ufcg.edu.br/ppgz/dissertacoes/dissertacao\\_2018/ariadne/ureia\\_de\\_liberacao\\_lenta\\_microencapsulada\\_com\\_cera.pdf](http://www.cstr.ufcg.edu.br/ppgz/dissertacoes/dissertacao_2018/ariadne/ureia_de_liberacao_lenta_microencapsulada_com_cera.pdf).
- Castro-Cabado, M., Parra-Ruiz F. J., Casado A.L., Román, J. S. 2016. “Thermal Crosslinking of Maltodextrin and Citric Acid. Methodology to Control the Polycondensation Reaction under Processing Conditions.” *Polymers and Polymer Composites* 24(8): 643–54.
- Cordeiro, P., Temtem, M., Winters, C. 2013. “Spray Congealing: Applications in the Pharmaceutical Industry.” *Chimica Oggi* 31(5): 69–72.

- Dedavid, B. A., Gomes C. I., Machado G. 2007. “Microscopia eletrônica de varredura. Aplicações e preparação de amostras”. *EDIPUCRS*. <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>.
- Demirel, M., Yazan, Y., Müller, R. H. 2001. “Formulation and *in vitro-in vivo* Evaluation of Piribedil Solid Lipid Micro- and Nanoparticles.” *Journal of Microencapsulation* 18(3): 359–71.
- Elbanna, K., Sarhan, O. M., & Abulreesh, H. H., Shaaban, M. R. 2017. “Microbiological, Histological, and Biochemical Evidence for the Adverse Effects of Food Azo Dyes on Rats.” *Journal of Food and Drug Analysis* 25(3): 667–80.
- Eldem, T., Speiser, P., Altorfer, H. 1991. <https://doi.org/10.1023/A:1015831801813>. “Polymeric Behavior Of Sprayed Lipid Micropellets and Its Evaluation by Differential Scanning Calorimetry and Scanning Electron Microscopy.” *Pharmaceutical Research* 8: 178–84.
- FAO. 2017. “Perspectivas Agrícolas OCDE-FAO: Brasil Vai Ultrapassar Os Estados Unidos Como o Maior Produtor de Soja Até 2026.” *Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura*. <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/992186/>.
- FAO. 2018. “Norma General Para Los Aditivos Alimentarios CODEX STAN 192-1995.”
- Figueiredo. 2007. “Determinação de cinzas e conteúdo mineral.” [http://www.pfigueiredo.org/BromII\\_5.pdf](http://www.pfigueiredo.org/BromII_5.pdf).
- Food Ingredients*. 2011. “Conservantes”. Dossiê Conservantes. 18: 28–51.
- Food Ingredients*. 2013. “Emulsificantes”. Dossiê emulsificantes 24: 50–64.
- Ganesan, P., Damodharan N. 2017. “Lipid Nanoparticles: Different Preparation Techniques, Characterization, Hurdles, and Strategies for the Production of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Oral Drug Delivery.” *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 6: 37–56.

- Gangurde, A., Ritesh F., Javeer, S. D., Patole R. K. 2015. “Microencapsulation Using Aqueous Dispersion of Lipid Matrix by Fluidized Bed Processing Technique for Stabilization of Choline Salt.” *Journal of Pharmaceutical Investigation* 45(2): 209–21.
- Gorji, S. G., Smyth, H. E., Sharma, M., Fitzgerald, M. 2016. “Lipid Oxidation in Mayonnaise and the Role of Natural Antioxidants: A Review.” *Trends in Food Science & Technology* 56: 88–102.
- Hatem, T., Ridi, R. E. 2018. “Arachidonic Acid: Physiological Roles and Potential Health Benefits – A Review.” *Journal of Advanced Research* 11: 33–41.
- Honorato, T.C., Batista, E., Nascimento, K. O., Pires, T. 2013. “Aditivos Alimentares: Aplicações e Toxicologia.” *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 8(5): 01–11.
- Huertas, A. A. G., Garay, L. G., Sá, V. G. M.. 2009. “Cera de Abelhas.” Apresentado na Semana do Fazendeiro, 80 anos de diálogo com o campo, Viçosa - MG -BR.
- Hutchings, J. B. 2011. *Food Color and Appearance*. New York; London: *Springer US*. 2 VIII.
- IMEN. 2011. “Perfil Nutricional Da Maionese Industrializada a Partir de Laudos Técnicos.” [http://www.nutricaoclinica.com.br/\\_n1/pdfs/dossie\\_tecnico\\_cientifico\\_perfil\\_nutricional\\_maionese\\_industrializada.pdf](http://www.nutricaoclinica.com.br/_n1/pdfs/dossie_tecnico_cientifico_perfil_nutricional_maionese_industrializada.pdf)
- Iro Group INC. 2018. “Tween 80.” <https://www.irochemical.com/product/Surfactants/Tween-80.htm>.
- Kheradmandnia, S., Vasheghani-farahani, E., Nosrati, M., Atyabi, F. 2010. “Preparation and Characterization of Ketoprofen-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Made from Beeswax and Carnauba Wax.” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6: 753–59.

- Kohno, Y., Kato, Y., Shibata, M., Fukuhara, C., Maeda, Y., Tomita, Y., Kobayashi, K., 2016. "Fixation and Stability Enhancement of Beta-Carotene by Organo-Modified Mesoporous Silica." *Microporous and Mesoporous Materials* 220: 1–6.
- Krinsky, N. I., Johnson, E. J. 2005. "Carotenoid Actions and Their Relation to Health and Disease." *Mol Aspects Medicin* 26:459-516.
- Lafrenière, J., Couillard, C., Lamarche, B., Lemieux, S. 2018. "Les Caroténoïdes Sériques Comme Biomarqueurs : Une Stratégie Pour Améliorer La Validité de l'évaluation Alimentaire." *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research* 79(1): 23–27.
- Lindstrom, M. 2005. "Broad Sensory Branding." *Journal of Product & Brand Management* 14(2): 84–87.
- Liu, Y., Gu, J., Zhang, J., Yu, F., Wang J., Nie, N., Li, W. 2015. "LiFePO<sub>4</sub> Nanoparticles Growth with Preferential (010) Face Modulated by Tween-80." *RSC Advances* 5(13): 9745–51.
- Mazur, K. L. 2017. "Encapsulação do Dietilditiocarbamato de Sódio em Nanopartículas Lipídicas Sólidas Via Dupla Emulsão." Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/186202/PENQ0724-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>.
- Mehnert, W., Mäder, K. 2001. "Solid Lipid Nanoparticles Production, Characterization and Applications." *Advanced Drug Delivery Reviews* 47(2–3): 165–96.
- Milani, J., Malek, G. 2014. "Food Industrial Processes: Methods and Equipment". *Croatia: Intech*.
- Milanovic, J., Manojlovic, V., Levic, S., Rajic, N., Nedovic V., Bugarski, B. 2010. "Microencapsulation of Flavors in Carnauba Wax." *Sensors* 10(1): 901–12.
- Msagati, T. A. M. 2013. "The Chemistry of Food Additives and Preservatives". Oxford; Ames, Iowa: *Wiley-Blackwell*.

- Muller, R. 2007. "Lipid Nanoparticles: Recent Advances." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(6): 375–76.
- Müller, R.H, Radtke, M., Wissing. S.A. 2002. "Nanostructured Lipid Matrices for Improved Microencapsulation of Drugs." *International Journal of Pharmaceutics* 242(1–2): 121–28.
- Naves, M. M. V. 1998. "Beta - Caroteno e Câncer." *Revista de Nutrição* 11(2): 99–115.
- Oliveira, A. P. S., Jacques, G. F. Nery, V. V. C., Abrantes, S. 2009. "Consumo de Corantes Artificiais Em Balas e Chicletes Por Crianças de Seis a Nove Anos." *Revista Analytica* 44. [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/ icict/12289/2/analytica\\_44\\_79-85.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/ icict/12289/2/analytica_44_79-85.pdf).
- Paradkar, A., Maheshwari, M., Tyagi, A. K., Chauhan, B., Kadam, S. S. 2003. "Preparation and Characterization of Flurbiprofen Beads by Melt Solidification Technique." *AAPS PharmSciTech* 4(4): 514–22.
- Pardeike, J., Hommoss, A., Müller, R. H. 2009. "Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) in Cosmetic and Pharmaceutical Dermal Products." *International Journal of Pharmaceutics* 366(1–2): 170–84.
- Peinado, I., Mason, M., Romano, A., Biasioli, F., Scampicchio, M. 2016. "Stability of  $\beta$ -Carotene in Polyethylene Oxide Electrospun Nanofibers." *Applied Surface Science* 370: 111–16.
- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I. C. F. R. 2012. "Towards Chemical and Nutritional Inventory of Portuguese Wild Edible Mushrooms in Different Habitats." *Food Chemistry* 130(2): 394–403.
- Prado, M. A., Godoy H. T. 2003. "Corantes Artificiais Em Alimentos." *Alimentos e Nutrição* 14(2): 237–50.
- Rashed, A., Khalid N. M., Noh, M. F. M., Rahman N. I., 2017. "The Nutritional Composition of Mayonnaise and Salad Dressing in the Malaysian Market." *Sains Malaysiana* 46(1): 139–47.

- Resolução – RDC n.o 123. 2001. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao+Alimentos/Embalagens>.
- Resolução – RDC n.o 2. 2007. [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_02\\_2007\\_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b).
- Resolução RDC no 44. 2009. <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/rdc-44-2009>.
- Richter, M., Lannes, S. C. S. 2007. “Ingredientes Usados Na Indústria de Chocolates.” *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 43(3). [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151693322007000300005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151693322007000300005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt) (October 22, 2018).
- Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Morales, P., Ferreira I. C. F. R. 2017. “Floral Parts of *Gomphrena Globosa* L. as a Novel Alternative Source of Betacyanins: Optimization of the Extraction Using Response Surface Methodology.” *Food Chemistry* 229: 223–34.
- 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(2): 351–54.
- Savolainen, M., Khoo, C., Glad, H., Dahlqvist, C., Juppo, A. M. 2002. “Evaluation of Controlled-Release Polar Lipid Microparticles.” *International Journal of Pharmaceutics* 244(1–2): 151–61.
- SEBRAE. 2015. “Apicultura.” Boletim de Tendências. [https://hbjunior19.files.wordpress.com/2013/07/bt\\_apic\\_2015\\_07\\_ceradeabelha.pdf](https://hbjunior19.files.wordpress.com/2013/07/bt_apic_2015_07_ceradeabelha.pdf).
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., Veiga, F., 2003. “Administração Oral de Peptídeos e Proteínas: II. Aplicação de Métodos de Microencapsulação.” *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 39(1): 1–20.

- Silva, G. K. P. 2014. “Micropartículas sólidas lipídicas: estudo de variáveis Operacionais e encapsulação de vitamina D3”. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão. [http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5770/1/CM\\_COEAL\\_2014\\_1\\_04.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5770/1/CM_COEAL_2014_1_04.pdf)
- Silva, H., Quintella, C., Meira, M. 2017. “Separation and Identification of Functional Groups of Molecules Responsible for Fluorescence of Biodiesel Using FTIR Spectroscopy and Principal Component Analysis.” *Journal of the Brazilian Chemical Society*. [http://jbcs.sbq.org.br/audiencia\\_pdf.asp?aid2=4966&nomeArquivo=2017-0077AR.pdf](http://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=4966&nomeArquivo=2017-0077AR.pdf) (July 8, 2019).
- Silva, P. T., Fries, L. L. M., Menezes, C. R., Holkem, A., Schwan, C., Wigmann, E. F., Bastos, J. O., Silva, C. B. 2014. “Microencapsulation: Concepts, Mechanisms, Methods and Some Applications in Food Technology.” *Ciência Rural* 44(7): 1304–11.
- Sorita, G. D. 2018. “Microencapsulação da Curcumina em Partículas Lipídicas Sólidas Visando Aplicações Alimentares Sujeitas a Processamento Térmico.” Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança.
- Souza, R. M. 2012. “Corantes Naturais Alimentícios e Seus Benefícios à Saúde.” Centro Universitário Estadual da Zona Oeste. <http://www.uezo.rj.gov.br/tccs/ccbs/Rosilane%20Moreth%20de%20Souza.pdf>.
- Svečnjak, L., Baranović, G., Vinceković, M., Prđun, S., Bubalo, D., Gajger, I. T. 2015. “An Approach for Routine Analytical Detection of Beeswax Adulteration Using FTIR-ATR Spectroscopy.” *Journal of Apicultural Science* 59(2): 37– 49.
- Swarbrick, J. 2016. “Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”, Third Edition. 3rd ed. *CRC Press* 2315-2338 and 4071-4073. <http://www.gmpua.com/Process/EncyclopediaPT.pdf>
- Tharp’s, B, and L. S. Yong. 2012. “Emulsificantes.” *Sorvetes e Casquinhas*. [http://insumos.com.br/sorvetes\\_e\\_casquinhas/materias/152.pdf](http://insumos.com.br/sorvetes_e_casquinhas/materias/152.pdf).

- Vali, S. R., Ju, Y., Kaimal, T. N. B., Chern, Y. 2005. "A Process for the Preparation of Food-Grade Rice Bran Wax and the Determination of Its Composition." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82(1): 57–64.
- Vieira, T. M. F. S. 2003. "Obtenção de Cera de Cana-de-Açúcar a Partir de Subproduto Da Indústria Sucro-Alcooleira: Extração, Purificação e Caracterização." <http://repositorio.unicamp.br/>.
- Watson, R., Preedy, V. 2019. "Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes". *Academic Press* 2nd Edition
- Wissing, S. A., Kayser, O., Müller, R.H. 2004. "Solid Lipid Nanoparticles for Parenteral Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(9): 1257–72.

## Pedido de Não Publicação Online

Nome: Amarilis Santos de Carvalho

Nº Aluno: 39434 Correio electrónico: amarilis.flor@hotmail.com

Nº do Bilhete de Identidade/Cartão do Cidadão: H967G84398

Título dissertação: Sistemas Corantes de  $\beta$ -Caroteno Baseados em Partículas Lipídicas Sólidas

Orientador(es): Prof. Dra Maria Filomena Barreiro

Prof. Dra. Isabel C. F. R. Ferreira

Prof Dr. Odinei Hess Gonçalves

Ano de conclusão: 2019 Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar

Declaro(amos) que a dissertação de mestrado entregue, deve ser depositada em acesso restrito, porque:

- Os resultados poderão dar lugar à exploração económica;
- Os resultados poderão ser patenteáveis.  Os resultados são confidenciais.

Ou que a dissertação de mestrado deve ser depositada em acesso embargado<sup>1</sup>, durante:

- 6 meses;  12 meses;

Bragança 30/ 07/ 2019

O(A) aluno(a) AS  
(Amarilis Santos de Carvalho)

O(s) Orientadores(s) Filomena Barreiro  
(FILOMENA BARREIRO)

<sup>1</sup> Embargado – O documento fica em acesso restrito durante o tempo escolhido. A partir dessa data fica em acesso livre.