



ESTUDO DE FORMULAÇÕES HIDROFÍLICAS DO CORANTE NATURAL CURCUMINA PARA APLICAÇÃO EM IOGURTES

Heloísa Helena Scorsato de Almeida

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

Orientadores

Maria Filomena F. Barreiro

Isabel C.F.R. Ferreira

Fernanda Vitória Leimann

Bragança

2017

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, **Ricardo e Alessandra**, que não mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos, vivesse todas essas experiências e aprendesse cada vez mais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus** por todas as graças concedidas até aqui, pois foi me dando paciência, sabedoria e determinação que consegui concretizar planos e realizar meus sonhos.

Aos meus pais **Ricardo** e **Alessandra**, ao meu irmão **Heitor** e avós **Helena** e **Caionice**, que são minha base e fortaleza, aqueles que sempre acreditaram no meu potencial, me orientaram e ensinaram valores que levarei por toda a vida. Se hoje estou aqui realizando este trabalho vocês são os responsáveis, sou grata por todo apoio, paciência e carinho.

A todos os meus **familiares** e **amigos** que de alguma forma me incentivaram e acompanharam. Meus **tios, tias, primos** e **primas**, em especial a tia **Claudionete** por todo amor e pela confiança depositada em mim.

As minhas orientadoras do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), professora **Maria Filomena F. Barreiro**, professora **Isabel C.F.R. Ferreira** e da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), professora **Fernanda Vitória Leimann**, por toda paciência e confiança. Sou grata por terem me proporcionado o contato com a área de investigação e por todo conhecimento compartilhado.

Aos investigadores **Lilian Barros**, **Ricardo Calhelha**, **Sandrina Heleno** e **Isabel Fernandes** por toda ajuda e aprendizado. Em especial ao **Custódio Lobo Roriz** pela paciência e amizade. Ao grupo do **LA LSRE-LCM** e **BioChemCore** por todo auxílio e companheirismo.

Aos professores da UTFPR, em especial a professora **Angela Maria Gozzo** por todo carinho e confiança. Aos amigos da UTFPR por todos os momentos compartilhados. Aos colegas do IPB pela recepção e carinho.

A todos os **professores** que tive no decorrer da minha vida, por toda a formação e conhecimento proporcionado. Aos amigos do coração **Leonardo** e **Victor** que independente da distância sempre estiveram ao meu lado.

Aos amigos **Victor**, **Karina** e **Eduarda** por todo carinho e união durante a graduação. Ao **Pedro** pelo apoio, amor e por estar presente nas melhores lembranças que construí nesses meses de intercâmbio.

As instituições de ensino UTFPR e IPB que por meio do Programa de Dupla Diplomação me proporcionaram crescimento pessoal e profissional, conhecer novas culturas e abrir meus olhos para experiências que um intercâmbio pode oferecer. Sou muito grata pela oportunidade de estudar em instituições com alta qualidade de ensino.

Aos amigos da UTFPR que estiveram comigo no IPB, em especial **Cristhian, Rafael e Jacqueline**, pelos momentos engraçados que vivemos e todo apoio.

E a todos que direta ou indiretamente me acompanharam, aconselharam e auxiliaram a realizar este trabalho.

À IOI OleoChemical por fornecimento do Miglyol 812.

Este trabalho foi em parte financiado por:

Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do seu financiamento ao CIMO (UID/AGR/00690/2013).

Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 - LA LSRE-LCM - financiado pelo FEDER, através do POCI-COMPETE2020 e por fundos nacionais através da FCT.

Projeto NORTE-01-0145-FEDER-000006 financiado pelo Norte 2020, através do FEDER e FSE, com o Acordo de Parceria PT2020.



ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1. Motivação e objetivos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Aditivos na indústria alimentar	7
2.1.1. Premência da sua utilização e classes principais	7
2.1.2. O caso particular dos corantes	9
2.1.3. Alternativas naturais versus corantes sintéticos.....	10
2.2. <i>Cúrcuma</i> Longa Linn como fonte de pigmentos.....	12
2.3. Processos de aplicação de corantes sintéticos	14
2.3.1. Processo de produção do iogurte	14
2.3.2. Tipos de corantes utilizados em iogurtes.....	16
2.3.3. Principais problemas.....	16
2.4. Técnicas de estabilização e compatibilização de ingredientes naturais	16
2.4.1. Micro/nanoencapsulação	17
2.4.2. Preparação de emulsões.....	19
2.4.3. Técnica de preparação de nanopartículas por dispersão sólida	22
2.4.4. Revisão bibliográfica sobre a utilização de micro/nanoencapsulação e micro/nano emulsões no campo dos corantes alimentares.....	24
2.4.5. Revisão bibliográfica sobre a utilização de nanopartículas produzidas por dispersão sólida no campo dos corantes alimentares.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Amostras de curcumina.....	29
3.1.1. Curcumina em pó (grau de pureza 65%)	29
3.1.2. Curcumina dispersável em água	29
3.1.3. Curcumina nanoencapsulada por dispersão sólida	29
3.2. Avaliação de propriedades bioativas.....	30

3.2.1. Atividade antioxidante.....	30
3.2.2. Atividade anti-inflamatória.....	32
3.2.3. Atividade citotóxica em células tumorais e não tumorais	33
3.2.4. Atividade antibacteriana	34
3.3. Incorporação em iogurtes para fins corantes.....	35
3.3.1. Preparação dos iogurtes	35
3.3.2. Avaliação da cor	36
3.3.3. Determinação de macronutrientes e valor energético.....	36
3.3.4. Perfis de açúcares livres e ácidos gordos.....	36
3.3.5. Monitorização da curcumina	37
3.3.6. Análise estatística	38
3.4. Desenvolvimento de formulações hidrofílicas de curcumina	38
3.4.1. Sistema químico	38
3.4.2. Tecnologia de emulsificação de alta pressão.....	39
3.4.3. Caracterização das emulsões produzidas.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1. Caracterização da curcumina nanoencapsulada por dispersão sólida	45
4.2. Propriedades bioativas das amostras de curcumina	46
4.3. Valor nutricional, parâmetros de cor e perfil de açúcares livres/ácidos gordos.....	50
4.4. Sistema químico de formulações hidrofílicas	56
4.5. Conclusões e perspectivas futuras.....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
6. ANEXOS	77

Lista de Abreviaturas

A	Água ultrapura
A/O	Água-em-óleo
AR	Azeite refinado
(AR _x /A _y)C	Razão azeite refinado (AR) / água (A) onde x e y representam os conteúdos de AR e A, respetivamente, em volume (ml). A letra C representa o conteúdo de curcumina em mg.
A _s	Absorvância
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
DC	Curcumina dispersável em água
DDA	Dose diária aceitável
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
DTG	Curva termogravimétrica derivada
E	Energia em valor nutricional
EC	Curcumina emulsionada
EC ₅₀	Concentração da amostra responsável por 50% do efeito biológico
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ESBL	Espécie de bactéria produtora de β-lactamases
EU	União Europeia
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-FID	Cromatografia gasosa com um detector de ionização de chama
GI ₅₀	Concentração da amostra que inibe 50% do crescimento celular
G	Massa de gordura para valor nutricional

HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HC	Massa de hidratos de carbono para valor nutricional
HeLa	Linha celular de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular de carcinoma de fígado
INT	Cloreto p-iodonitrotetrazólio
IR	Índice de refração
LCT	Ácidos gordos de cadeia longa
LD	<i>Laser Diffraction</i>
LPS	Lipopolissacárido
M	Miglyol 812
MCF-7	Linha celular de carcinoma da mama
MCT	Ácidos gordos de cadeia média
MDA	Malonaldeído
MDA-TBA	Complexo entre malonaldeído com ácido tiobarbitúrico
MIC	Concentração inibitória mínima
MO	Microscopia ótica
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilina
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
(Mx/Ay)C	Razão Miglyol (M) / água (A) onde x e y representam os conteúdos de M e A, respetivamente, em volume (ml). A letra C representa o conteúdo de curcumina em mg.
N	Azoto
NC	Curcumina nanoencapsulada
NCI-H460	Linha celular de carcinoma do pulmão
NED	N-(1-nafti)etilenediamina
NO	Óxido nítrico

O/A	Óleo-em-água
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Massa de proteína para valor nutricional
PC	Curcumina em pó
PLP2	Células não tumorais de fígado de porco
PUFA	Ácidos gordos poli-insaturados
PVP	Poli(vinil pirrolidona)
RAW 264,7	Linha celular de macrófagos de rato
rpm	Rotações por minuto
RSA	Atividade captadora de radicais
SFA	Ácidos gordos saturados
SRB	Sulforodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Curva termogravimétrica
UFC	Unidade formadora de colônia
v/m	Volume/massa
v:v	Volume:volume
VI	Volume insuficiente para medição do pH
YDC	Iogurte incorporado com curcumina dispersável em água
YNC	Iogurte incorporado com curcumina nanoencapsulada
YPC	Iogurte incorporado com curcumina em pó

Lista de Figuras

Figura 1. Gama de cores e fontes para a obtenção de corantes naturais (Fonte: Adaptado de DOEHLER (https://www.doehler.com)).....	12
Figura 2. Estrutura química da curcumina (A), demetoxicurcumina (B) e bis-demetoxicurcumina (C) (Fonte: Lestari & Indrayanto, 2014).....	13
Figura 3. Processo de produção do iogurte (Fonte: Esteves & Barbosa, 2013)	15
Figura 4. (A) nanoesfera ou microesfera - o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) nanocápsula ou microcápsula - o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante (polímero). (Fonte: Suave et al., 2006).....	18
Figura 5. Métodos para formar nanopartículas (Fonte: Pan & Zhong, 2016).	19
Figura 6. Representação do diagrama ternário para um sistema óleo/água/emulsionante colocando em evidência o tipo de sistema formado. Os pontos numerados correspondem a composições que deram origem a emulsões (pontos marcados com círculos a preto) e microemulsões (pontos marcados com cruces) (Fonte: Lima et al., 2016).	21
Figura 7. Métodos de formação de nanoemulsão (Fonte: Adaptado de Gupta et al., 2016).	22
Figura 8. Estrutura monomérica do poli(vinil-pirrolidona) (Fonte: Gupta et al., (2015)).....	23
Figura 9. Homogeneizador de alta pressão utilizado na preparação das nanoemulsões (Fonte: Manual AVESTIN, Inc).	40
Figura 10. Esquema de funcionamento do homogeneizador de alta pressão (Fonte: Adaptado de Manual AVESTIN, Inc).	41
Figura 11. Curvas TG e DTG da polivinilpirrolidona utilizada como material de encapsulação, e curcumina em pó, e curcumina nanoencapsulada	46
Figura 12. Iogurtes incorporados com diferentes formulações do corante curcumina (B=controlo, NC=nanoencapsulada, DC=dispersável em água e PC=curcumina em pó).	53
Figura 13. Etapas de preparação da emulsão (M50/A50)C3, onde: (1) aspecto da mistura O/A antes da preparação da emulsão primária; (2) aspecto da emulsão primária; (3) emulsões obtidas após 3 e 6 ciclos de passagem a a alta pressão, e (4) emulsões 4 semanas após a produção.	61

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de corantes sintéticos utilizados em alimentos.	9
Tabela 2. Exemplos de corantes naturais utilizados em alimentos.	10
Tabela 3. Exemplos de técnicas de estabilização/solubilização no campo dos corantes alimentares	24
Tabela 4. Informação da quantidade de corante incorporado no iogurte.	36
Tabela 5. Registo dos ensaios de preparação das emulsões. Os ensaios são designados por razão O/A, o óleo utilizado e teores dos componentes.	42
Tabela 6. Propriedades antioxidantes e citotóxicas de diferentes formulações do corante curcumina.	48
Tabela 7. Atividade antibacteriana de diferentes formulações do corante curcumina.	50
Tabela 8. Valor nutricional dos iogurtes incorporados com diferentes formulações do corante curcumina durante sua vida útil (valor médio±desvio padrão).	51
Tabela 9. Avaliação da cor dos iogurtes incorporados com as diferentes formulações de curcumina, durante sua vida útil (valor médio±desvio padrão).	52
Tabela 10. Perfil e concentração (g/100 g) de açúcares livres dos iogurtes incorporados com diferentes formulações do corante curcumina (valor médio±desvio padrão).	53
Tabela 11. Perfil e percentagem relativa de ácidos gordos das amostras de iogurtes incorporados com diferentes formulações do corante curcumina, (valor médio±desvio padrão).	55
Tabela 12. Composição dos sistemas químicos das formulações para nanoemulsões.	56
Tabela 13. Registo da medição de pH das emulsões preparadas.	59
Tabela 14. Sistemas químicos contendo curcumina para formação de nanoemulsões e suas condições de dissolução.	61

RESUMO

A utilização de aditivos naturais está em expansão na indústria alimentar, devido à maior exigência dos consumidores que procuram produtos com qualidade diferenciada e benefícios para a saúde. Entre os vários aditivos, a utilização de corantes em alimentos tem a finalidade de deixar o produto com melhor aparência tornando-o mais apelativo. A curcumina (E100) é um corante natural que, além de conferir cor, possui atividades biológicas, servindo de alternativa a alguns corantes sintéticos que apresentam efeitos alergénicos, carcinogénicos ou de défice de atenção e aumento de hiperatividade em crianças, por exemplo. Por ser um corante hidrofóbico é necessário proceder à sua modificação e/ou compatibilização com o meio aquoso para melhorar a sua estabilidade e possibilitar a sua aplicação em matrizes alimentares hidrofílicas. Assim, métodos como a encapsulação e a preparação de emulsões são exemplos de metodologias que podem ser usadas para a incorporação de agentes ativos em diversos produtos, garantindo a compatibilidade com a matriz alimentar onde são incorporados, tornando-os solúveis e estáveis, aumentando a sua biodisponibilidade e melhorando a libertação no meio desejado. Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu na realização de um estudo visando a aplicação de formulações de curcumina (E100) em iogurtes (matriz hidrofílica). Para tal, selecionaram-se diferentes formas de curcumina (comerciais e preparadas em laboratório), nomeadamente curcumina em pó (PC, comercial, conteúdo em curcumina 65%, hidrofóbica), curcumina dispersável em água (DC, comercial, conteúdo em curcumina 4,7-5,3%, hidrofílica) e curcumina nanoencapsulada (NC, laboratorial, conteúdo em curcumina 8,3%, hidrofílica). Foi ainda desenvolvida uma formulação hidrofílica de curcumina que teve por base a sua emulsificação em água por dissolução numa fase óleo apropriada (curcumina emulsificada, EC), utilizando para o efeito a técnica de emulsificação de alta pressão.

As diferentes formulações apresentaram propriedades bioativas nomeadamente, atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica em células tumorais, de acordo com a seguinte ordem PC>NC>DC. A cor conferida pelas diferentes formulações manteve-se durante a vida útil dos iogurtes. No entanto, houve diferenças na tonalidade conseguida pela aplicação de cada uma das formulações, demonstrando potencial de utilização em iogurtes com diferentes aromas/sabores (características sensoriais que o consumidor associa à cor). O perfil nutricional dos iogurtes preparados manteve-se de acordo com as especificações do rótulo da amostra controlo, cumprindo o ingrediente corante

adicionado apenas a função de conferir cor. Quanto à preparação da curcumina emulsificada, após ensaios preliminares foi possível chegar à seleção de um sistema químico hidrofílico estável sendo este composto por um óleo de grau alimentar (Miglyol 812, triglicerídeo com ácidos gordos de cadeia média e com um conteúdo de curcumina de 10,0 mg/10 ml de Miglyol). Os estudos de preparação de uma formulação hidrofílica emulsionada realizados mostraram que a melhor opção corresponde à utilização do Miglyol como fase óleo, quando se usa uma razão óleo/água (O/A) 50/50. A utilização de 6 ciclos de passagem a alta pressão originam emulsões estáveis durante o período de armazenamento e com tamanho de gotícula inferior.

No geral, os resultados demonstraram a viabilidade de aplicação do corante natural curcumina (E100), sob diferentes formulações, em matrizes alimentares. O estudo efetuado para desenvolver o novo produto (curcumina emulsificada), embora preliminar, valida a estratégia utilizada. Apresenta como desvantagens o baixo conteúdo em curcumina incorporado e como vantagens o uso de concentrações de emulsionante baixas.

ABSTRACT

The use of natural additives is expanding in the food industry due to the increased demand of consumers seeking products with differentiated quality and health benefits. Among the several additives, the use of dyes in foods has the goal of making the product look better, by making it more appealing. Curcumin (E100) is a natural dye that, in addition to conferring color, has biological activity, serving as an alternative to some synthetic dyes that have allergenic, carcinogenic effects or disturbs the attention deficit and increased hyperactivity in children, for example. As a hydrophobic dye its modification/compatibilization with the aqueous medium is required to improve its stability and enable its application in hydrophilic food matrices. Thus, methods such as encapsulation and preparation of emulsions are examples of methodologies that can be used for the incorporation of active agents into several products, ensuring their compatibility with the food matrix, making them soluble and stable, increasing their bioavailability and enhancing their release in the desired medium. In this context, the objective of this work was to carry out a study aiming the application of curcumin (E100) formulations into yogurt (hydrophilic matrix). For this, different forms of curcumin (commercial and laboratorial samples) were selected, namely curcumin powder (PC, commercial, curcumin content 65%, hydrophobic), water-dispersible curcumin (DC, commercial, curcumin content 4,7-5,3%, hydrophilic) and nanoencapsulated curcumin (NC, laboratorial sample, curcumin content 8,3%, hydrophilic). A hydrophilic formulation of curcumin was also developed based on its emulsification in water by dissolving it in an appropriate oil phase (emulsified curcumin, EC), using the high pressure emulsification technique.

The different formulations presented bioactive properties namely, antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity in tumor cells, according to the following order PC> NC> DC. The color conferred by the different formulations was maintained during the yogurts liveness. However, there were differences in the color tone achieved by the application of each of the formulations, showing potential of use in yoghurt with different flavors / tastes (sensorial characteristics that the consumer associates with color). The nutritional profile of the prepared yoghurts was maintained according to the specifications of the control sample, the dye ingredient added fulfills only the color-conferring function. For the preparation of emulsified curcumin, after preliminary tests it was possible to select a stable hydrophilic chemical system, which is composed by a

food grade oil (Miglyol 812, triglyceride with medium chain fatty acids and a curcumin content of 10,0 mg/10 ml. The studies of the emulsion preparation showed the formulation that uses Miglyol as the oil phase in a 50/50 oil/water (O/W) ratio, subjected to 6 cycles of high pressure as the best solution. This system gave emulsions with good stability during storage and with lower droplet size.

Overall, the results demonstrated the feasibility of applying the natural curcumin dye (E100) under different formulations in food matrices. The study carried out to develop the new product (emulsified curcumin), although preliminary, validates the strategy used. It presents as disadvantages the low content in curcumin incorporated as advantages the use of low emulsifier concentrations.

1. Introdução e Objetivos

1.1. Motivação e objetivos

Entre os constituintes alimentares responsáveis por uma melhoria considerável das características organolépticas, os aditivos são revelados fundamentais. Eles exercem benefícios sobre a vida útil, qualidade microbiológica e segurança de alimentos. Destaca-se também por sua atratividade sensorial, nomeadamente a percepção visual, a cor e o cheiro, e em particular os corantes alimentares são de extrema importância neste domínio (Martins et al., 2016). Neste contexto será estudada a incorporação de corantes naturais em matrizes alimentares, estes que muitas vezes, possuem caráter hidrofóbico e sensibilidade à luz, pH, temperatura, entre outros. Por isso a necessidade de estudar técnicas que facilitem a sua aplicação e melhore sua solubilização/estabilização. Numa perspectiva futura, se o iogurte incorporado for bem aceite pela indústria e consumidores, será um factor importante para a área de aplicação de corantes naturais, muitos com propriedades bioativas, melhorando a qualidade do produto.

Os objetivos do trabalho são:

- a) Avaliação de propriedades bioativas de diferentes formulações de curcumina (E100): curcumina em pó (grau de pureza 65%), curcumina dispersável em água e curcumina nanoencapsulada por dispersão sólida, sendo elas: atividade antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e antibacteriana;
- b) Incorporação das diferentes formulações de curcumina em iogurtes, com o objetivo de avaliar a sua utilização como corante natural com propriedades bioativas. Com ensaios realizados ao longo do tempo de armazenamento (0, 7 e 15 dias);
- c) Desenvolvimento de soluções alternativas às comerciais recorrendo à preparação de emulsões óleo-em-água, utilizando um homogeneizador de alta pressão.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Aditivos na indústria alimentar

2.1.1. Premência da sua utilização e classes principais

A alimentação é primordial para os seres humanos contribuindo com os nutrientes essenciais necessários à sua sobrevivência. No decorrer dos anos, foi-se observando um aumento e uma diversificação da produção de alimentos que, globalmente, têm estimulado a inovação na indústria alimentar. Concomitantemente, a necessidade de preservar a qualidade dos produtos alimentares durante o processamento, transporte e armazenamento, foi sendo cada vez maior levando à utilização de refrigeração, embalagens especiais e/ou uso de aditivos alimentares.

Segundo o *Codex Alimentarius* um aditivo alimentar é uma substância que, normalmente, não é consumida como alimento por si só ou usada como ingrediente, dotada ou não de valor nutritivo, e que é adicionada ao alimento com um propósito tecnológico (e organoléptico) na sua fabricação, processamento, acondicionamento, transporte ou armazenamento, para promover possíveis alterações, direta ou indiretamente, afetando características do alimento. Este termo não inclui contaminantes ou substâncias adicionadas com o propósito de melhorar a qualidade nutricional do alimento (Codex, 2016). Em síntese, sua adição tem a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar as características físicas e/ou organolépticas.

Justifica-se a utilização de aditivos alimentares quando sua aplicação apresenta vantagens, sem enganar o consumidor ou apresentar risco para a saúde do mesmo, servindo para uma ou mais funções tecnológicas através de meios economicamente e tecnologicamente praticáveis, visando preservar a qualidade nutricional do alimento; fornecer ingredientes ou componentes necessários a grupos de consumidores que tenham necessidades nutritivas especiais; aumentar a conservação ou estabilidade de um alimento melhorando as suas propriedades organolépticas, desde que isso não altere a natureza e qualidade do alimento; auxiliar o processo tecnológico desde que o aditivo não seja utilizado para dissimular efeitos de matérias-primas defeituosas ou más práticas de manipulação no decorrer do processamento do alimento (Codex, 2016).

Os aditivos alimentares podem ser divididos nas seguintes classes principais: conservantes, aditivos nutricionais, agentes corantes, agentes aromatizantes, agentes de texturização e agentes variados. Adicionalmente, os conservantes são subdivididos em

agentes antimicrobianos, antioxidantes e agentes anti-escurecimento; os corantes abrangem compostos azo, derivados chinoptalon, compostos triarilmetano, xantinas e índigos; os agentes aromatizantes incluem os edulcorantes, os aromas naturais e sintéticos e os intensificadores de sabor; os agentes texturizantes são divididos em emulsionantes e estabilizantes (Carocho et al., 2015). O grupo dos agentes variados pode incorporar agentes quelantes, enzimas, agentes anti-espuma, catalisadores, solventes, lubrificantes e agentes propulsores. No que diz respeito à sua origem e manufatura, os aditivos podem ser divididos em quatro grupos: aditivos naturais (obtidos diretamente de animais ou plantas); aditivos similares aos naturais (produzidos sinteticamente imitando os naturais); aditivos naturais modificados (aditivos naturais modificados quimicamente); e aditivos artificiais (compostos sintéticos) (Carocho et al., 2014).

Na União Europeia (EU), todos os aditivos alimentares, aprovados ou não pela EU, são rotulados com a letra “E” e um número específico. Esta nomenclatura foi alargada à Comissão do *Codex Alimentarius* para identificar facilmente aditivos alimentares em todo o mundo. Assim, houve um esforço para criar uma base de dados única de aditivos legais e utilizados dentro da EU, onde através do Regulamento 1129 de 2011, todos os aditivos aprovados estão listados, bem como sua dose diária aceitável (DDA) (Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Conselho, Regulamento (CE) nº 1129/2011 do Conselho). A DDA é o ponto de partida para estabelecer a quantidade máxima permitida de um determinado aditivo a incluir em cada produto alimentar, podendo variar de miligramas a *quantum satis*, expressos em miligramas de aditivo por quilograma de peso corporal (mg/ kg de peso corporal). *Quantum satis* é uma palavra do latim empregada pela *European Food Safety Authority* (EFSA) que determina que não existe um nível máximo numérico específico e que as substâncias devem ser utilizadas de acordo com as boas práticas de fabricação, a um nível que não ultrapasse o necessário para atingir o objetivo pretendido e não engane o consumidor (Carocho et al., 2014).

Atualmente, o interesse dos consumidores por uma alimentação saudável associado à existência de estudos sobre possíveis riscos de toxicidade e efeitos cancerígenos dos aditivos sintéticos, estimulou o desenvolvimento de alimentos com uma presença mínima (ou ausência) de substâncias artificiais e, em alternativa, aditivos naturais.

2.1.2. O caso particular dos corantes

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), um corante alimentar é “qualquer corante, pigmento ou substância que, quando adicionado ou aplicado a um alimento, medicamento ou cosmético, ou ao corpo humano, é capaz (isoladamente ou através de reações com outras substâncias) de transmitir cor” (Martins et al., 2016). Sendo assim, os corantes alimentares são usados para alterar ou conferir cores para os alimentos, visando aumentar sua atratividade aos olhos dos consumidores. Os corantes têm vindo a ser usados desde tempos longínquos na indústria de alimentos, com algumas controvérsias em relação aos seus efeitos sobre a saúde (Carocho et al., 2014).

A cor é frequentemente associada ao fator qualidade. As principais razões para a adição de corantes em alimentos são: (i) restaurar a cor natural perdida durante o processamento e armazenamento; (ii) reduzir a variação lote-a-lote dos produtos; (iii) complementar a intensidade das cores naturais; (iv) dar cor a produtos incolores e (v) gerar produtos aceitáveis e atraentes para o consumidor (Damant, 2011).

Nas Tabelas 1 e 2 estão reunidos alguns exemplos de corantes, respetivamente sintéticos e naturais, aplicados em alimentos.

Tabela 1. Exemplos de corantes sintéticos utilizados em alimentos.

Corante	DDA (mg/ kg peso corporal)	Aplicações
Amaranto (E123)	0,8	Bebidas e ovas de peixe.
Amarelo Crepúsculo (E110)	2,5	Bebidas não-alcoólicas, doces e geleias.
Tartrazina (E102)	7,5	Bebidas não-alcoólicas, doces e geleias.
Azul Brillhante FCF (E133)	10,0	Leite em pó, bebidas, geleias, doces, condimentos, glacés, xaropes, extratos.
Vermelho 40 (E129)	7,0	Refrigerantes e carnes processadas.

Fonte: Martins, N., Roriz, C., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I. et al. (2016). Food colorants: challenges, opportunities and current desires of agroindustries to enture consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52.

Tabela 2. Exemplos de corantes naturais utilizados em alimentos.

Corante	Fonte	Aplicação
Betalaina (E162)	Beterraba (<i>Beta vulgaris</i> L.)	Hambúrgueres, sobremesas, gelados, geleias, sopas, molhos, doces, bebidas, iogurte.
Luteína (E161b)	Raízes (<i>Daucus carota</i> L.) e flores (<i>Tagetes erecta</i> L.)	Produtos lácteos, refrigerantes, confeitos, salada.
Curcumina (E100)	Rizomas da <i>Cúrcuma longa</i> L.	Peixe e produtos assados, produtos lácteos, gelado, iogurte, bolos, biscoitos, doces, cereais, molhos, gelatina.
Clorofila (E140)	Folhas (<i>Spinacea oleracea</i> L.) e algas (<i>Spirulina pratensis</i>)	Bebidas, sumo de frutas, massas, produtos lácteos, sopas.
Ácido Carminico (E120)	Combinação de insetos da espécie <i>Dactylopius coccus</i>	Bolos, cookies, bebidas, geleias, gelado, salsicha, tortas, peixe, iogurte, gelatina, bebidas não-carbonatadas, chicletes.

Fonte: Martins, N., Roriz, C., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I. et al. (2016). Food colorants: challenges, opportunities and current desires of agroindustries to enture consumer expectations and regulatory practices. Trends in Food Science & Technology, 52.

2.1.3. Alternativas naturais versus corantes sintéticos

Existem duas classes distintas de corantes disponíveis para uso em alimentos, os artificiais e os naturais. Os artificiais são sintetizados por via química e os naturais são extraídos de substâncias vegetais ou animais.

Com a procura crescente e contínua destes aditivos, desenvolveram-se numerosos corantes sintéticos para serem adicionados aos alimentos com a finalidade de melhorar a qualidade e características da coloração, no entanto, ao longo do tempo, a maioria deles foi banida devido a efeitos colaterais evidentes, sinais de toxicidade a curto e longo prazo e possíveis efeitos cancerígenos (Martins et al., 2016).

Os corantes alimentares naturais têm-se revelado mais eficazes, quanto a benefícios de longo prazo. Oferecem maior segurança e proporcionam benefícios para a saúde, isto é, além

de conferirem características organolépticas, atuam também como antioxidantes e conservantes, e por último, contribuem para conferir propriedades funcionais aos produtos alimentares. Alguns fatores externos interferem na estabilidade da cor dos alimentos reduzindo a sua atratividade, nomeadamente: temperatura, luz, ar/oxigénio, pH, estrutura química, solventes, materiais de embalagem e condições de armazenamento. No que respeita aos corantes naturais, a nível industrial têm sido aplicadas técnicas para otimizar a extração de pigmentos naturais, garantindo a sua estabilidade nos alimentos, evitando a perda de cor e o aparecimento de características desagradáveis (Martins et al., 2016).

Apesar de apresentarem maior estabilidade e facilidade de aplicação na coloração de alimentos, os corantes sintéticos têm vindo a ser substituídos por alternativas naturais devido aos riscos que apresentam para a saúde humana, nomeadamente efeitos cumulativos relacionados com a ingestão diária. Por exemplo, uma alternativa para o corante tartrazina (E102), que tem sido associado à irritabilidade, ansiedade e distúrbios do sono em crianças, consiste na utilização de corantes naturais de coloração amarela como, por exemplo, a curcumina (E100), a luteína (E161-b), o urucum (E160-b) e alguns carotenoides (Carocho et al., 2015). Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de técnicas que ajudem a otimizar a aplicação destes corantes, num espectro alargado de matrizes, dado que correspondem a alternativas muito bem aceites no mercado.

Embora não tão generalizada como a produção de corantes sintéticos, existe já alguma representatividade da produção e comercialização de corantes de origem natural. São exemplos disso às empresas CHR Hansen (<http://www.chr-hansen.com/en/natural-colors>), DDW – The Colour House (<http://www.chr-hansen.com/en/natural-colors>) e a DOEHLER (<https://www.doehler.com>). No que respeita à gama de produtos existente esta é já significativa em termos de cor e fontes de obtenção, tal como pode ser verificado na Figura 1.

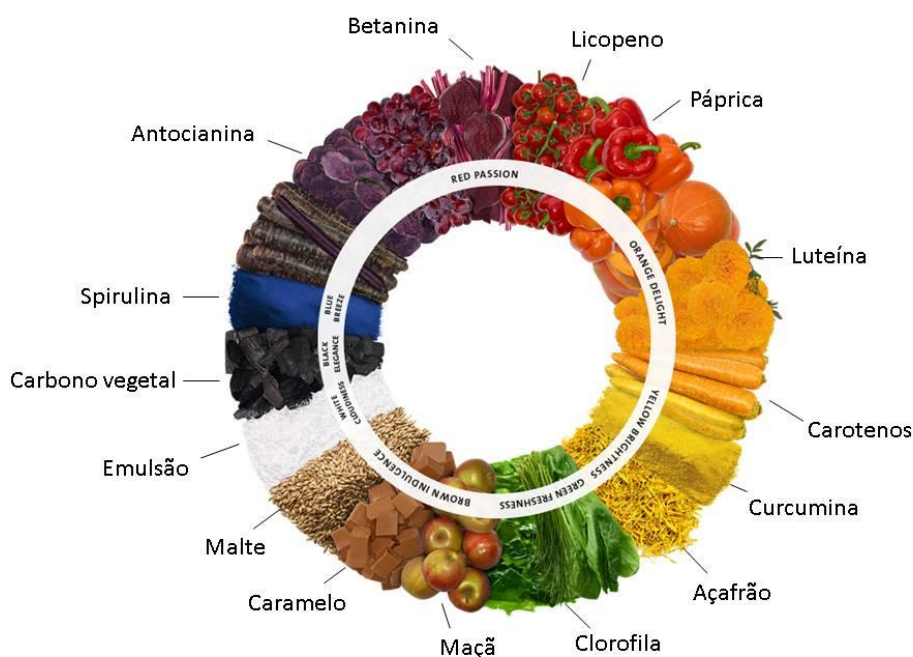


Figura 1. Gama de cores e fontes para a obtenção de corantes naturais (Fonte: Adaptado de DOEHLER (<https://www.doehler.com>)).

2.2. *Curcuma Longa* Linn como fonte de pigmentos

A curcumina é um composto polifenólico natural isolado dos rizomas de *Curcuma Longa* Linn (Bergonzi et al., 2014). Um grande número de plantas pertencentes à família *Zingiberaceae* é utilizado como condimento, corante para alimentos e, também, como medicamento (Antunes & Araújo, 2000). A curcumina é o principal princípio ativo constituinte da cúrcuma que é amplamente utilizada como conservante, aromatizante e corante natural em bebidas e alimentos como curry, mostarda, queijos, gelados, iogurtes e margarina, substituindo corantes artificiais (Codevilha et al., 2015).

Os constituintes químicos da *Curcuma Longa* Linn incluem compostos de curcuminoides sendo estes curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina, cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 2, responsáveis pela pigmentação dos rizomas, tendo a curcumina como principal substância ativa (60 a 76%) (Marchi et al., 2016). Estes compostos pertencem ao grupo diaril-heptanoides. A curcumina em si aparece como um composto cristalino com uma cor laranja-amarelo brilhante, comumente usada como agente de coloração, bem como aditivo alimentar. A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que a ingestão diária aceitável deste aditivo se situa na faixa de 0-3 mg/kg peso corporal. (Lestari & Indrayanto, 2014).

Os produtos que contenham curcumina têm sido identificados como seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, a Diretoria de Produtos de Saúde Natural do Canadá e pelo FAO (*Food and Agriculture Organization*)/OMS (Mahmood et al., 2015).

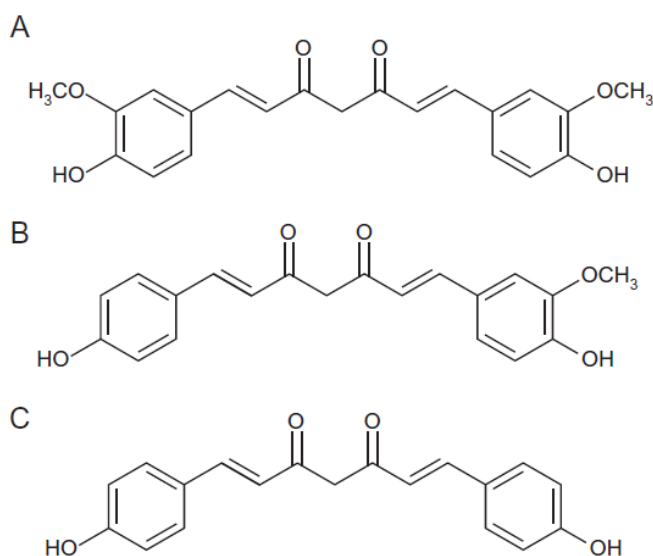


Figura 2. Estrutura química da curcumina (A), demetoxicurcumina (B) e bis-demetoxicurcumina (C) (Fonte: Lestari & Indrayanto, 2014)

A curcumina é praticamente insolúvel em água a pH ácido e neutro, mas solúvel em solventes orgânicos polares e não polares, bem como bases ou em solventes extremamente ácidos. A estabilidade da curcumina é dependente do pH, o que é comprovado pela alteração da cor da solução de curcumina em vários valores de pH. A pH menor que 1, as soluções apresentam coloração vermelha devido à presença da sua forma protonada. A pH entre 1-7, as soluções são amarelas com a maioria das moléculas na fórmula neutra. Para valores de pH superiores a 7,5 as soluções exibem uma alteração de cor para o vermelho-laranja (Lestari & Indrayanto, 2014).

Vários estudos revelaram que a curcumina possui propriedades antibacterianas, antiproliferativas, anti-inflamatórias, antioxidantes e anticarcinogênicas (Mahmood et al., 2015). Não obstante estas propriedades interessantes, as principais barreiras para o uso de curcumina na indústria de processamento de alimentos são a sua fraca solubilidade em água e a sua suscetibilidade a condições alcalinas, luz, oxidação e calor, que também limitam sua eficácia clínica (Paramera et al., 2011). Deste modo, foram desenvolvidas numerosas tecnologias para melhorar a solubilidade em meio aquoso, para proteger da degradação e da oxidação e para aumentar a biodisponibilidade por ingestão oral (Shin et al., 2015)

Este corante pode ser encontrado em diferentes formulações que utilizam técnicas que visam melhorar a sua estabilidade e solubilidade, aumentando também a biodisponibilidade da curcumina. Estas incluem a encapsulação e a preparação de emulsões, facilitando a aplicação industrial deste pigmento no alimento. A encapsulação de compostos bioativos à nanoescala, por exemplo, mostrou melhorar a estabilidade física dos compostos dentro e fora do intestino e aumentar a captação de componentes durante a digestão (Rao & Khanum, 2015).

Exemplos de aplicação da curcumina na área alimentar: Segundo Mangolim et al. (2014), este corante é comumente utilizado em produtos lácteos, tendo estes autores desenvolvido um complexo do corante com β -ciclodextrina, e realizado a sua incorporação durante o processo de fabrico em 3 formulações diferentes visando conferir cor a um gelado com sabor baunilha. Marcolino et al. (2011) testou a adequação do uso do complexo do corante com β -ciclodextrina em iogurte e queijo. Vitaglione et al. (2012) avaliou a biodisponibilidade da curcumina em diferentes tipos de pão, contendo o corante na forma livre e microencapsulada em revestimento derivado da celulose (contendo curcumina isoladamente ou em combinação com mistura de três compostos bioativos: piperina, quercetina e genisteína). Wang et al. (2012) avaliou os efeitos de preservação de microcápsulas de curcumina aplicadas em tofu, pão e carne de porco cozida. Sousdaleff et al. (2013) estudou a aplicação do corante microencapsulado com norbixinato de potássio e também do corante com maltodextrina, em gelado de baunilha.

2.3.Processos de aplicação de corantes na indústria dos laticínios

2.3.1. Processo de produção do iogurte

O iogurte é definido como um produto coagulado obtido por fermentação láctica devido à ação exclusiva de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e de *Streptococcus thermophilus* sobre o leite e produtos lácteos devendo a flora específica estar viva e ser abundante no produto final (Esteves & Barbosa, 2013).

A fase mais apropriada do processo para a adição de aditivos, incluindo corantes, depende do tipo de iogurte a fabricar. Como mostrado na Figura 3, no iogurte sólido o processo de fermentação ocorre dentro da própria embalagem, não havendo homogeneização posterior, resultando num produto semi-sólido. No iogurte batido, a fermentação ocorre em fermentadoras ou incubadoras seguida de quebra do coágulo por agitação mecânica.

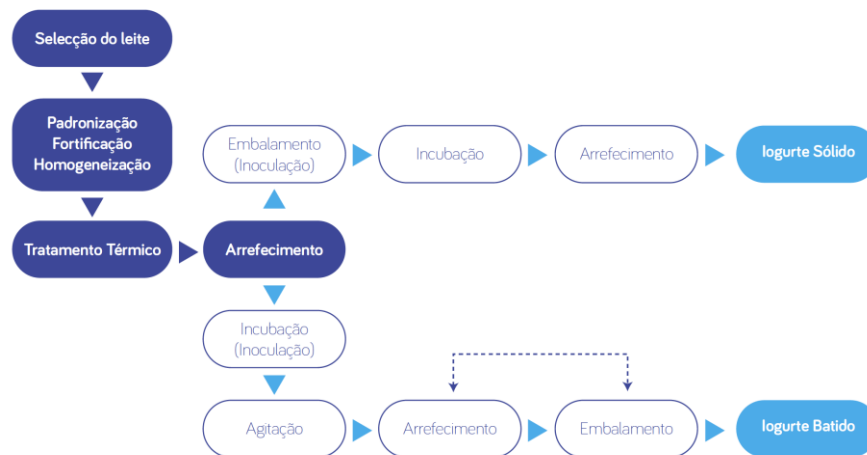


Figura 3. Processo de produção do iogurte (Fonte: Esteves & Barbosa, 2013)

De uma forma mais detalhada, o leite utilizado para fabricação de iogurte, que deve apresentar boa qualidade físico-química, é submetido, numa primeira fase, a tratamento térmico para destruir microrganismos patogénicos e outros que possam competir com o fermento do iogurte, para além de promover a desnaturação das proteínas do soro e favorecer o crescimento das bactérias do iogurte. Seguidamente, procede-se ao arrefecimento (42-43°C), para adição de 1-2% de fermento láctico homogeneizado (cultura). Esta fase poderá ser utilizada para adicionar o corante no caso dos iogurtes sólidos. Após a adição da cultura, o leite permanece em repouso aproximadamente 4 horas para que ocorra a fermentação. No final deste processo o coágulo deve apresentar pH entre 4,5-4,7 (ponto isoelétrico da caseína); o gel deve ser liso, brilhante, sem desprendimento de soro ou gases (Reis et. al., 2000).

Após fermentação, o produto passa por uma etapa de arrefecimento com o objetivo de inibir o desenvolvimento das bactérias interrompendo a produção de ácido láctico. É recomendado que esta etapa decorra em duas fases, para evitar o choque térmico, que provoca uma contração da massa. A primeira etapa consiste em diminuir a temperatura até 18-20°C, no máximo, em 30 minutos. No caso do iogurte batido, a adição de ingredientes tais como frutas, corantes e cereais pode ser feita nesta fase dado que passam por um processo de homogeneização posterior (quebra do coalhado com agitação, visando obter uma massa de textura homogênea) (Reis et. al., 2000).

2.3.2. Tipos de corantes utilizados em iogurtes

Os corantes utilizados para coloração do iogurte têm a finalidade de identificar/recordar o sabor escolhido, relacionando-o, por exemplo, com a fruta (Reis et. al., 2000). São normalmente utilizados corantes naturais como antocianina (E163), betalaína (E162), curcumina (E100), carmin de cochonilha (E120) e carotenoides entre outros. Quanto a corantes artificiais, alguns exemplos incluem o amarelo crepúsculo (E110), a tartrazina (E102) e o vermelho 40 (E129). Como exemplos de utilização têm: os autores Wallace & Giusti (2008), que analisaram a aplicação de antocianina (E163) extraída de *Berberis boliviana* L. em iogurte com diferentes teores de gordura, comparando com as antocianinas aciladas de extratos de cenoura roxa, betalaína (E162) da beterraba e corante sintético vermelho 40 (E129); Coisson et al. (2005) incorporou sumo de *Euterpe oleracea*, fonte de antocianina (E163), em iogurte; Nontasan et al., (2012) estudou a extração de antocianina do farelo de arroz preto e incorporação do corante em iogurte; Gomes et al. (2014) prepararam complexos de pigmentos extraídos de pimentão (*Capsicum annuum*), os carotenóides capsantina e capsorubina (E160c) com β -ciclodextrina para incorporar em iogurte; Domingos et al. (2014) estudaram a utilização do corante luteína (E161b), um carotenoide, e sua estabilidade oxidativa em iogurte.

2.3.3. Principais problemas

Os principais desafios na aplicação de corantes prendem-se com a sua solubilidade e preservação da sua estabilidade. No caso particular do iogurte, uma matriz proteica que apresenta água e gordura na sua composição, há que adicionar o facto de ser um produto ácido que passa por variações de temperatura durante seu processamento. Assim, para que seja escolhido o corante ideal deve-se analisar se o mesmo é estável às variações de pH e temperatura, de forma a que a cor se mantenha uniforme em todo o produto durante o processamento e no seu tempo de prateleira.

2.4. Técnicas de estabilização e compatibilização de ingredientes naturais

Recentemente, a indústria alimentar tem feito um esforço para disponibilizar alimentos que, para além da sua função vital, possam também apresentar uma vertente funcional. Outra das tendências corresponde à utilização, cada vez maior, de ingredientes naturais em substituição dos sintéticos, como já anteriormente focado neste trabalho. Exemplos disso incluem a incorporação de curcumina, carvacrol, retinol, α -tocoferol, resveratrol, quercetina,

β -caroteno e minerais diversos. No entanto, as tecnologias e os processos utilizados pela indústria alimentar para a incorporação desses compostos em alimentos nem sempre foram eficazes. Estes apresentam muitas vezes problemas relacionados com solubilidade, degradação, agregação, coalescência e interação com as matrizes alimentares, que fazem com que o seu efeito funcional seja diminuído, ou até mesmo perdido, antes de chegar ao consumidor. A micro/nanotecnologia tem sido apresentada nos últimos anos como uma forma de solucionar alguns desses problemas - envolvendo a produção, o processamento e a aplicação de sistemas à micro/nano escala através do controle da sua forma e tamanho (Pinheiro et al., 2013).

No que respeita à utilização de corantes, existem diferentes técnicas que podem conduzir à sua estabilização e modificação da solubilidade de forma a proporcionar uma correta compatibilidade com a matriz alimentar onde vão ser incorporados. Dada a sua importância, nas secções seguintes serão abordados os tópicos da micro/nanoencapsulação e da preparação de emulsões. Outras técnicas incluem a preparação de compostos de inclusão princípio-ativo/ciclodextrinas e a preparação de misturas emulsionáveis/dispersáveis em água. Esta última técnica é muito utilizada a nível industrial e passa pela preparação de misturas contendo a curcumina, um emulsionante e um álcool de cadeia média.

2.4.1. Micro/nanoencapsulação

A encapsulação é a técnica através da qual um material, ou uma mistura de materiais, é revestido ou aprisionado numa matriz de um outro material ou sistema. O material revestido é chamado de material ativo ou núcleo, e o material de revestimento é chamado de invólucro ou encapsulante (Madene et al., 2006).

De acordo com seu tamanho, estas partículas podem ser classificadas como nanopartículas ou micropartículas, estando nas gamas 0,01-0,2 μm e 1-100 μm respetivamente. A escolha do método mais adequado para a encapsulação depende do tipo de material ativo, da aplicação pretendida e do mecanismo de libertação desejado para a sua ação. Existem diferentes métodos de encapsulação, que dependem da forma como o material é colocado/formado para proteger princípio ativo. Estes podem ser subdivididos em métodos físicos, químicos ou físico-químicos (Suave et al., 2006).

Quanto à morfologia das estruturas formadas é possível distinguir duas tipologias principais. Se o material ativo incorporado ao sistema se encontra disperso numa matriz do

material encapsulante, temos uma estrutura designada por micro/nanoesfera (Figura 4 (A)). No caso das nano/microcápsulas, o material ativo incorporado encontra-se na forma de um núcleo líquido, confinado por uma parede do material encapsulante (Figura 4 (B)) (Anton et al., 2008).

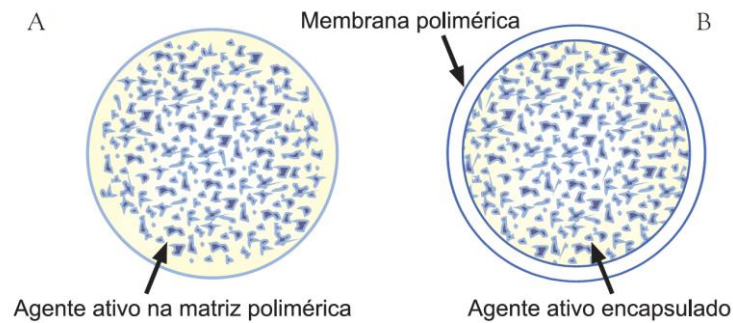


Figura 4. (A) nanoesfera ou microesfera - o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) nanocápsula ou microcápsula - o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante (polímero). (Fonte: Suave et al., 2006)

No caso da formação de nanopartículas é possível utilizarem-se dois tipos de procedimentos: procedimentos *top-down* (de cima para baixo) e *bottom-up* (de baixo para cima). Em métodos *top-down*, as forças mecânicas são aplicadas para fragmentar macro/microestruturas em nanoestruturas usando para o efeito diversas operações unitárias. Em métodos *bottom-up*, são utilizados princípios físicos, químicos e biológicos para construir nanoestruturas a partir de partículas ou moléculas. Estes dois métodos diferem na magnitude da energia mecânica utilizada; sendo chamados de métodos de alta e baixa energia, respetivamente (Pan & Zhong, 2016). Estes métodos estão representados de forma esquemática na Figura 5.

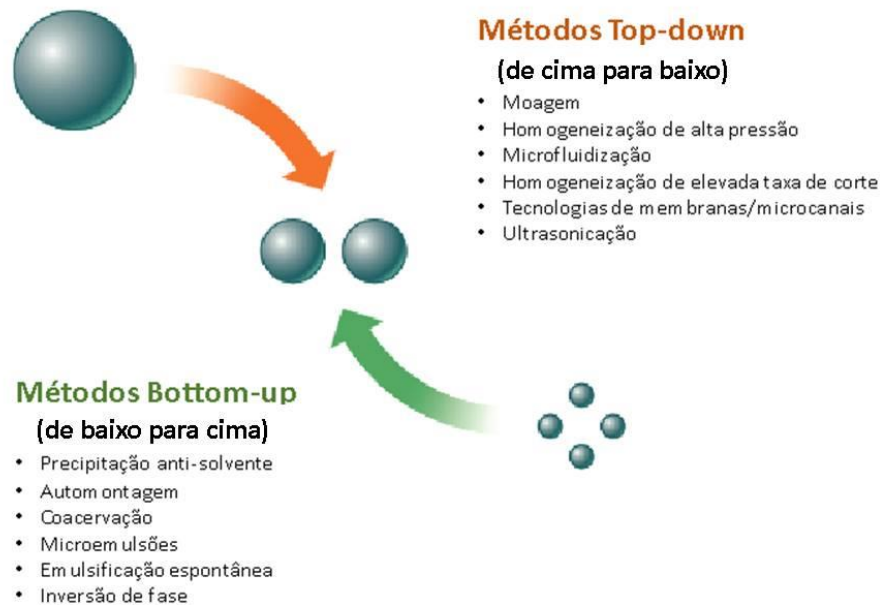


Figura 5. Métodos para formar nanopartículas (Fonte: Pan & Zhong, 2016).

2.4.2. Preparação de emulsões

No campo da preparação das emulsões há que distinguir as emulsões propriamente ditas (macroemulsões), as nanoemulsões e as microemulsões. As principais diferenças residem na gama de tamanho das gotículas e as características de estabilidade. As macro e nanoemulsões são descritas como termodinamicamente instáveis, no entanto, devido ao tamanho pequeno das gotículas das nanoemulsões, estas podem ser cineticamente estáveis para escalas de tempo elevadas. Este tipo de sistemas é bastante atraente para um leque alargado de aplicações por serem relativamente menos sensíveis a mudanças físicas e químicas (Gupta et al., 2016). Por outro lado, as microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, opticamente transparentes, isotrópicos e de baixa viscosidade. São constituídos por gotículas de tamanho nanométrico dispersas numa fase contínua constituída por um solvente imiscível com a fase dispersa (Silva et al., 2015).

Uma emulsão é formada por 3 componentes principais: uma fase hidrofílica (designada por “fase água”), uma fase lipofílica (designada por “fase óleo”) e um emulsionante (que pode ser uma mistura de mais do que um emulsionante, usualmente um emulsionante e um co-emulsionante). A adição de um emulsionante é crítica para a criação de

gotículas de menor tamanho, uma vez que diminui a tensão interfacial, isto é, a energia superficial por unidade de área, entre as fases óleo e água da emulsão (Gupta et al., 2016).

Uma ferramenta muito importante usada no desenvolvimento de emulsões consiste da construção do diagrama ternário (ou pseudoternário) do sistema óleo/água/emulsionante. A sua elaboração, que traduz a combinação de diferentes proporções dos seus constituintes, possibilita um estudo detalhado sobre o sistema, nomeadamente avaliar as características físico-químicas das formulações. Adicionalmente permite comparar a utilização de diferentes sistemas de preparação.

Por intermédio dos diagramas ternários é possível identificar os componentes mais adequados e suas proporções relativas para a obtenção de sistemas fisicamente estáveis. Estes diagramas apresentam à forma de um triângulo equilátero, sendo representado nos vértices cada um dos componentes, e em cada um dos lados as variações nas concentrações dos componentes (de 0 a 100%). A sua análise possibilita encontrar as regiões de transição entre emulsões, a zona de separação de fases e a região das emulsões O/A (óleo-em-água) e A/O (água-em-óleo) e, conseqüentemente, determinar as concentrações mínimas de cada componente para obter um dado tipo de emulsão. A formulação ideal de uma emulsão corresponde àquela necessária para que o sistema resultante tenha as propriedades físico-químicas desejadas, tais como viscosidade, estabilidade, pH e área específica da fase dispersa. Adicionalmente, deve proporcionar uma aplicação eficiente do ponto de vista tecnológico e, evidentemente, conseguida a um baixo custo (Silva et al., 2015). A Figura 6 mostra um diagrama ternário típico de um sistema óleo/água/emulsionante.

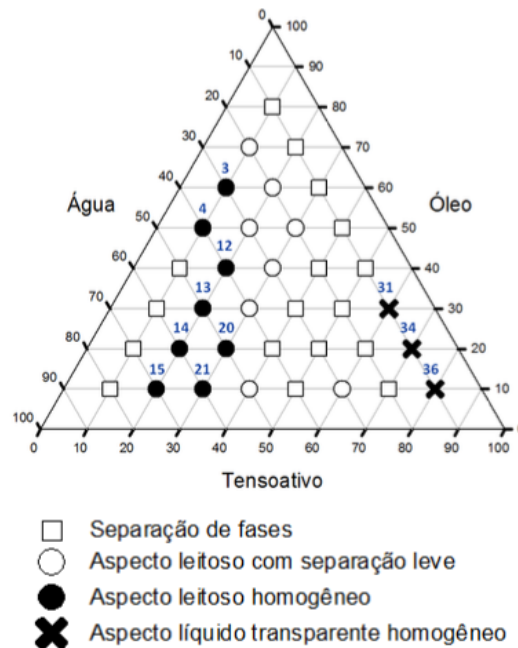


Figura 6. Representação do diagrama ternário para um sistema óleo/água/emulsionante colocando em evidência o tipo de sistema formado. Os pontos numerados correspondem a composições que deram origem a emulsões (pontos marcados com círculos a preto) e microemulsões (pontos marcados com cruzes) (Fonte: Lima et al., 2016).

Nas últimas décadas, o foco da investigação tem sido colocado na preparação de nanoemulsões através de vários métodos. Estes são classificados em duas grandes categorias: métodos de alta e baixa energia (Figura 7) (Gupta et al., 2016). As nanoemulsões são dispersões coloidais que contêm pequenas partículas (tipicamente em torno de 20 a 200 nm de diâmetro) dispersas num meio aquoso. Existe um crescente interesse na utilização destes sistemas na indústria alimentar devido às alterações provocadas nas propriedades físico-químicas e no desempenho biológico, associadas à redução do tamanho de partícula. Reduzir o tamanho das partículas numa emulsão resulta numa série de consequências que podem ser benéficas para determinadas aplicações alimentares. Nomeadamente: (i) maior estabilidade à agregação de gotículas e à separação por ação da gravidade; (ii) maior clareza ótica e (iii) aumento da biodisponibilidade oral. Em particular, as nanoemulsões podem ser úteis para encapsular bioativos lipofílicos (Guttoff et al., 2015). A estabilidade, as propriedades físico-químicas e o desempenho funcional das nanoemulsões dependem significativamente da concentração de gotículas, composição, distribuição de tamanho de partícula e das propriedades interfaciais, que podem ser controladas alterando suas condições de preparação. O tamanho das gotículas é crucial para determinar a sua estabilidade, aparência, propriedades reológicas e biodisponibilidade (Joung et al., 2016)

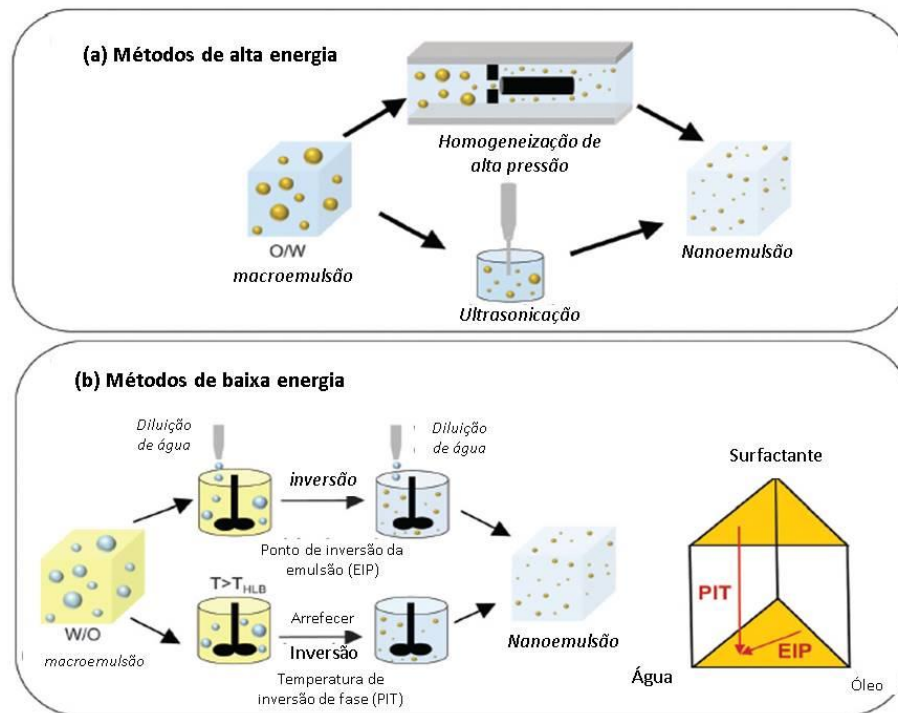


Figura 7. Métodos de formação de nanoemulsão (Fonte: Adaptado de Gupta et al., 2016).

As propriedades das substâncias que compõem o sistema químico da emulsão influenciam diretamente o comportamento das fases, assim como a sua capacidade de solubilização de compostos adicionados. A estrutura e propriedades da fase lipídica apresentam variação principalmente devido ao tamanho da cadeia e grau de instauração do triacilglicerol utilizado (componentes comumente utilizados como fase “óleo”). A temperatura influencia também o processo de formação das microemulsões. Adicionalmente, é necessário que estas sejam estáveis para certas gamas de temperatura, já que os alimentos ou bebidas precisam de ser estáveis à temperatura de armazenamento. Também a natureza e a concentração do surfactante e co-surfactante utilizados influenciam essa estabilidade (Fasolin, 2013).

A formulação de emulsões com corantes naturais constitui também uma alternativa para otimizar a aplicação destes na área alimentar, melhorando a sua solubilização e estabilidade no meio.

2.4.3. Técnica de preparação de nanopartículas por dispersão sólida

O método de dispersão sólida foi utilizado originalmente para melhorar as propriedades de dissolução e a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água,

dispersando-os em portadores solúveis em água (Giri et al., 2012). Na produção de nanopartículas por dispersão sólida uma mistura de encapsulante (com característica hidrofílica, como a poli(vinil-pirrolidona)) e o composto bioativo a ser encapsulado (com característica hidrofóbica) são solubilizados em um solvente orgânico comum, e então a mistura é submetida à sonificação, que induz à interação entre as moléculas encapsulante e encapsulado, por ligações de hidrogênio (Kavaras et al., 2006) sendo então o solvente evaporado ao final do processo (Silva et al., 2017).

A preparação destes sistemas pressupõe a presença de interações intermoleculares entre o fármaco e o veículo polimérico para evitar a aglomeração de fármacos e a recristalização ou a formação de formas metaestáveis. Essas interações podem ser caracterizadas como fatores críticos para as propriedades físico-químicas dos sistemas resultantes (Kavaras et al., 2006). Este efeito aumenta a compatibilidade ou a miscibilidade entre os materiais usados, uma vez que a ligação ao hidrogênio induz uma contribuição entusiasta negativa e favorável à energia livre de Gibbs de mistura (Kanvas et al., 2005).

A poli(vinil pirrolidona) (PVP) é um polímero não-tóxico amplamente aplicado na produção de micro e nanopartículas. Na Figura 8 temos sua molécula que possui uma porção fortemente hidrofílica, composta pela fração pirrolidona, e também uma região hidrofóbica, na qual se encontra o grupo alquila. Essas características tornam o PVP um estabilizante eficaz, capaz de evitar a aglomeração de partículas em fase aquosa. Isso porque suas cadeias carbônicas hidrofóbicas se repelem, resultando no distanciamento das partículas e fazendo com que a dispersão coloidal se mantenha estável. O PVP é solubilizado com facilidade em água ou outro solvente não aquoso, devido ao seu caráter anfifílico (Koczur et al., 2015). Seu uso como encapsulante de compostos bioativos e nutracêuticos, como a curcumina, pode ser observado em diversos estudos recentes: Paradkar et al. (2004), Karavas et al. (2006), Kaewnopparat et al. (2009), Wu et al., (2009), Frizon et al., (2013), Kumavat et al. (2013) e Martins et al. (2013).

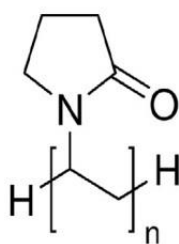


Figura 8. Estrutura monomérica do poli(vinil-pirrolidona) (Fonte: Gupta et al., (2015)).

2.4.4. Revisão bibliográfica sobre a utilização de micro/nanoencapsulação e micro/nano emulsões no campo dos corantes alimentares

Na literatura existem vários estudos que utilizam estas técnicas para melhorar a solubilidade de corantes promovendo assim a sua estabilização quando aplicados em matrizes alimentares. A Tabela 3 reúne um conjunto de exemplos onde estas estratégias são utilizadas.

Tabela 3. Exemplos de técnicas de estabilização/solubilização no campo dos corantes alimentares

Corante	Cor	Método de estabilização/solubilização	Referências
Antocianina (E163)	Varição de laranja, vermelho, púrpura e azul;	- Encapsulação do corante com maltodextrina e auxílio de micro-ondas, para incorporação em emulsão A/O;	Zaidel et al., (2014).
Betalaina (E162)	Varição de vermelho e amarelo;	- Dupla emulsão água-em-óleo-em-água através de misturador de alta velocidade; - Microencapsulação do corante com maltodextrina pouco cristalizada e goma arábica, através da técnica spray-dryer;	- Kaimainen et al., (2015); - Janiszeuska, (2014).
Curcumina (E100)	Varição de amarelo e laranja;	- Nanoemulsão do corante revestido com quitosana, obtida através de ultrasonicação; - Emulsão óleo-em-água contendo o corante através de um microfluidizador/homogeneizador de alta pressão; - Complexo do corante com β -ciclodextrina, através de co-precipitação liofilização e método de evaporação de solvente; - Nanopartículas contendo o corante, revestidas com quitosana, através de nanoprecipitação/ método de substituição de sol vente.	- Li et al., (2016); - Zou et al., (2015)/Ma et al., (2017); - Mangolim et al., (2014); - Mazzarino et al., (2012).
Luteína (E161b)	Amarelo	- Emulsão óleo-em-água contendo corante através de microfluidizador;	- Pardo-Davidov et al., (2016).

2.4.5. Revisão bibliográfica sobre a utilização de nanopartículas produzidas por dispersão sólida no campo dos corantes alimentares

Praticamente não se encontram trabalhos com aplicação de nanopartículas sólidas produzidas por dispersão sólida em alimentos. Mas citando mais alguns exemplos desta técnica, temos autores como: Chuah et al. (2014) produziram nanopartículas contendo curcumina a partir de extrusão por fusão realizada por extrusora de parafuso co-rotativa; Li et al. (2013) produziram dispersões sólidas através de técnica spray-dryer e Li et al. (2015) através de liofilização, após agitação e evaporação do solvente.

Alguns trabalhos relatam a nanoencapsulação da curcumina a partir da técnica de dispersão sólida e evidenciam o aumento da solubilidade e da taxa de dissolução das nanopartículas produzidas em comparação ao composto *in natura*. Paradkar et al. (2004) prepararam dispersões sólidas de curcumina em PVP, em diferentes proporções, por *spray drying*, com o intuito de melhorar sua dissolução em meio ácido. Seus resultados demonstraram que as dispersões sólidas com razões de curcumina e PVP de 1:7 e 1:10 apresentaram dissolução completa em ácido clorídrico 0,1N após 30 minutos de análise, enquanto a curcumina pura obteve um percentual de liberação menor que 10% ao fim de 90 minutos. Kaewnopparat et al. (2009) produziram dispersões sólidas de curcumina em PVP pelo método de evaporação de solvente e realizaram estudos de solubilidade e dissolução das partículas obtidas, de suas misturas físicas e do composto puro em dois meios: fluido gástrico simulado sem pepsina e fluido intestinal simulado sem pancreatina. Os resultados comprovaram o aumento da solubilidade das dispersões sólidas nos dois meios testados em comparação à curcumina pura, sendo este aumento proporcional à quantidade de PVP na formulação. O mesmo ocorreu nas análises de dissolução, nas quais a curcumina pura apresentou uma liberação menor que 1% em 60 minutos, enquanto suas dispersões sólidas exibiram dissolução completa nos dois fluidos em aproximadamente 15 minutos. Martins et al. (2013) elaboraram micropartículas de pigmentos curcuminóides em PVP pela técnica de dispersão sólida e observaram um aumento na solubilidade das micropartículas em comparação aos pigmentos puros da ordem de 100 vezes (21,30 µg/mL e 0,22 µg/mL, respectivamente).

3. Material e Métodos

3.1. Amostras de curcumina

3.1.1. Curcumina em pó (grau de pureza 65%)

A curcumina em pó usada neste trabalho é comercializada como Curcumin C1386 pela Sigma-Aldrich Brasil. Tem um grau de pureza de 65%. Apresenta coloração alaranjada, é isenta de modificações e é insolúvel em água. Esta forma vai ser designada no trabalho por PC.

3.1.2. Curcumina dispersável em água

A curcumina dispersável em água é comercializada pela CHR Hansen como Vegex Tumeric WS5. Consiste numa mistura do corante curcumina (E100, 4,75-5,25%) com polisorbato 80 (E433, aproximadamente 75%) e propilenoglicol (E1520, aproximadamente 19%). Apresenta-se como um líquido viscoso com coloração que varia do alaranjado ao castanho. É solúvel em água. Esta forma vai ser designada no trabalho por DC.

3.1.3. Curcumina nanoencapsulada por dispersão sólida

A amostra nanoencapsulada é composta pela curcumina em pó (grau de pureza 65%) e PVP (polivinilpirrolidona). É obtida através do processo de dissolução de solvente comum (Karavas et al. (2006); Miranda et al. (2016)) e apresenta uma coloração alaranjada a vermelho. Para a sua preparação, realizada no grupo da UTFPR (Campus Campo Mourão), utilizou-se o seguinte procedimento: inicialmente, 100 mg de PVP (E1201), 10 mg do corante (E100) e 10 mg do estabilizante Tween 80 (E433), foram dissolvidos em etanol sob agitação. A mistura obtida foi levada a um ultrassom (Fischer Scientific, modelo 120, ponteira de 1/8") e submetida a ciclos de 30 s com aplicação do ultrassom e 10 s de pausa durante um período total de 15 min a uma potência de 150 Watts. Durante a sonificação a temperatura esteve controlada por um banho a 25°C. Seguidamente evaporou-se o solvente em estufa, onde passou quinze minutos sob efeito de ultrassom e, em seguida, evaporou-se o solvente em estufa de convecção a 40°C até atingir massa constante obtendo-se um filme/matriz que por ação mecânica (moagem com pistilo e almofariz) deu origem às nanopartículas. O teor teórico de curcumina é de $8,33 \times 10^{-2}$ mg/mg de sólidos (equivalente a 8,3% m/m). Devido à modificação efetuada estas nanopartículas são hidrofílicas. Esta amostra foi caracterizada por *Laser Diffraction* (LD) (Malvern, Mastersizer 3000 Hydro MV), para

determinar tamanho da partícula (foi utilizado n-hexano como meio líquido de dispersão), e também analisada termicamente (TG 209 – F3, Netzsch) sendo pesado aproximadamente 8 mg de cada componente em um cadinho de alumina (polímero PVP, curcumina nanoencapsulada e curcumina em pó), com início em 20°C chegando até 710°C, sob fluxo de azoto . Esta forma vai ser designada no trabalho por NC.

3.2.Avaliação de propriedades bioativas

3.2.1. Atividade antioxidante

Foram realizados quatro ensaios para avaliar a atividade antioxidante das diferentes formulações do corante. As amostras em pó, emulsionada e nanoencapsulada foram dissolvidas em metanol na concentração 1 mg/mL, sendo submetidas a sucessivas diluições até à concentração de 0,49 µg/mL. Os resultados foram expressos em valores de EC₅₀, ou seja, a concentração da amostra que providencia (50%) da atividade antioxidante ou a absorvância de 0,5 na avaliação do poder redutor (Sobral, 2015).

a) Efeito captador de radicais livres (DPPH)

Esta metodologia foi realizada em triplicata utilizando uma placa de 96 poços, onde a reação consiste na adição de 30 µL de cada uma das soluções das amostras seguida de 270 µL de solução metanólica de DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo) (6x10⁻⁵ M). A mistura foi deixada 60 min em repouso no escuro. A redução do radical de DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm em um leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.m Winooski, VT, EUA). A atividade captadora de radicais (RSA) foi calculada como percentagem de descoloração da solução de DPPH, utilizando a fórmula:

$$\%RSA = \frac{(ADPPH - AS)}{ADPPH} \times 100$$

Onde, A_S é a absorvância da solução na presença da amostra numa determinada concentração e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de amostra que leva a 50% da atividade captadora de radicais (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de percentagem RSA em função da concentração da amostra. Utilizou-se o trolox como padrão (Sobral, 2015).

b) Poder redutor

Esta metodologia foi realizada em duplicata utilizando eppendorfs (2 mL), onde foi adicionado 0,5 mL de cada uma das soluções das amostras seguido de 0,5 mL de solução-tampão de fosfato de sódio (pH= 6,6; 200mM) juntamente com 0,5 mL de ferricianeto de potássio (1% w/v, 100mg/10mL). As misturas foram incubadas a 50°C durante 20 min. Após incubação, foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético 10%. Retirou-se 0,8 mL do sobrenadante para uma microplaca de 48 poços, adicionando 0,8 mL de água destilada e 160 µL de cloreto de ferro (0,1% w/v, 1mg/mL). Utilizando o leitor de microplacas citado anteriormente, mediram-se as absorvâncias a 690 nm. A concentração de amostra que fornece 0,5 de absorvância (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração. Utilizou-se o trolox como padrão (Sobral, 2015).

c) Inibição da descoloração do β-caroteno

Para esta metodologia inicialmente preparou-se uma solução de β-caroteno (2mg) em 10 mL de clorofórmio. Transferiram-se 2 mL desta solução para um balão, que por um evaporador rotativo a 40°C evaporou todo clorofórmio. Adicionaram-se 40 mg de ácido linoleico, 400 mg do emulsificante Tween 80 juntamente com 100 mL de água destilada, agitando vigorosamente a mistura. Foi transferido 4,8 mL da emulsão para tubos de ensaio que continham 0,2 mL das diferentes concentrações das amostras, que após agitação foi feita leitura das absorvâncias a 470 nm no tempo zero. Os tubos foram incubados num banho-maria a 50 °C com agitação durante 2h, seguido da leitura das absorvâncias a 470 nm no tempo dois. A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Descoloração} = \frac{A_{470T2}}{A_{470T0}} \times 100$$

Onde A_{470T0} é a absorvância inicial e A_{470T2} é a absorvância do β-caroteno após 2h de ensaio. A concentração de amostra que leva a 50% de atividade antioxidante (EC₅₀) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β-caroteno em função da concentração. Utilizou-se o trolox como padrão (Sobral, 2015).

d) Inibição da peroxidação lipídica – TBARS

Inicialmente pesou-se uma determinada massa de tecido cerebral de porco para um tubo de falcon, ao qual foi adicionado tampão tris-HCl (2:1, *v:m*; 20 mM, pH=7,4, conservado em frigorífico) e em seguida agitado. Centrifugou-se a suspensão a 3500 rpm durante 10 min. Em duplicata de tubos de ensaio foi adicionado 200 µL de cada solução das amostras, 100 µL de ácido ascórbico, 100 µL de sulfato de ferro e 100 µL de sobrenadante da suspensão do homogenizado cerebral, sendo incubados em banho-maria a 37,5°C durante 1h. Adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético (28%) e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (2%), voltando a ser aquecido a 80°C durante 20 min. Após este tempo, centrifugou-se a 3000 rpm por 5 min para remoção de proteínas. A intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA) (MDA-TBA) do sobrenadante foi medida através da absorvância a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (% inibição) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde A é a absorvância do controlo e B a absorvância da solução com a amostra. A concentração de amostra que leva a 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de amostra. Utilizou-se o trolox como padrão (Sobral, 2015).

3.2.2. Atividade anti-inflamatória

Inicialmente 8 mg das amostras de curcumina nanoencapsulada e dispersável em água foram dissolvidas em água, enquanto que a curcumina em pó (pureza 65%) foi dissolvida em dimetilsulfóxido:água (DMSO:água, 50:50, *v/v*), obtendo soluções com concentrações finais de 8 mg/mL que foram submetidas a quatro diluições sucessivas em duplicata numa gama de concentrações de 400 a 6,25 µg/mL. A atividade anti-inflamatória foi avaliada seguindo o procedimento descrito por Sobral (2015). Em resumo, a linha celular de macrófagos de rato RAW264.7 foi cultivada em meio DMEM suplementado com soro fetal de bovino a 10% inativado pelo calor e glutamina a 37°C sob 5% de CO₂, em ar umidificado. Para cada análise, as células foram desprendidas com ajuda de um raspador de células. A densidade das células foi 5x10⁵ células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 1% de acordo com os testes de exclusão com o corante azul de tripano. As células foram colocadas em placas de 96 poços, contendo

assim cada poço 150.000 células e deixou-se a placa uma noite dentro da câmara de incubação. Em seguida, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de cada uma das amostras durante 1h. A dexametasona (50n μ M) foi usada como controlo positivo na experiência. O passo seguinte foi a estimulação com lipopolissacarído (LPS) (1 μ g/mL) durante 18h. Também foi avaliado o efeito das amostras testadas na ausência de LPS, de modo a observar se elas induziam mudanças nos níveis de NO (óxido nítrico) basais. No controlo negativo não foi adicionado LPS. Todas as amostras e LPS foram dissolvidas em DMEM suplementado. Para determinar a concentração de NO, foi utilizado um *kit* de reagentes de Griess que continha sulfanilamida, di-hidrocloreto de N-(1-nafti)etilenediamina (NED) e uma solução nítrica. Foram transferidos 100 μ L do sobrenadante da cultura de células para uma placa em duplicado, misturando-lhe a sulfanilamida a solução de NED, respetivamente, e deixando repousar 5 a 10 minutos cada, à temperatura ambiente. A produção de nitrito foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm, no leitor de placas já referido anteriormente, e foi comparada com a curva de calibração padrão. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da produção de NO em comparação com o controlo negativo (100%) e os valores de EC₅₀ (concentração da amostra que providencia 50% da inibição da produção de NO), também foram estimados.

3.2.3. Atividade citotóxica em células tumorais e não tumorais

a) Células tumorais

Para esta análise em células tumorais utilizaram-se as soluções descritas na seção 3.2.2. Preparou-se as seguintes culturas de células tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e HeLa (carcinoma cervical) todas obtidas no DSMZ-Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ECACC (European Collection of Cell Cultures). As células foram mantidas rotineiramente como cultura de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de FBS inativado pelo calor e glutamina a 2mM, a 37°C, numa incubadora de ar umidificado contendo 5% de CO₂. Para avaliar a citotoxicidade, realizou-se o ensaio de Sulforodamina B (SRB). Para isso, após preparadas e realizadas a contagem de células em microscópio, as linhas celulares foram colocadas em microplacas de 96 poços (190 μ L) nos poços com as diluições da amostra (10 μ L) e incubadas durante 48h. Após o período de incubação, as células aderentes foram fixadas por adição de ácido tricloroacético 10% (100 μ L) e

incubadas durante 1h a 4°C. Após esse tempo, as microplacas foram lavadas com água e secas, para que em seguida adicionasse 100 µL de SRB (0 a 7%) e incubou-se por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, removeu-se a SRB não aderida utilizando como solução de lavagem ácido acético a 1% e foram secas. A SRB aderida foi solubilizada com Tris 10mM (200 µL) e a absorvância foi lida a um comprimento de onda de 540 nm no leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% do crescimento celular). A elipticina foi usada como padrão (Rudke, 2016).

b) Células não tumorais

Para analisar a atividade citotóxica em células não tumorais também se utilizaram as soluções descritas na seção 3.2.2. Preparou-se uma cultura de células a partir de fígado de porco, que se designou por PLP2 (porcine liver primary culture: cultura primária de células de fígado de porco). Os tecidos de fígado foram lavados com uma solução salina equilibrada de Hank (HBSS) e divididos em explantes de 1x1 mm³. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25 cm² em DMEM suplementado com 10% de FBS, 2 mM de aminoácidos não essenciais e 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, e incubados a 37°C com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. O meio foi mudado a cada dois dias e o crescimento das células foi acompanhado com um microscópio de contraste de fase. A citotoxicidade foi analisada através do mesmo procedimento e ensaio de SRB citado no item (a). Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% do crescimento celular na cultura primária PLP2) e utilizou-se elipticina como padrão (Rudke, 2016).

3.2.4. Atividade antibacteriana

Para esta metodologia foram utilizadas quatro bactérias Gram positivo (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocitogenes*, *Staphylococcus aureus* sensível à metilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA)) e seis Gram negativo (*Eschericia coli*, *Eschericia coli* produtora de β-lactamases, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*). Inicialmente, 48h antes da análise, fez-se a repicagem das bactérias para meio fresco seguida de incubação a 37°C durante 24h e posterior repicagem para meio fresco novamente e incubação a 37°C durante mais 24h,

garantindo que as bactérias se encontrariam na fase exponencial de crescimento. Para a preparação das amostras pesou-se 10 mg de cada formulação do corante, sendo a curcumina em pó insolúvel em água foi necessário sua solubilização em 500 µL de DMSO + 500 µL de água, seguida de adição de 1 mL de água (5 mg/mL, 25% DMSO) e diluída (com meio e bactéria) por 5 vezes (1 mg/mL, 5%DMSO); as demais amostras foram dissolvidas no meio de cultura (1 mg/mL).

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi realizada pelo método de microdiluição com o ensaio colorimétrico de cloreto p-iodonitrotetrazólio (INT). Inicialmente, preparou-se a solução das bactérias ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) com respectivos meios, para adicionar 100 µL na microplaca de 96 poços. Nos primeiros poços foram adicionados 200 µL das amostras com concentração 1mg/mL, com a pipeta multicanal pipetou-se 100 µL realizando as diluições sucessivas. Foi feito um controlo (meio de cultura+bactéria; 480 µL+20 µL). Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 18-24h. As MICs das amostras foram determinadas após adição de 40 µL de INT (0,2 mg/mL) e incubação a 37°C durante 1h para analisar se houve mudança de cor. Quando não se regista alteração de cor considera-se que a bactéria foi inibida (a coloração rosa representa bactéria viável). A MIC foi definida como a concentração da amostra mais baixa que impediu esta alteração e exibiu inibição completa do crescimento bacteriano (Svobodova et al., 2017).

3.3. Incorporação em iogurtes para fins corantes

3.3.1. Preparação dos iogurtes

Os iogurtes naturais (de agricultura biológica) base foram adquiridos num supermercado local na cidade de Bragança – Portugal, com a seguinte informação nutricional por 100 g do produto: energia: 316 kJ/74 kcal; lípidos: 3,8 g, dos quais saturados: 2,4 g; hidratos de carbono: 4,7g, dos quais açúcares: 4,7 g; proteínas: 5 g; sal: 0,15 g. A incorporação das formulações do corante foi efetuada diretamente, respeitando os limites estabelecidos pela legislação e dose diária aceitável, e tendo em vista a coloração pretendida (tonalidades agradáveis e naturais adequadas ao produto de aplicação) (Tabela 4). O iogurte com o corante foi homogeneizado através de ação mecânica até dissolução e uniformidade da cor. Utilizou-se como controlo iogurte sem adição de corante. A estabilidade da cor e o valor nutricional dos produtos finais foram analisadas em três tempos diferentes: 0, 7 e 15 dias de armazenamento a 4°C.

Tabela 4. Informação da quantidade de corante incorporado no iogurte.

Massa de iogurte	Massa de curcumina dispersável em água (DC)	Massa de curcumina em pó (65% pureza) (PC)	Massa de curcumina nanoencapsulada (NC)
70 g	5,5 mg	50,0 mg	7,0 mg

3.3.2. Avaliação da cor

A monitorização da capacidade corante das formulações e uniformidade da mesma no produto final foi realizada através de um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Japão), equipamento projetado para medir e avaliar a cor. Utilizou-se 8 mm de abertura do diafragma para obter os valores CIE L*, a* e b* (com o auxílio do programa EasyRGB).

3.3.3. Determinação de macronutrientes e valor energético

As amostras foram analisadas após liofilização quanto ao teor em cinzas, proteínas, gordura e hidratos de carbono, seguindo procedimentos oficiais de análise de alimentos (A.O.A.C., 2016). A diferença da massa entre o produto fresco e seco permitiu determinar a humidade. As cinzas foram determinadas por incineração de determinada massa da amostra a 600°C. O teor de proteínas foi determinado pelo método macro-Kjeldahl através de equipamento (model Pro-nitro M Kjeldhal Steam Distillation System, Barcelona Spain), utilizou-se o fator 6,38 para converter o teor de azoto (N) em proteína total. A gordura foi determinada após extração em Soxhlet com éter de petróleo. Os hidratos de carbono totais foram obtidos por diferença. Sendo a energia calculada a partir da equação:

$$E = 4 \times (P + HC) + 9 \times G$$

Onde E representa a energia (kcal/100 g), P a massa de proteína, HC a massa de hidratos de carbono e G a massa de gordura, todas expressas em g.

3.3.4. Perfis de açúcares livres e ácidos gordos

Para os açúcares livres, inicialmente, utilizou-se a massa da amostra após a extração de gordura, preparando-a para ser analisada por HPLC (cromatografia líquida

de alta eficiência). Utilizou-se um cromatógrafo constituído por um sistema integrado composto por uma bomba (Knaer, sistema Smartiline 1000, Berlin, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartiline manager 5000) e um injetor automático (AS-2057 Jasco, Easton, MD, EUA), acoplado a um detector de índice de refração (IR) (Knauer Smartiline 2300). A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (5 µm, de 250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, Knauer) operando a 35°C. A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) a um fluxo de 1 mL/min. Os açúcares foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos nas amostras com os picos padrões. A quantificação baseou-se no sinal do detector de índice de refração aplicando o método do padrão interno (melezitose). Os dados obtidos foram analisados usando o *software* Clarity 2.4 (DataApex) (Rudke, 2016).

Para os ácidos gordos, a amostra de gordura bruta obtida por extração Soxhlet passou pela metodologia de derivatização para ser analisado por HPLC. Utilizou-se um cromatógrafo gasoso (DANI 1000, Contone, Suíça) equipado com um injetor *split/splitless* e um detector de ionização de chama (GC-FID a 260°C), uma coluna Macherey-Nagel (Düren, Alemanha) (50% cianopropilmetilo, 50% fenilmetilpolisiloxano 30 m x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,25 mm d_f). O forno teve a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial de 50°C, mantida durante 2 minutos, rampa de 30°C/min até 125°C, rampa de 5°C/min até 160°C, rampa de 20°C/min até 180°C, rampa de 3°C/min até 200°C, rampa de 20°C/min até 220°C e mantida durante 15min. O fluxo de gás de arraste (hidrogênio) foi 4 mL/min (0,61 bar), medido a 50°C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250°C. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os picos padrões (FAME). Os resultados foram registrados e processados usando o *software* CSW 1.7 (DataApex1, Praga, República Checa) (Rudke, 2016).

3.3.5. Monitorização da curcumina

Para realizar a metodologia de quantificação de curcumina, inicialmente, foram feitos testes para a escolha do melhor solvente e determinar qual o comprimento de onda com maior absorvância. Foi utilizado para todas as análises o solvente metanol. Segundo Lestari & Indrayanto (2014) o máximo de absorção de curcumina em metanol é cerca de 420 nm, e a solução apresentou uma cor amarelo brilhante devido à sua excitação π - π^* . Foi feita a monitorização do corante antes e após a incorporação no

iogurte. Depois de incorporado, a amostra passou por uma extração com solvente metanol, onde o extrato foi quantificado através de uma técnica espectrofotométrica (AnalytikJena, Jena, Germany) com as leituras feitas a 420 nm.

3.3.6. Análise estatística

Foram utilizadas duas repetições das amostras com respectivos número de réplicas de cada análise para cada leitura de concentração nos ensaios. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste HSD de Tukey com $p = 0,05$. Para cada parâmetro com apenas dois valores disponíveis, foi aplicado um teste t de Student para determinar a diferença significativa entre as amostras correspondentes, com $p = 0,05$. Quando o valor p foi inferior a 0,05, foram consideradas diferenças significativas entre as amostras. As análises foram realizadas com o IBM SPSS Statistics, versão 23.0. (IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

3.4. Desenvolvimento de formulações hidrofílicas de curcumina

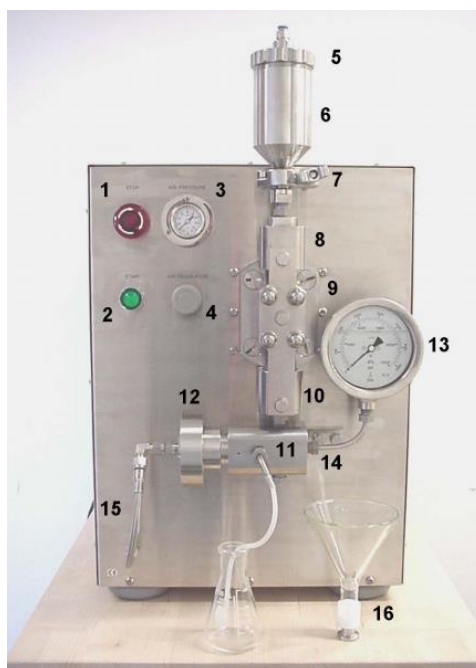
3.4.1. Sistema químico

No presente trabalho foram desenvolvidas formulações hidrofílicas de curcumina tendo por base a preparação de emulsões óleo-em-água. O sistema químico base utilizado compreendeu o uso de um óleo de grau alimentar (azeite refinado e Miglyol 812), água ultrapura e um surfactante (Tween 20, HLB 16,7).

Inicialmente fez-se um estudo, sem adição de corante, utilizando os dois óleos alimentares selecionados e Tween 20 (num conteúdo de 30% relativamente à fase óleo). O estudo compreendeu variar a razão óleo/água (O/A) nas seguintes proporções: 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50, visando maximizar o volume da fase óleo (fase onde será incorporado o corante, portanto correspondendo a maximizar a quantidade de corante na emulsão). Adicionalmente estudou-se o efeito de aplicação de 3 e 6 ciclos na preparação das emulsões através do homogeneizador de alta pressão (ver descrição da tecnologia no ponto 3.4.2.). Dado que a preparação da emulsão com razão O/A de 50/50 decorreu com sucesso, esta foi selecionada para fazer os estudos posteriores de incorporação do corante.

3.4.2. Tecnologia de emulsificação de alta pressão

Na preparação das amostras utilizou-se a tecnologia de emulsificação de alta pressão. Neste tipo de tecnologia, a mistura de óleo e água é submetida a um fluxo turbulento e a taxas de cisalhamento elevadas. A turbulência é o mecanismo predominante, que leva à ruptura da fase dispersa em pequenas gotículas. O movimento relativo entre as gotas resulta na sua colisão, levando à sua coalescência. Geralmente, existe um equilíbrio dinâmico entre ruptura e coalescência. A vida útil, bem como a textura da emulsão, depende muito da distribuição do tamanho das gotículas formadas, que pode ser ajustada controlando durante o processo (Floury et al., 2000). Esta técnica é recomendada para reduzir o tamanho das partículas de forma eficiente e com alta reprodutibilidade, permitindo processar suspensões muito concentradas. Tem sido amplamente aplicada na preparação de emulsão estáveis, apresentando as seguintes vantagens: simplicidade, alta eficiência e dispensa de uso de solventes orgânicos (Donsi et al., 2010). O equipamento utilizado neste trabalho corresponde a um emulsificador do tipo EmulsiFlex-C3 da Avestin (Figura 9).



Onde:

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1-Botão OFF | 9-Corpo da bomba |
| 2-Botão ON | 10-Válvula de retenção de saída |
| 3-Manómetro de ar / gás | 11-Válvula de homogeneização |
| 4-Regulador de pressão de ar / gás | 12-Cilindro de controlo pneumático |
| 5-Tampa do reservatório de amostra | 13-Manómetro de homogeneização |
| 6-Reservatório da amostra | 14-Encaixe da válvula do manómetro |
| 7-Ligação do reservatório à válvula de entrada | 15-Sistema de fornecimento do gás |
| 8-Válvula de retenção de entrada | 16-Cilindro de amostra |

Figura 9. Homogeneizador de alta pressão utilizado na preparação das nanoemulsões (Fonte: Manual AVESTIN, Inc).

Na Figura 10 mostra-se esquematicamente o funcionamento do equipamento, onde uma bomba de alta pressão (B) empurra o produto através de uma válvula de homogeneização ajustável (C). Pode ser recolhido no reservatório E ou reciclado através do reservatório A através do circuito normal ou passando através de um permutador de calor (D) (acessório opcional).

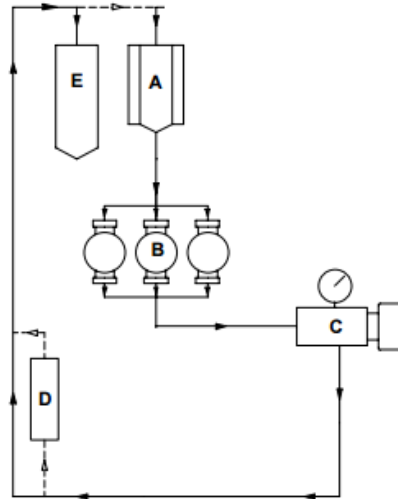


Figura 10. Esquema de funcionamento do homogeneizador de alta pressão (Fonte: Adaptado de Manual AVESTIN, Inc).

O procedimento para a preparação das emulsões foi efetuado em duas etapas, tendo o volume total da emulsão sido estabelecido em 20 ml:

- I. A primeira etapa correspondeu à preparação da emulsão O/A primária, através da mistura do Tween 20 na fase aquosa sob agitação magnética. Seguidamente, adicionou-se o óleo e procedeu-se à preparação da emulsão utilizando o homogeneizador CAT Unidrive X, durante 3 minutos e utilizando uma velocidade de homogeneização de 11 000 rpm. Com base neste estudo seleccionou-se a razão O/A 50/50 para a preparação das emulsões contendo curcumina. A curcumina foi dissolvida na fase óleo a uma temperatura de 60°C, sob agitação na etapa anterior à preparação da emulsão primária. Seguidamente procedeu-se à preparação da emulsão.
- II. A segunda etapa correspondeu à redução do tamanho de gotícula da emulsão primária, com recurso ao homogeneizador de alta pressão. As emulsões foram submetidas a 3 e 6 ciclos de passagem, utilizando uma pressão de 20000 psi. No final de cada conjunto de ciclos (3 e 6), recolheram-se amostras de aproximadamente 10 ml para caracterização posterior.

A Tabela 5 contém os dados sobre os registos de preparação das emulsões.

Tabela 5. Registo dos ensaios de preparação das emulsões. Os ensaios são designados por razão O/A, o óleo utilizado e teores dos componentes.

Ensaio	Fase óleo	V _{óleo} (mL)	V _{água} (mL)	V _{Tween} (mL)
AR20/A80	Azeite refinado	4.0	16.0	1.2
AR30/A70	Azeite refinado	6.0	14.0	1.8
AR40/A60	Azeite refinado	8.0	12.0	2.4
AR50/A50	Azeite refinado	10.0	10.0	3.0
M20/A80	Miglyol 812	4.0	16.0	1.2
M30/A70	Miglyol 812	6.0	14.0	1.8
M40/A60	Miglyol 812	8.0	12.0	2.4
M50/A50	Miglyol 812	10.0	10.0	3.0

3.4.3. Caracterização das emulsões produzidas

As emulsões produzidas foram analisadas observadas semanalmente de forma a verificar a perda de estabilidade (aparecimento de fases distintas e heterogeneidade) A morfologia das emulsões foi analisada por microscopia ótica, utilizando o microscópio ótico Nikon Eclipse 50i, equipado com uma câmara Nikon Digital Sight para aquisição de imagem. Adicionalmente, o pH das emulsões foi medido utilizando um elétrodo de pH em vidro WTW.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização da curcumina nanoencapsulada por dispersão sólida

A curcumina nanoencapsulada foi caracterizada relativamente ao tamanho médio de partícula e ao perfil de degradação térmica.

No que respeita ao tamanho de partícula da curcumina nanoencapsulada, os resultados da análise efetuada estão registados no Anexo A. A técnica de difração de laser mede a intensidade da luz dispersa por um grupo de partículas numa variedade de ângulos. Os resultados são baseados na dispersão observada para um conjunto de partículas com volume esférico equivalente ao da amostra analisada, sendo apresentados como diâmetros esféricos equivalentes de uma distribuição de volume. A distribuição em número é calculada a partir da distribuição em volume. Adicionalmente, o equipamento utilizado nesta análise requer a dispersão prévia da amostra num solvente, sob agitação forte e, caso seja necessário, a utilização de ultrassons. Para além disto, o solvente deverá ser selecionado tendo em conta a insolubilidade da amostra. Nesta análise foi utilizado o n-hexano como solvente. Devido à dificuldade de dispersão adequada desta amostra, foram efetuadas várias medições utilizando diferentes velocidades de agitação e utilização de ultrassons. Ao longo destas, foi possível verificar que a utilização de ultrassons favoreceu a degradação das nanocápsulas, resultando na libertação da curcumina. Os resultados registados no Anexo A correspondem à utilização de uma velocidade de agitação de 2500 rpm durante 10 minutos, antes de iniciar a análise. Foram obtidas as distribuições de tamanho de partícula em volume e em número, os respetivos percentis D_{10} , D_{50} e D_{90} e os tamanhos médios de partícula. No entanto, os resultados obtidos mostram a presença de aglomerados devido à má dispersão da amostra, o que indica que esta técnica não é a mais adequada para a análise deste tipo de amostras.

No que respeita à análise do perfil de degradação térmico da curcumina nanoencapsulada, os perfis obtidos são apresentados na Figura 11.

A determinação da variação da massa para uma substância em determinados intervalos de temperatura pode ser utilizada para avaliação da estabilidade térmica da amostra, a composição e estabilidade dos compostos intermediários e produto final, comportamento térmico, determinação do teor de umidade e/ou solventes, determinação da temperatura de ebulição e sublimação, determinação da temperatura de decomposição térmica e do teor de cinzas. Ao finalizar o processo térmico regista-se a

curva termogravimétrica (TG) e a curva termogravimétrica derivada (DTG) (esta permite melhor definição de onde se iniciou e finalizou a perda de massa) (Nascimento, 2014). Os resultados da análise termogravimétrica (TG) permitiram verificar que o início da degradação da curcumina ocorre a uma temperatura de 180 °C, enquanto que para a polivinilpirrolidona (PVP), utilizada como material da matriz das nanocápsulas, se inicia a 329 °C. Relativamente ao resíduo final, a PVP apresenta 5,48% de resíduo enquanto que a curcumina tem cerca de 43,5%. A curcumina nanoencapsulada, por sua vez, tem um resíduo de 15,9% e a degradação inicia-se a uma temperatura de 344 °C, sendo superior à da curcumina em pó, o que indica que a sua estabilidade térmica aumentou devido à encapsulação.

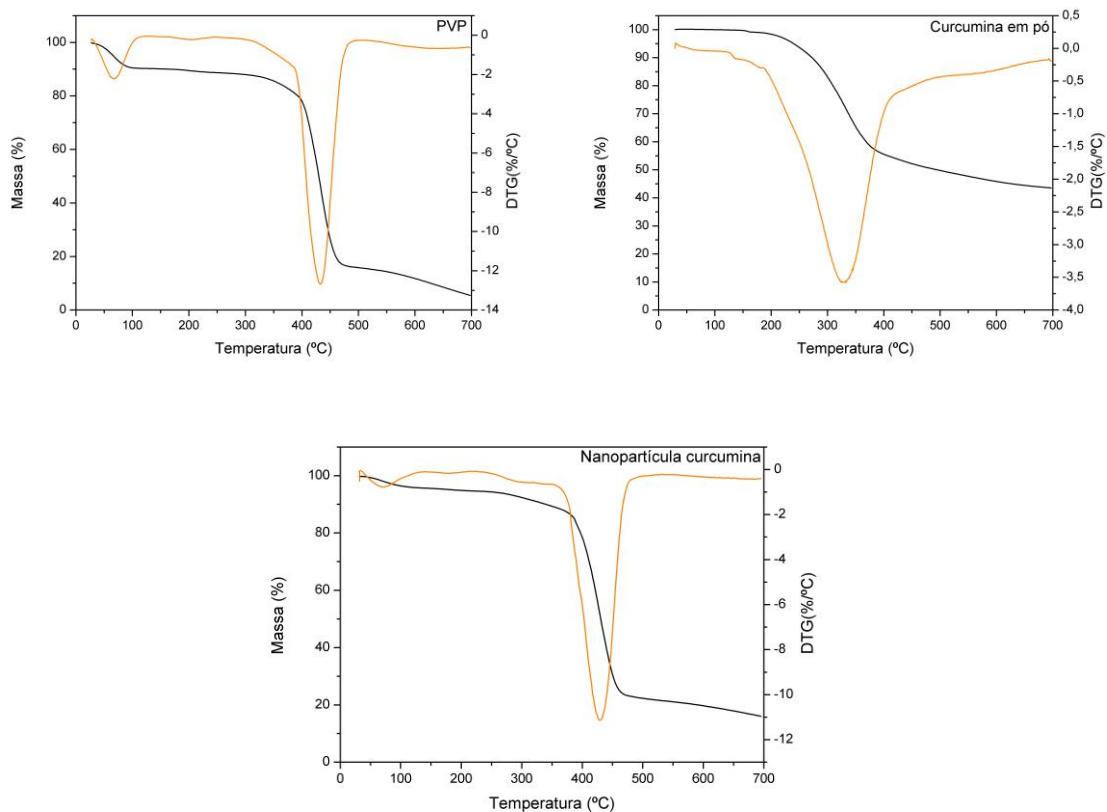


Figura 11. Curvas TG e DTG da polivinilpirrolidona utilizada como material de encapsulação, curcumina em pó e curcumina nanoencapsulada

4.2. Propriedades bioativas das amostras de curcumina

Foram analisadas as propriedades bioativas do corante curcumina (E100) em diferentes formulações, curcumina nanoencapsulada (NC), curcumina dispersável em água (DC) e em pó com pureza 65% (PC) e os resultados são apresentados na Tabela 6.

Foram escolhidos diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante das amostras, de forma a englobar mecanismos distintos. O ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um teste rápido que reflete o potencial de eliminação de radicais livres de compostos com capacidade para ceder elétrons. No poder redutor, os iões Fe^{3+} são usados como agentes oxidantes e a deteção de Fe^{2+} é avaliada para estudar antioxidantes capazes de reduzir estes iões através de transferência simples de elétrons. No ensaio de descoloração de β -caroteno, o radical linoleico formado a partir da peroxidação de ácido linoleico a 50°C , ataca as ligações duplas do β -caroteno, o que podem ser prevenido por antioxidantes. O ensaio TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) utiliza biomarcadores de peroxidação lipídica de ácido tiobarbitúrico (TBA) e malonilaldeído (MDA) para avaliar o potencial de antioxidantes que previnem a formação do cromogénio TBA-MDA (Svobodova et al., 2017).

As amostras de curcumina mostraram atividade antioxidante e os resultados foram expressos em valores de EC_{50} , que representam a concentração que promove 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor; assim, valores mais elevados correspondem a um menor potencial antioxidante. A atividade antioxidante das amostras estudadas seguiu a ordem $\text{PC} > \text{NC} > \text{DC}$. Note-se que a curcumina em pó 65% de pureza, apresentou valores próximos do controlo positivo, exceto no ensaio do poder redutor; no caso do ensaio TBARS foi bastante melhor que o Trolox (controlo positivo).

Foram já realizados alguns estudos sobre a atividade antioxidante do corante natural curcumina em diferentes formulações. Por exemplo, Joung et al. (2016) analisaram a redução da oxidação lipídica do leite durante o armazenamento devido à incorporação de nanoemulsão contendo curcumina; Yi et al. (2016), descreveram uma elevada atividade antioxidante da curcumina nanoencapsulada em α -lactoalbumina; segundo Rao & Khanum (2015), a atividade antioxidante da curcumina, eugenol, timol e alguns péptidos resultantes de proteínas hidrolisadas tem sido descrita nomeadamente pela capacidade de neutralizar radicais livres, protegendo o corpo humano de doenças e os alimentos da deterioração através da oxidação lipídica.

Tabela 6. Propriedades antioxidantes e citotóxicas de diferentes formulações do corante curcumina.

	NC	DC	PC	Controlo positivo
Atividade antioxidante (valores EC₅₀; µg/mL)				
DPPH	813±6 ^b	1113±11 ^a	48±2 ^c	41±1
Poder redutor	552±5 ^b	858±4 ^a	46±1 ^c	18±1
B-caroteno	468±6 ^b	691±17 ^a	41±3 ^c	41,7±0,3
TBARS	10,6±0,3 ^b	19,8±0,6 ^a	7,90±0,01 ^c	23±1
Atividade anti-inflamatória (valores EC₅₀; µg/mL)				
Produção de NO	202±5 ^b	244±10 ^a	63±2 ^c	16±1
Atividade citotóxica (valores GI₅₀; µg/mL)				
MCF-7	47±5 ^a	47±2 ^a	29±3 ^b	1,00±0,04
NCI-H460	170±11 ^a	172±2 ^a	48±1 ^b	1,0±0,1
HeLa	90±2 ^a	75±1 ^b	20±1 ^c	2,0±0,1
HepG2	71±7 ^b	153±18 ^a	17±1 ^c	1,0±0,2
PLP2	206±11 ^b	235±13 ^a	89±2 ^c	3±1

*Trolox, dexametasona e elipitina foram utilizados como controlos positivos para atividade antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica, respetivamente. Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre as diferentes formulações de curcumina ($p < 0,05$).

A inflamação é uma resposta biológica complexa envolvendo microvasos, células imunes e mediadores moleculares em resposta a estímulos nocivos (isto é, patógenos, células danificadas e irritadas). O stresse oxidativo é um processo fisiopatológico que se manifesta com a superprodução de espécies reativas de oxigénio e espécies reativas de azoto em resposta a estímulos oxidativos. A curcumina é tradicionalmente conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatórias, podendo aliviar as respostas inflamatórias através de vários mecanismos, que incluem a inibição de citocinas pró-inflamatórias, a adesão e infiltração de macrófagos e a modulação da atividade imunocitária (Jiang et al., 2017).

Na Tabela 6, apresentam-se os valores de EC₅₀ obtidos nos ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória, que representam a concentração responsável por 50% da inibição da produção de óxido nítrico (NO) em comparação com o controlo negativo (100% de produção de NO). Segundo Svobodova et al. (2016), o NO é um mediador pleiotrópico produzido em locais inflamatórios e é usado para determinar a atividade anti-inflamatória em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (lipopolissacárido). Todas as formulações do corante apresentaram atividade anti-inflamatória seguindo a ordem PC>NC>DC.

Analisou-se também a citotoxicidade das amostras em células tumorais e não tumorais. Segundo Fang et al. (2013), a curcumina exibe inibição do crescimento de tumores *in vitro* e *in vivo*, suprime a proliferação celular em várias linhas celulares e inibe a tumorigênese. No presente trabalho, a análise citotóxica foi efetuada em linhas celulares tumorais humanas MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e HeLa (carcinoma cervical), e em culturas primárias de células de fígado de porco (PLP2- não-tumorais). Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (Tabela 6), que representam a concentração que inibiu 50% do crescimento celular. As diferentes formulações revelaram capacidade para inibir o crescimento das células tumorais, segundo a seguinte ordem: PC>NC>DC. No entanto, as amostras em estudo também demonstraram toxicidade para células não-tumorais, na mesma ordem anterior, apesar de em concentrações superiores às necessárias para inibir o crescimento das linhas celulares tumorais. Deve realçar-se o facto de que as amostras de iogurte incorporadas com as diferentes formulações do corante não apresentaram toxicidade para células não tumorais (PLP2, GI₅₀>400 µg/mL).

Existem indícios de que os grupamentos metoxila e hidroxila da curcumina sejam os reponsáveis por sua atividade antimicrobiana. A literatura relata que a curcumina em sua forma *in natura* apresenta atividade antimicrobiana para *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* e *Shigella dysenteriae* (Silva, 2016). Moghadamtousi et al. (2014), realizaram estudos de avaliação da atividade antibacteriana com um extrato aquoso do rizoma de *Curcuma longa* e descreveram concentrações mínimas inibitória (MICs) de 4 a 16 mg/mL e concentrações mínimas bactericidas (MBCs) de 16 a 32 mg/mL contra *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, por exemplo. Na Tabela 7, são apresentados os resultados da atividade antimicrobiana (MICs) das diferentes formulações de curcumina em estudo no presente trabalho. Pode observar-se que todas as bactérias foram inibidas, com exceção de duas Gram-negativo (*Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa*) que foram resistentes à formulação DC. No geral, as bactérias Gram-positivo foram sensíveis a PC com MICs de 0,0625 mg/mL; para NC os valores de MIC foram 0,5 mg/mL e para DC variaram de 0,5 a 1 mg/mL. As bactérias Gram-negativo também foram sensíveis a PC

apresentando MICs de 0,125 a 0,5 mg/mL. As formulações NC e DC foram menos ativas com MICs de 1 mg/mL.

Tabela 7. Atividade antibacteriana de diferentes formulações do corante curcumina.

Bactérias	MIC (mg/mL)		
	NC	DC	PC
Gram-positivo			
MRSA	0,5	0,5	0,0625
MSSA	0,5	0,5	0,0625
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,5	1	0,0625
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,5	1	0,0625
Gram-negativo			
<i>Escherichia coli</i>	1	1	0,125
<i>Escherichia coli</i> ESBL	1	1	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	1	1	0,125
<i>Morganella morganii</i>	1	-	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	-	0,5

MIC = concentração mínima de inibição

ESBL = produtor de β -lactamases

MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MSSA = *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

4.3. Avaliação nutricional, parâmetros de cor e perfil de açúcares livres/ácidos gordos

As diferentes formulações de curcumina foram incorporadas em iogurtes visando avaliar se havia, ou não, alteração no perfil nutricional do produto final, nomeadamente ao nível de macronutrientes, energia, açúcares livres e ácidos gordos. Na Tabela 8 estão representados os perfis nutricionais das amostras de iogurte estudadas. A humidade foi o parâmetro com o valor mais elevado (variando de 81 a 85 g/100 g); os hidratos de carbono apresentaram variação de 5,50 a 6,4 g/100 g, seguidos das proteínas (5,0 a 5,4 g/100 g) e das gorduras (3,5 a 3,9 g/100 g). Note-se que não houve diferença significativa entre as amostras no decorrer do tempo e também comparando com o perfil nutricional expresso no rótulo da amostra controlo (citado no item 3.3.1). Considera-se

isto um aspecto positivo, pois a função do corante é apenas conferir cor, não provocando alterações na composição do produto.

Tabela 8. Valor nutricional dos iogurtes incorporados com diferentes formulações do corante curcumina durante sua vida útil (valor médio±desvio padrão).

Valor nutricional (tempo 0, 7 e 15 dias)	Humidade (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Gordura (g/100 g)	Proteínas (g/100 g)	Hidratos de carbono (g/100 g)	Energia (kcal/100 g)
Controlo-0	84±1 ^a	0,7±0,1 ^a	3,6±0,5 ^a	5,00±0,01 ^b	6,3±0,3 ^a	78±2 ^a
YNC-0	84±1 ^a	0,80±0,01 ^a	3,6±0,4 ^a	5,200±0,001 ^{ab}	6,2±0,3 ^a	78±1 ^a
YDC-0	84±1 ^a	0,80±0,02 ^a	3,90±0,03 ^a	5,061±0,004 ^b	6,00±0,04 ^a	79,40±0,03 ^a
YPC-0	85±1 ^a	0,73±0,03 ^a	3,7±0,3 ^a	5,2±0,2 ^a	5,7±0,2 ^a	76,7±0,9 ^a
Controlo-7	81±1 ^a	0,80±0,03 ^a	3,55±0,08 ^a	5,2±0,2 ^a	6,2±0,2 ^a	77,6±0,4 ^a
YNC-7	83±1 ^a	0,82±0,02 ^a	3,6±0,3 ^a	5,8±0,3 ^a	6,00±0,04 ^a	79,3±0,8 ^a
YDC-7	82±1 ^a	0,830±0,002 ^a	3,7±0,1 ^a	5,4±0,2 ^a	6,03±0,04 ^a	78,9±0,5 ^a
YPC-7	82±1 ^a	0,83±0,03 ^a	3,5±0,1 ^a	5,1±0,4 ^a	6,4±0,3 ^a	78,0±0,5 ^a
Controlo-15	84±1 ^a	0,80±0,03 ^a	3,6±0,1 ^a	5,3±0,2 ^a	6,00±0,05 ^a	77,4±0,4 ^a
YNC-15	85±1 ^a	0,80±0,04 ^a	3,7±0,1 ^a	5,21±0,02 ^a	5,50±0,03 ^a	76,0±0,5 ^a
YDC-15	84±1 ^a	0,83±0,02 ^a	3,80±0,01 ^a	5,3±0,2 ^a	6,1±0,2 ^a	79,60±0,04 ^a
YPC-15	85±1 ^a	0,80±0,04 ^a	3,570±0,001 ^a	5,1±0,1 ^a	5,8±0,1 ^a	75,8±0,1 ^a

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os iogurtes com as diferentes formulações de curcumina em cada um dos tempos de armazenamento ($p < 0,05$).

Os parâmetros L^* , a^* e b^* relativos à avaliação da cor dos iogurtes incorporados com diferentes formulações de curcumina e armazenados durante 15 dias, apresentam-se na Tabela 9. O aspeto das amostras pode também ser observado na Figura 12. Segundo Roriz et al. (2017), os valores médios foram considerados para determinar as coordenadas de cores, onde L^* representa a luminosidade, a^* representa cromaticidade num eixo verde (-) para vermelho (+) e b^* representa cromaticidade num eixo azul (-) para amarelo (+).

Para estas amostras o parâmetro de interesse é o b^* . Através dos resultados da leitura da cor, nota-se que não houve variação significativa da mesma durante a vida útil dos iogurtes. Comparando o parâmetro L^* do controlo com as amostras incorporadas com NC e DC, observa-se valores aproximados, diferenciando-se apenas a amostra com PC, pois houve a necessidade de incorporar uma maior quantidade para atingir a

coloração desejada. A olho nu os iogurtes com NC e DC aparentavam a mesma coloração amarela (aplicável a um iogurte de banana); porém, através dos valores de b^* nota-se que existe uma diferença: $NC > DC$; a amostra com PC apresentava uma coloração mais alaranjada diferente das demais (aplicável a um iogurte de manga/pêssego), logo um valor diferente de b^* . De facto, com a adição da curcumina em pó obtinha-se sempre uma tonalidade alaranjada e nunca amarelada.

Após monitorização espectrofotometricamente (420 nm) da curcumina (mg) nas amostras de iogurte, verificou-se que esta foi preservada ao longo dos quinze dias de armazenamento.

Tabela 9. Avaliação da cor dos iogurtes incorporados com as diferentes formulações de curcumina, durante sua vida útil (valor médio \pm desvio padrão).

		Parâmetros da cor		
		L*	a*	b*
Dia 0	Controlo	93,6 \pm 0,3 ^a	-3,53 \pm 0,01 ^b	10,5 \pm 0,3 ^d
	YNC	93,2 \pm 0,3 ^a	-5,24 \pm 0,03 ^c	25,9 \pm 0,4 ^a
	YDC	93,50 \pm 0,09 ^a	-7,64 \pm 0,02 ^d	20,63 \pm 0,03 ^c
	YPC	85,7 \pm 0,2 ^b	-1,70 \pm 0,07 ^a	33,3 \pm 0,1 ^b
Dia 7	Controlo	93,3 \pm 0,6 ^a	-3,35 \pm 0,04 ^b	9,8 \pm 0,6 ^d
	YNC	93,4 \pm 0,1 ^a	-9,72 \pm 0,01 ^d	26,7 \pm 0,1 ^b
	YDC	93,6 \pm 0,3 ^a	-8,17 \pm 0,04 ^c	21,8 \pm 0,5 ^c
	YPC	89,47 \pm 0,02 ^b	-1,41 \pm 0,06 ^a	34,60 \pm 0,06 ^a
Dia 15	Controlo	92,8 \pm 0,2 ^a	-3,38 \pm 0,03 ^b	9,5 \pm 0,2 ^d
	YNC	93,4 \pm 0,4 ^a	-9,7 \pm 0,3 ^d	27,4 \pm 0,1 ^b
	YDC	93,2 \pm 0,1 ^a	-7,7 \pm 0,2 ^c	20,9 \pm 0,4 ^c
	YPC	89,1 \pm 0,2 ^b	-1,3 \pm 0,2 ^a	36,9 \pm 0,1 ^a

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os iogurtes com as diferentes formulações de curcumina em cada um dos tempos de armazenamento ($p < 0,05$).



Figura 12. Iogurtes incorporados com diferentes formulações do corante curcumina (B=controle, NC=nanoencapsulada, DC=dispersável em água e PC=curcumina em pó).

Foram identificados dois açúcares livres na análise por HPLC acoplado com um detector de índice de refração. Os valores das concentrações de galactose e lactose são apresentados na Tabela 10. A concentração de açúcares totais é similar ao valor expresso no rótulo do iogurte controle.

Tabela 10. Perfil e concentração (g/100 g) de açúcares livres dos iogurtes incorporados com diferentes formulações do corante curcumina (valor médio±desvio padrão).

		Galactose	Lactose	Açúcares totais
Dia 0	Controle	0,90±0,01 ^b	4,0±0,1 ^b	4,9±0,1 ^b
	YNC	0,85±0,03 ^b	3,80±0,02 ^c	4,60±0,04 ^c
	YDC	0,85±0,04 ^b	3,8±0,1 ^c	4,60±0,07 ^c
	YPC	1,00±0,04 ^a	4,20±0,04 ^a	5,2±0,1 ^a
Dia 7	Controle	0,90±0,01 ^b	4,00±0,03 ^b	4,90±0,04 ^b
	YNC	0,85±0,05 ^b	3,80±0,06 ^c	4,60±0,01 ^c
	YDC	0,90±0,03 ^b	4,00±0,06 ^b	5,00±0,03 ^b
	YPC	1,00±0,03 ^a	4,2±0,1 ^a	5,20±0,09 ^a
Dia 15	Controle	0,90±0,09 ^a	3,8±0,4 ^a	4,8±0,5 ^a
	YNC	1,00±0,08 ^a	3,8±0,1 ^a	4,8±0,2 ^a
	YDC	0,90±0,03 ^a	3,90±0,01 ^a	4,90±0,02 ^a
	YPC	1,00±0,03 ^a	4,00±0,06 ^a	5,10±0,03 ^a

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os iogurtes com as diferentes formulações de curcumina em cada um dos tempos de armazenamento ($p < 0,05$).

A Tabela 11 mostra o perfil em ácidos gordos obtido por análise em HPLC. Foram apresentados os ácidos gordos (expressos em percentagem relativa) mais abundantes, pois estes são os que têm maior contribuição para o perfil nutricional das amostras. Estão expressas também as percentagens de ácidos gordos saturados (SFA),

monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA). Os ácidos gordos mais abundantes foram o ácido palmítico (C16:0) e o ácido oleico (C18:1) com valores de 33,5 a 36% e 19,8 a 20,8%, respectivamente, seguidos do ácido mirístico (C14:0) e do ácido esteárico (C18:0), com valores de 12,2 a 13,2% e 10,0 a 10,5%, respectivamente. No geral, verifica-se que os ácidos gordos saturados estão presentes em maior quantidade, com valores de 73,4 a 76,0%, seguido dos monoinsaturados (21,8 a 23,0%) e, por último, dos polinsaturados (2,6 a 3,8%). Pequenas variações da percentagem de alguns ácidos gordos fez com que fossem detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, porém na prática tais valores não promoverão alterações da qualidade nutricional ou bioativa do produto final.

Tabela 11. Perfil e percentagem relativa de ácidos gordos das amostras de iogurtes incorporados com diferentes formulações do corante curcumina, (valor médio±desvio padrão).

		C6:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	SFA(%)	MUFA(%)	PUFA(%)
Dia 0	Controlo	3,3±0,3 ^a	3,6±0,2 ^{ab}	4,1±0,2 ^a	12,7±0,2 ^b	35,40±0,09 ^a	10,2±0,04 ^a	20,7±0,5 ^a	2,3±0,5 ^a	74±1 ^{ab}	22,7±0,4 ^a	3,5±0,6 ^a
	YNC	2,7±0,5 ^a	3,4±0,3 ^b	4,1±0,1 ^a	12,8±0,2 ^{ab}	35,8±0,3 ^a	10,40±0,08 ^{ab}	20,7±0,2 ^a	2,1±0,2 ^{ab}	73,8±0,6 ^b	22,7±0,3 ^a	3,3±0,3 ^{ab}
	YDC	3,3±0,1 ^a	3,7±0,2 ^{ab}	4,2±0,2 ^a	12,8±0,2 ^{ab}	35,2±0,3 ^a	10,5±0,2 ^{ab}	20,4±0,3 ^{ab}	2,04±0,01 ^{ab}	74,3±0,3 ^b	22,4±0,3 ^a	3,30±0,06 ^{ab}
	YPC	3,3±0,3 ^a	3,8±0,1 ^a	4,4±0,2 ^a	13,2±0,4 ^a	36,0±0,8 ^a	10,4±0,3 ^b	19,8±0,7 ^b	1,7±0,3 ^b	76±2 ^a	21,8±0,9 ^b	2,6±0,6 ^b
Dia 7	Controlo	3,5±0,7 ^a	3,8±0,4 ^{ab}	4,3±0,1 ^a	12,80±0,05 ^a	35,2±0,6 ^{ab}	10,2±0,3 ^a	20,2±0,5 ^{ab}	2,00±0,04 ^a	74,5±0,5 ^a	22,3±0,5 ^{ab}	3,30±0,03 ^a
	YNC	3,5±0,4 ^a	3,9±0,1 ^a	4,30±0,07 ^a	12,8±0,2 ^a	35,1±0,1 ^b	10,20±0,04 ^a	20,10±0,02 ^b	2,0±0,1 ^a	74,5±0,2 ^a	22,20±0,03 ^b	3,3±0,2 ^a
	YDC	3,20±0,03 ^a	3,7±0,1 ^{ab}	4,20±0,03 ^a	12,9±0,1 ^a	35,3±0,3 ^{ab}	10,2±0,2 ^a	20,2±0,1 ^{ab}	2,5±0,6 ^a	73,9±0,7 ^a	22,3±0,1 ^{ab}	3,7±0,6 ^a
	YPC	2,80±0,06 ^a	3,53±0,05 ^b	4,20±0,02 ^a	12,90±0,03 ^a	35,8±0,2 ^a	10,5±0,1 ^a	20,62±0,04 ^a	2,1±0,08 ^a	74,0±0,2 ^a	22,730±0,001 ^a	3,2±0,2 ^a
Dia 15	Controlo	3,0±0,3 ^a	3,7±0,2 ^a	4,2±0,1 ^a	12,6±0,01 ^a	35,0±0,5 ^a	10,4±0,04 ^a	20,8±0,2 ^a	2,20±0,08 ^a	73,4±0,2 ^b	23,0±0,2 ^a	3,5±0,1 ^a
	YNC	3,4±0,3 ^a	3,8±0,1 ^a	4,20±0,08 ^a	12,4±0,2 ^a	34,9±0,6 ^a	10,40±0,01 ^a	20,34±0,06 ^{ab}	2,101±0,06 ^a	73,9±0,3 ^{ab}	22,60±0,04 ^{ab}	3,5±0,2 ^a
	YDC	3,6±0,5 ^a	3,5±0,5 ^{ab}	4,4±0,3 ^a	12,20±0,02 ^a	33,5±0,9 ^b	10,0±0,4 ^b	20,0±0,7 ^b	2,10±0,08 ^a	74,4±0,8 ^a	22,1±0,7 ^b	3,5±0,1 ^a
	YPC	3,5±0,8 ^a	3,1±0,2 ^b	4,4±0,1 ^a	12,6±0,7 ^a	35,0±1,0 ^a	10,10±0,07 ^{ab}	20,03±0,01 ^b	2,3±0,3 ^a	74,0±0,4 ^{ab}	22,30±0,04 ^b	3,8±0,4 ^a

Ácido butírico (C4:0); ácido capríco (C6:0); ácido cítrico (C10:0); ácido láurico (C12:0); ácido mirfístico (C14:0); ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); ácido oleico (C18:1n9); ácido linoleico (C18:2n6c); SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos poli-insaturados. A diferença para 100% corresponde a outros 13 ácidos gordos menos abundantes (dados não apresentados). Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os iogurtes com as diferentes formulações de curcumina em cada um dos tempos de armazenamento (p<0,05).

4.4. Sistema químico de formulações hidrofílicas

Os estudos da preparação das emulsões foram efetuados utilizando duas fases óleo distintas, azeite refinado e Miglyol 812, sendo por isso diferenciados como sistemas químicos 1 e 2, de acordo com o óleo utilizado, tal como é descrito na Tabela 12.

Tabela 12. Composição dos sistemas químicos das formulações para nanoemulsões.

Sistema químico 1	
Fase óleo	Azeite refinado (AR)
Emulsionante	Tween 20
Fase água	Água ultra-pura (A)
Sistema químico 2	
Fase óleo	Miglyol 812 (M)
Emulsionante	Tween 20
Fase água	Água ultra-pura (A)

Para este estudo, selecionaram-se óleos de grau alimentar para a preparação das emulsões, tendo em consideração a posterior incorporação destas em alimentos. A seleção do óleo é importante do ponto de vista da preparação da emulsão, sendo a sua capacidade de dissolução da curcumina também um factor a ter em consideração, dado que um dos objetivos do presente estudo é maximizar a quantidade deste corante presente na emulsão. De acordo com o estudo de Joung e colaboradores (Joung et al., 2016), a solubilidade da curcumina é superior em óleos constituídos por triglicerídeo com ácidos gordos de cadeia média (MCT), comparativamente com os óleos constituídos por triglicerídeo com ácidos gordos de cadeia longa (LCT). Com base nesta referência, foram selecionados para teste o Miglyol como sendo um óleo de cadeia média e o azeite refinado como um óleo de cadeia longa.

No que respeita ao emulsionante, a sua seleção deve ser efetuada tendo em consideração a sua adsorção à superfícies de gotículas durante a homogeneização, de forma a baixar a tensão interfacial e a facilitar a separação de gotículas e a formação do revestimento protetor que evita a agregação destas (Luo et al., 2017). O Tween 20 é um surfactante amplamente utilizado, que apresenta a capacidade de formar uma camada adsorvida em sistemas dispersos elevada. A sua reologia favorece a migração das suas moléculas para regiões com menor concentração o que permite uma difusão

mais rápida mantendo, conseqüentemente a estabilidade das emulsões (Mattia et al., 2017). O estudo de preparação das emulsões foi iniciado através do teste sem adição de corante, utilizando os dois óleos alimentares selecionados e Tween 20 (num conteúdo de 30% relativamente à fase óleo).

O estudo efetuado compreendeu variar a razão óleo/água (O/A) nas seguintes proporções: 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50, tendo o volume total de emulsão preparado sido 20 ml (registo na Tabela 5 no item 3.4.2). As emulsões produzidas foram caracterizadas por inspeção visual, de forma a detetar a presença de heterogeneidade e separação de fases ao longo do tempo de armazenamento. O registo de imagens das emulsões preparadas com azeite refinado, efetuado ao longo do período de armazenamento máximo de 4 semanas, é mostrado nas Figuras 1 a 4 do Anexo B. Com base neste registo, verificou-se que, a generalidade das emulsões produzidas com o azeite refinado, apresentou um aspecto leitoso (devido ao maior tamanho de gotículas nas emulsões) logo após a produção e que este foi mantido ao longo do período de armazenamento. Para além disto, não foi detetado o aparecimento de separação de fases ou heterogeneidade, ao longo deste período. No que respeita ao número de ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão, não se observam diferenças significativas entre as emulsões que passaram 3 e 6 vezes.

A observação das emulsões por MO resultou num conjunto de imagens que são apresentadas no Anexo C. A análise destas imagens permitiu verificar que a aplicação de 3 passagens no homogeneizador de alta pressão teve um efeito pouco visível na redução do tamanho da gotícula das emulsões preparadas com a razão O/A 20/80 e 30/70, enquanto que para as razões 40/60 e 50/50 a redução das gotículas foi mais notória, dado que a emulsão final apresenta um aspecto mais fino. Quando se compara as imagens de todas as emulsões sujeitas a 3 ciclos, com as submetidas a 6 ciclos de passagem, não se observa uma diferença significativa na redução do tamanho de gotícula.

No que respeita às emulsões preparadas com o Miglyol, a inspeção visual destas ao longo do período de armazenamento permitiu verificar a sua boa estabilidade, dado que não foi observada a presença de separação de fases. No final da produção todas as emulsões apresentavam um aspeto leitoso homogéneo, com a exceção da emulsão 50/50 sujeita a 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão, que apresentou um

aspecto mais translúcido (devido ao menor tamanho de gotículas na emulsão, aspecto desejado) é mostrado nas Figuras 5 a 8 do Anexo B.

As imagens registradas por MO e apresentadas no Anexo C permitiram verificar que as emulsões produzidas com razões O/A de 20/80 e 30/70 e submetidas a 3 ciclos de passagem a alta pressão apresentam gotículas mais grosseiras, comparativamente com as restantes. O aumento de ciclos de passagem para 6 resultou numa redução significativa do tamanho de gotícula, dado que na ampliação de 40X não é possível observar a presença de gotículas, tendo sido necessário recorrer a ampliações superiores para efetuar a sua observação. A análise com as ampliações de 100 e 400X permitiram observar uma maior redução do tamanho da gotícula quando se utilizam 6 ciclos a alta pressão, para as razões O/A de 40/60 e 50/50. No caso da razão 50/50, praticamente não são visíveis gotículas quando se utiliza a ampliação de 400X, devido ao limite da capacidade ótica do equipamento, indicando que nestas condições se atingiu um tamanho de gotícula inferior.

No que diz respeito aos valores de pH das emulsões preparadas, estes estão registados na Tabela 13. Verificou-se que o pH das emulsões preparadas com o azeite refinado apresentou pouca variação, para todas as razões O/A utilizadas. No caso das emulsões produzidas com Miglyol observou-se que, quando se aplicam 6 ciclos de alta pressão, o valor do pH diminui à medida que o teor de óleo presente na emulsão aumenta, sendo o menor valor 4,63 apresentado pela emulsão O/A 50/50.

Comparando a generalidade os resultados obtidos com o azeite refinado, verificou-se que a utilização do Miglyol permitiu obter emulsões com tamanhos de gotículas inferiores para todas as razões O/A testadas.

Tabela 13. Registo da medição de pH das emulsões preparadas.

O/A	pH 3 ciclos	pH 6 ciclos
Azeite refinado		
AR20/A80	4,14	4,91
AR30/A70	4,59	4,96
AR40/A60	VI	4,91
AR50/A50	VI	4,97
(AR50/A50)C1	VI	5,20
(AR50/A50)C2	VI	5,43
Miglyol 812		
M20/A80	VI	5,77
M30/A70	VI	5,27
M40/A60	VI	5,11
M50/A50	4,85	4,63
(M50/A50)C3	VI	5,79
(M50/A50)C4	-	5,22

VI: volume insuficiente para medição do pH.

Com base nos resultados obtidos, selecionou-se a formulação O/A de 50/50 para teste da solubilização da curcumina. As formulações utilizadas e as respetivas quantidades de curcumina solubilizadas estão descritas na Tabela 14. Numa primeira etapa, testou-se a dissolução da curcumina na fase óleo. Esta foi efetuada sob agitação a uma temperatura de 60°C. A curcumina foi pesada e adicionada gradualmente, com períodos de pausa para promover a sua dissolução. A sua adição terminou quando se observou o início da sua deposição. Comparando as quantidades solubilizadas nos dois óleos testados, em 10 mL, verificou-se que o Miglyol apresentou capacidade para dissolver 10,0 mg de curcumina, enquanto que com o azeite apenas se dissolveram 8,9 mg. O facto de a solubilidade da curcumina em óleos ser limitada tem motivado vários estudos. De acordo com alguns autores, a solubilidade está relacionada com a interação molecular entre o óleo e a curcumina, sendo influenciada pela tamanho da cadeia molecular dos triglicéridos que constituem o óleo. De acordo com Ma et al. (2017), os triglicéridos de cadeia molecular média curta, possuem mais grupos polares (oxigénio) por unidade de massa, o que incrementa as interações dipolo-dipolo entre este e as moléculas do corante, aumentando sua solubilidade. No trabalho de Ahmed e colaboradores (Ahmed et al., 2012), foram realizados estudos de preparação de emulsões óleo-em-água contendo curcumina. Este autor verificou que a quantidade

máxima de curcumina solubilizada aumentou à medida que o peso molecular de óleo utilizado diminuiu, tendo o melhor resultado sido obtido com óleos de cadeia molecular curta e média, quando comparadas com os óleos de cadeia molecular mais longa.

Após a solubilização da curcumina, procedeu-se à preparação das emulsões, mantendo os 3 e 6 ciclos de passagem a alta pressão. A Figura 13 mostra as diferentes etapas de preparação de uma emulsão contendo curcumina. O registo de imagens destas emulsões é apresentado na Figura 1 do Anexo D. Através destas é possível verificar que as emulsões preparadas com azeite refinado ficaram instáveis 2 semanas após a produção, uma vez que se observou o início da separação de fases (a formação de duas fases é visível). O registo de imagens feito por MO e apresentado no Anexo C mostra a presença de gotículas grosseiras. No que respeita às emulsões produzidas com o Miglyol, o registo de imagens mostrado na Figura 2 do Anexo D, permite verificar que estas se mantiveram estáveis ao longo do tempo de armazenamento. As imagens de MO mostram que estas emulsões são constituídas por gotículas mais finas.

No que respeita ao pH das emulsões contendo curcumina (Tabela 13), observou-se que nas emulsões preparadas com azeite o aumento da quantidade de curcumina de 2,5 para 8,9 mg provocou um incremento do valor do pH de 5,20 para 5,43. No caso das emulsões preparadas com Miglyol, o aumento da quantidade de curcumina de 6,0 para 10,0 mg provocou uma diminuição do valor de pH de 5,79 para 5,22.

Com base neste estudo foi possível concluir que o Miglyol apresenta uma capacidade de solubilização da curcumina superior à do azeite refinado, e origina emulsões com tamanho de partícula mais fino e com maior estabilidade.

A última etapa deste estudo correspondeu à avaliação do efeito do aumento do número de ciclos de alta pressão na redução do tamanho de gotícula da emulsão e na sua estabilidade. Para o efeito, foram preparadas emulsões utilizando Miglyol e razões O/A de 40/60 e 50/50. As imagens destas emulsões são apresentadas na Figura 1 do Anexo E. Estas emulsões tinham um aspecto leitoso, semelhante ao observado para as emulsões produzidas com 6 ciclos a alta pressão. Para além disto, permaneceram estáveis ao longo do período de armazenamento de 4 semanas. As imagens de MO apresentadas no Anexo C, permitem confirmar o tamanho de gotícula reduzido. Com base nestes resultados procedeu-se à preparação de uma emulsão contendo curcumina solubilizada em Miglyol, tendo sido utilizada a razão O/A 50/50 e 10 mg de curcumina.

As imagens destas amostras são mostradas na Figura 2 do Anexo E e permitem verificar a sua boa estabilidade ao longo do período de armazenamento de 4 semanas. Adicionalmente, as imagens de MO apresentadas no Anexo C permitem confirmar o tamanho reduzido das gotículas da emulsão. No entanto, com base nestes resultados, não é possível comparar o efeito do aumento do número de ciclos de alta pressão de 6 para 21, dado que não são visíveis diferenças significativas ao nível do tamanho de gotícula formada devido à gama de trabalho do microscópio utilizado. Para esta análise seria necessário empregar outras técnicas, tais como a análise das nanoemulsões microscopia confocal de varrimento laser, não disponível.

Tabela 14. Sistemas químicos contendo curcumina para formação de nanoemulsões e suas condições de dissolução.

	Condições de dissolução	M _{curcumina} (mg)
Sistema químico 1		
(AR50/A50)C1	Temperatura: 60 °C Agitação: 110 rpm	2,5
(AR50/A50)C2	Temperatura: 60 °C Agitação: 110 rpm	8,9
Sistema químico 2		
(M50/A50)C3	Somente agitação: 110 rpm	6,0
(M50/A50)C4	Temperatura: 60°C Agitação: 110 rpm	10,0

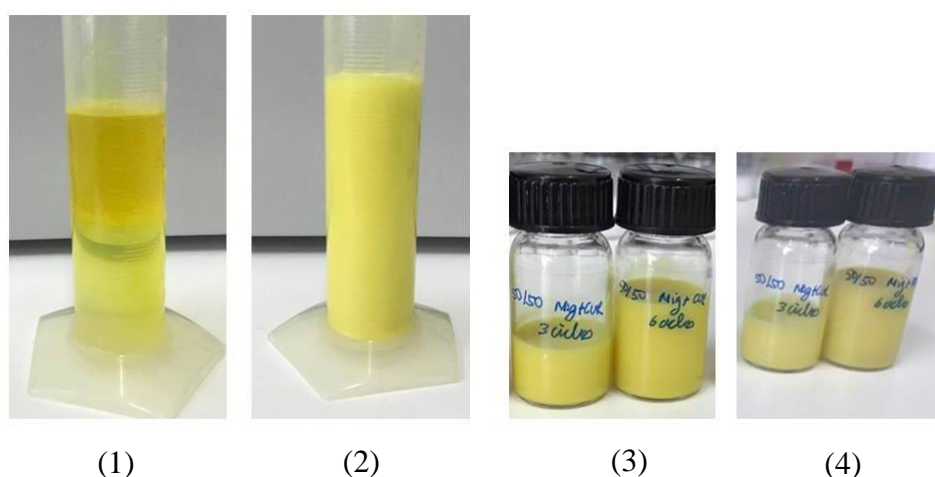


Figura 13. Etapas de preparação da emulsão (M50/A50)C3, onde: (1) aspecto da mistura O/A antes da preparação da emulsão primária; (2) aspecto da emulsão primária; (3) emulsões obtidas após 3 e 6 ciclos de passagem a a alta pressão, e (4) emulsões 4 semanas após a produção.

4.5. Conclusões e perspectivas futuras

O estudo desenvolvido visou analisar a utilização de diferentes formulações do corante natural curcumina (E100) em iogurtes. Para além da sua capacidade para conferir cor, foram também avaliadas diferentes propriedades bioativas do corante, nomeadamente atividade antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e antibacteriana. A formulação PC foi a que apresentou melhores propriedades bioativas, seguida de NC e DC.

Quando introduzidas em amostras de iogurte, a formulação PC conferiu tons de laranja e as demais, NC e DC, tons amarelos. As formulações mantiveram a sua função de conferir cor durante o tempo de armazenamento dos iogurtes, sem provocar alterações nutricionais no produto final.

Os estudos de preparação de uma formulação hidrofílica emulsionada realizados visaram, numa primeira fase, a avaliação do efeito da fase óleo na formação das emulsões, tendo sido testados razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 utilizando dois óleos de grau alimentar: o azeite refinado e o Miglyol 812, e 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão. Este estudo permitiu selecionar a razão O/A 50/50, utilizando o Miglyol, como a mais promissora para atingir a formação de emulsões com tamanho de gotícula inferior e maior estabilidade quando se aplicam 6 ciclos de passagem a alta pressão. Os testes de solubilização da curcumina na fase óleo realizados revelaram que a maior quantidade de curcumina incorporada corresponde a 10 mg/10 mL, quando se utiliza o Miglyol. Foram preparadas emulsões contendo curcumina dissolvida no azeite refinado e no Miglyol, tendo sido observado que as emulsões produzidas com azeite apresentaram uma baixa estabilidade durante o período de armazenamento, enquanto que as emulsões produzidas com Miglyol permaneceram estáveis durante 4 semanas. As análises de MO revelaram que as emulsões preparadas com Miglyol apresentam uma distribuição de gotículas mais fina e com menor tamanho. Adicionalmente, o aumento do número de passagens de 6 para 21 no sistema de alta pressão não revelou diferenças significativas nas propriedades das emulsões preparadas.

Os estudos efetuados indicaram que a utilização do Miglyol como fase óleo, numa razão O/A 50/50, incorporando 10 mg/10 mL de curcumina e sujeitos a 6 ciclos de passagem a alta pressão originam emulsões estáveis e com tamanho de gotícula inferior.

Como trabalho futuro, seria interessante proceder à incorporação da emulsão de curcumina no iogurte, proceder à avaliação das propriedades deste e comparar com as outras formas de curcumina estudadas. Adicionalmente seria interessante estudar a formulação desenvolvida na coloração de bebidas, p.ex. refrigerantes (misturas constituídas por água contendo em solução, emulsão ou suspensão sumo de frutos).

5. Referências Bibliográficas

- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D. & Xiao, H. (2012). Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry*, 132, 799-807.
- A.O.A.C. (2016). Official methods of analysis of AOAC international. AOAC international, 20ª ed.
- Anton, N., Benoit, J. P., Saulnier P. (2008) Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review. *Journal of Controlled Release*, 128, 185-199.
- Antunes, L. & Araújo, M. (2000). Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista Nutrição*, vol. 13, n. 2, Brasil. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732000000200002>.
- Bergonzi, M., Hamdouch, R., Mazzacuva, F., Isacchi, B. & Bilia, A. (2014). Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions. *LWT – Food Science and Technology*, 59, 148-155.
- 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. *Comprehensive reviews in food Science and food safety*, v. 13. doi: 10.1111/1541-4337.12065.
- Carocho, M., Morales, P. & Ferreira, I. C.F.R. (2015). Natural Food Additives: *Quo Vadis?*. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 284-295.
- Codevilha, C., Barin, J., Silva, C., Silva, T., & Menezes, C. (2015). Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: revisão. *Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM*. doi. 10.5902/2179-460X19744.
- Codex Alimentarius (2016). General standard for food additives. Codex stan 192-1995 revisado em 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsfa/pt/>>.
- Coisson, J., Travaglia, F., Piana, G., Capasso, M. & Arlorio, M. (2005). *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. *Food Research International*, 38, 893-897.

- Chuah, A., Jacob, B., Jie, Z., Ramesh, S., Mandal, S., Puthan, J., Deshpande P. et al. (2014). Enhanced bioavailability and bioefficacy of an amorphous solid dispersion of curcumin. *Food Chemistry*, 156, 227–233.
- Damant, A.P. (2011). *Food Colourants – Chapter 8*. Food Standards Agency, Woodhead Publishing Limited, 252-305.
- Domingos, L., Xavier, A., Mercadante, A., Petenate, A., Jorge, R. & Viotto, W. (2014). Oxidative stability of yogurt with added lutein dye. *American Dairy Science Association*. doi: 10.3168/jds.2013-6971.
- Donsi, F., Wang, Y., Li, J. & Huang, Q. (2010) Preparation of curcumin sub-micrometer dispersions by High-Pressure Homogenization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2848-2853. doi: :10.1021/jf903968x.
- Esteves, R. & Barbosa, M. (2013) O iogurte: para saber mais. Associação Portuguesa dos Nutricionistas, coleção e-books nº 28.
- Fang, X., Fang, L., Gou, S. & Cheng L. (2013). Design and synthesis of dimethylaminomethyl-substituted curcumin derivatives/analogues: Potent antitumor and antioxidant activity, improved stability and aqueous solubility compared with curcumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23, 1297-1301.
- Fasolin, Luiz H. (2013) *Sistemas auto-organizáveis na obtenção de produtos com diferentes aplicações: microemulsões, cristais líquidos e géis a base de microemulsões*. (Tese de doutoramento). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Brasil.
- Floury, J., Desrumaux, A. & Lardières, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 127-134.
- Frizon, F., Eloy, J., Donaduzzi, C., Mitsui, M. & Marchetti, J. (2013). Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions by solvent methods. *Powder Technology*, 235, 532-539.
- Giri, T., Kumar, K., Alexander, A., Ajazuddin, Badwaik, H. & Tripathi, D. (2012). A novel and alternative approach to controlled release drug delivery system based on solid dispersion technique. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 50, 147–159.

- Gomes, L., Petito, N., Costa, V., Falcão, D. & Araújo, K. (2014). Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. *Food Chemistry*, 148, 428-436.
- Gupta, B., Chen, B. & Lee, J. (2015). Solvation consequences of polymer PVP with biological buffers MES, MOPS, and MOPSO in aqueous solutions. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 91, 62-72.
- Gupta, A., Eral, H., Hattona, A. & Doyle, P. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Royal Society of Chemistry, Soft Matter*, 12, 2826. doi:0.1039/c5sm02958a.
- Guttoff, M., Saberi, A. & McClements, D. (2015). Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. *Food Chemistry*, 171, 117-122.
- Holz, J. P. (2011). Preparação de micro e nanoesferas de PLGA com mentol. (Tese de Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Honorato, T., Batista, E., Nascimento, K. & Pires, T. (2013). Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. *Revista verde*, vol. 8, n. 5, p. 1-11, Brasil.
- Janiszewska, E. (2014). Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. *Powder Technology*, 264, 190-196.
- Jiang, S., Han, J., Li, T., Xin, Z., Ma, Z., Di, W., Hu, W., Gong, B., Di, S., Wang, D. & Yang, Y. (2017). Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. *Pharmacological Research*, 119, 373-383.
- Joung, H., Choi, M., Kim, T., Park, S., Park, H. & Shin, G. (2016). Development of food-grade curcumin nanoemulsion and its potential application to food beverage system: antioxidant property and *in vitro* digestion. *Journal of Food Science*, vol. 81, n. 3, doi: 10.1111/1750-3841.13224.
- Kaewnopparat, N., Kaewnopparat, S., Jangwang, A., Maneenaun, D., Chuchome, T. & Panichayupakaranant, P. (2009). Increased solubility, dissolution and physicochemical studies of curcumin-polyvinylpyrrolidone K-solid dispersions. *International Scholarly and Scientific Research and Innovation*, 3(7), 210-215.

- Kaimainen, M., Marze, S., Jarvenp, E., Anton, M. & Huopalahti, R. (2015). Encapsulation of betalain into w/o/w double emulsion and release during in vitro intestinal lipid digestion. *LWT – Food Science and Technology*, 60, 899-904.
- Karavas, E., Ktistis, G., Xenakis, A. & Georgarakis, E. (2006). Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63, 103-114.
- Koczur, K., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L. & Skrabalak, S. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Trans*, 44, 17883-17905. doi: 10.1039/C5DT02964C.
- Kumavat, S., Chaudhari, Y., Borole, P., Shenghani, K., Duvvuri, P., Bubera, N. & Shah, P. (2013). Characterization and evaluation of curcumin – PVP solid dispersion by solvent evaporation technique. *International Journal of Pharmaceutical & Research Sciences*, 2(5), 693-706.
- Lestari, M. & Indrayanto, G. (2014) Chapter three – Curcumin. *Profiles of Drugs Substances, Excipients and Related Methodology*, vol. 39. doi. 10.1016/B978-0-12-800173-8.00003-9.
- Li, J., Hwang, I., Chen, X. & Park, H. (2016). Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocolloids*, 60, 138-147.
- Li, B., Konecke, S., Wegiel, L., Taylor, L. & Edgar, K. (2013). Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1108-1116.
- Li, J., Lee, I., Shin, G., Chen, X. & Park (2015). Curcumin-Eudragit E PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94, 322–332.
- Lima, D., Guimarães, C., Silva, S. & Leonardi, G. (2016). Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas líquido-cristalinos contendo óleo de copaíba. *Congresso brasileiro de cosmetologia*.

- Luo, X., Zhou, Y., Bai, L., Liu, F., Zhang, R., Zhang, Z., Zheng, B., Deng, Y. & McClements, D. (2017). Production of highly concentrated oil-in-water emulsions using dual-channel microfluidization: Use of individual and mixed natural emulsifiers (saponin and lecithin). *Food Research International*, 96, 103-112.
- Ma, P., Zeng, Q., Tai, K., He, X., Yao, Y., Hong, X. & Yuan, F. (2017). Preparation of curcumin-loaded emulsion using high pressure homogenization: Impact of oil phase and concentration on physicochemical stability. *LTW – Food Science and Technology*. doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.074.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21. doi.:10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x.
- Mahmood, K., Zuber, M., Salman, M., Anjum, M. et al. (2015). Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 877-890.
- Mangolim, C., Moriwaki, C., Nogueira, A., Sato, F., Baesso, M., Neto, A. & Matioli, G. (2014). Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chemistry*, 153, 361-310.
- Marchi, J., Tedesco, L., Melo, A., Frasson, A., França, V., Sato, S. & Lovato, E. (2016). *Curcuma Longa* L., o açafrão da terra e seus benefícios medicinais. *Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 20, 189-194.
- Marcolino, V., Zanin, G., Durrant, L., Benassi, M. & Matioli, G. (2011). Interaction of curcumin and bixin with β -cyclodextrin: complexation methods, stability, and applications in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3348-3357.
- Martins, R., Pereira, S., Siqueira, S., Salomão, W. & Freitas, L. (2013). Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. *Food Research International*, 50(2), 657-663.
- Martins, N., Roriz, C., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I. et al. (2016). Food colorants: challenges, opportunities and current desires of agroindustries to enture consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 1-15.

- Mattia, C., Sacchetti, G., Mastrocola, D., Sarker, D. & Pittia, P. (2010). Surface properties of phenolic compounds and their influence on the dispersion degree and oxidative stability of olive oil O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 24, 652-658.
- Mazzarino, L., Travelet, C., Ortega-Murillo, S., Otsuka, I., Pignot-Paintrand, I., Lemos-Senna, E., et al. (2012). Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 370, 58-66.
- Miranda, C., Silva, J., Becker, D., Guerra, G., Leiman, F., Golçalves, O. & Ineu, R. (2016). Caracterização de nanopartículas de luteína em PVP e efeitos na atividade cerebral da enzima AChE *in vitro*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil.
- Moghadamtousi, S., Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abukakar, S. & Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, article ID 186864, 12 pages. doi: 10.1155/2014/186864.
- Nascimento, Morgana L. (2014). Parâmetros de qualidade físico-química de produtos vegetais da *Agave sisalana*. (Tese de Graduação) Universidade Estadual da Paraíba, Brasil.
- Nontasana, S., Moongngarma, A. & Deeseenthum, S. (2012). Application of functional colorant prepared from black rice bran in yogurt. *APCBEE Procedia*, 2, 62-67.
- Pan, K. & Zhong, Q. (2016). Organic nanoparticles in foods: fabrication, characterization and utilization. *The Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 245-266.
- Paradkar, A., Ambike, A., Jadhav, B. & Mahadik, K. (2004). Characterization of curcumin – PVP solid dispersion by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 271, 281-286.
- Paramera, E., Konteles, S., Karathanos, V. (2011). Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 125, 892-902.
- Pardo-Davidov G., Gumus, C. & McClements D. (2016). Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of pH and temperature on physical and chemical stability. *Food Chemistry*, 196, 821-827.

- Pinheiro, A.; Cerqueira, M. & Vicente, A. (2013). Nanotecnologia como ferramenta para produzir novos alimentos funcionais: vantagens e precauções. *Tecno hospital – revista de engenharia e gestão da saúde*, 59.
- Rao, P. J., Khanum, H. A green chemistry approach for nanoencapsulation of bioactive compound – Curcumin (2015). *LWT – Food Science and Technology*, 65, 695-702.
- Reis, J., Miyagi, E., Chandelier, R., Bergamasco, A., Lobato, V. & Moura, C. (2000). Fabricação de derivados do leite como uma alternativa de renda ao produtor rural. *Boletim técnico*, Editora UFLA, Lavras, Brasil.
- Roriz, C., Barros, L., Prieto, M., Barreiro, M.F., Morales, P. & Ferreira, I. C.F.R. (2017). Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Industrial Crops & Products*, 105, 29-40.
- Rudke, Adenilson R. (2016). Obtenção de extratos de *Agaricus bisporus* com ergosterol para incorporação em iogurtes e procedimentos de microencapsulação. (Tese de Mestrado). Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Sari, T., Mann, B., Kumar, R., Singh, R., Sharma, R., Bhardwaj, M. & Athira, S. (2015). Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, 43, 540-546.
- Shin, G. H., Kim, J. T., Park, H. J. Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods (2015). *Trends in Food Science & Technology*, 46, 144-157.
- Silva, A. (2016). Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de curcumina e aplicação de microcristais de curcumina em cenoura minimamente processada. (Tese de Mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil.
- Silva, J., Geiss, J., Oliveira, S., Brum, E., Sagae, S., Becker, D., Leimann, F.V., Ineu, R., Guerra, G. & Gonçalves, O.H. (2017). Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. *Materials Science and Engineering C*, 76, 1005-1011.
- Silva, J., Silva, Y., Piatnicki, C., Böckel, W. & Mendonça, C. (2015). Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Química Nova*, vol. 38, n. 9, Brasil. doi. 10.5935/0100-4042.20150135.

- Singh, M., Hemant, K., Ram, M. & Shivakumar, H. (2010). Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 5, 65-77.
- Sobral, Filipa A. S. (2015). Parâmetros químicos e bioatividade de amostras de pão de abelha e apitoxina. (Tese de Mestrado). Instituto Politécnico de Bragança & Universidade de Salamanca, Bragança.
- Sousdaleff, M., Baesso, M., Neto, A., Nogueira, A., Marcolino, V. & Matioli, G. (2013). Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 955-965.
- Suave, J., Dallagnol, E., Pezzini, A., Silva, D., Meier, M. & Soldi, V. (2006). Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, vol. 7, n. 2.
- Svobodova, B., Barros, L., Calhella, R., Heleno, S., Alves, M., Walcott, S., Bittova, M., Kuban, V. & Ferreira, I. C.F.R. (2017). Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* L. medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. *Industrial Crops and Products*, 95, 365–373.
- Vitaglione, P., Lumaga, R., Ferracane, R., Radetsky, I., Mennela, I., Schettino, R., Shimoni, E. & Fogliano, V. (2012). Curcumin bioavailability from enriched bread: the effect of microencapsulated ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3357-3366.
- Walker, R., Gumus, C., Decker, E. & McClements, D. (2017). Improvements in the formation and stability of fish oil-in-water nanoemulsions using carrier oils: MCT, thyme oil, & lemon oil. *Journal of Food Engineering*, 211, 60-68.
- Wallace, T. & Giusti, M. (2008). Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nanocyclated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science*, 73, 241-248.
- Wang, Y., Shao, J., Zhou, C. Zhang, D., Bie, X., Ly, F., Zhang, C. & Lu, Z. (2012). Food preservation effects of curcumin microcapsules. *Food Control*, 27, 113-117.

Wu, K. Li, J., Wang, W. & Winstead, D. (2009). Formation and characterization of solid dispersions of piroxicam and polyvinylpyrrolidone using spray drying and precipitation with compressed antisolvent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(7). doi:10.1002/jps.21598.

Yi, J., Fan, Y., Zhang, Y., Wen, Z., Zhao, L. & Lu, Y. (2016). Glycosylated α -lactalbumin-based nanocomplex for curcumin: Physicochemical stability and DPPH-scavenging activity. *Food Hydrocolloids*, 61, 369-377.

Zaidel, D., Sahat, N., Jusoh, Y. & Muhamad, I. (2014). Encapsulation of anthocyanin from roselle and red cabbage for stabilization of water-in-oil emulsion. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 82-89.

Zou, L., Liu, W., Liu, C., Xiao, H. & McClements, D. (2015). Utilizing food matrix effects to enhance nutraceutical bioavailability: increase of curcumin bioaccessibility using excipient emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 2052-2062.

6. Anexos

ANEXO A: Resultados da determinação do tamanho de partícula da curcumina nanoencapsulada: distribuições em número e em volume, respectivos percentis e tamanhos médios

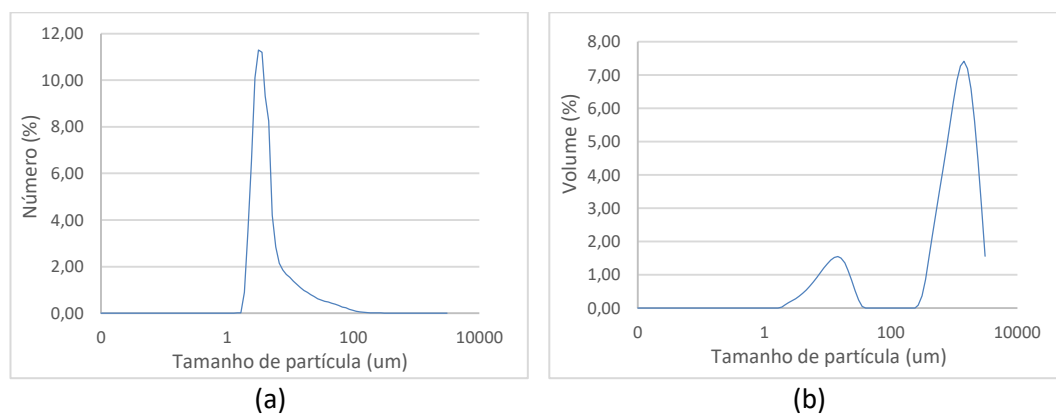


Figura 1. Distribuições de tamanho de partícula em número (a) e em volume (b) da curcumina nanoencapsulada.

Tabela 1. Resultados dos percentis D_{10} , D_{50} e D_{90} e tamanhos médios de partícula determinados com base nas distribuições em volume e em número.

Amostra	Distribuição em volume (μm)				Distribuição em número (μm)			
	D_{10}	D_{50}	D_{90}	Tamanho médio	D_{10}	D_{50}	D_{90}	Tamanho médio
Curcumina nanoencapsulada	13,30	1110,00	2330,00	1094,70	2,42	4,60	14,50	7,44

ANEXO B: Registo de imagens das emulsões iniciais (sem adição de corante)

Figura 1. Emulsões preparadas com azeite refinado utilizando razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 (da esquerda para a direita, na imagem), utilizando 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão, 1 semana após a produção.



Figura 2. Emulsões preparadas com azeite refinado utilizando razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 e utilizando 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão (3 ciclos na imagem à esquerda e 6 ciclos na imagem à direita), 2 semanas após a produção.



Figura 3. Emulsões preparadas com azeite refinado utilizando razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 (da esquerda para a direita), utilizando 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão, 3 semanas após a produção.



Figura 4. Emulsões preparadas com azeite refinado utilizando razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 (da esquerda para a direita na imagem), utilizando 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão, 4 semanas após a produção.



Figura 5. Emulsões preparadas com Miglyol utilizando razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 (da esquerda para a direita na imagem), utilizando 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão, 1 semana após a produção.



Figura 6. Emulsões preparadas com Miglyol utilizando razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 e utilizando 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão (da esquerda para a direita, na imagem), 2 semanas após a produção.





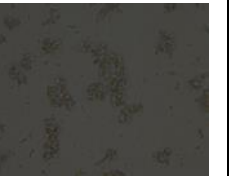
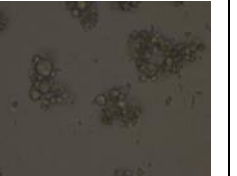

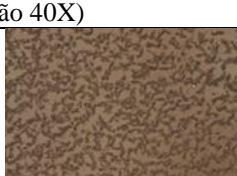
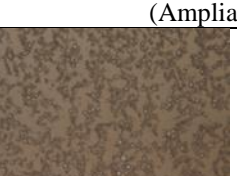

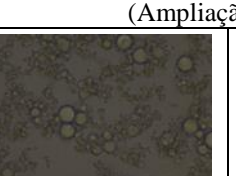
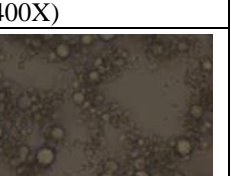
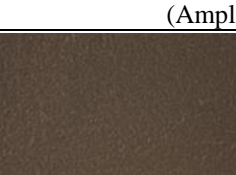
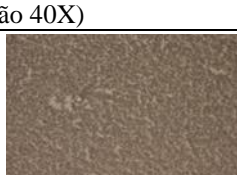
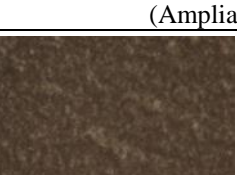
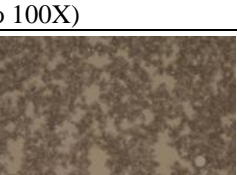
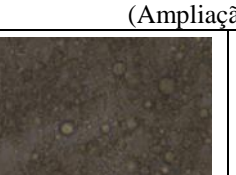
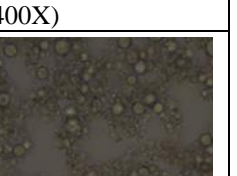
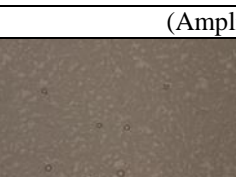

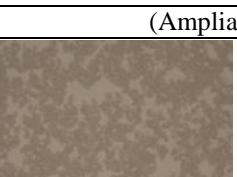
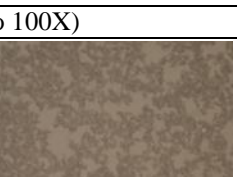
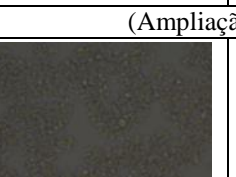
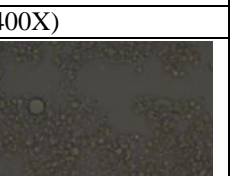




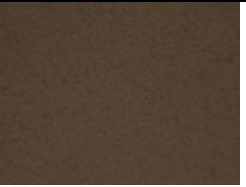
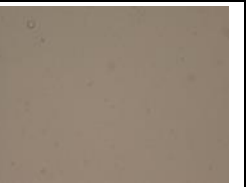

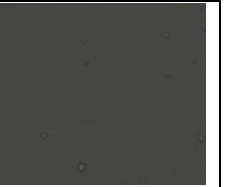




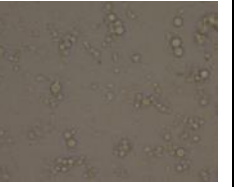

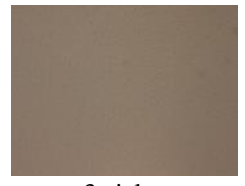

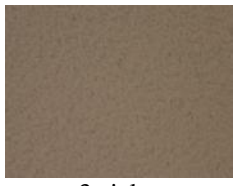





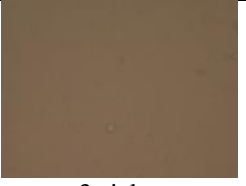
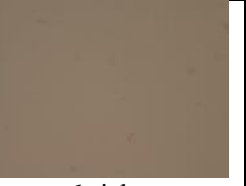


Figura 7. Emulsões preparadas com Miglyol utilizando razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 (da esquerda para a direita na imagem), utilizando 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão, 3 semanas após a produção.



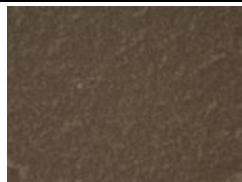








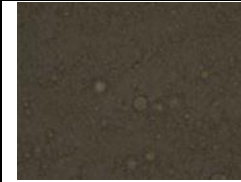





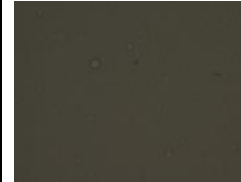





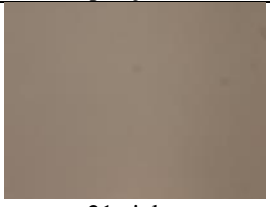





Figura 8. Emulsões preparadas com Miglyol utilizando razões O/A de 20/80, 30/70, 40/60 e 50/50 (da esquerda para a direita na imagem), utilizando 3 e 6 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão, 4 semanas após a produção.

ANEXO C: Registo de imagens por MO, das emulsões primárias e após a passagem no homogeneizador de alta pressão.

Ensaio	Imagens MO					
AR20/A80						
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)	
AR30/A70						
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)	
AR40/A60						
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)	
AR50/A50						
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)	

Ensaio	Imagens MO							
M20/A80								
	3 ciclos		6 ciclos		3 ciclos		6 ciclos	
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)			
M30/A70								
	3 ciclos		6 ciclos		3 ciclos		6 ciclos	
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)			
M40/A60								
	3 ciclos		6 ciclos		3 ciclos		6 ciclos	
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)			
M50/A50								
	3 ciclos		6 ciclos		3 ciclos		6 ciclos	
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)			

Ensaio	Imagens MO					
(AR/A)C1						
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)	
	3 ciclos	6 ciclos	3 ciclos	6 ciclos	3 ciclos	6 ciclos
(AR/A)C2						
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)	
	3 ciclos	6 ciclos	3 ciclos	6 ciclos	3 ciclos	6 ciclos
(M/A)C3						
	(Ampliação 40X)		(Ampliação 100X)		(Ampliação 400X)	
	3 ciclos	6 ciclos	3 ciclos	6 ciclos	3 ciclos	6 ciclos

Ensaio	Imagens MO		
M40/A60	 <p data-bbox="880 491 983 515">21 ciclos</p> <p data-bbox="835 528 1028 552">(Ampliação 40X)</p>	 <p data-bbox="1323 491 1426 515">21 ciclos</p> <p data-bbox="1279 528 1494 552">(Ampliação 100X)</p>	 <p data-bbox="1783 491 1886 515">21 ciclos</p> <p data-bbox="1738 528 1930 552">(Ampliação 400X)</p>
	M50/A50	 <p data-bbox="880 767 983 791">21 ciclos</p> <p data-bbox="835 804 1028 828">(Ampliação 40X)</p>	 <p data-bbox="1323 767 1426 791">21 ciclos</p> <p data-bbox="1279 804 1494 828">(Ampliação 100X)</p>
(M50/A50)C4		 <p data-bbox="880 1043 983 1067">21 ciclos</p> <p data-bbox="835 1080 1028 1104">(Ampliação 40X)</p>	 <p data-bbox="1323 1043 1426 1067">21 ciclos</p> <p data-bbox="1279 1080 1494 1104">(Ampliação 100X)</p>
	Emulsão primária (AR20/A80)	 <p data-bbox="748 1297 1115 1321">Homogeneizada CAT Unidrive T</p> <p data-bbox="835 1334 1028 1358">(Ampliação 40X)</p>	 <p data-bbox="1196 1297 1563 1321">Homogeneizada CAT Unidrive X</p> <p data-bbox="1283 1334 1476 1358">(Ampliação 100X)</p>

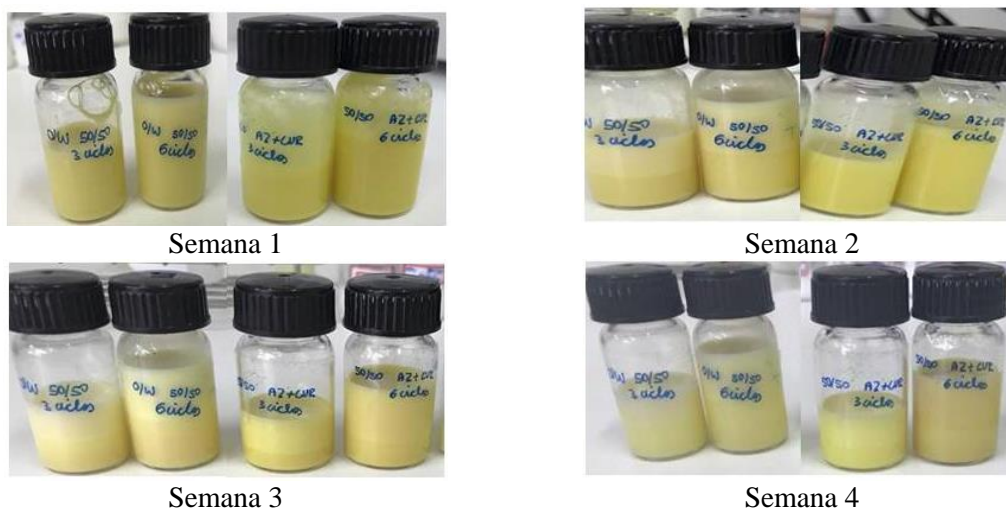
ANEXO D: Registo de imagens das emulsões preparadas com curcumina

Figura 1. Emulsões preparadas com azeite refinado contendo 2,5 e 8,9 mg de curcumina, utilizando razão O/A 50/50, desde 1 semana após a preparação até à semana 4.

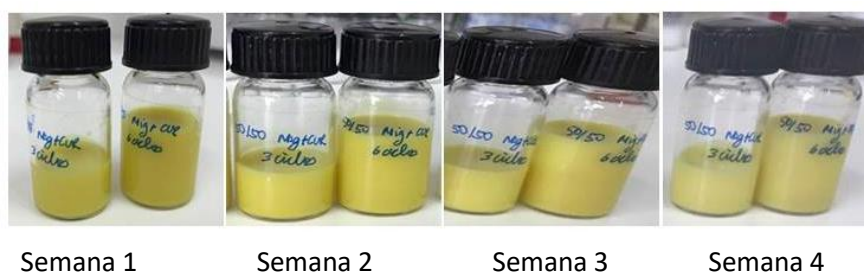


Figura 2. Emulsões preparadas com Miglyol contendo 6,0 e 10,0 mg de curcumina, utilizando razão O/A 50/50, desde 1 semana após a preparação até à semana 4..

ANEXO E: Registo de imagens das emulsões preparadas com Miglyol e submetidas a 21 ciclos de passagem no homogeneizador de alta pressão



Figura 1. Emulsões preparadas utilizando razões O/Ade 40/60 e 50/50 sem curcumina, nas semanas 1, 2 e 4 após a produção.

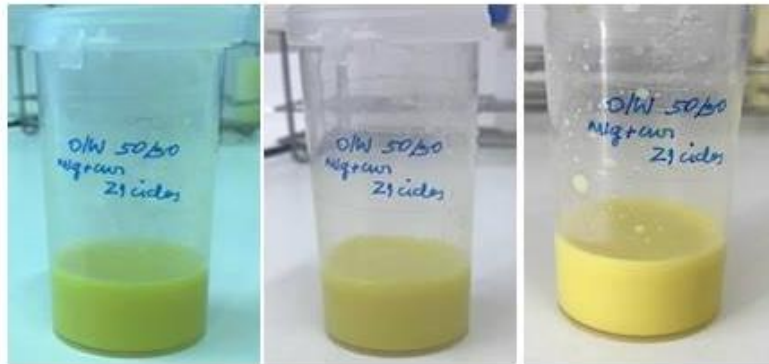


Figura 2. Emulsão preparada utilizando a razão O/A 50/50 contendo 10.0 mg de curcumina, nas semanas 1, 2 e 4 após a produção