



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

**INCLUSÃO DE BIXINA, CURCUMINA E
BETANINA EM CICLODEXTRINA PARA
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Vanessa Aparecida Marcolino
(Farmacêutica)

Prof^a Dr^a Lucia Regina Durrant
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS - SÃO PAULO
Agosto – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M333i Marcolino, Vanessa Aparecida
Inclusão de bixina, curcumina e betanina em
ciclodextrina para aplicação na indústria de alimentos
/ Vanessa Aparecida Marcolino. – Campinas, SP:
[s.n.], 2008.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Corantes naturais. 2. Bixina. 3. Curcumina.
4. Betanina. 5. Ciclodextrina. 6. Complexos. I.
Durrant, Lucia Regina. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em inglês: Inclusion of bixin, curcumin and betanin in cyclodextrin for
application in food industry

Palavras-chave em inglês (Keywords): Natural colorants, Bixin,
Curcumin,

Betanin, Cyclodextrin, Complexes

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Delia Rodriguez Amaya

Neura Bragagnolo

Gisella Maria Zanin

Maria Helena Santana

César Costapinto Santana

Data de defesa: 8-8-2008

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Lucia Regina Durrant
(Orientadora)

Prof^a Dr^a Delia Rodriguez Amaya
(Membro)

Prof^a Dr^a Neura Bragagnolo
(Membro)

Prof^a Dr^a Gisella Maria Zanin
Membro

Prof^a Dr^a Maria Helena Santana
Membro

Prof Dr César Costapinto Santana
Membro

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus

Ao meu Marido Kleber Pitarelli por sua capacidade de me recolocar nos trilhos a cada deslize e jamais me permitir pensar em desistir por mais árdua que fosse a batalha.

Ao meu Filho Arthur Marcolino Pitarelli por ter suportado a falta da mamãe desde muito pequenino.

Ao meu Pai José Galvão Marcolino, por seu apoio, dedicação, incentivando para que eu nunca me deixasse ser vencida pelos desafios.

A minha Mãe Maria Aparecida Tenerello Marcolino, por seu discernimento e ternura apaziguando meu coração nos momentos mais difíceis.

Aos meus Irmãos Viviane Galvão Marcolino e Thiago Galvão Marcolino, pelo apoio e atenção especial dedicada aos meus pais enquanto não pude estar presente;

Aos meus Sogros Ulisses Pedro Pitarelli e Maria de Lourdes Pitarelli, pelos cuidados dedicados ao meu filho na minha ausência;

AGRADECIMENTOS

A Professora Dr. Lucia Regina Durrant pela orientação, apoio e grande contribuição a minha formação profissional.

A Professora Dr Gisella Maria Zanin por ter me acolhido e auxiliado em tudo, sem que me dissesse não em qualquer momento.

A Professora Dr Graciete Matioli pela dedicação desinteressada e compreensão nos momentos de crise.

A Professora Dra Helena pela força e atenção dispensada.

A Luisa e Lauro pelo apoio técnico prestado.

A amiga Fernanda pela ajuda dispensada no trabalho com análises.

A amiga Professora Daniela pela auxílio na operação de programas de construção de gráficos.

Ao Professor Edgardo pelo auxílio na interpretação dos gráficos térmicos.

Ao Professor La Verde pelo auxílio na interpretação dos gráficos de RMN.

A Professora Marta pelo carinho e receptividade em seu laboratório.

A todas as pessoas que me auxiliaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1-	INTRODUÇÃO	1
2-	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1-	Ciclodextrinas.....	5
2.2-	Propriedades das Ciclodextrinas.....	7
2.3-	Formação de Complexos de Inclusão	8
2.4-	Toxicidade.....	10
2.5-	Métodos de Complexação.....	11
2.5.1-	Método de Co-precipitação	11
2.5.2-	Método de Suspensão (<i>Slurry</i>).....	12
2.5.3-	Método de Amassamento (<i>Kneading</i>)	13
2.5.4-	Método de Complexação a partir do Ponto de Fusão	13
2.5.5-	Método de Mistura Física.....	14
2.5.6-	Método de Mistura por Umidade e Aquecimento	14
2.5.7-	Método de Complexação por Dióxido de Carbono Supercrítico.....	14
2.6-	Aplicações de Ciclodextrinas em Alimentos.....	15
2.6.1-	Estabilização de Compostos Voláteis	16
2.6.2-	Mascaramento de Odores e Sabores.....	17
2.6.3-	Estabilização de Emulsões	18
2.6.4-	Controle e Mascaramento de Cores e Pigmentos.....	19
2.6.5-	Ciclodextrina como Agente Protetor de Ingredientes Alimentícios	19
2.7-	Corantes Naturais de Interesse.....	20
2.7.1-	Urucum.....	21
2.7.1.1-	Bixina	24
2.7.1.2-	Norbixina	24
2.7.1.3-	Principais aplicações para os pigmentos bixina e norbixina.....	25
2.7.1.4-	Processo de coloração	26
2.7.1.5-	Legislação	26
2.7.1.6-	Fatores que afetam a estabilidade	27
2.7.1.7-	Inclusão do corante bixina com ciclodextrinas e estabilidade	28
2.7.2-	Curcumina.....	29
2.7.2.1-	Tipos de extrato de curcumina	30
2.7.2.2-	Aplicações.....	31
2.7.2.3-	Legislação	33
2.7.2.4-	Fatores que afetam a estabilidade	34
2.7.2.5-	Inclusão do corante curcumina com ciclodextrinas e estabilidade ..	34
2.7.3-	Beterraba	36
2.7.3.1-	Extratos e suas formas de aplicação.....	37
2.7.3.2-	Fatores que interferem na cor e estabilidade do corante de beterraba	39
2.7.3.3-	Legislação	40
2.7.3.4-	Betaninas e formação de complexo de inclusão em ciclodextrinas.	41
2.8-	Análise Sensorial	42
2.9-	Cor	42
2.10-	Textura	43

3-	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1-	Materiais Utilizados	45
3.1.1-	Corantes.....	45
3.1.2-	Equipamentos	45
3.2-	Métodos	46
3.2.1-	Determinação da Solubilidade e Faixa de Absorvância para Curcumina, Bixina e Betanina	46
3.2.2-	Determinação da Constante de Formação Aparente para Curcumina, Bixina e Betanina	47
3.2.3-	Determinação Espectrofotométrica dos Corantes Curcumina, Bixina e Betanina	48
3.2.4-	Preparação do Complexo de Inclusão β -CD-Corante pelo Método de Co-precipitação	49
3.2.5-	Preparação do Complexo de Inclusão β -CD-Corante pelo Método de Mistura Física	50
3.2.6-	Preparação do Complexo de Inclusão α -CD-Betanina pelo Método de Mistura Física	50
3.2.7-	Preparação do Complexo de Inclusão β -CD-Corante pelo Método de Dióxido de Carbono Supercrítico.....	51
3.2.8-	Caracterização do Complexo Obtido.....	51
3.2.8.1-	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	51
3.2.8.2-	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	52
3.2.8.3-	Termogravimetria (TG) e termogravimetria diferencial (DTG)	53
3.2.9-	Testes de Estabilidade	53
3.2.9.1-	Estocagem	53
3.2.9.2-	Quantificação dos corantes	54
3.2.9.3-	Análise dos resultados	54
3.2.10-	Aplicação do Corante Fabricado	54
3.2.10.1-	Análise sensorial	55
3.2.10.2-	Análise da cor.....	55
3.2.10.3-	Análise de textura.....	56
3.2.10.4-	Análise estatística	56
4-	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1-	Resultado das Análises Realizadas para o Corante Curcumina.....	57
4.1.1-	Espectro de Absorção	58
4.1.2-	Determinação da Constante de Formação Aparente para a Curcumina.....	59
4.1.3-	Análise de Sobrenadante do Complexo de Inclusão Obtido pelo Método de Co-precipitação	63
4.1.4-	Análise dos Complexos Formados por TGA	63
4.1.5-	Análise dos Complexos Formados por DSC	66
4.1.6-	Análise dos Complexos Formados por RMN	69
4.2-	Resultado das Análises Realizadas para o Corante Bixina.....	71
4.2.1-	Espectro de Absorção	73
4.2.2-	Determinação da Constante de Formação Aparente para a Bixina	74
4.2.3-	Formação do Complexo de Inclusão.....	77
4.2.4-	Análise dos Complexos Formados por TGA	77

4.2.5- Análise dos Complexos Formados por DSC	80
4.2.6- Análise dos Complexos Formados por RMN	83
4.3- Resultado das Análises Realizadas para o Corante Beterraba.....	84
4.3.1- Espectro de Absorção	86
4.3.2- Formação do Complexo de Inclusão.....	88
4.3.3- Análise dos Complexos Formados por TGA	89
4.3.4- Análise dos Complexos Formados por DSC	91
4.4-Teste de Estabilidade.....	93
4.4.1- Corante Curcumina e Curcumina Complexada.....	94
4.4.2- Corante Bixina e Bixina Complexada	95
4.5-Aplicação do Corante Fabricado	97
4.5.1- Análise Sensorial.....	97
4.5.2- Análise Instrumental da Cor e Textura	98
4.5.2.1- Queijo Minas Frescal.....	98
4.5.2.2- Iogurte	100
4.5.2.3- Requeijão	101
5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	103
6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de uma molécula de β -ciclodextrina.....	6
Figura 2: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão, Bergamasco, 2003.	9
Figura 3: Fórmula estrutural da bixina, fórmula química $C_{25}H_{30}O_4$	24
Figura 4: Fórmula estrutural da curcumina, $R_1 = R_2 = OCH_3$, fórmula química $C_{21}H_{20}O_6$	30
Figura 5: Fórmula estrutural da betanina, fórmula química $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$	37
Figura 6: À esquerda molécula de curcumina, à direita espectro de curcumina feito com acetona a 0,0005% (Henry, 1996).	57
Figura 7: Aumento do pico de absorção em função do acréscimo da concentração de curcumina nas concentrações 5×10^{-5} (a), 1×10^{-5} (b), 5×10^{-6} (c) molar. Espectro de absorção da curcumina em metanol;.....	58
Figura 8: Espectro de absorção da curcumina em várias concentrações de β -CD; de baixo para cima correspondente a: 0; $5,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $1,5 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3}$; $3,0 \times 10^{-3}$; $4,0 \times 10^{-3}$; 5×10^{-3} mol/L, com [curcumina]= $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L; pH=2,4.....	59
Figura 9: Determinação da estequiometria do complexo de inclusão curcumina- β -CD pelo método de Benesi-Hildebrand's utilizando-se solução aquosa: a) $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]$ (hipótese de formação de complexo 1:1); b) $1/A - A_0$ em função de $1/[\beta - CD]^2$ (hipótese de formação de complexo 1:2).....	61
Figura 10: Determinação da estequiometria do complexo de inclusão curcumina- β -CD utilizando-se curcumina em solução de metanol $1/A - A_0$ em função $1/[\beta - CD]^2$ 62	62
Figura 11: Curvas termogravimétricas dos 2 produtos usados para formação de complexos, curcumina (a) e β -CD (b);.....	63
Figura 12: Curvas termogravimétricas dos produtos complexados, sendo que as letras correspondem respectivamente a: a) curcumina- β -CD mistura física com amassamento, b) curcumina- β -CD co-precipitação e c); curcumina- β -CD mistura física simples;.....	65
Figura 13: Curvas de DSC para padrões, β -CD (a) e curcumina (b);.....	67
Figura 14: Curvas de DSC para produtos da complexação curcumina- β -CD pelos métodos, mistura física com amassamento (a), co-precipitação (b) e mistura física simples (c);.....	67
Figura 15: Espectro de RMN- H^1 de β -CD em água deuterada.....	69
Figura 16: Espectro de absorbância de bixina em clorofórmio na concentração de 0,0003g/100mL (Henry, 1996).....	72
Figura 17: Aumento do pico absorção em função do acréscimo da concentração de bixina com valores de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} , $7,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} e $1,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . espectro de bixina em metanol.	73
Figura 18: Espectro de absorção de bixina em várias concentrações de β -CD: de baixo para cima, 0; $5,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $1,5 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} ; Concentração de bixina fixa de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}	74

Figura 19: Determinação da estequiometria do complexo de inclusão bixina- β -CD pelo método de Benesi-Hildebrand's utilizando-se solução em metanol: a) $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]$ (hipótese de formação de complexo 1:1); b) $1/A - A_0$ em função de $1/[\beta - CD]^2$ (hipótese de formação de complexo 1:2).....	76
Figura 20: Curvas termogravimétricas das substâncias: bixina (a) e β -CD (b);.....	78
Figura 21: Curvas termogravimétricas dos produtos complexados, sendo que as letras correspondem respectivamente a: a) bixina- β -CD mistura física com amassamento, b) bixina- β -CD co-precipitação e c); bixina- β -CD mistura física simples; ..	79
Figura 22: Curvas de DSC para componentes puros, bixina (a) e β -CD (b);.....	81
Figura 23: Curvas de DSC para os produtos da complexação bixina- β -CD pelos métodos, (a) mistura física com amassamento, (b) co-precipitação e (c) mistura física simples;.....	82
Figura 24: Espectro de RMN- H^1 de Bixina- β -CD em água deuterada.	83
Figura 25: Espectro de absorvância de betanina em água a 0,00075%, com absorvância de 530nm.	85
Figura 26: Aumento do pico de absorção em função do acréscimo da concentração de betanina;.....	86
Figura 27: Valores de concentração de β -CD em função da absorvância de betanina, utilizando pH 4,0.	87
Figura 28: Valores de concentração de α -CD em função da absorvância de betanina, utilizando pH 4,0.	88
Figura 29: Curvas termogravimétricas das substâncias usadas para a formação de complexos, sendo que as letras correspondem respectivamente a: a) α -CD, b) β -CD e c) betanina;.....	89
Figura 30: Curvas termogravimétricas dos produtos complexados, sendo que as letras correspondem respectivamente a: a) betanina- α -CD mistura física com amassamento, b) betanina- β -CD mistura física com amassamento.	90
Figura 31: Curvas de DSC para os produtos puros. (a) β -CD, (b) α -CD e (c) betanina. .	92
Figura 32: Curvas de DSC para produtos da complexação. (a) betanina- α -CD, (b) betanina- β -CD.	93
Figura 33: Porcentagem remanescente de curcumina durante o tempo de armazenamento na presença e ausência de luz.	94
Figura 34: Porcentagem remanescente de curcumina complexada com β -CD durante tempo de armazenamento na presença e ausência de luz.	95
Figura 35: Porcentagem remanescente de bixina durante o tempo de armazenamento na presença e ausência de luz.	96
Figura 36: Porcentagem remanescente de bixina complexada com β -CD durante tempo de armazenamento na presença e ausência de luz.	97
Figura 37: Queijo minas frescal, (a) queijo sem adição de corante, (b) queijo acrescido de 20ppm de curcumina, e (c) queijo acrescido de 20ppm de complexo CP curcumina- β -CD.....	99
Figura 38: Tubos de ensaio contendo iogurte, tubo (a) iogurte natural sem adição de corante, tubo (b) iogurte natural acrescido de 5ppm de curcumina, e tubo (c) iogurte natural acrescido de 5ppm de complexo CP curcumina- β -CD.	100

Figura 38: Tubos de ensaio contendo iogurte, tubo (a) iogurte natural sem adição de corante, tubo (b) iogurte natural acrescido de 5ppm de curcumina, e tubo (c) iogurte natural acrescido de 5ppm de complexo CP curcumina- β -CD.	101
Figura 39: Requeijão, (a) sem adição de corante, (b) acrescido de 20ppm de bixina, e (c) acrescido de 20ppm de complexo CP bixina- β -CD	103
Figura 40: RMN- H^1 para complexo Curcumina- β -CD método de co-precipitação.....	122
Figura 41: RMN- H^1 para complexo Curcumina- β -CD método de mistura física simples.....	123
Figura 42: RMN- H^1 para complexo Curcumina- β -CD método de mistura física com amassamento.....	123
Figura 43: RMN- H^1 para complexo Bixina- β -CD método de mistura física simples.....	124
Figura 44: RMN- H^1 para complexo Bixina- β -CD método de mistura física com amassamento.....	124

Resumo

A indústria de alimentos está crescendo muito nos últimos anos, e durante a observação de um alimento qualquer fica claro que o impacto visual causado pela cor sobrepõe-se aos demais. Este atributo é um dos mais importantes na comercialização dos alimentos e constitui critério de aceitação ou não do produto.

A rejeição aos corantes sintéticos por motivos de saúde faz crescer a busca por corantes naturais que possam substituí-los adequadamente. Desta maneira o presente trabalho objetivou a formação de complexos entre corante e ciclodextrinas (CD) com o intuito de melhorar a solubilidade e a estabilidade de três corantes de interesse, a saber, curcumina, bixina e betanina, responsáveis por fornecer as colorações mais empregadas na indústria.

Durante as análises ficou evidente que o método de co-precipitação, dentre os realizados, apresentou maiores indícios de formação de complexo, para os corantes curcumina e bixina sendo inviável para a betanina. Desta maneira estabeleceu-se um índice estequiométrico corante- β -CD de 1:2 no caso da curcumina e de 1:1 para a bixina .

A constante de formação aparente foi calculada e forneceu valores de $4 \times 10^4 \text{ mol}^2 \cdot \text{L}^2$ para curcumina e de $3,34 \times 10^2 \text{ mol}^2 \cdot \text{L}^2$ para bixina com valores de R^2 iguais a 0,9982 e 0,9981 e possibilidade de complexação de 86,31 e de 78,4%, respectivamente.

As análises térmicas de caracterização dos complexos, ou seja, termogravimetria e calorimetria diferencial de varredura, também comprovaram uma maior estabilidade para os complexos feitos pelo método de co-precipitação, já o método de RMN não foi conclusivo para nenhum dos corantes.

Os testes de estabilidade demonstraram uma interferência bastante forte da luz na decomposição da bixina e sua complexação promoveu uma melhora significativa na manutenção da intensidade da cor. Para a curcumina percebeu-se que a luz não é o único fator que influencia no processo de descoloração do produto.

Os testes instrumentais de cor comprovaram a maior capacidade colorante dos complexos frente ao corante puro. Os testes de análise instrumental de textura demonstraram que a inclusão do complexo na formulação do produto não altera suas características iniciais.

Com relação à aplicação dos corantes em alimento, os estudos de análise sensorial demonstraram uma ótima aceitação para o queijo tipo minas frescal equivalente a uma nota média 6,7 numa escala hedônica de 7 pontos. Para o requeijão a aceitação também foi relevante apresentando uma nota média de 5,6.

Foi possível observar que a aplicação em alimentos dos três corantes estudados levou a um incremento da coloração ao se usar um complexo na mesma concentração. Apesar disto o corante de beterraba foi o único que não apresentou dados satisfatórios quanto à possível formação do complexo, o que se deve em grande parte ao seu forte caráter hidrofílico.

Abstract

The food industry has grown significantly in recent years, and when observing any type of food, it is clear that the visual impact caused by its color is more important than that caused by other factors. This attribute is one of the most important in the commercialization of foods and constitutes a criterion for the acceptance or non-acceptance of the product.

The rejection of synthetic food colorants for health reasons has led to the search for natural food colorants that can adequately substitute them. In the light of this problem, the objective of the present study was to form complexes from colorants and cyclodextrins (CDs) with the aim of improving the solubility and stability of three particular colorants, namely: curcumin, bixin and betanin, which are the most frequently used colorants in the food industry.

During the analyses it was found that, of the methods used, the co-precipitation method showed the best indications of complex formation for the curcumin and bixin colorants, although it was not viable for betanin. β -CD-colorant stoichiometric ratios of 1:2 and 1:1 were established for curcumin and bixin, respectively.

Apparent rate of formation was calculated, resulting in values of $4 \times 10^4 \text{ mol}^2 \cdot \text{L}^2$ for curcumin and $3.34 \times 10^2 \text{ mol}^2 \cdot \text{L}^2$ for bixin, with R^2 values of 0.9982 and 0.9981, and chances of forming complexes of 86.31 and 78.4%, respectively.

Thermic characterization analyses of the complexes, that is, differential scanning thermogravimetry and calorimetry, also showed greater stability for the complexes produced by the co-precipitation method. However, the NMR method was not conclusive for any of the colorants.

Stability tests demonstrated that light influenced very strongly in the decomposition of bixin and that there was a significant improvement in the maintenance of its color intensity in its complex form. For curcumin, it was observed that light was not the only factor that affected the process of product discoloration.

The instrumental color tests showed the complexes had a greater coloring capacity compared to the pure colorant. The instrumental texture tests demonstrated that the inclusion of the complex in the manufacture of products did not alter their initial characteristics.

With regard to the application of the colorants in food, sensory analysis studies demonstrated excellent acceptance in a type of natural white cheese called *Minas Frescal*, achieving a mean score 6.7 on a hedonic scale of seven points. For cream cheese, acceptance was also good, receiving a mean score of 5.6.

Increases in color were observed for all three complexes of the colorants when they were added to food in the same concentrations as the natural colorants. However, betanin (a pigment from beetroot) did not show satisfactory complex formation data, which was largely due to its strongly hydrophilic character.

1- INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o desenvolvimento da indústria de alimentos está crescendo consideravelmente, e os consumidores tornam-se cada vez mais exigentes em relação aos produtos consumidos, baseados na sua influência direta na saúde. Na observação de um alimento, o impacto visual causado pela cor, sobrepõe-se a todos os outros, fazendo deste atributo um dos mais importantes na comercialização de alimentos e constituindo assim, primeiro critério de aceitação ou rejeição de um produto.

A facilidade de padronização dos corantes sintéticos, associada ainda à sua grande disponibilidade muito contribuiu para sua expansão. No entanto, na década de 70 constatou-se que estes se apresentavam como potenciais causadores de doenças degenerativas como câncer, deformações teratogênicas entre outros.

A crescente divulgação quanto aos efeitos nocivos dos corantes sintéticos contribui para a sua substituição por produtos naturais. Em 1990, a Food and Drug Administration (FDA) proibiu a utilização de alguns corantes sintéticos nos Estados Unidos. Também na Europa houve restrição ao uso de corantes artificiais.

A busca por corantes alimentícios que atendam aos requisitos considerados saudáveis aumenta gradualmente e para satisfazer o cliente, a substituição dos corantes alimentícios sintéticos está sendo feita, na medida do possível, por corantes naturais. No entanto, parte dos corantes naturais de interesse em alimentos apresenta sensibilidade à luz, ao calor, problemas de solubilidade e estabilidade. O uso de ciclodextrina apresenta-se como uma opção interessante na tentativa de solucionar ou minimizar estes problemas, por meio da formação de complexo de inclusão entre o corante hidrofóbico e a ciclodextrina.

Os corantes são empregados em numerosos alimentos e bebidas com o intuito de compensar a perda da cor durante o processamento industrial e a estocagem, para uniformizar a cor dos alimentos, colorindo os alimentos originalmente incolores, tornando-os mais atrativos ao consumidor.

O emprego de corantes naturais em substituição aos artificiais por diversos setores da indústria gera um crescente interesse pelos produtos provenientes do urucum. Os métodos rudimentares, freqüentemente aplicados para a obtenção destes produtos tendem a ser substituídos por processos mais elaborados visando, não só a redução dos custos de processamento, mas também agregar valor ao pigmento. Estes corantes apresentam problemas de instabilidade resultante da própria estrutura dos carotenóides, exigindo cuidados especiais durante as fases de processamento.

O urucum é um dos corantes naturais mais utilizados pela indústria brasileira, representando cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo, sendo o Brasil um dos maiores produtores e exportadores de sementes de urucum.

A mudança na Ingestão Diária Aceitável (IDA) para extratos de urucum ocorreu na década de 80, pois nos anos 70, a IDA era de 1,25mg/kg de massa corpórea diminuindo para 0,065mg/kg de massa corpórea em 1982. Além disto, a utilização de extratos de urucum em alimentos sofre severas restrições no que se refere à gama de produtos em que pode ser adicionado, bem como quanto à quantidade permitida.

Alguns fitoterápicos têm sido empregados como agente fotoprotetores em tratamentos radioterápicos devido às suas propriedades antioxidantes. A bixina figura em algumas pesquisas relacionadas a aplicações farmacológicas por apresentar um grande potencial antioxidante, o que garante que dentro de pouco tempo estudos sobre este composto, bem como conhecimento toxicológico

detalhado estará à disposição de todos o que poderá alterar novamente o valor da IDA pré-estabelecido.

Os corantes naturais são liberados para uso em âmbito mundial, no entanto, devido aos seus problemas de instabilidade seu uso é bastante limitado. De posse da informação, já comprovada, que o uso de ciclodextrina em muitos compostos pode vir a aumentar sua estabilidade frente a barreiras como pH, temperatura, luz, presença de oxigênio e ataques enzimáticos, sua utilização em testes para a otimização dos corantes naturais já citados é bastante justificada.

Dados fornecidos pela literatura apontam para a viabilidade do processo de formação de complexos de inclusão que poderão posteriormente ser utilizados de maneira vastíssima em todos os ramos da indústria alimentícia, com uma aceitação maior pela população em geral, hoje bastante interessada em hábitos naturais.

As cores mais utilizadas para a coloração de alimentos, sem dúvida nenhuma, são o amarelo e o vermelho e suas combinações, por este motivo o presente trabalho visou buscar a estabilidade dos corantes naturais que podem fornecer estas colorações, sendo estes a bixina, a curcumina e a betanina. A pesquisa também manteve um enfoque maior no estudo do urucum uma vez que os demais apresentam estudos feitos em âmbito nacional e internacional. Em busca do uso seguro e racional dos corantes o trabalho também enfocou a estabilidade dos complexos frente à luz e sua aplicação em alimentos, atentando a possíveis alterações sensoriais pela presença do complexo na formulação.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são malto-oligossacarídeos cíclicos constituídos por um número variável de unidades de glicose (geralmente de 6 a 8), unidos por ligações α -1,4. As mais comuns são as α -CD (ciclohexamilose), β -CD (cicloheptamilose) e γ -CD (ciclooctamilose)(Duchêne et al, 1984).

As CDs foram primeiro descritas por Villers, em 1891, e eram denominadas de “celulosinas”. Logo depois, Schardinger identificou as três ciclodextrinas mais comuns, que foram chamadas de alfa, beta e gama-ciclodextrina. Estes novos compostos eram também referidos como açúcares de Schardinger. Por 25 anos entre 1911 e 1935, Pringshein na Alemanha foi o pesquisador mais proeminente nesta área, demonstrando que estes açúcares formavam complexos aquosos estáveis com muitos complexos químicos. Pela metade da década de 70, cada uma das ciclodextrinas naturais tinham sido caracterizadas estruturalmente e quimicamente e muitos complexos tinham sido estudados (Bekers et al, 1991).

As CDs são moléculas não higroscópicas, homogêneas e cristalinas possuindo uma forma cônica truncada com uma cavidade interior onde o tamanho e forma são determinados pelo número de unidades de glicose ligadas. Este interior é relativamente apolar o que explica a facilidade de formação de complexos com substâncias orgânicas (Szejtli, 1988).

A forma cônica das ciclodextrinas deve-se à conformação do carbono C₁ dos resíduos de α -D-glicopiranosil e à ausência de rotação livre ao redor das ligações glicosídicas. Os grupos hidroxilas secundários (nos átomos de carbono C₂ e C₃ das unidades de glicose) estão situados de um lado do anel e todas as hidroxilas primárias (nos átomos de carbono C₆) do outro lado. Isto torna as ciclodextrinas com características hidrofílicas externamente. O lado das hidroxilas

secundárias é mais largo que o lado das hidroxilas primárias. A rotação livre das hidroxilas primárias reduz o diâmetro efetivo da cavidade no lado onde elas ocorrem, enquanto o grupo de hidroxilas secundárias apresenta uma cadeia relativamente rígida, sem rotação (Bekers et al, 1991).

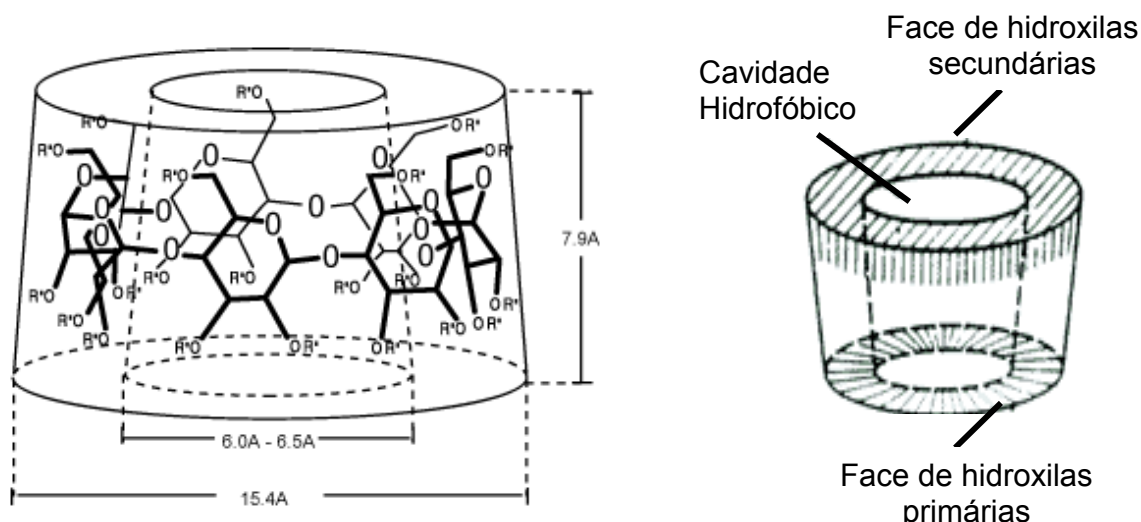


Figura 1: Representação esquemática de uma molécula de β -ciclodextrina.

A análise das estruturas das CDs por raios-X mostra a existência de grupos hidroxilas secundários (presentes em carbonos C_2 e C_3 das unidades de glicose) situados de um lado do anel, enquanto todos os grupos de hidroxilas primárias estão situados do outro lado (carbono C_6). Já os grupamentos hidrogênicos apolares dos carbonos C_3 e C_5 e os demais pares de elétrons livres de oxigênio estão direcionados para o interior da molécula (**figura 1**). Isto resulta na obtenção de uma molécula externamente polar podendo ser dissolvida em água, com uma cavidade apolar, ou seja, com uma matriz hidrofóbica (Szejtli, 1988).

Desta maneira ainda com base na **figura 1**, observa-se que por estarem orientadas para fora, as hidroxilas nos átomos C_2 , C_3 e C_6 podem sofrer ataque químico que modifica a estrutura das ciclodextrinas sem alterar a cavidade central. Isso permite que as CDs sejam transformadas em derivados, com modificações em suas propriedades físico-químicas (Matioli, 2000).

2.2- Propriedades das Ciclodextrinas

A solubilidade da α -CD, à temperatura ambiente, é aproximadamente sete vezes maior que a solubilidade da β -CD, enquanto a da γ -CD é aproximadamente 14 vezes maior, segundo Frömming & Stzejtli (1994). A solubilidade das CDs aumenta rapidamente com a elevação da temperatura, o que permite uma recristalização fácil com o abaixamento da mesma (Duchêne et al, 1984). Algumas outras características são apresentadas na **tabela 1**.

Tabela 1: Características físico-químicas das ciclodextrinas (Szejtli, 1988).

Propriedades	α -Ciclodextrina	β -Ciclodextrina	γ -Ciclodextrina
Unidades de glucopirranose	6	7	8
Massa molar g/mol	972	1135	1297
Solubilidade em água 25°C(%)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro exterior (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volume da cavidade (Å)	174	262	427

Del Valle (2004) afirmou que as ciclodextrinas em solução apresentam-se em diferentes tipos de disposições, ou seja, arranjo cristalino, sendo estes principalmente de dois tipos: moléculas arranjadas formando uma estrutura em gaiola ou canal. Na estrutura em gaiola a cavidade de cada CD é bloqueada nos dois lados pelas moléculas adjacentes de CD, isolando-se assim, cada uma das cavidades, já na estrutura em canal, as moléculas se alinham uma sobre as outras, formando um alinhamento linear de cavidades, onde as moléculas inclusas ficam contidas. Tendo em vista a habilidade da ciclodextrina em promover ligação covalente e não covalente específica com outras CDs, as ciclodextrinas podem ser utilizadas como blocos para a construção de complexos macromoleculares para a inclusão de vários compostos orgânicos.

As cavidades das CDs cristalizadas a partir da água não são vazias. Algumas moléculas de água ficam contidas nas cavidades das CDs, enquanto outras formam parte integrante da estrutura cristalina. Os complexos de inclusão

das CDs são formados pela substituição da água inclusa por moléculas hóspedes adequadas (Frömming & Szejtli, 1994).

As CDs não possuem ponto de fusão definido, mas começam a se decompor a partir de 200°C. Suas propriedades térmicas exatas dependem do teor de água, estrutura cristalina, grau de aquecimento e decomposição da atmosfera. Uma das mais destacadas propriedades das CDs é a resistência às enzimas que catalisam a hidrólise do amido. As CDs são totalmente resistentes à β -amilase, pois não contêm grupos susceptíveis ao ataque desta enzima. As α -amilases que não necessitam de grupos terminais livres, são capazes de hidrolisar as CDs, embora em baixa velocidade (Citernesi & Sciacchitano, 1995).

2.3- Formação de Complexos de Inclusão

Uma das características das CDs é a habilidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos com o aprisionamento de moléculas (moléculas hóspedes) dentro de uma cavidade de uma CD (molécula hospedeira). A necessidade mínima para a formação desse complexo de inclusão é que a molécula hóspede deve se adequar inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da CD. Complexos estáveis não serão formados com moléculas hóspedes pequenas, pois, estas escaparão do interior da cavidade das CDs, sendo que moléculas muito grandes que não possam penetrar na cavidade das CDs possuem inviabilidade de complexação, no entanto, se certos grupos laterais da molécula conseguem se acomodar na cavidade da CD a formação do complexo é possível. Usualmente, são formados complexos 1:1 (CD:hóspede), contudo, se uma molécula hóspede é muito longa para se acomodar em uma cavidade, a sua outra extremidade também é responsável pela formação do complexo e desta forma podem ser formados complexos 2:1, 2:2, 3:1, 3:2 entre outros (Bekers et al, 1991). Na **figura 2** mostra-se um esquema da formação de um complexo de inclusão.

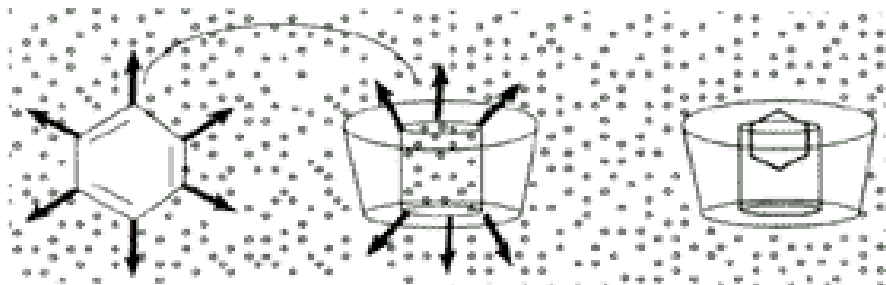


Figura 2: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão, Bergamasco, 2003.

As moléculas hidrofóbicas ou alguns resíduos hidrofílicos têm mais afinidade pela cavidade da CD em solução aquosa. A hidratação de um complexo de CD, com um hóspede hidrofóbico é favorecida energeticamente quando comparada com a hidratação separada dos componentes (Szejtli, 1998).

A preparação do complexo de inclusão se faz, geralmente em meio líquido. A formação de complexos em fase sólida é, em certos casos termicamente espontânea, apesar da estabilidade ser maior em solução aquosa. Os métodos de preparação dos complexos dependem, essencialmente, das propriedades das moléculas hospedes (Duchêne et al, 1984).

De acordo com Szejtli (1988) a presença de um solvente não é condição necessária para a formação de um complexo de inclusão, no entanto, quando possível a formação do complexo em solução é um processo muito rápido. Os hóspedes capazes de formarem complexos mais estáveis são aqueles menos solúveis em água. Para se alcançar um equilíbrio em solução aquosa, um longo tempo de reação é necessário, ou o hóspede deve ser dissolvido em solventes orgânicos. A seleção de solvente é restrita, exceto para alguns solventes fortemente hidrofílicos e com estrutura molecular pequena, tais como metanol, etilenoglicol, dietilenoglicol, glicerina entre outros. Muitos podem ser aplicados, pois formam complexos estáveis.

2.4- Toxicidade

Segundo Bekers et al (1991) os complexos de administração oral tem poucos danos, provavelmente porque quantidades insignificantes de CDs são absorvidas no trato intestinal. Testes para determinar a toxicidade aguda das CDs naturais administradas oralmente em ratos resultaram em altos valores de LD₅₀ (>10g/kg).

Del Valle (2004) citou que a segurança toxicológica das CDs foi revisada, sendo que as CDs naturais e seus derivados hidrofílicos são capazes apenas de permear as membranas biológicas lipofílicas, assim como a córnea e com certa dificuldade. O estudo de toxicidade realizado por Totterman et al (1997) demonstrou que as ciclodextrinas administradas oralmente são praticamente atóxicas devido à ínfima absorção pelo trato gastrointestinal. Assim a α -CD possui as seguintes características: irritação após administração de injeção intramuscular, retenção de alguns lipídeos, irritação ocular e 2 a 3% de absorção após administração oral em ratos. Não foi observado metabolização no trato intestinal superior, apenas quebra de moléculas realizada somente por microflora intestinal mais específica do cólon, e excreção de 60% após administração oral na forma de CO₂, 26 a 33% como metabólito incorporado e 7 a 14% como metabólitos nas fezes e urina, com LD₅₀ oral >10g/kg e LD₅₀ IV 500-750 mg/kg. Já a β -CD tem capacidade de ser menos irritante quando comparada à α -CD depois de injeção intramuscular, pouquíssima quantidade (1-2%) absorvida no trato intestinal superior depois de administração oral, mesmo tipo de metabolização bacteriana no cólon, é a ciclodextrina mais utilizada em preparações farmacêuticas com LD₅₀ oral >5g/kg e LD₅₀ IV 450-790 mg/kg. Com relação à γ -CD observou-se praticamente nenhuma irritação cutânea após injeção intramuscular, esta CD é rápida e completamente degradada em glicose no trato intestinal por enzimas, praticamente não há metabolização após administração intravenosa, com LD₅₀ oral >>8g/kg e LD₅₀ IV 4000mg/kg, é provavelmente a menos tóxica das três ciclodextrinas naturais citadas.

Segundo Szente & Szejtli (2004), estes derivados de amido são ingredientes não tóxicos, não absorvidos pelo trato gastrointestinal superior e com metabolização completa pela microflora do cólon.

2.5- Métodos de Complexação

Não existe um método universal para a preparação dos complexos com ciclodextrinas. O método deve ser feito sob medida para o hóspede, e de acordo com a finalidade (Szejtli, 1988).

Para cada molécula a ser inclusa é necessária a escolha de um método específico e de parâmetros de otimização, especialmente o teor de água, temperatura, tempo de agitação e pH, sendo que a falta de controle do pH pode favorecer a liberação de moléculas iônicas (Loftsson, et al 1993).

Dentre os métodos mais comuns para a obtenção de complexos pode-se citar: co-precipitação, suspensão (*slurry*), amassamento (*kneading*), mistura a seco, mistura úmida e aquecimento por inclusão supercrítico. Uma breve abordagem de cada método é apresentada a seguir.

2.5.1- Método de Co-precipitação

Este método é o mais amplamente usado em laboratório. A molécula hóspede, ou sua solução é adicionada lentamente em uma solução aquosa de ciclodextrina. Se um solvente orgânico for necessário para a dissolução da molécula hóspede, esse tem de ser preferencialmente solúvel em água ou volátil (Phita & Hoshino, 1992).

A molécula hóspede é geralmente adicionada a uma solução de ciclodextrina quente. O equilíbrio é alcançado com intensa agitação e com resfriamento lento em poucas horas. Depois de atingido o equilíbrio, o precipitado pode ser recuperado por decantação, centrifugação ou filtração. O precipitado poder ser lavado com uma pequena quantidade de água ou solvente solúvel em

água como etanol, metanol ou acetona, o solvente de lavagem pode ser prejudicial a alguns complexos, por este motivo deve ser testado anteriormente (Loftsson et al 1993).

Segundo Masson et al (1998) a principal desvantagem deste método é a escala, pois devido à limitada solubilidade das CDs grandes volumes de água devem ser utilizados, sendo que o uso de tanques, tempo e energia de aquecimento e resfriamento devem ser importantes fatores na análise de custos. O uso de surfactantes não iônico reduz comprovadamente a complexação de ciclodextrina, por outro lado, a adição de etanol pode promover a formação de complexos em meios sólidos e semi-sólidos.

2.5.2- Método de Suspensão (*Slurry*)

Neste método a ciclodextrina e o hóspede não são dissolvidos, mas finamente suspensos em água à temperatura ambiente, com intensa agitação. Geralmente uma parte de ciclodextrina é misturada com duas partes de água, formando a suspensão. A molécula hóspede para ser inclusa deve ser dissolvida em um solvente adequado ou adicionada diretamente (sem uso de solvente) à suspensão de ciclodextrina (Loftsson et al 1993).

Bergamasco (2003) afirma que o tempo exigido para completar a complexação é variável, e depende da molécula hóspede. Esta técnica é realizada em temperatura ambiente, contudo, para vários hóspedes pode-se aplicar o calor para aumentar a taxa de complexação, porém deve-se tomar cuidado para não desestabilizar o complexo e evitar que a reação não se complete.

Neste método, o complexo pode ser coletado como no método de co-precipitação, bem como ainda, pode-se utilizar a secagem tipo *spray* ou liofilizador. Além da vantagem de viabilidade para propósitos industriais, pois há uma diminuição na quantidade de água utilizada comparativamente ao método

anterior, pode-se verificar que o equipamento exigido é convencional e raramente se necessita de investimento adicional (Loftsson & Brewster, 1996).

2.5.3- Método de Amassamento (*Kneading*)

Este método é uma variação do método de suspensão, sendo aplicável a princípios ativos fracamente solúveis em água. A ciclodextrina é macerada intensamente com uma pequena quantidade de água, formando uma pasta onde o hóspede é misturado diretamente sem o uso de qualquer solvente, seguido do amassamento da mistura. O tempo de maceração varia com o tipo de molécula hóspede trabalhada. O complexo resultante pode ser seco diretamente ou ainda pode ser lavado com água ou solvente orgânico para a remoção da molécula hóspede livre misturada ao complexo de inclusão. As pastas algumas vezes secam formando uma massa firme ao invés de um pó fino, isto depende diretamente do tipo de hóspede com o qual se está trabalhando e também da quantidade de água utilizada na fabricação da pasta. Geralmente, a massa firme pode ser seca completamente e em seguida triturada para a obtenção de um pó da mistura contendo o complexo (Loftsson & Brewster, 1996).

Este método não é recomendado para a obtenção de produtos de complexação puros. A lavagem com solvente orgânico pode remover uma quantidade variável de moléculas hóspedes já incluídas, devido ao seu coeficiente de partição em favor do solvente orgânico (Duchêne et al, 1984).

2.5.4- Método de Complexação a partir do Ponto de Fusão

Complexos podem ser preparados pela fusão da molécula hóspede com ciclodextrina. O ponto de fusão não deve se aproximar da temperatura inicial de degradação térmica da ciclodextrina (deve ser abaixo de 180°C). Em tais casos deve-se ter excesso de hóspede e, depois do resfriamento, este excesso deve ser retirado por uma lavagem cuidadosa com um solvente que forma um complexo fraco. A sublimação a vácuo é preferível o que deixa este método praticamente restrito a hóspedes sublimáveis (Frömming & Szejtli, 1994).

2.5.5- Método de Mistura Física

Algumas moléculas podem ser complexadas pela simples mistura do hóspede com a ciclodextrina. A mistura física é mais adequada a óleos ou hóspedes líquidos. O tempo de mistura exigido é variável e depende da substância. Geralmente, este método é realizado à temperatura ambiente e funciona como uma variação do método de amassamento. A principal vantagem deste método é que não há adição de água, a menos que seja usada na lavagem do complexo. As desvantagens são os riscos de endurecimento em maior escala de processamento, resultando em uma mistura de qualidade insuficiente para a formação do complexo e, com muitos hóspedes, além de ser necessário maior tempo de contato (Del Valle, 2004).

2.5.6- Método de Mistura por Umidade e Aquecimento

Este método utiliza pequenas quantidades de água ou pode ser realizado sem adição da mesma. A quantidade de água utilizada pode ser a suficiente para a hidratação da ciclodextrina sendo que a molécula hóspede pode ser adicionada em cerca de 20 a 25% a mais do que a quantidade de água de hidratação. Esta quantidade de água é comumente encontrada em torta de filtro dos métodos de co-precipitação e suspensão. O hóspede e a ciclodextrina são misturados juntos e colocados em um recipiente lacrado, este recipiente com seu conteúdo é aquecido a 100°C. Após o aquecimento o conteúdo é retirado e seco. A quantidade de água adicionada, o grau e tempo de mistura, bem como o aquecimento do conteúdo, devem ser otimizados segundo cada molécula hóspede a ser complexada (Loftsson & Brewster, 1996).

2.5.7- Método de Complexação por Dióxido de Carbono Supercrítico

A inclusão de princípios ativos e outros produtos no estado sólido, em ciclodextrina, pode ser obtida por meio da utilização de dióxido de carbono supercrítico que envolve basicamente pressão e temperatura, sendo que pelos estudos realizados notou-se que a pressão, sozinha, não tem efeito direto na inclusão de compostos. No entanto, a temperatura por si só influencia

positivamente a formação do complexo. Melhores resultados foram obtidos com a combinação dos dois fatores, temperatura e pressão, aplicados conjuntamente com dado de até 98,5% de inclusão. Este novo método é bastante atrativo, pois permite a inclusão de compostos no estado sólido sem a necessidade da utilização de solventes orgânicos, além do auxílio do dióxido de carbono na limitação da degradação de substâncias instáveis devido ao seu caráter de inércia (van Hess et al, 2002).

2.6- Aplicações de Ciclodextrinas em Alimentos

Quase todas as aplicações das CDs envolvem complexação. Em muitos casos os complexos são separados numa forma mais ou menos pura e utilizados como substâncias cristalinas, enquanto em outros casos o processo de complexação é somente um estado transiente, e se torna aparente a partir do resultado final (Bergamasco, 2003).

As vantagens em potencial do uso e da disponibilidade das CDs apresentam um papel decisivo no crescente interesse pelas mesmas. Estas são usadas em alimentos, fármacos, cosméticos, produtos domésticos, agroquímicos, indústria têxtil, indústria de papel, tecnologia química, química analítica dentre outros (Matioli, 2000).

Segundo o mesmo autor, apesar das ciclodextrinas serem conhecidas há aproximadamente um século sua capacidade de formação de complexos de inclusão só foi reconhecida em meados dos anos 50, sendo que a utilização em alimentos só veio a acontecer nos anos 80 no Japão e Hungria. Com o crescimento de pesquisas na área, hoje as ciclodextrinas possuem alto potencial de aplicabilidade em alimento.

A primeira publicação referente à aplicação de CDs em alimentos industrializados data de 1962, e o número de patentes tem crescido consideravelmente desde 1981 (Szejtli, 1988).

A maioria das matérias-primas encontradas nos alimentos industriais são descritas como adequadas para inclusão. As substâncias aromáticas e as utilizadas para fornecer sabores estão entre as mais freqüentemente descritas, juntamente com produtos bactericidas, enzimas de plantas, vitaminas, óleos, gorduras e antioxidantes, que podem ser complexados antes de serem adicionadas à composição de alimentos industriais (Duchêne et al, 1984).

A principal vantagem da inclusão dos componentes alimentícios é o aumento da estabilidade dos componentes incluídos, quer sejam de matérias-primas ou de produtos acabados. A estabilização é essencialmente importante para produtos voláteis, fotoativos, termoativos e sensíveis à oxidação. A proteção de matérias-primas não diz respeito à proteção contra ação de microrganismos, mas sim proteção de produtos física e/ou quimicamente instáveis. Dentre os produtos de alto valor comercial que podem ser melhores conservados após a inclusão estão os agentes aromatizantes, os adoçantes, os extratos vegetais, óleos, as vitaminas e os anti-sépticos. Com relação aos produtos acabados, a inclusão é responsável pela estabilização e pela melhoria da qualidade final do produto, no que se refere ao sabor, ao aroma, ao gosto, à forma e à cor dos alimentos, tais como: sopas de peixe, queijos, sucos de frutas, manteiga, chás, cremes, sucos de tomate entre outros (Duchêne et al, 1984).

2.6.1- Estabilização de Compostos Voláteis

Comprovadamente o grande potencial das ciclodextrinas está na área de sabor (flavor) e especiarias, estes ingredientes são considerados instáveis *in natura* o que restringe sua aplicação em alimentos, devido à diminuição da vida de prateleira dos produtos. A possível utilização das ciclodextrinas na estabilização de compostos voláteis pode controlar a prematura volatilização permitindo a utilização destes produtos e favorecendo o processamento de certos alimentos (Staff Article, 1988).

Nagamoto (1985) citou que a utilização de ciclodextrinas aumentou a estabilidade das especiarias utilizadas em produtos cárneos, sendo que pode ser comprovado que a estabilidade térmica foi aumentada na adição de gorduras. Também notou a preservação de sabor dos bolos, biscoitos, frutas cítricas, cebola, alho e purê de vegetais.

Lindner et al (1981) estudaram a inclusão de extratos aromáticos de alho, de alecrim, de mostarda e de cebola, entre outros com 10% de β -CD. Os complexos resultantes eram estáveis por vários anos, sem qualquer perda do aroma e isentos de impurezas microscópicas e microbiológicas.

2.6.2- Mascaramento de Odores e Sabores

As ciclodextrinas podem mascarar o odor de certos produtos como peixes, alho, carnes, extrato de leveduras, leite de soja entre outros, além da capacidade de complexação com agentes adoçantes como aspartame que promove uma melhora no sabor e também uma diminuição do amargor e do “aftertaste” de outros adoçantes como o esteviosídeo (Del Valle, 2004). O amargor causado principalmente pela presença de limoneno e naringina, bem como o “off-taste” no suco de laranja, proteínas hidrolisadas de plantas e animais podem ser melhorados pela adição de ciclodextrina (Nagamoto, 1985). Já Konno et al (1981) observaram que a adição de 0,3% de β -CD aos sucos cítricos reduziu, sensivelmente, seu amargor.

Segundo Yu (1988) a ciclodextrina adicionada em bebidas quentes na proporção de 0,1% é capaz de retirar ou diminuir os odores estranhos e o sabor amargo de chás e café que atingiram temperaturas de 90°C durante o processamento da bebida.

Já a caseína hidrolisada de leite é uma ótima fonte protéica de fácil absorção, que, no entanto tem seu uso restringido pelo sabor amargo, estudos de Specht et al, (1981) sugerem a adição de 10% de β -CD ao hidrolisado para

retirada total do sabor amargo, aumentando assim a utilização deste tipo de proteína, um processo muito similar foi utilizado para a retirada do sabor amargo do extrato de ginseng.

No Japão as ciclodextrinas são aprovadas como amido modificado para aplicações na indústria de alimentos há mais de duas décadas, servindo para mascarar o odor de alimentos frescos (Furuta et al, 1993)

Szejtli (1982) demonstrou que o mascaramento de odores e sabores indesejáveis era mais otimizado em baixas temperaturas e alta concentração de ciclodextrinas. A adição de 10% de β -ciclodextrina em proteína hidrolisada diminui comprovadamente o amargor, já a adição de 0,3% da mesma ciclodextrina antes do tratamento térmico, remove por completo o amargor do suco de grapefruit.

2.6.3- Estabilização de Emulsões

As ciclodextrinas, por sua característica hidrofílica na face externa da molécula e hidrofóbica na face interna, são bastante utilizadas na preparação de emulsões feitas à base de gorduras e óleos, pois podem estabilizar e prevenir a oxidação e rancidez. Considerando esta habilidade são utilizadas em produtos alimentícios como molho para saladas, maionese, óleo de bacalhau entre outros (Szejtli, 1982).

Ainda no campo lipídico, encontram-se CDs sendo utilizadas para estabilizar os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (PUFA), os quais apresentam importantes funções fisiológicas tais como: propriedades antitrombótica, antialérgica, redução do colesterol, entre outras. Esses ácidos graxos são quimicamente reativos, necessitando de inclusão na forma de pó para proteção contra a auto-oxidação. Yoshii et al (1996) desenvolveram um novo método para formar complexos de PUFA com as CDs na forma de pó e utilizaram este mesmo pó para o desenvolvimento de um alimento a base de peixe do mar na forma de pasta.

Segundo Szente & Szejtli (2004) a adição de CDs em emulsões ou queijos pode aumentar a retenção de água e conseqüentemente a vida de prateleira do produto, bem como em produtos cárneos, onde o aumento de retenção de água favorece a textura do alimento.

As CDs também têm sido usadas para melhorar a textura de alimentos. Juhász et al (1988) adicionaram de 1 a 5 % de β -CD na salsicha tipo frankfurter, durante sua produção usual, e verificaram uma grande melhora na textura do produto.

2.6.4- Controle e Mascaramento de Cores e Pigmentos

Os pigmentos naturais como carotenóides e flavonóides podem ser estabilizados por complexos em ciclodextrinas. Os pigmentos podem ter sua cor mascarada ou intensificada (Nagamoto, 1985).

Segundo Kawashima (1980) o corante natural utilizado em ketchup pode ser estabilizado pela adição de 0,2% de β -CD, o qual, não demonstrou perda efetiva de cor mesmo após 2 horas de aquecimento a 100°C.

2.6.5- Ciclodextrina como Agente Protetor de Ingredientes Alimentícios

Uma outra aplicação das ciclodextrinas como protetores, está no fato de que muitos aromas são reconhecidamente sensíveis a vários tipos de processos de irradiação. No caso do citral, componente responsável pelo odor de frutas cítricas frescas, pode ocorrer a ciclização por radiação UV, levando à formação de monoterpenos que causam alterações significantes de sabor em sucos, entretanto quando o citral é encapsulado com CDs, não se observa a formação de monoterpenos mesmo após exposição do produto à radiação UV por seis horas (Szejtli et al., 1979).

As CDs-complexadas com aromas voláteis e óleos essenciais possuem resistência ao aquecimento, segundo observações realizadas por Szente & Szejtli

(2004) onde comparações mostram que entre 80-90°C existem perdas de 94% para o aroma de alho e 88% para o aroma de café complexados com lactose contra 2% e 9% de perda em β -CD-complexada, o que mostra claramente seu efeito protetor frente à exposição ao calor.

2.7-Corantes Naturais de Interesse

Este trabalho manteve seu enfoque em três tipos básicos de corantes naturais: a bixina um tipo de carotenóide conceituado nos itens anteriores, além da curcumina e da betalaína extraída da beterraba.

A fabricação e o preparo de alimentos têm se modificado muito ao longo dos anos, particularmente nas últimas três décadas. No passado, os alimentos provinham da região onde eram produzidos ou de regiões muito próximas. Atualmente muitos alimentos produzidos em regiões longínquas necessitam freqüentemente de aditivos para manter a sua qualidade. Além disso, a variedade e a apresentação dos alimentos são preocupações constantes das indústrias alimentícias. Estes fatores motivam as indústrias de alimentos a utilizarem quase que exclusivamente agentes químicos para conservar, colorir ou aromatizar os alimentos, com o objetivo de atrair cada vez mais os consumidores (Antunes & Araújo, 2000).

A crescente divulgação quanto aos efeitos nocivos dos corantes químicos contribui para a substituição por produtos naturais. Em 1990, o FDA (Food and Drug Administration) proibiu o emprego de alguns corantes nos Estados Unidos. Restrições similares também foram impostas na Europa, proibindo-se o uso para o consumo humano. Esta mudança por parte de órgãos governamentais muito contribui para o retorno e conseqüente aumento da demanda dos produtos naturais (Goyle & Gupta, 1998).

Os corantes naturais por serem constituídos de uma mistura de numerosos compostos de estrutura complexa são, freqüentemente, mais caros, isto porque

requerem etapas de concentração e purificação normalmente mais elaboradas. Outro aspecto que também contribui para seu elevado valor deve-se à reduzida concentração normalmente presente na sua matriz de origem, o que acarreta seu elevado preço (Francis, 1994).

O mesmo autor menciona ainda que os principais corantes naturais de aplicação na indústria de alimentos são: os carotenóides, as antocianinas, a clorofila, a riboflavina, as betalaínas e os caramelos. Deste grupo, as antocianinas existem em uma ampla variedade de cores, seja: em tons de azul, magenta e púrpura, ou ainda tonalidades que vão do vermelho ao amarelo. Já foram identificadas mais de 250 diferentes antocianinas. Contudo, apenas um pequeno número delas são usadas como aditivos em alimentos. São normalmente corantes cuja cor é bastante influenciada pelo pH.

Fatores como luz, calor e oxigênio potencializam processos de degradação dos corantes naturais. O pH também afeta a estabilidade de muitos corantes naturais, da mesma forma que a presença de determinados íons metálicos com reconhecidas características catalíticas, como ferro, alumínio, cobre ou mesmo magnésio, cuja ação catalítica é menor. Estes catalisadores podem aumentar a taxa de decomposição de alguns pigmentos, acarretando em consequência a perda de coloração. Os carotenóides, particularmente, são extremamente susceptíveis a estes efeitos (Najar et al, 1988).

2.7.1- Urucum

Quando os conquistadores espanhóis chegaram ao Novo Mundo conheceram muitas plantas cujos extratos eram empregados pelos Maias e Aztecas. Uma destas plantas, o urucum, existente ao longo da América tropical era usado como extrato para tingir tecidos e pintar o corpo, além de ser utilizada junto à vanilina na formulação de uma bebida à base de cacau. O nome científico do urucum, *Bixa orellana*, foi dado por Francisco Orellana, após uma expedição na região Amazônica Setentrional (Sandi, 2003; Oliveira, 2005).

A planta, (*Bixa orellana*) da família das Bixaceae recebe diferentes denominações populares ao redor do mundo: Urucu, urucum e açafroa (Brasil), atole, achiote e bija (Peru, Colômbia e Cuba), achiote, bija, onoto (Venezuela), urukú (Paraguai), rocou e rocuyer (República Dominicana e Guiana francesa), rocuyer (França), changuaricá, pumacué e K'u-zub, (México). Outras denominações encontradas na literatura são: uñañé, eroyá, chagerica, orelana, ranota, annatto e lipstick (USA) (Sandi, 2003).

O urucueiro é um arbusto com altura entre 2,0 a 4,0 metros, podendo atingir até 6,0 metros dependendo das condições de clima e idade da planta. Cresce em altitudes de até 1000 metros, contudo, desenvolve-se melhor em zonas relativamente baixas, de 100 a 500 metros, suportando temperaturas de 24° a 35°C. Seus frutos são cápsulas ovóides “cachopas”, cobertas por espinhos flexíveis, em cujo interior encontram-se de 30 a 50 sementes. Oriundo da América Tropical acredita-se que tenha sido uma das primeiras plantas “domesticada” pelos índios da região, provavelmente para fins cerimoniais, a partir da *Bixa excelsa*, árvore silvestre da família das (Bixáceae) (Mendes et al, 2006).

As sementes do urucueiro são cobertas por uma resina vermelha que contém como pigmento principal o carotenóide bixina, principal pigmento de preparações lipossolúveis. A norbixina produto de saponificação da bixina, é o pigmento principal de preparações hidrossolúveis, sendo encontrada em pequena quantidade nas sementes e nas preparações lipossolúveis (Mercadante & Pfander, 2001).

O urucum é empregado com frequência como condimento na culinária asiática, africana e européia. Foram os espanhóis os responsáveis pela expansão do consumo deste produto ao redor do mundo, o que levou a um aumento de sua produção já no século XIX (Sandi, 2003). Os corantes de urucum têm sido usados há muitos anos para a produção de produtos de maquiagem, tintura de tecidos e de alimentos (Ferreira et al, 1999).

As sementes do urucum têm sido empregadas na Europa e nos Estados Unidos por mais de 100 anos. A bixina, seu principal carotenóide, foi identificado pela primeira vez em 1825. Os extratos de urucum contêm os carotenóides naturais obtidos do seu pericarpo, ou ainda, mais propriamente da testa ou tegumento que envolve a semente. Os dois maiores componentes destes extratos são: a bixina com características de lipossolubilidade (9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato monometilado, (C₂₅H₃₀O₄)) e a norbixina, com característica de hidrossolubilidade e correspondendo à fórmula (C₂₄H₂₈O₄) (Humeau et al, 2000).

A produção total de sementes de urucum no Brasil aumentou de 972 toneladas em 1984 para 9000 em 2006, sendo que neste ano o valor do quilo da semente foi cotado a R\$ 3,00 (IBGE, 2007). Os maiores exportadores destas sementes são o Peru e o Quênia, e os maiores importadores, os Estados Unidos (FAO/WHO, 1999), já que no Brasil o mercado nacional absorve a maior parte das sementes produzidas.

Entre os corantes naturais, o urucum figura como o segundo em importância econômica depois do caramelo (Francis, 1994). O cultivo do urucum destina-se exclusivamente à comercialização do corante presente na semente, podendo chegar no máximo a 4,5% em massa, nas sementes de boa procedência. A produção de pigmento, contudo, deixa a semente como subproduto. Esta semente foi avaliada no sentido de tornar o cultivo daquela espécie mais lucrativo, procurando, por exemplo, explorar a sua possível aplicação como ração animal (Mendes, 2006).

Segundo Bressani et al (1983), em diversas ocasiões, o Mistério da Agricultura de vários países latino-americanos referiam-se ao potencial econômico que representa a exploração industrial do pigmento da *Bixa orellana*. A produção do pigmento deixa como resíduo a semente, a qual poderia contribuir para que a exploração do urucum fosse mais rentável. Os resultados de análises químicas da semente do urucum revelaram que esta contém quantidades intermediárias de

2.7.1.1- Bixina

Para uso em alimentos, a extração do corante lipossolúvel é feita, usualmente com óleo comestível sob ação do calor, cujo pigmento principal é a bixina com massa molar igual a 394,5, apesar da formação de compostos de degradação e de isomerização (Reith & Gilien, 1971).

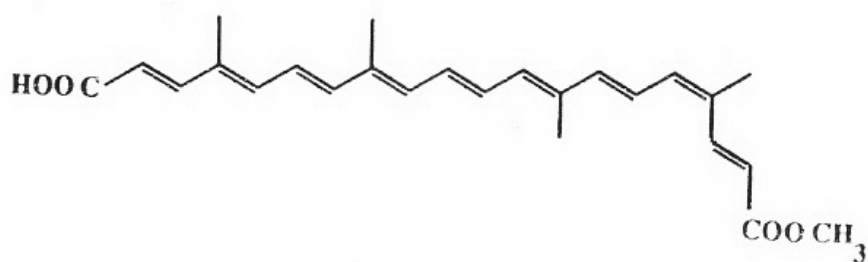


Figura 3: Fórmula estrutural da bixina, fórmula química $C_{25}H_{30}O_4$.

2.7.1.2- Norbixina

24

em pequenas quantidades nas sementes e nas preparações lipossolúveis (Tocchini & Mercadante, 2001).

É comum a prática comercial de soluções alcalinas contendo de 0,5 a 4% de norbixina, a sua extração direta não é viável devido ao baixo nível percentual nas amostras naturais (Henry, 1996).

2.7.1.3- Principais aplicações para os pigmentos bixina e norbixina

Segundo Oliveira (2005) os pigmentos extraídos do urucum servem como corante com ampla aplicação em diversos ramos industriais. A Organização Mundial da Saúde reconhece sua nula toxicidade tanto para o consumo humano como para sua aplicação na pele. O produto é registrado pela União Européia sob a denominação de E160 b.

O maior segmento consumidor destes corantes é a indústria de derivados lácteos, sendo empregado para colorir queijos, manteigas, iogurtes e margarinas. Tem aplicação também em produtos derivados de carne como: salsichas, salames e defumados; derivados de pescados; molhos de salada; cereais matinais, caramelos, sorvetes, como também em achocolatados, refrigerante, e licores (Bareth et al, 2002).

Em cosmética, o pigmento encontra aplicação como: na formulação de bronzeadores, na forma de extrato oleoso; produtos de maquiagem como: batons e pós-faciais; produtos para cabelos como: tintura e xampus, como também em sabonetes. Na indústria têxtil é empregado para tingir algodão, lã e especialmente a seda, conferindo a esta um efeito especial difuso, amarelo-laranja. Também tem sido empregado como pigmento na indústria de couro, bem como na fabricação de tintas e vernizes, graxas para sapato e ceras para pisos (Sandi, 2003).

Várias são as propriedades atribuídas à planta e que são exploradas pela medicina tradicional das quais são mencionadas: ser efetivo contra diarreia, amidalite, no tratamento de doenças peitorais, também como estimulante, diurético, febrífugo, expectorante, cicatrizante, afrodisíaco e laxante (Giuliano et al, 2003).

2.7.1.4- Processo de coloração

É possível que para a obtenção de uma determinada coloração se faça um blend de extratos de bixina e norbixina usando como carreadores substâncias como propilenoglicol ou polissorbatos que poderão posteriormente ser utilizadas em alimentos de base aquosa ou oleosa (Henry, 1996).

2.7.1.5- Legislação

O uso da bixina (*annatto*) é aprovado nos Estados Unidos como um corante para alimentos, remédios e cosméticos. Vários estudos em relação ao potencial genotóxico da bixina sugerem que este aditivo natural não é nem mutagênico nem clastogênico em células de mamíferos. Nenhum efeito adverso na reprodução foi demonstrado em um estudo onde a alimentação de múltiplas gerações de ratos foi suplementada com este carotenóide (Silva et al, 2001; Paumgartten et al, 2002).

Em investigações realizadas na Holanda sobre a toxicidade do urucum, mediante experiências em ratos, camundongos e suínos, concluiu-se que o pigmento não apresentou toxicidade, podendo ser empregado com segurança para colorir alimentos (Paumgartten et al, 2002)

A mudança na Ingestão Diária Aceitável (IDA) preconizadas pela WHO (World Health Organization) para extratos de urucum ocorreu na década de 80, passando de 1,25mg/kg de massa corpórea para 0,065mg/kg de massa corpórea em 1982. Além disto, a utilização de extratos de urucum em alimentos tem sofrido severas restrições por órgãos internacionais, no que se refere à gama de produtos em que pode ser adicionado, bem como quanto à quantidade permitida. Uma das

alegações feitas é o desconhecimento sobre a composição deste extrato (Mercadante & Pfander, 2001).

Uma recente avaliação da ingestão de bixina no Brasil, entretanto, estimou que o nível de consumo de grande parte da população (cerca de 14 milhões de pessoas) é aproximadamente 150% maior que a ingestão diária recomendada pela WHO. Esta ingestão elevada de bixina pode ser explicada pelo consumo do condimento feito das sementes do urucum (colorau) no Norte e Nordeste do Brasil (Paumgarten et al, 2002, Firace, 2004).

2.7.1.6- Fatores que afetam a estabilidade

Os fatores de instabilidade a seguir citados são descritos por Henry (1996).

- a) pH: a norbixina tem capacidade de precipitar em pHs ácidos, já a bixina não é afetada por influência do pH, podendo ser usada livremente em produtos ácidos;
- b) Cátions: os cátions bivalentes especialmente o cálcio podem formar sais com a norbixina, assim sendo, a norbixina é incompatível com produtos contendo alta concentração de cálcio;
- c) Luz e Aquecimento: quando utilizada em proteínas ou amido a norbixina se torna estável à luz e aquecimento, no entanto, a estabilidade é reduzida quando se encontra diluída em sistemas aquosos. A bixina também é resistente ao calor, porém, em temperaturas superiores a 100°C inicia-se o processo de degradação onde a cor amarelo limão começa a ser visualizada, seguida de uma perda gradual da coloração. Dados da literatura também demonstram a incapacidade de congelamento de soluções destes dois corantes naturais. Segundo Ferreira et al (1999) as alterações de cor e diminuição dos teores de sal de norbixina são

dependentes do tempo de tratamento, e demonstram que nas temperaturas de 90 e 100°C as reações são menos dependentes do tempo do que a 120 e 140°C, onde as amostras se tornaram mais claras, menos vermelhas e mais amarelas.

- d) Oxigênio: devido ao sistema de duplas ligações conjugadas todos os carotenóides são susceptíveis à oxidação, pode-se evitar este processo com a adição de ácido ascórbico.

Segundo Lyng et al (2005) a inclusão da bixina em alfa-ciclodextrina é um mecanismo eficiente de proteção do carotenóide contra vários agentes como luz, ozônio, ar e temperatura além de torná-lo mais solúvel em água.

2.7.1.7-Inclusão do corante bixina com ciclodextrinas e estabilidade

Rao et al (2005) avaliaram o efeito das condições de processamento na estabilidade de alimentos incorporados com bixina e perceberam que comparado aos produtos tradicionais (bolos e biscoitos), o aquecimento direto e o processamento do alimento em óleo quente representam as formas de maior perda da capacidade do corante, enquanto para o processo de extrusão as perdas são similares aos produtos tradicionais e a exposição ao microondas não altera o corante, não tendo perdas significativas.

Balaswamy et al (2006) estudaram a estabilidade do corante em pó comparativamente com a óleo-resina, sob várias condições como: temperatura fria na ausência de luz, temperatura fria com luz ambiente, e a temperatura e luz ambiente, durante 360 dias, onde foram feitas medidas espectrofotométricas. Percebeu-se que em todos os casos o corante em pó apresentava uma perda muito grande comparada à óleo-resina. A constante de segunda ordem foi calculada para o pó e considerada extremamente pequena para a forma de óleo-resina, sugerindo-se que seja utilizado esta forma como armazenamento até a utilização do corante.

Lyng et al, (2005) tentaram o método de mistura direta com agitação para a complexação da molécula de bixina com α -CD, e concluíram que a interação da CD com o corante promove um aumento da hidrofília do corante antes completamente hidrofóbico. Além disso, a molécula da CD parece exercer uma fotoproteção reduzindo a degradação do corante frente à luz em 30%.

Barbosa et al (2005) avaliaram a estabilidade da encapsulação por secagem tipo spray de bixina com maltodextrina e goma arábica em solução aquosa na presença e ausência de luz a 21°C. Os resultados mostraram a eficiência da encapsulação para a proteção do corante, com mais estabilidade ao se utilizar a complexação com maltodextrina e a condição de ausência de luz com efeito protetor de até 10 vezes se comparado ao corante sem complexação; já na presença de luz o efeito protetor também se manteve, mas com um índice menor, em torno de duas vezes.

2.7.2-Curcumina

A curcumina é o principal corante presente no rizoma da planta *Curcuma longa*. Este tubérculo é utilizado em temperos, como condimento, sendo o principal ingrediente do curry em pó (Jasim & Ali, 1992).

Este tubérculo é cultivado em países tropicais incluindo a Índia, China, Paquistão, Haiti e Peru e usualmente é comercializado como raiz seca que pode ser transformada em pó, insolúvel em água, e sua cor deve-se, em parte, à dispersão nos alimentos, ou pela dissolução em óleos vegetais. A curcumina (**figura 4**) é o principal corante do tubérculo acompanhado por pequenas quantidades de outros compostos, sendo que todos são insolúveis em água, possuindo massa molar de 368,4 (Govindarajan, 1980).

Sampathu et al (1988) relatam que a Índia é o maior produtor mundial do tubérculo, com valores que variam entre 250 a 300 mil toneladas. A maior parte

deste tubérculo acaba sendo consumida sob a forma de tempero e apenas uma pequena fração, 1000 a 1500 toneladas são convertidas em extrato.

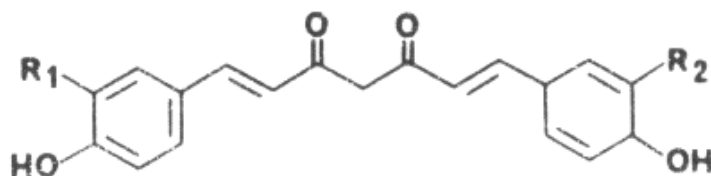


Figura 4: Fórmula estrutural da curcumina, $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$, fórmula química $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$.

A quantidade de corante natural de curcumina produzida anualmente é bastante pequena, variando na ordem de 30 toneladas, quando comparada com a quantidade de curcumina consumida como tempero. Tomando-se como pressuposto a produção indiana do tubérculo como sendo de 250 mil toneladas e assumindo-se como média um conteúdo de 3% de curcumina pura conclui-se que o consumo anual do país ficaria em torno de 7 500 toneladas de curcumina, valor bastante superior ao produzido no mesmo país, mostrando que a produção do corante natural está aquém das necessidades de mercado (Henry, 1996).

2.7.2.1- Tipos de extrato de curcumina

Existem três tipos básicos de extratos de curcumina: óleo essencial do tubérculo, óleo-resina e curcumina.

- a) Óleo Essencial do Tubérculo: é obtido por destilação por arraste a vapor feita com o seu pó, que possui o aroma volátil que compõe o condimento, este óleo é incolor. Este produto está presente no tubérculo numa fração de 3 a 5% e existe uma demanda comercial diminuta para este tipo de produto (Manzan et al., 2003).

- b) Óleo-resina: é o extrato mais comum, possui tanto o aroma quanto a coloração em porções relativamente proporcionais à do condimento. É obtido por extração com etanol nos rizomas secos, sendo que o solvente é extraído mais tarde sob vácuo. Os condimentos na forma de óleo-resina possuem grande vantagem sobre o tubérculo, principalmente no que diz respeito à qualidade microbiológica, padronização das propriedades organolépticas e ausência de contaminantes. Por esta razão o uso de óleo-resinas vem crescendo muito nos últimos 30 anos. O óleo-resina advindo do tubérculo possui cerca de 37-55% de curcumina (Manzan et al., 2003).
- c) Curcumina: funciona como um princípio puro de coloração e possui muito pouco aroma do tubérculo que lhe deu origem, é obtido pela cristalização da óleo-resina, e possui uma pureza de cerca de 95% (Henry, 1996). Segundo o mesmo autor, Fukazawa (1970) patenteou a extração de curcumina com éter, com posterior evaporação do solvente e dissolução do resíduo em óleo vegetal. Sabe-se que a óleo-resina bem como os colorantes à base de curcumina são instáveis frente à luz e meio alcalino. Desta maneira pesquisadores como Leshnik (1982) preconiza a preparação de um pó colorante estável pelo uso de secagem em *spray* juntamente com ácido cítrico, amido de milho, polissorbato 60 e citrato de sódio, formando um produto encapsulado que apresentou uma estabilidade por até 16 semanas a 35°C. A curcumina também se apresenta como corante insolúvel em água, mas que, ao ser complexada com metais, melhora sua solubilidade segundo Maing & Miller (1981).

2.7.2.2- Aplicações

Na forma pura, com 95% de pureza, a curcumina não é ideal para uso direto na indústria de alimentos, principalmente por ser insolúvel em água e pouco solúvel em outros solventes. Em vários países emprega-se a curcumina dissolvida com uma mistura de solventes de grau alimentício que permite sua emulsificação, nesta forma o produto possui cerca de 4-10% de curcumina, miscível em água. O

polissorbato 80 (Tween 80) favorece sua emulsificação e é um carreador ideal para a curcumina. Diante disso a curcumina apresenta uma coloração amarela brilhante mesmo em pequenas doses, sabe-se que a cor se torna saturada com níveis superiores a 20ppm, determinando a dose mínima para que se alcance a cor desejada. A coloração fornecida pela curcumina é bastante semelhante à obtida pelo uso do corante artificial amarelo tartrazina (Tonnesen, 2002). Outras formas de comercialização da curcumina também são conhecidas, e incluem suspensão da curcumina em óleo vegetal e dispersão deste corante em amido, mas não as formas mais comumente usadas. As várias aplicações da curcumina no setor alimentício, de acordo com Navas-Diaz & Ramos-Peinado (1992) são apresentados a seguir:

- Indústria de laticínios: na indústria lática está a principal utilização da curcumina. O creme de baunilha é usualmente colorido pela combinação de curcumina e norbixina em quantidade de 20ppm para 12ppm respectivamente, em iogurte o uso de 5ppm fornece uma cor amarelo limão bastante aceitável. A coloração pela curcumina é feita preferencialmente em produtos viscosos para que se consiga uma perfeita homogeneização. A única restrição para o uso de curcumina na indústria de laticínios está na coloração de leite longa vida aromatizado e acondicionado em embalagens transparentes, onde a estabilidade à luz é o fator limitante.
- Panificação: é bastante tradicional o uso de coloração amarela em bolos e biscoitos, para isto se utiliza um blend entre curcumina e norbixina, outro corante natural comumente utilizado em sorvetes, sendo que os produtos podem ser protegidos por longo tempo de exposição à luz empregando-se embalagens adequadas.
- Doces: em geral a curcumina é bem aceita em todos os confeitos não expostos excessivamente à luz. É comum que a indústria faça uso de

solução estoque de corante para que se torne mais fácil a padronização e mistura na massa de açúcar.

- Produtos congelados: algumas bebidas refrescantes podem ser coloridas com sucesso pela adição de 5-15ppm de curcumina e seu baixo pH não vem a ser um grande inconveniente. No entanto, vale lembrar que soluções de curcumina não devem ser congeladas, pois há risco de precipitarem.
- Misturas secas: corante de curcumina obtido por secagem em *spray* utilizando goma acácia como carreadora é ideal para a mistura com cremes e pudins instantâneos. Estes produtos sempre contêm cerca de 8% de curcumina. Quando se usa esta goma é necessário, na reconstituição do produto, o emprego de calor, alternativamente pode-se dispersar o corante em amido.

2.7.2.3- Legislação

A óleo-resina obtida a partir da *Curcuma longa* é permitida universalmente como condimento. A legislação sueca, por exemplo, cita que a páprica, açafrão entre outros, não são considerados corantes, mas primariamente como condimentos. A curcumina é especificamente permitida como corante natural pela união européia (Ilker, 1987).

Segundo Francis (1996) os extratos do tubérculo não apresentam efeito mutagênico, além de reduzir a nitrosação da metiluréia pelo nitrato de sódio reduz a mutagenicidade da *Salmonella typhimurium*. Outros pesquisadores ainda relatam que a *Listeria monocytogenes* não consegue sobreviver em meios de cultura contendo corantes à base de curcumina. Estes efeitos de respostas antibacterianas e antimutagênicas encorajam o uso de curcumina em alimentos.

2.7.2.4- Fatores que afetam a estabilidade

Segundo Tang et al. (2002) muitos fatores alteram a estabilidade, sendo que os citados a seguir estão diretamente relacionados com a curcumina dissolvida em meio aquoso.

- pH: a curcumina apresenta coloração amarelo limão quando exposta ao meio ácido, com uma tonalidade verde distinta. Com o aumento do pH a tonalidade verde passa a ficar menos distinta, já em meio alcalino (pH acima de 9) a cor se torna distintamente laranja.
- Aquecimento: a curcumina é essencialmente estável ao aquecimento.
- Luz: a curcumina é sensível à luz e este fator é um dos mais usuais quanto ao limite de suas aplicações em alimentos. A curcumina em suspensão é mais estável do que em meio solubilizado.
- Dióxido de enxofre: o dióxido de enxofre normalmente utilizado na indústria de alimentos como um controlador de microflora, reduz a intensidade de cor da curcumina solubilizada quando seus índices são superiores a 100ppm.

2.7.2.5- Inclusão do corante curcumina com ciclodextrinas e estabilidade

Tonnesen et al (2002) demonstraram que dentre as CDs investigadas (hidroxipropil- α -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, hidroxipropil- γ -ciclodextrina, β -ciclodextrina metilada randomicamente, sulfabutiléter- β -ciclodextrina e hidroxitrimetilamôniopropil- β -ciclodextrina) obtidas pelo método de co-precipitação, formaram complexos 1:1 com a molécula de curcumina. Numa solução com 5% de CD houve um aumento da solubilidade em até 10^4 e a estabilidade química em pH 8 foi acrescida em 50 vezes. As soluções de curcumina em meio tamponado puro possuíam vida média de dois minutos, enquanto em soluções com β -CD 5% a vida média passou para 46 horas. Em

contraste a fotodegradação obteve apenas uma pequena melhora na presença de solução de ciclodextrina.

Já os relatos de Tang et al (2002) demonstraram que a complexação de β -CD com curcumina ocorre na proporção de 2:1 respectivamente, sendo que a formação foi comprovada pelo aumento da absorbância e pelo método espectrofotométrico de determinação da curcumina.

Entretanto, Qi et al (2003) encontraram uma proporção estequiométrica de 1:1 em estudos baseados nas propriedades de absorção frente a luz da curcumina, em soluções de ciclodextrinas.

Mais recentemente Baglole et al (2005) concluíram que a proporção estequiométrica da complexação curcumina-CD ocorre na proporção de 1:2 baseado em mensuração fluorométrica que complementado com relatos de Loftsson et al (2004) tentam explicar a possível diferença obtida nas proporções estequiométricas dependendo do método utilizado, já que estes autores reforçam que a ciclodextrina pode exercer algum efeito sobre a não formação de complexo de inclusão agindo como um surfactante, causando apenas agregação de moléculas.

Sowbhagya et al (2005) analisaram a possível substituição do corante artificial amarelo tartrazina por curcumina em alimentos extrusados e verificou que do ponto de vista de estabilidade a curcumina, após a vida de prateleira do alimento, apresentou uma manutenção de 83% da cor enquanto a tartrazina possuía uma manutenção da cor de 93%. Os autores ainda relatam que a perda da cor seguiu uma cinética de primeira ordem em ambos os casos e que a curcumina apresentou uma taxa de degradação maior que da tartrazina, mas que ainda assim é uma alternativa viável para a utilização em produtos extrusados em substituição ao corante artificial.

Estudos sobre a estabilidade da curcumina e curcuminóides realizado por Tomren et al (2007) demonstram que os curcuminóides de modo geral são mais estáveis à degradação hidrolítica do que a curcumina quando complexados com CD. Em contrapartida, os ensaios fotoquímicos demonstraram uma maior estabilidade da curcumina complexada comparada aos curcuminóides.

2.7.3- Beterraba

A beterraba vermelha é cultivada há milhares de anos em todo tipo de temperatura e clima. Os pigmentos presentes são conhecidos como betalaínas e podem ser divididos em duas classes: os pigmentos vermelhos conhecidos como betacianinas e os amarelos chamados de betaxantinas, ambos bastante solúveis em água. As betalaínas possuem uma distribuição limitada nas plantas, não havendo muitas espécies que possuam estas substâncias como colorante básico, sendo que ao que tudo indica as betalaínas e antocianinas são mutuamente exclusivas, ou seja, plantas que produzem betalaínas não contêm antocianinas e vice-versa (Henry, 1996).

O mesmo autor refere ainda que a maioria das variedades de beterraba contém a betacianina vermelha, chamada betanina, com massa molar de 550,5 (**figura 5**) como composto corante predominante representando de 75 a 90% do total de corantes apresentados. Já a vulgaxantina I e II são os principais corantes amarelos que compõem o grupo das betaxantinas.

A beterraba é uma excelente fonte de corante natural e algumas variedades contêm mais de 200mg/100g de massa fresca de betacianinas representando mais de 2% de sólidos solúveis. Quantidades bastante apreciáveis deste vegetal, cerca de 200.000 toneladas, são anualmente colhidas na Europa Ocidental, sendo que a grande maioria é consumida como vegetal ou como conserva. Cerca de 20.000 toneladas são convertidas em suco e corante, desta maneira o consumo de beterraba como corante é bastante pequeno se comparado a seu consumo como vegetal, até mesmo porque quando se consome 100g de beterraba está se

consumindo 200mg de betanina. Entretanto quando se consome 100g de iogurte de morango contendo betanina como corante, a quantidade ingerida é de apenas 0,5mg (Lewis & Walker, 1995).

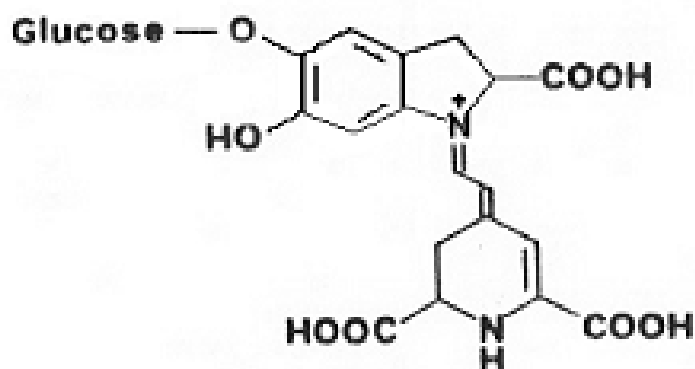


Figura 5: Fórmula estrutural da betanina, fórmula química $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$.

2.7.3.1- Extratos e suas formas de aplicação

A beterraba é transformada em suco de maneira muito similar à utilizada nas indústrias de suco de frutas. Este suco é centrifugado, pasteurizado e concentrado a um líquido viscoso com aproximadamente 70% de açúcar e 0,5% de betanina, desta maneira, este produto conhecido como suco de beterraba concentrado, é utilizado na indústria de alimentos como ingrediente. Também é possível a produção de um extrato colorido (o que aumenta o poder colorante e reduz o sabor) pela fermentação de alguns açúcares a álcool com posterior retirada deste produto durante a etapa de concentração (Yamada et al, 1980).

O suco pode ser transformado em pó pela secagem em *spray* juntamente com maltodextrina (Chandra et al, 1993).

O mesmo autor comenta ainda que a betanina possui uma coloração tão intensa quanto outros corantes artificiais semelhantes como Amaranto e Ponceau 4R, sendo que em produtos como iogurte usa-se comumente 5ppm de betanina. Já no sorvete sabor morango a sua concentração é de aproximadamente 20ppm.

É necessário mencionar que o suco de beterraba oferecido no mercado possui uma especificação de aproximadamente 1% de betanina, já no pó a concentração cai para cerca de 0,4 a 0,7% do colorante (Francis, 1989).

A susceptibilidade da betanina ao calor, oxigênio e a alta atividade de água restringe seu uso como corante alimentício, sendo mais utilizada em produtos que possuem um nível restrito de tratamento térmico, ou que possuam baixa atividade de água, ou até mesmo em alimentos com pequenos prazos de validade que não incluam SO₂ como agente conservante na sua formulação. Desta maneira os produtos mais comuns de aplicação deste corante são as misturas de pós e produtos congelados (Francis, 1989).

O sorvete consiste na maior aplicação para o corante à base de beterraba, a maioria dos sorvetes com tonalidade rosa na Alemanha utilizam suco de beterraba ou corante a base de beterraba na sua composição, sendo que a betanina se apresenta em concentrações que variam de 15 a 25ppm (Yamada et al, 1980).

Assim como no sorvete, no iogurte este corante novamente é o de preferência, seguido da curcumina. Sabe-se que a proporção usualmente utilizada é de cerca de 4 a 8 ppm. Neste tipo de produto a qualidade microbiológica do corante é particularmente importante devido ao fato do suco de beterraba ser susceptível ao crescimento de leveduras e fungos. Assim se estabelece níveis ótimos com valores menores de 10 unidade formadora de colônia por grama (UFC/g) do produto. A boa qualidade depende do processamento para a obtenção do suco já que este suco possui grandes níveis de açúcar o que possibilita o desenvolvimento de bolores e leveduras. O armazenamento em temperaturas inferiores a 5°C é indicado para auxiliar no processo de conservação (Henry, 1996).

2.7.3.2- Fatores que interferem na cor e estabilidade do corante de beterraba

Como a maioria dos corantes naturais, o corante à base de beterraba sofre de inerente instabilidade, sendo mais estável em condições de baixos pHs e estando sujeito a degradações dos pigmentos para produtos incolores ou com formação de pigmentos marrons, sendo que metabólitos insolúveis também podem ocorrer (Jackman & Smith, 1996).

- pH: o corante de beterraba mostra boa estabilidade em pH 4,5. Em pH de 7,0 ou acima desse valor a betanina se degrada mais rapidamente não sendo recomendada sua aplicação em meios alcalinos. A coloração não sofre mudanças significativas em valores de pH que variam de 3 a 7, já em condições muito ácidas o corante adquire um tom mais azulado, uma vez que a forma vermelha aniônica é convertida a um cátion violeta. Em condições de alcalinidade a coloração se torna amarelada chegando a tons de marrom devido à quebra da betanina.
- Temperatura: os pigmentos de beterraba são susceptíveis à degradação pelo calor, fator que limita sensivelmente sua utilização como corante alimentício. A taxa de diminuição da cor em diferentes temperaturas é dependente de variados fatores como pH e atividade de água. O processo de pasteurização do suco usado como corante provoca uma diminuição de até 5% na intensidade da cor. O aquecimento por um curto período de tempo, no caso do suco, é aceitável sendo que o fator mais importante consiste no rápido resfriamento na sequência do processamento.
- Oxigênio: as betaninas são susceptíveis à oxidação e perdem a coloração, sendo que isto é mais comumente observado durante a vida de prateleira dos alimentos, e os produtos com alta atividade de água apresentam esta oxidação de maneira mais evidente. Alguns antioxidantes como o ácido ascórbico tem se mostrado benéfico para evitar a descoloração deste

pigmento, mesmo sabendo que outros agentes como β -hidroxianizol (BHA) e o β -hidroxitolueno (BHT) se mostraram inefetivos.

- Luz: a luz é capaz de causar a degradação dos pigmentos de beterraba, no entanto, outros fatores têm uma maior relevância no efeito descolorante, causando limitação para seu uso como ingrediente alimentício.
- Atividade de Água: o pó obtido pela secagem do suco de beterraba quando armazenado em ambiente seco é bastante estável, mesmo na presença de oxigênio. Pós à base de carotenóides nas mesmas condições são oxidados mais rapidamente. Já em meio aquoso soluções com alta concentração de sólido promovem maior estabilização da cor do pigmento.
- Cátions: alguns íons bi e tri valentes, particularmente o ferro e cobre, aceleram a degradação das betaninas. Desta maneira o uso de seqüestrantes ou agentes quelantes melhoram a estabilização da cor.
- Dióxido de Enxofre: a presença de SO_2 causa uma total e completa descoloração dos pigmentos de beterraba, assim os conservantes utilizados juntamente com pigmentos deste tipo devem ser benzoatos e sorbatos.

2.7.3.3- Legislação

O suco concentrado de beterraba é permitido universalmente como corante de alimentos, sendo muito utilizado na Europa e América do Norte além de muitos outros países como Egito, Índia, Tailândia entre outros. A união européia estabeleceu uma padronização para corante de beterraba vermelha com no mínimo 0,4% de betanina (tanto para forma líquida quanto para os pós). As especificações preparadas pelo Join Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA) são bastante

semelhantes, mas usam outra base de cálculo que estabelecem um limite mínimo de 1% para líquidos e 4% para pós (Henry, 1996).

2.7.3.4- Betaninas e formação de complexo de inclusão em ciclodextrinas

Yamada et al (1980) fizeram uso de extrato de antocianinas e betaninas retiradas de diversas fontes, como morangos, uvas e beterraba, sendo que estas substâncias foram examinadas com papel cromatográfico para a comprovação de sua pureza antes da utilização. Para a formação de complexos de inclusão testaram a α -CD e a β -CD, sendo que a β -CD causou um efeito de desbotamento maior do que a α -CD. O efeito de desbotamento é baseado na mudança do íon oxonium para pseudobase e pode ser explicado pela hipótese da formação da pseudobase por dois passos. O primeiro passo seria a formação do complexo de inclusão da antocianina com a β -CD e o segundo passo seria a mudança do íon oxonium para pseudobase por ação catalítica da β -CD. No entanto, a cor volta à mesma intensidade apresentada antes da adição da β -CD pela forte acidificação do meio. Este resultado sugere que a formação do complexo de inclusão pode proteger as antocianinas da decomposição.

Chandra et al (1993) demonstraram que as antocianinas provenientes de suco de cereja (torta) foram estabilizadas com uso de ácido fosfórico e ciclodextrinas, sendo que as misturas de pigmentos quando estocadas em pó e adicionadas anteriormente de ciclodextrinas, permaneceram estáveis em condições laboratoriais mesmo depois de 12 semanas de armazenamento. Ao final de 12 semanas, o mesmo pó de antocianinas sem a presença das ciclodextrinas, apresentava-se em melhores condições do que o suco, onde todas as amostras analisadas, sem acidificação, apresentavam perda da coloração vermelha além de presença de precipitado marrom. As amostras acidificadas com 4% de ácido fosfórico apresentavam claramente menor degradação das antocianinas.

2.8-Análise Sensorial

A análise sensorial pode ser definida como uma disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações em alimentos que possam ser percebidas pelo sentido da visão, olfato, tato, sabor e audição, utilizando conhecimentos de Ciência de Alimentos, Fisiologia, Psicologia e Estatística (Simpson et al, 1998). Entre as aplicações mais freqüentes da análise sensorial tem-se melhoramento e desenvolvimento de novos produtos; avaliação de processos; controle de qualidade; avaliação de estabilidade no armazenamento; estudos de aceitabilidade ou preferência do consumidor e correlação com medidas instrumentais (Ift, 1981).

Os métodos discriminativos são, em geral, de fácil interpretação, requerem pouco tempo, são relativamente baratos e estabelecem a diferença qualitativa e/ou quantitativa entre as amostras (Stone & Sidel, 1985).

A análise descritiva caracteriza e descreve as propriedades sensoriais de um produto, empregando uma linguagem técnica (Murray et al, 2001).

2.9-Cor

A cor é uma percepção visual que resulta da detecção da luz após interação com um objeto (Pomeranz & Meloan, 1994).

Pode variar em três dimensões: tonalidade cromática (“hue”), luminosidade ou brilho (“value” ou “brightness”) e croma, saturação ou pureza (“chroma”, “saturation” ou “purity”). A tonalidade cromática é um atributo pelo qual se identificam as cores (violeta, azul, amarelo, laranja, vermelho e púrpura), essa percepção é resultado de diferenças na absorção da energia radiante em vários comprimentos de onda. A luminosidade é o atributo que descreve a relação entre a luz refletida ou absorvida e caracteriza a cor como mais clara ou mais escura (de

preto a branco). O croma é o atributo que indica a pureza da cor, quanto esta é diferente do cinza (ABNT, 1992; Pomeranz & Meloan, 1994; Lawless & Heymann, 1998).

No sistema CIELAB, a cor é descrita por um diagrama tridimensional, onde o espaço é definido pelas coordenadas retangulares (L^* , a^* , b^*). L^* , a luminosidade, varia de 0 a 100, em que o valor 0 indica o preto e o 100, o branco. O valor a^* define o componente vermelho-verde, variando do vermelho ($+a^*$), localizado de 0° ou 360° , ao verde ($-a^*$), que está a 180° (na ausência dos componentes amarelo ou azul). O valor b^* define o componente amarelo-azul, na ausência dos componentes verde ou vermelho, variando do amarelo ($+b^*$) ao azul ($-b^*$), localizados a 90° e 270° , respectivamente (Shewfelt et al., 1988). Os parâmetros croma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) e tonalidade cromática ($H^* = \arctan(b^*/a^*)$) são coordenadas cilíndricas do mesmo espaço. O H^* mostra a localização da cor em um diagrama, aonde o ângulo 0° representa vermelho puro; o 90° , o amarelo puro; o 180° , o verde puro; e o 270° , o azul puro. O croma é definido pela distância de H^* ao centro do diagrama tridimensional, sendo o 0 no centro e aumentando de acordo com a distância (Clydesdale, 1984; Lawless & Heymann, 1998).

2.10-Textura

A textura é uma propriedade sensorial que pode ser detectada pelos sentidos do tato e da visão, e se manifesta quando o alimento sofre uma deformação (Anzaldúa-Morales, 1994).

As propriedades que caracterizam a textura são classificadas em três categorias: atributos mecânicos, geométricos e de composição. Os primeiros indicam o comportamento mecânico dos alimentos antes da deformação e, por sua vez, dividem-se em primários e secundários. Os primários estão correlacionados com uma propriedade mecânica tal como a força, deformação e energia, os secundários resultam da combinação de propriedades primárias. Os

atributos geométricos são aqueles relacionados com a forma de orientação das partículas dos alimentos. Os de composição são os que, aparentemente, indicam a presença de algum componente no alimento (Anzaldúa-Morales, 1994). Entre as técnicas de avaliação da textura podem ser citados métodos instrumentais, químicos e microscópicos.

Para a análise sensorial de textura de alimentos, têm sido freqüentemente utilizados métodos descritivos (Jack et al, 1993; Murray et al, 2001).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais Utilizados

3.1.1- Corantes

Os corantes empregados na pesquisa foram selecionados pela importância que suas cores representam na indústria alimentícia, desta maneira utilizou-se a bixina com 90% de pureza, fornecida pela Christian Hanssen, o corante à base de beterraba, do mesmo fornecedor e a curcumina (grau analítico) fornecida pela Synth.

Como agentes de inclusão foram utilizadas as ciclodextrinas α e β fornecidas pela Roxette. Todos os demais reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico.

3.1.2-Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- Balança analítica METTLER AE200;
- Espectrofotômetro UV-VIS, marca SHIMADZU, modelo UV-1601PC;
- Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1), marca VARIAN, modelo mercury plus BB, 300MHz;
- Calorímetro Diferencial de Varredura, marca SHIMADZU, modelo DSC-50;

- Termobalança, marca SHIMADZU, modelo TGA-50;
- pH-metro digital, marca TEC-2, acoplado com eletrodos de vidro;
- Incubadora Refrigerada com Agitação Orbital, marca: TECNAL, modelo: TE 424
- Texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems);
- Colorímetro Minolta CR10.

3.2- Métodos

3.2.1- Determinação da Solubilidade e Faixa de Absorvância para Curcumina, Bixina e Betanina

Antes de começar as análises foi necessário conferir a solubilidade e a faixa de absorvância dos corantes fornecidos pelo distribuidor para atestar que seus valores estavam de acordo com os padrões de literatura.

Os corantes foram dissolvidos em diferentes solventes para verificar seu grau de saturação e em seguida procedeu-se a varredura em espectrofotômetro para observação do valor do pico de absorvidade.

Os solventes testados foram: água, etanol, metanol, acetona, éter e etilenoglicol.

3.2.2- Determinação da Constante de Formação Aparente para Curcumina, Bixina e Betanina

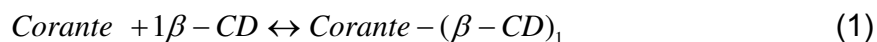
Nesta determinação a concentração final dos corantes foi mantida, para curcumina, bixina e betanina e os valores finais da concentração foram $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, respectivamente. O pH do sistema foi ajustado para 2,4 com a adição de 2 mL de solução tampão citrato de sódio/ácido clorídrico.

Já a concentração de β -CD foi variada pela preparação de uma solução mãe de ciclodextrina com concentração de 0,01 mol/L, onde foram retiradas alíquotas (0-5 mL). O volume obtido no tubo de ensaio da mistura de solução de corante mais β -CD e tampão foi diluído para 10 mL com água destilada e agitado vigorosamente, sendo deixado em repouso para equilíbrio durante 15 minutos.

A absorbância foi medida a 431 nm, 488 nm e 530 nm, para os corantes curcumina, bixina e betanina respectivamente, comprimentos de onda estes, previamente encontrados por varredura espectrofotométrica dos corantes, e foi utilizado um branco preparado com todos os reagentes na mesma concentração com exceção do corante. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

Aos dados obtidos a partir da leitura em espectrofotômetro aplicou-se o método de Benesi-Hildebrand's (Mesplet et al, 2005) para a determinação do coeficiente estequiométrico com a utilização dos dados em um gráfico que combina valores de $1/(A-A_0)$ em função de $1/[\beta\text{-CD}]$ buscando uma relação linear para a determinação deste coeficiente, para posterior obtenção do valor da constante de formação aparente (K_f).

Assumindo que o corante faz um complexo com a molécula de β -CD na proporção de 1:1, o equilíbrio pode ser escrito da seguinte maneira:



e a constante de formação aparente (K_f) do complexo seria dada por:

$$K_f = [\text{Corante} - \beta\text{-CD}] / [\text{Corante}][\beta\text{-CD}]^1 \quad (2)$$

onde, $[\text{Corante} - \beta\text{-CD}]$, $[\text{Corante}]$ e $[\beta\text{-CD}]^1$ estão em equilíbrio.

Desta forma de acordo com Szente & Szejtli (2004), a relação observada entre a absorvância e a concentração de $\beta\text{-CD}$ é dada por:

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{(A_\infty - A_0)K_f[\beta\text{-CD}]^1} + \frac{1}{A_\infty - A_0} \quad (3)$$

onde, A denota a absorvância da concentração de $[\beta\text{-CD}]$ testada, A_0 é a absorvância na ausência de $\beta\text{-CD}$ e A_∞ é a absorvância quando todas as moléculas de corante são efetivamente complexadas, assim sete concentrações foram analisadas para cada corante com intuito de construir um gráfico que demonstrasse qual a relação estequiométrica obtida durante a complexação e o valor de K_f para cada um deles.

3.2.3- Determinação Espectofotométrica dos Corantes Curcumina, Bixina e Betanina

Alíquotas de curcumina variando de $(0,0-4,0) \times 10^{-7}$ mol, de bixina entre $(0,0-4,0) \times 10^{-2}$ mol e de betanina $(0,0-5,0) \times 10^{-3}$ mol, foram adicionadas a 7,5 mL de solução de $\beta\text{-CD}$ de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L e 2mL de tampão citrato/ácido clorídrico e diluído até 10mL em tubo de ensaio. A mistura foi agitada fortemente e deixada em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos.

A absorvância da solução foi determinada nos comprimentos de onda de 431 nm, 488 nm e 530 nm para os corantes curcumina, bixina e betanina respectivamente. Um branco preparado com os mesmos reagentes excluindo-se apenas o corante foi utilizado. As medidas foram feitas todas em duplicata.

3.2.4- Preparação do Complexo de Inclusão β -CD-Corante pelo Método de Co-precipitação

O complexo de inclusão β -CD-corante foi realizado segundo dados fornecidos pela constante de formação aparente que mostrou como cada um dos corantes específicos agiam frente à β -ciclodextrina, formando um valor estequiométrico próprio para cada um deles. Assim, calculou-se a quantidade de corante a ser complexado em uma solução contendo 50mL de β -CD na concentração de 0,06mol/L. Os corantes foram previamente dissolvidos em álcool etílico a 60°C, e adicionados gota, a gota a um balão volumétrico de 250mL de três bocas, onde já se encontrava a solução de β -CD à temperatura de 60°C e sob agitação forte. A mistura foi agitada por um período de 4 horas sob refluxo a 70°C. Em seguida o refluxo foi retirado e a solução permaneceu nesta temperatura por mais 1 hora para que o álcool remanescente fosse todo evaporado.

O sistema foi resfriado à temperatura ambiente e agitado fortemente durante mais 8 horas. A mistura reacional foi mantida por uma noite à temperatura de 4°C e então filtrada com papel de filtro quantitativo faixa branca, com porosidade de 25 micras, sob vácuo. O produto cristalino obtido foi seco em estufa de circulação de ar em temperatura de 55°C e guardado em dessecador para as próximas análises.

3.2.5- Preparação do Complexo de Inclusão β -CD-Corante pelo Método de Mistura Física

- Curcumina: foram macerados 1,135g de β -CD (1 mmol) com 0,1842g de curcumina (0,5 mmol) em um cadinho de porcelana, com auxílio de pistilo, sem a adição de qualquer solvente, durante 15 minutos;
- Bixina: foram macerados 1,135g de β -CD (1 mmol) com 0,3945g de bixina (1 mmol) em um cadinho de porcelana, com auxílio de pistilo, sem a adição de qualquer solvente, durante 15 minutos;
- Betanina: foram macerados 1,135g de β -CD (1 mmol) com 0,5505g de betanina (1 mmol) em um cadinho de porcelana, com auxílio de pistilo, sem a adição de qualquer solvente, durante 15 minutos. Foi testado também uma possível razão estequiométrica de 1:2 β -CD:corante e para isso foram macerados 1,135g de β -CD (1 mmol) com 0,2752g de betanina (0,5 mmol);

3.2.6- Preparação do Complexo de Inclusão α -CD-Betanina pelo Método de Mistura Física

Além do teste feito com a β -CD foi testada também a possibilidade de formação de complexo com a α -ciclodextrina, onde foram macerados 0,972g de α -CD (1 mmol) com 0,5505g de betanina (1 mmol) em um cadinho de porcelana, com auxílio de pistilo, sem a adição de qualquer solvente, durante 15 minutos. Foi testado também uma possível razão estequiométrica de 1:2 α -CD:corante e para isso foram macerados 0,972g de α -CD (1 mmol) com 0,2752g de betanina (0,5 mmol).

3.2.7- Preparação do Complexo de Inclusão β -CD-Corante pelo Método de Dióxido de Carbono Supercrítico

O complexo de inclusão β -CD-corante no método supercrítico foi feito a uma temperatura de 30°C, com um tempo de permanência de 12 horas, sendo que a pressão utilizada foi de 250Kgf/s². Durante a preparação as proporções estequiométricas de corante e CDs foram mantidas e adequadas para o método.

3.2.8- Caracterização do Complexo Obtido

Os complexos formados foram caracterizados por várias técnicas diferentes. O método selecionado depende da informação exigida sobre o complexo, que pode variar simplesmente da necessidade de se saber se a complexação ocorreu, até quantificar a extensão da complexação (Bergamasco, 2003). Os principais métodos empregados são resumidamente apresentados na sequência.

3.2.8.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear de prótons (RMN-H¹) e do carbono 13 (RMN-C¹³) é eficiente para a identificação e estudo dos compostos de inclusão com ciclodextrinas, seja no estado sólido ou no estado líquido. Na molécula de β -ciclodextrina, as unidades de glicose possuem grupos de hidroxilas primárias e secundárias nas regiões terminais da estrutura toroidal. Os prótons H(3) e H(5) são direcionados para o interior da cavidade da molécula, enquanto H(1), H(2) e H(4) estão localizados no seu exterior. Desta forma, se a molécula hóspede está acomodada na cavidade, os prótons localizados no interior da cavidade, H(3) e H(5), ou próximo a ela, H(6) devem estar deslocados. Alternativamente, se a associação ocorrer no exterior da estrutura toroidal, H(1), H(2) e/ou H(4) devem ser afetados (Bergamasco, 2003; Szejtli, 1988).

Os espectros de RMN de hidrogênio (^1H -RMN) foram obtidos de soluções usando água deuterada como solvente. Estes espectros de RMN foram obtidos à temperatura ambiente ($22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), com campo magnético de 300,058 MHz, tempo de aquisição (at) de 2,0 segundos, pulso (pw) de 45° , 128 repetições e uma faixa espectral (sw) de 0 a 12 ppm.

3.2.8.2- Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Esta técnica pode ser utilizada para demonstrar a complexação de alguns hóspedes.

- Hóspede com alto ponto de fusão e ebulição: a DSC revela dois picos para a ciclodextrina livre. A 100°C há um pico para a liberação de água, e a 300°C um pico aparece como a decomposição da ciclodextrina. Muitos complexos não têm pico, ou um pico reduzido a 100°C que resulta do deslocamento das moléculas de água da cavidade pelo hóspede.
- Hóspedes Voláteis: a formação do complexo com hóspedes voláteis resulta num aumento da temperatura de ebulição do hóspede. Assim, a temperatura de ebulição aumentada é uma indicação de complexação.
- Hóspedes com ponto de fusão baixo: similarmente, a ausência de um pico de fusão para alguns hóspedes é uma indicação de complexação. Esta técnica é limitada para aqueles hóspedes que têm ponto de fusão ou ebulição menor que a temperatura de decomposição da ciclodextrina (300°C) ou que é maior ou menor que a da água (100°C) (Bergamasco, 2003).

Para as análises de DSC foram utilizados recipientes de alumínio e aproximadamente 6 mg de amostra. As amostras foram submetidas a um intervalo

de aquecimento da temperatura ambiente até 500° C, com uma taxa de aquecimento (β) de 10° C/min e fluxo de nitrogênio de 20 mL/min.

3.2.8.3- Termogravimetria (TG) e termogravimetria diferencial (DTG)

Estas técnicas fornecem dados quantitativos de perda de massa com o aumento da temperatura. A ciclodextrina perde seu teor de água quando a temperatura se aproxima de 100°C, e começa a se decompor acima de 250°C. Este método é adequado para determinar se um produto particular é um complexo verdadeiro. Se a substância hóspede não está complexada, freqüentemente sofre alguma alteração antes da degradação térmica da CD (250-300°C). Esta alteração pode ser devida à evaporação, decomposição, oxidação, fusão ou transição polimórfica (Szejtli, 1988).

Aproximadamente 6 mg de amostra foram colocadas em um recipiente de platina. Cada amostra foi submetida a um aquecimento desde a temperatura ambiente até 1000°C, em atmosfera de nitrogênio (20 mL/min) e taxa de aquecimento (β) de 10°C/min.

3.2.9- Testes de Estabilidade

A estabilidade dos corantes frente à luz foi testada com base em estudos de Mاتيoli & Rodriguez-Amaya (2002).

3.2.9.1- Estocagem

Os corantes bixina, bixina- β CD, curcumina e curcumina- β CD foram armazenados em embalagens de polietileno com área de 100cm², nos quais foram colocados 1g de material. Parte das embalagens foram expostas à luz natural, enquanto outras foram protegidas da luz, em ambiente escuro durante 53 dias, à temperatura ambiente.

3.2.9.2- Quantificação dos corantes

Em erlenmeyer de 50mL foi pesado 0,1g do pó que foi disperso em 10mL de acetona e 10mL de hexano. Seguiu-se agitação em agitador mecânico a 260 rpm, por 55 minutos a 10°C. Posteriormente foram realizadas diluições necessárias para a leitura em espectrofotômetro e a concentração calculada.

3.2.9.3- Análise dos resultados

Os resultados percentuais das concentrações dos corantes monitorados no período experimental foram analisados por regressão linear, a qual permitiu definir o modelo matemático mais adequado à cinética de reação dos corantes ao tratamento empregado, segundo a equação definida por Arabshahi & Lund (1985).

3.2.10- Aplicação do Corante Fabricado

O corante produzido por diversas técnicas foi aplicado em alimento para a visualização de possíveis melhoras na solubilidade e poder colorante, para tanto, sabendo-se que todos os corantes relacionados eram compatíveis com a indústria de laticínios escolheu-se o iogurte e o queijo para a aplicação dos complexos de curcumina e betanina e o queijo e o requeijão para a aplicação do complexo de bixina.

- O iogurte foi preparado com a utilização de três litros de leite pasteurizado adicionado de um copo de iogurte natural mantido por 6 horas a temperatura de 40°C, para fermentação adequada. Posteriormente separou-se um litro de iogurte para servir como branco, ou seja, ausente de corante, ao segundo litro adicionou-se 5ppm de curcumina e ao litro final 5ppm de curcumina complexada. Os testes foram realizados com estas amostras.
- O queijo tipo minas frescal foi preparado utilizando-se 5L de leite pasteurizado, uma colher de coalho dissolvido em ¼ de copo com água e

uma colher de iogurte natural. Foram preparadas três amostras, sendo que à primeira não foi adicionado corante, ao segundo foi adicionado 20ppm de curcumina e ao terceiro foi adicionado 20ppm de curcumina complexada. Os testes foram realizados com estas amostras.

- Para fabricação do requeijão foram utilizados 5L de leite, creme de leite UHT, sal e leite pra dar o ponto da massa. O processo de obtenção da massa foi feito normalmente, sendo que à primeira amostra não foi adicionado corante, já a segunda amostra adicionou-se 20ppm de bixina e a terceira 20ppm de bixina complexada. O corante foi acrescentado as amostras sempre no momento de cozimento da massa.

3.2.10.1- Análise sensorial

Os testes de análise sensorial foram realizados em supermercado da cidade de Maringá, onde os clientes que freqüentam o local se predispunham a provar as amostras e preencher a ficha de análise (**Anexo II**) manifestando sua avaliação quanto ao produto testado.

Para verificar a aceitação da nova formulação com aplicação de corante, 50 consumidores avaliaram amostras de queijo e requeijão. Utilizou-se uma escala hedônica estruturada de 7 pontos, com termos verbais nas extremidades e meio. Também foi solicitado aos provadores que citassem os motivos pelos quais comprariam ou não a amostra analisada.

3.2.10.2- Análise da cor

As amostras (queijo, requeijão e iogurte) foram acondicionadas e mantidas refrigeradas. Foi empregada a técnica instrumental tradicional para a determinação de cor com a utilização de colorímetro. As análises foram realizadas empregando-se um delineamento inteiramente ao acaso. Para a determinação instrumental, foram feitas as leituras (3 repetições) utilizando-se um

colorímetro Minolta CR10. O equipamento possuía como especificação: área de leitura 8mm, iluminante CIE D₆₅ (luz natural do dia), colocado num ângulo de 8° e observador padrão CIE 10° (Minolta, 2008). O colorímetro forneceu diretamente os parâmetros de L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b*(componente amarelo-azul).

3.2.10.3- Análise de textura

O queijo tipo minas frescal foi cortando com molde plástico de 1,5cm de raio e altura de aproximadamente 1cm, enquanto para o requeijão foram utilizados cortes retangulares de 1cm de altura por 2cm de diâmetro. As amostras foram analisadas (dez repetições, inteiramente ao acaso) utilizando-se um texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems). As condições de operação foram: sensor (“probe”) cilíndrico, de metal, de diâmetro de 2,5cm (P25), força de 0,05N, velocidade do teste 3mm/s, distância de penetração de 3mm. A partir dos perfis de textura, foram avaliados os parâmetros de dureza (N), coesividade (adimensional), elasticidade (adimensional), adesividade (Ns) e gomosidade (N) (Pons & Fiszman, 1996).

3.2.10.4- Análise estatística

Foi empregado um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se amostra (alimento aplicado corante) como única causa de variação e teste de médias Tukey a 5% de probabilidade, por meio do software Statística 7.0/2003 (Stat Soft, Inc. Tulsa, OK, EUA).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Resultado das Análises Realizadas para o Corante Curcumina

A solubilização do corante ocorreu nos solventes etanol, metanol, éter, acetona e etilenoglicol, com exceção da água, no entanto, alguns destes solventes não se mostravam adequados para a utilização em espectrofotômetro por causarem alterações na linha de base, sendo que o único que não apresentava tais alterações foi o metanol, em concordância com os relatos de Tang et al (2002) que preconiza a utilização deste solvente para preparações de análises espectrofotométricas com curcumina.

Segundo Henry (1996) a curcumina é bastante solúvel em solventes orgânicos e isto foi verificado na prática pela utilização dos solventes já citados. O mesmo autor mostra uma varredura do corante feita com acetona (**figura 6**), onde o pico de absorvância se encontra na faixa de 430nm.

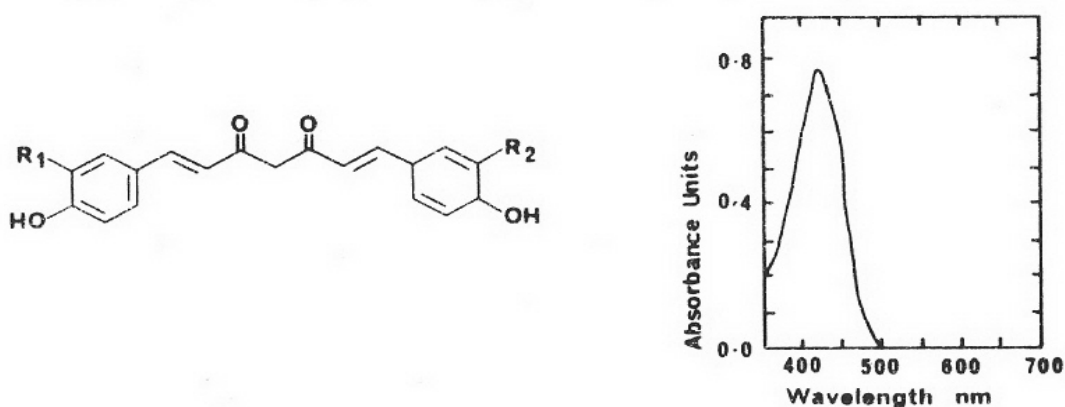


Figura 6: À esquerda molécula de curcumina, à direita espectro de curcumina feito com acetona a 0,0005% (Henry, 1996).

Desta maneira, preparou-se uma solução mãe de corante curcumina em metanol com concentração de 1×10^{-3} molar de onde foram retiradas 5 alíquotas e feitas diluições 1:1 em água destilada e após a solução ser agitada foi realizada a

varredura entre 190-1100nm, esta amplitude foi necessária pra garantir que havia presença de pico somente na faixa esperada (430nm). Foi observado um espectro de absorbância concordante com os valores de literatura (**figura 6**). Três alíquotas ilustram a **figura 7**, que apresenta somente os principais pontos variando de 300-500nm mostrando o comportamento deste corante durante a varredura realizada.

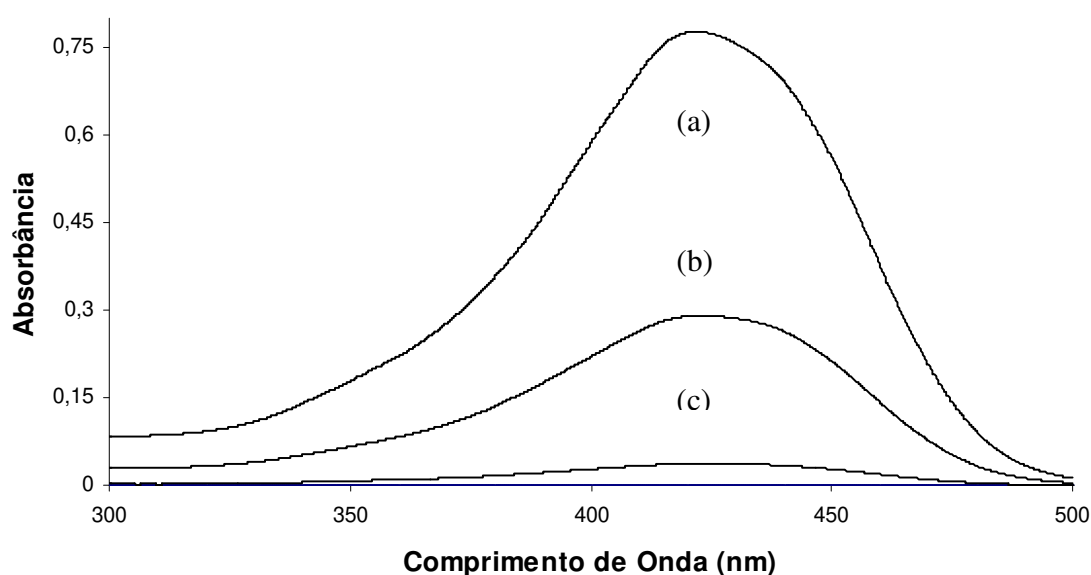


Figura 7: Aumento do pico de absorção em função do acréscimo da concentração de curcumina nas concentrações 5×10^{-5} (a), 1×10^{-5} (b), 5×10^{-6} (c) molar. Espectro de absorção da curcumina em metanol;

4.1.1- Espectro de Absorção

A **figura 8** apresenta a variação do pico de absorção conforme acréscimo de β -CD, onde diferentes concentrações de β -CD foram adicionadas à mesma concentração de curcumina e pode-se verificar que a primeira curva referente à ausência de β -CD apresenta pico de absorção em 426nm, já a última linha representada pela adição de 0,005 mol/L de β -CD tem o pico deslocado para 431,5nm. Este efeito batocrômico pode ser explicado pela proteção exercida pela molécula de β -CD nos elétrons excitados do cromóforo, conseqüentemente

apresentando um indicativo de formação de complexo, em concordância com o estudo de Tang et al (2002) que demonstraram que a curcumina apresentava espectros de absorção diferentes conforme variavam-se as concentrações de β -CD, ou seja, os valores de pico de absorção variaram de 426nm a 431nm segundo o acréscimo de β -CD.

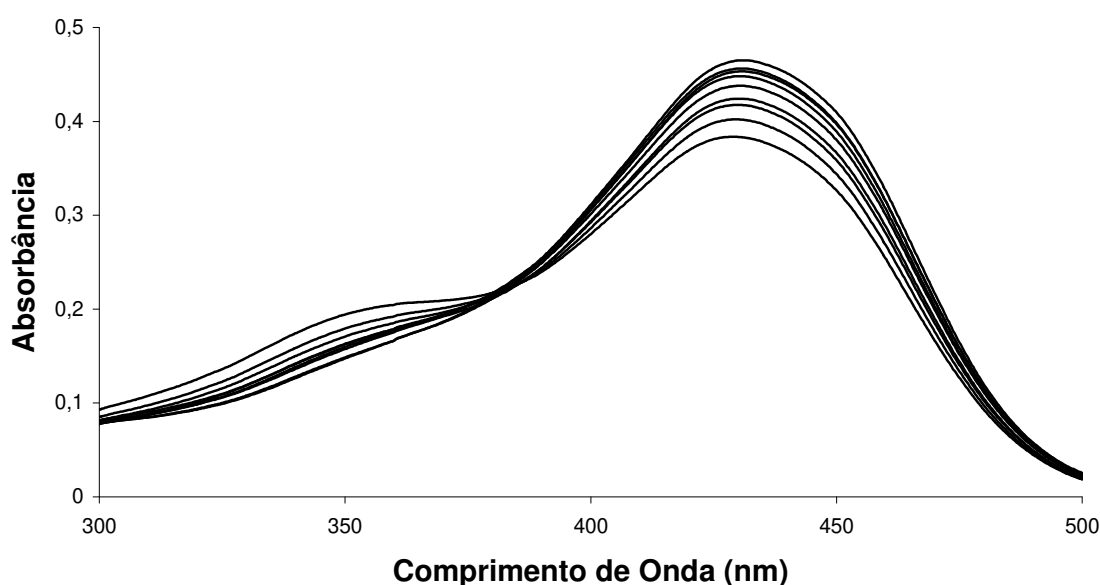


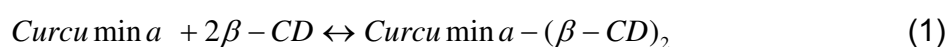
Figura 1: Espectro de absorção da curcumina em várias concentrações de β -CD; de baixo para cima correspondente a: 0; $5,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $1,5 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3}$; $3,0 \times 10^{-3}$; $4,0 \times 10^{-3}$; 5×10^{-3} mol/L, com [curcumina] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L; pH=2,4.

4.1.2- Determinação da Constante de Formação Aparente para a Curcumina

Tang et al (2002) mencionam ainda em seus estudos que a dimensão da molécula de curcumina é bastante ampla para ser incluída em apenas uma cavidade da molécula de β -CD, desta maneira seria racional imaginar uma proporção de 2 moléculas de β -CD para 1 molécula de curcumina. No entanto, Tonnesen et al., (2002) demonstraram em seu trabalho que a proporção de complexação entre curcumina- β -CD era de 1:1.

Por haver contradição entre os autores e devido à necessidade de se realizar a complexação do corante com a molécula hóspede, o presente trabalho determinou o coeficiente estequiométrico a ser utilizado durante as complexações subsequentes.

Considerando que a curcumina faz um complexo com a molécula de β -CD na proporção de 1:2, o equilíbrio pode ser escrito da seguinte maneira:



e a constante de formação aparente (K_f) do complexo seria dada por:

$$K_f = [\text{Curcu min a} - \beta - \text{CD}] / [\text{Curcu min a}][\beta - \text{CD}]^2 \quad (2)$$

onde, [Curcumina- β -CD], [Curcumina] e [β -CD]² estão em equilíbrio.

Desta forma de acordo com Szente & Szejtli (2004), a relação observada entre a absorvância e a concentração de β -CD é dada por:

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{(A_\infty - A_0)K_f[\beta - \text{CD}]^2} + \frac{1}{A_\infty - A_0} \quad (3)$$

onde, A corresponde à absorvância da concentração de [β -CD] testada, A_0 à absorvância na ausência de β -CD e A_∞ à absorvância quando todas as moléculas de curcumina são efetivamente complexadas. Foram analisadas sete concentrações com o intuito de construir um gráfico (**figura 9**) que demonstrasse a relação estequiométrica obtida durante a complexação de acordo com o método de Benesi-Hildebrand's (Mesplet, 2005).

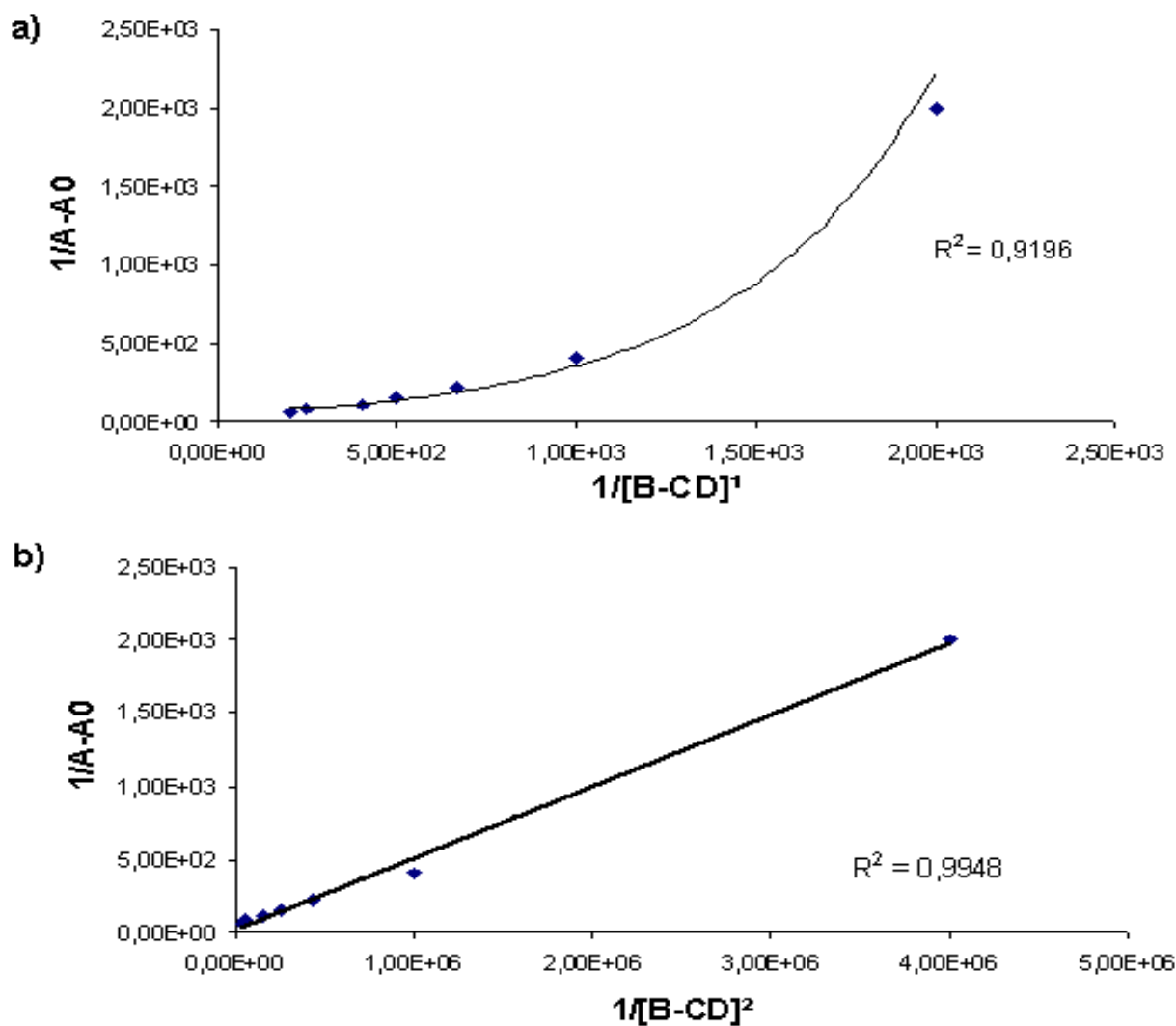


Figura 9: Determinação da estequiometria do complexo de inclusão curcumina-β-CD pelo método de Benesi-Hildebrand's utilizando-se solução aquosa: a) $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]$ (hipótese de formação de complexo 1:1); b) $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]^2$ (hipótese de formação de complexo 1:2).

Assim quando se plotam graficamente valores de $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]$ observa-se uma relação não linear o que reflete a não formação de complexo na razão estequiometria de 1:1 como apresentado na **figura 9a**.

Testou-se a hipótese 1:2 plotando-se no gráfico valores de $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]^2$, conforme estudos apresentados por Mesplet et al. (2005) e Baranac et al (1990). Como resultado uma relação linear foi obtida (relação polinomial de segunda ordem) com valor de $R^2 = 0,9948$, definindo a proporção estequiométrica de 1:2 (**figura 9b**) conforme resultado previsto por Tang et al (2002) e em discordância com os estudos de Tonnesen et al (2002).

O valor da constante de formação aparente, baseando-se numa solução aquosa de curcumina, apresentou valor de $K_f = 4 \times 10^4 \text{ mol}^{-2} \cdot \text{L}^2$.

Entretanto, alguns experimentos foram realizados utilizando-se curcumina em solução contendo metanol e o valor da constante de formação aparente obtido foi de $1,49 \times 10^5 \text{ mol}^{-2} \cdot \text{L}^2$, com valor de R^2 igual a 0,9982 (**figura 10**). Isto significa que quando um complexo curcumina- β -CD com razão 1:2, é formado na presença de outro solvente que não água a constante que representa a estabilidade do complexo formado é maior, indicando formação de um complexo mais estável.

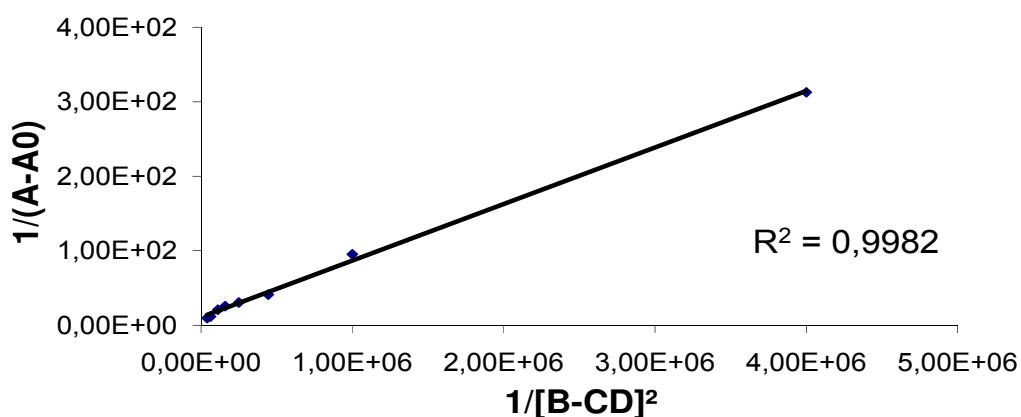


Figura 10: Determinação da estequiometria do complexo de inclusão curcumina- β -CD utilizando-se curcumina em solução de metanol $1/(A - A_0)$ em função $1/[\beta - CD]^2$.

4.1.3- Análise de Sobrenadante do Complexo de Inclusão Obtido pelo Método de Co-precipitação

Uma maneira de analisar hipoteticamente a formação de complexo seria pela medida espectrofotométrica do sobrenadante obtido após a coleta do pó complexado. Os resultados obtidos demonstraram que do total de curcumina colocado no processo somente 13,69% restaram neste líquido, ou seja, estavam livres. A outra parcela, 86,31%, estava na forma de pó não podendo ser garantido que todo o corante estivesse realmente incluso no interior da molécula de β -CD, mas, todavia, isto apresenta um bom indicativo de formação de complexo, precisando outras análises como DSC, TGA e RMN para a confirmação.

4.1.4- Análise dos Complexos Formados por TGA

As curvas termogravimétricas da curcumina e da β -ciclodextrina são apresentadas na **figura 11**.

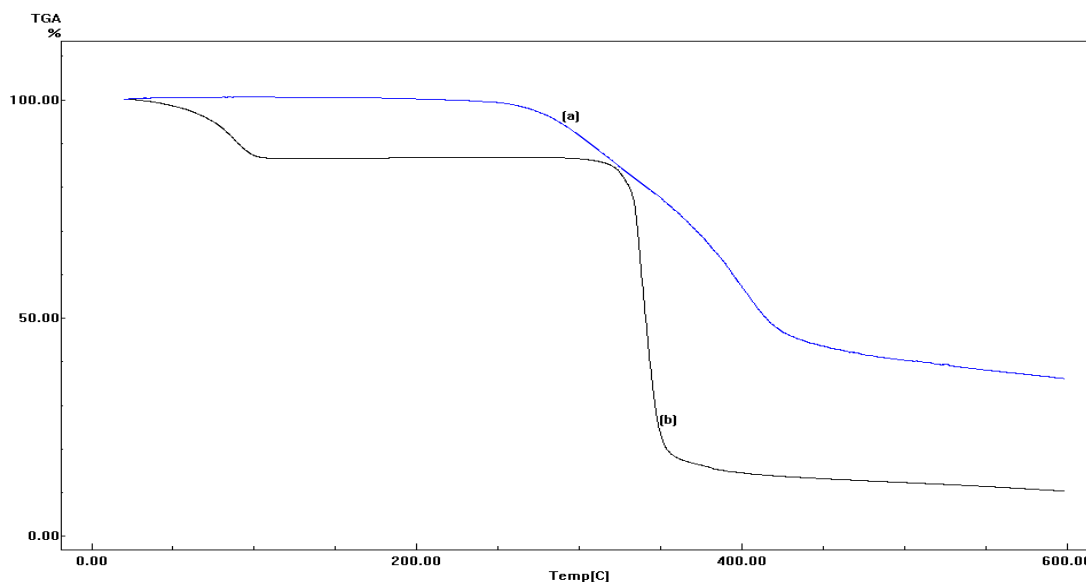


Figura 11: Curvas termogravimétricas dos 2 produtos usados para formação de complexos, curcumina (a) e β -CD (b);

O primeiro estágio de perda de massa da β -CD, na análise termogravimétrica, ocorre na temperatura de 26-107°C, e corresponde à desidratação da molécula como resultante da perda de 13% de umidade. O segundo estágio está relacionado à decomposição da estrutura da β -CD, com perda de 67% de massa do composto, na faixa de temperatura de 280°C a 500°C. Por outro lado a curcumina apresenta um comportamento diferenciado, por ser uma molécula pouco hidrofílica não se observa o estágio de perda de água como na β -CD fazendo com que a molécula passe dos 200°C sem alteração de massa. A 246°C a molécula começa a perder massa num processo contínuo de decréscimo até 450°C, com perda de aproximadamente 56%, entrando posteriormente numa sequência de perda lenta e gradativa.

A partir da análise das curvas termogravimétricas (**figura 12**) e dos dados mostrados na **tabela 2**, pode-se verificar que as curvas da β -CD e da curcumina mistura física com amassamento, praticamente se sobrepõem, o que denota a presença de β -CD na forma livre, ambas as curvas a e b mantêm a linha de manutenção de massa (platô) entre 100 e 250°C com uma perda de massa inferior à da β -CD, mas superior ao da curcumina o que era esperado já que o complexo formado possui dois terços da quantidade de água da β -CD pura.

Um fator que indica com mais precisão a formação de complexo é a mudança de características físicas como o ponto de decomposição. Segundo a **tabela 2**, a curva que mais se encontra entre o valor médio dos reagentes utilizados para a formação do complexo é a do método de co-precipitação. O método físico com amassamento se assemelha ao ponto de decomposição da β -CD pura. O método físico simples mostra-se termodinamicamente menos estável quando comparado às duas curvas anteriores, pois sua perda de massa começa a ocorrer pelo menos 60°C antes da curva de co-precipitação.

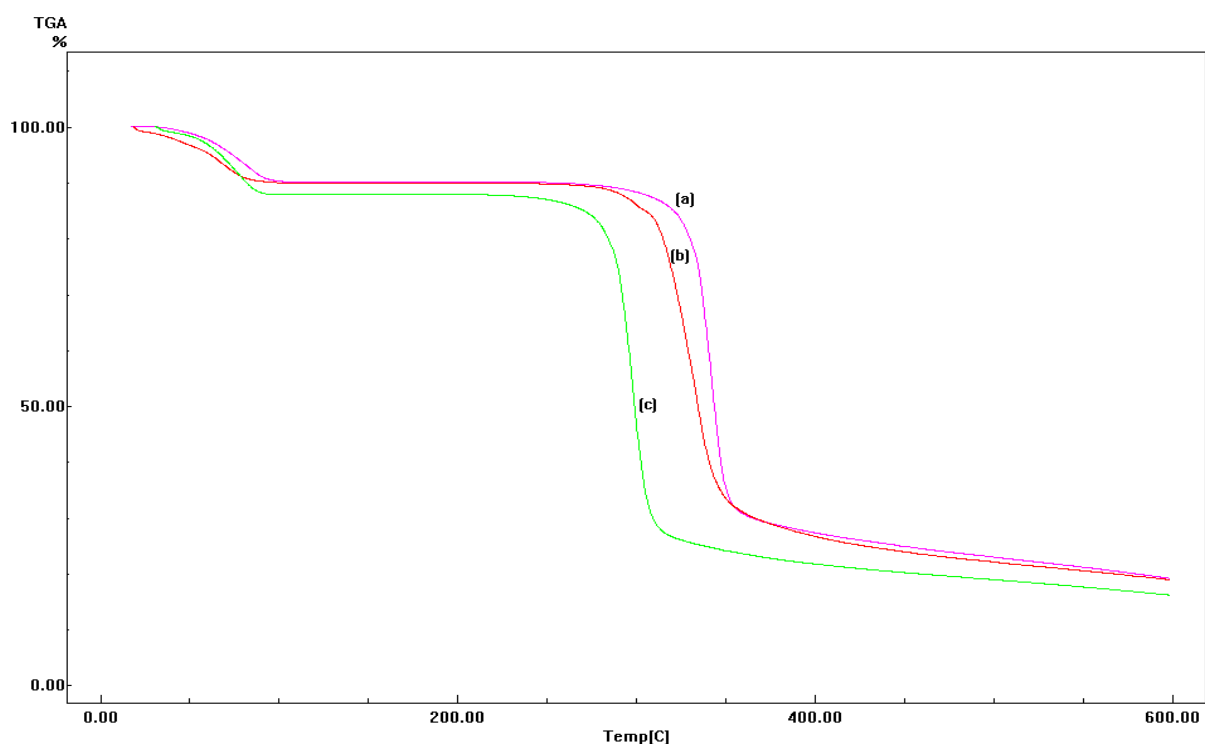


Figura 12: Curvas termogravimétricas dos produtos complexados, sendo que as letras correspondem respectivamente a: a) curcumina- β -CD mistura física com amassamento, b) curcumina- β -CD co-precipitação e c); curcumina- β -CD mistura física simples;

Tabela 2: Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão.

Sistema	Técnica	T °C de decomposição	Estágio	TGA (faixa de temperatura °C)	Perda de massa (%)
Curcumina	-	270	1	20-175	0,3
			2	175-471	58
			3	471-600	7
β -CD	-	300	1	24,7-104,0	13
			2	250-387	72
			3	387-600	5
Curcumina- β -CD (1:2)	Co-precipitação	280	1	24,7-104	9
			2	250-387	62
			3	387-600	9
	Mistura física amassamento	300	1	24,7-104	10
			2	250-387	62
			3	387-600	9
	Mistura física simples	220	1	24,7-104	12
			2	250-387	65
			3	387-600	6

4.1.5- Análise dos Complexos Formados por DSC

A técnica de DSC foi utilizada para a caracterização preliminar dos compostos de inclusão.

Segundo Szejtli (1988), as ciclodextrinas não apresentam ponto de fusão definido, e acima de 200°C começam a se decompor. As propriedades termoanalíticas observadas dependem de pelo menos quatro fatores: teor de água, estrutura cristalina, velocidade de aquecimento e atmosfera gasosa dos ensaios. Os termogramas de DSC apresentam as medidas dos fluxos de calor gerados e absorvidos pela amostra, durante um aquecimento programado. Em geral, a complexação é verificada pelo desaparecimento do pico endotérmico característico da molécula encapsulada. Este desaparecimento pode ser atribuído ao estado amorfo, à formação do complexo, ou ambos.

A curva de DSC para a β -CD exibe um pico endotérmico a 104,7°C, que é devido à evaporação de água. Há um pequeno pico endotérmico a 220,2°C, sem qualquer perda de massa, que segundo a literatura, pode representar um processo físico e é atribuído a uma transformação reversível da β -CD, contudo a natureza desta transformação não é conhecida (Bergamasco, 2003). O terceiro pico, a 326,1°C, é referente à degradação térmica da β -CD (**figura 13**).

No termograma da curcumina um pico endotérmico é observado a 175°C (**figura 13**) representativo da degradação térmica da substância, desta maneira observa-se que a curcumina não tem ponto de fusão, o que torna um pouco mais complicado atestar a formação de complexo desta substância.

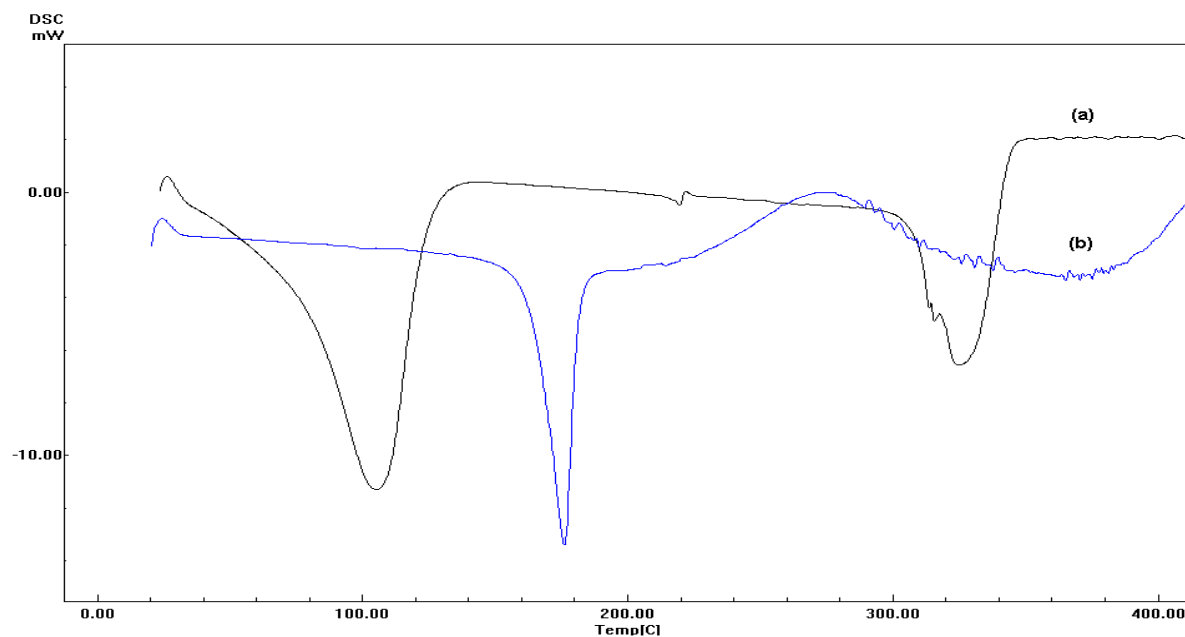


Figura 13: Curvas de DSC para padrões, β -CD (a) e curcumina (b);

A **figura 14** mostra as curvas de DSC para os complexos feitos por diferentes métodos na proporção estequiométrica 1:2.

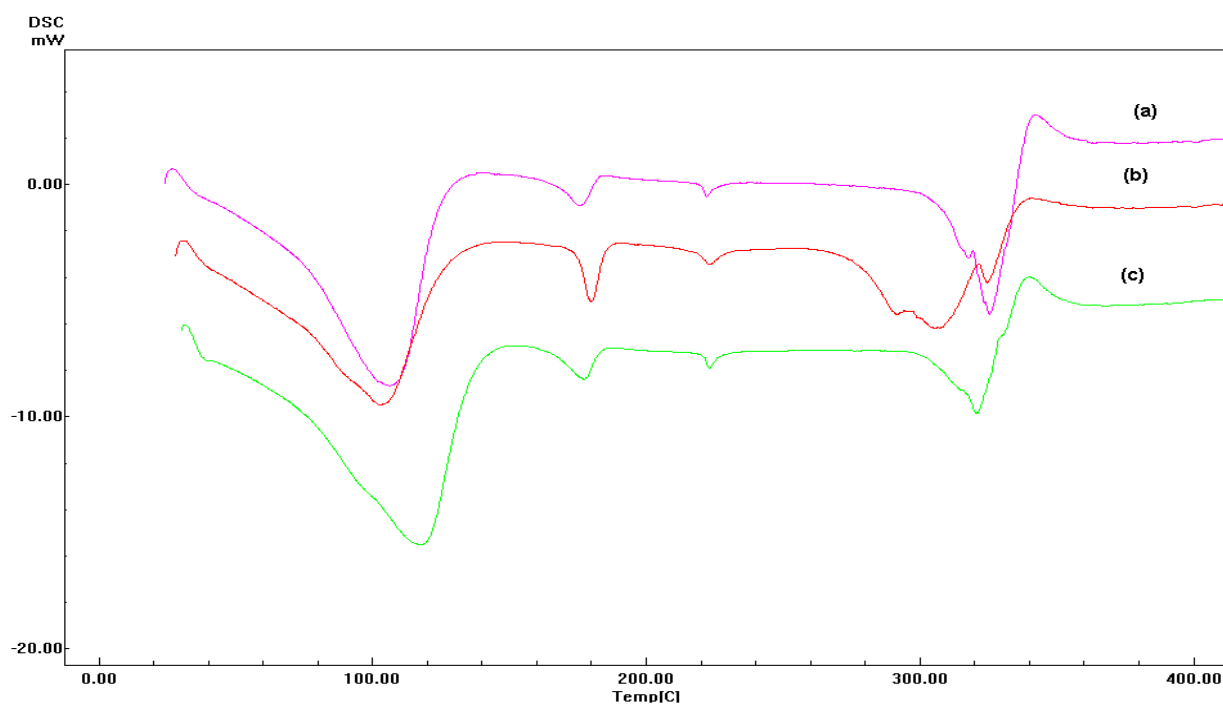


Figura 14: Curvas de DSC para produtos da complexação curcumina- β -CD pelos métodos, mistura física com amassamento (a), co-precipitação (b) e mistura física simples (c);

A **tabela 3** mostra valores de análise térmica dos gráficos de DSC que são úteis para a caracterização e informações sobre uma possível formação de complexo.

Tabela 3: Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão da curcumina- β -CD. MFA (Mistura física com amassamento); CP (Co-precipitação) e MFS (mistura física simples).

	β -CD	Curcumina	MFA	CP	MFS
Temp. evaporação da água(°C)	104,7	-	106,6	103,2	116,7
ΔH do pico de evaporação da água	439,2	-	409,05	340,4	368,7
Temp. degradação curcumina (°C)	-	176	176,66	180,4	177,5
ΔH da degradação da curcumina	-	123,8	18,39	14,2	15,7
Temp. degradação da β -CD (°C)	326	-	325,4	307,5	322
ΔH da degradação da β -CD(°C)	177	-	164,19	182,6	79,2

Segundo Brady & Humiston (2003) e Bergamasco (2003), quanto maiores forem às variações de temperatura e entalpia dos sistemas de picos maior a possibilidade de formação de complexo por alterações de características físicas. Com base na **tabela 3** e analisando a **figura 14** pode-se observar que em relação à evaporação de água comparativamente as temperaturas da mistura física com amassamento (MFA) e da co-precipitação (CP) são bem próximas. Todavia a variação de entalpia causada pelo pico do complexo por co-precipitação é energeticamente inferior indicando uma melhor integração entre a curcumina e a β -CD. Outro dado interessante é que este mesmo complexo promove uma maior proteção térmica da curcumina fazendo com que sua degradação passe de 176°C para 180,45°C, ou seja, um ganho térmico de aproximadamente 4,5°C, sendo que sua variação entálpica também é a mais significativa.

Novamente um fato observado na seção anterior se repete aqui, onde, os valores apresentados pelo complexo mistura física com amassamento são muito similares aos da β -CD indicando que esta se apresenta de forma livre, já a mistura

física simples apresenta dados discrepantes dos anteriores não sendo relevantes para a análise.

4.1.6- Análise dos Complexos Formados por RMN

As indicações de picos de RMN- H^1 dos compostos puros e dos supostos complexos de inclusão no espectro RMN- H^1 estão sumarizadas na **tabela 4**, sendo que a **figura 15** mostra o espectro de RMN- H^1 feito para a molécula de ciclodextrina usando como solvente água deuterada.

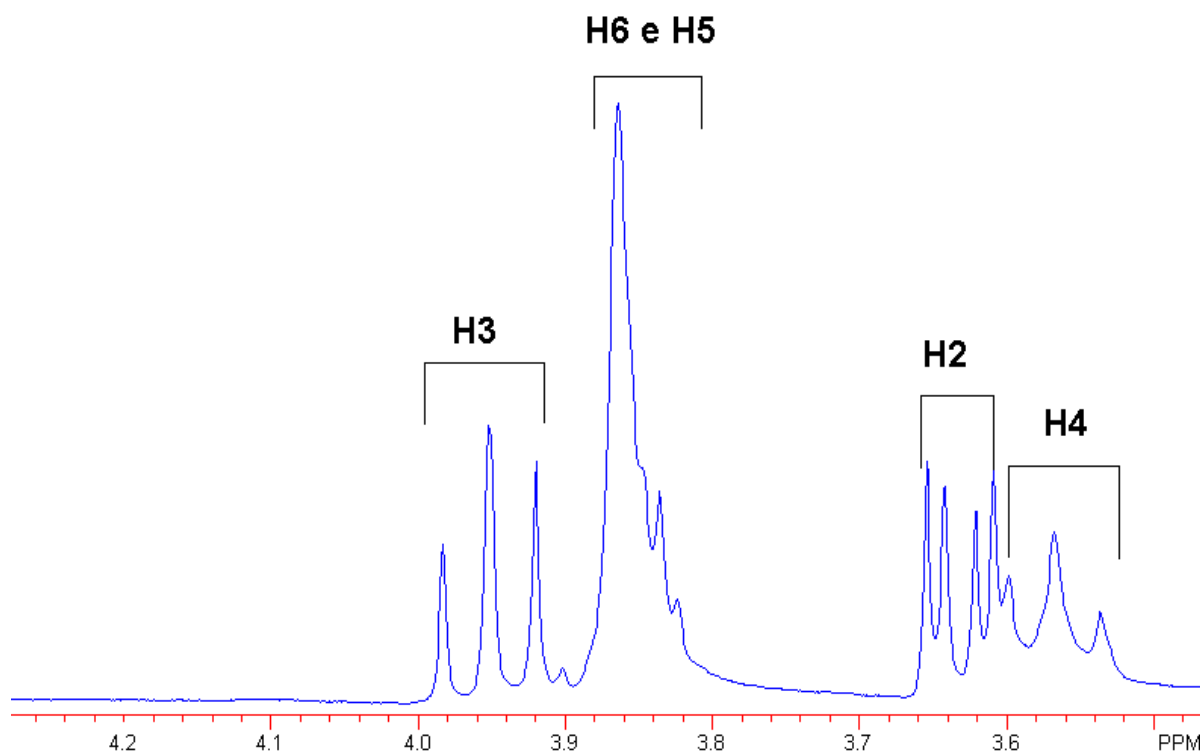


Figura 15: Espectro de RMN- H^1 de β -CD em água deuterada.

Observando-se a **figura 15** verifica-se os hidrogênios de interesse neste tipo de análise para a possível identificação de formação de complexo. Desta maneira, quando há formação de complexo, ou seja, a molécula hóspede entra na cavidade da ciclodextrina os sinais de H3, H5 e H6 mudam caracterizando a formação de complexo.

Por outro lado, para a curcumina não foi possível realizar a análise por RMN devido ao fato da substância ser insolúvel em água, já que seria necessário pelo menos uma pequena solubilização para que o equipamento pudesse detectar o composto, fato que não ocorreu.

Tabela 4: Pico de RMN-H¹ para substâncias puras e possíveis complexos, MFA (Mistura Física com amassamento), CP (Co-precipitação), MFS (Mistura Física Simples) e DSC (Dióxido de carbono supercrítico) (outros RMN-H¹ em Anexo).

	H3	H6 e H5	H2	H4
Curcumina	-	-	-	-
β-CD	3,983	3,865	3,655	3,599
	3,952	3,836	3,642	3,588
	3,921	3,825	3,621	3,537
MFA	3,987	3,896	3,661	3,605
	3,956	3,839	3,649	3,547
	3,925		3,627	3,543
CP	3,983	3,865	3,656	3,601
	3,952	3,847	3,644	3,570
	3,920	3,835	3,623	3,539
MFS	3,986	3,868	3,659	3,604
	3,955	3,850	3,647	3,573
	3,923	3,838	3,626	3,542
DCS	3,989	3,871	3,662	3,606
	3,958	3,841	3,650	3,575
	3,926	3,831	3,629	3,544

Com base nos dados mostrados na **tabela 4** verifica-se que a alteração de pico pelo contato da molécula hóspede com a β-CD é pequena ou nenhuma, assim não há como afirmar a formação de complexo pela utilização deste método. Também pode-se presumir que o complexo é muito pouco solúvel e grande, em adição, este complexo possui alto poder colorante, o que justifica a coloração observada na água deuterada.

Segundo Wimmer et al (2002), hóspedes alifáticos ou complexos com constante de associação baixa geralmente sofrem deslocamentos químicos

insignificantes, o que poderia justificar o não deslocamento químico significativo dos picos da β -CD para estes possíveis complexos.

Uma outra justificativa para este comportamento está relacionada com a dimensão das moléculas, uma vez que nem todas as moléculas se acomodam dentro da cavidade da β -CD de diâmetro de aproximadamente 0,60-0,65nm. Szejtli (1988) observou esta mesma não adequação com o complexo de inclusão p-nitrofenolato- α CD, onde não apareceram deslocamentos químicos significantes do espectro deste complexo. Outro caso semelhante foi descrito por Bergamasco (2003), onde a sulfluramida apesar de outros indícios de complexação também não alterou significativamente os picos da β -CD na análise de RMN.

Nas figuras 40 a 44 (**Anexo I**) são mostrados os espectros de RMN obtidos para os complexos preparados pelos diferentes métodos.

A partir dos resultados apresentados pode-se inferir que a proporção estequiométrica de um possível complexo de inclusão curcumina: β -CD é de 1:2. O método de co-precipitação é o mais viável por possibilitar maiores garantias de probabilidade de formação do complexo.

4.2- Resultado das Análises Realizadas para o Corante Bixina

Assim como no item 4.1 referente à curcumina, aqui também foi necessário testar a solubilidade do corante nos vários solventes possíveis.

Da mesma forma que anteriormente a opção foi feita pelo metanol devido ao seu comportamento mais estável frente a análises espectrofotométricas. Henry (1996) mostra em seu trabalho uma varredura do corante bixina que se apresenta segundo a **figura 16**.

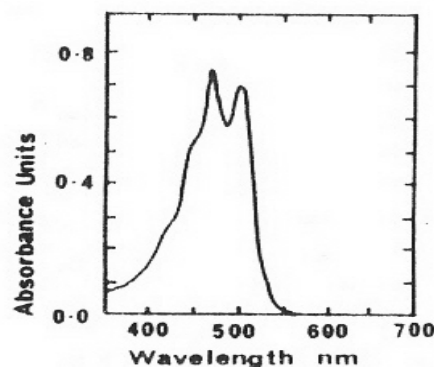
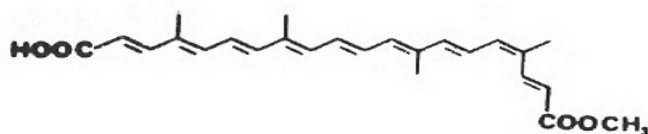


Figura 16: Espectro de absorvância de bixina em clorofórmio na concentração de 0,0003g/100mL (Henry, 1996).

Baseados na experiência anterior com o corante curcumina, preparou-se uma solução mãe de corante bixina em metanol com concentração de 5×10^{-3} molar. Desta solução foi retirada 1 alíquota e feito 3 diluições 1:1 em metanol seguido de agitação e verificou-se durante a varredura feita entre 190-1100nm uma similaridade do pico de absorbância na faixa espectral da substância, cerca de 455nm, com os valores mostrados na **figura 16**, no entanto esta figura foi desenvolvida com clorofórmio que demonstra uma melhor definição dos pico em detrimento do metanol, estas 3 alíquotas ilustram a **figura 17**, que apresenta somente os principais pontos variando de 350-600nm mostrando o comportamento deste corante durante a varredura realizada.

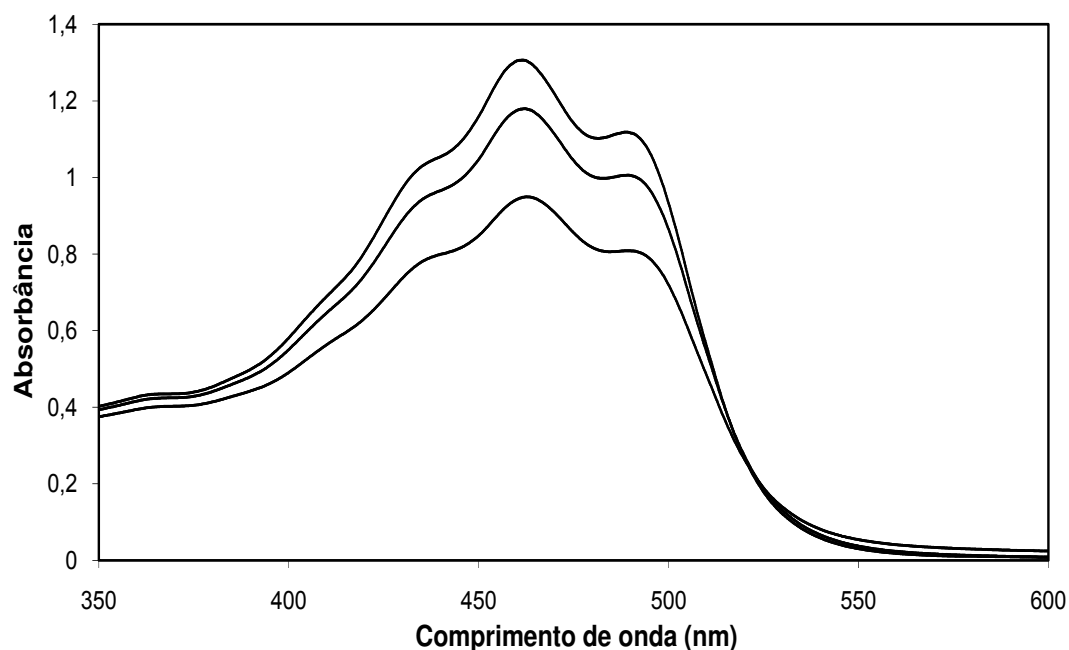


Figura 17: Aumento do pico absorção em função do acréscimo da concentração de bixina com valores de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. espectro de bixina em metanol.

4.2.1- Espectro de Absorção

Ao contrário do comportamento da curcumina que apresentava um efeito batocrômico, para a molécula de bixina não se observou o mesmo efeito. Isto pode ser explicado devido à ausência dos anéis aromáticos que em consequência implicam numa leitura de espectro num ponto confluyente que para o solvente metanol foi de 488nm. No entanto, em semelhança à curcumina observa-se que mesmo com a manutenção da concentração de bixina ocorre um acréscimo da absorvância no mesmo comprimento de onda com a variação crescente de β -CD, o que pode ser indicativo de formação de complexo. Estas informações estão sintetizada nas **figura 18**.

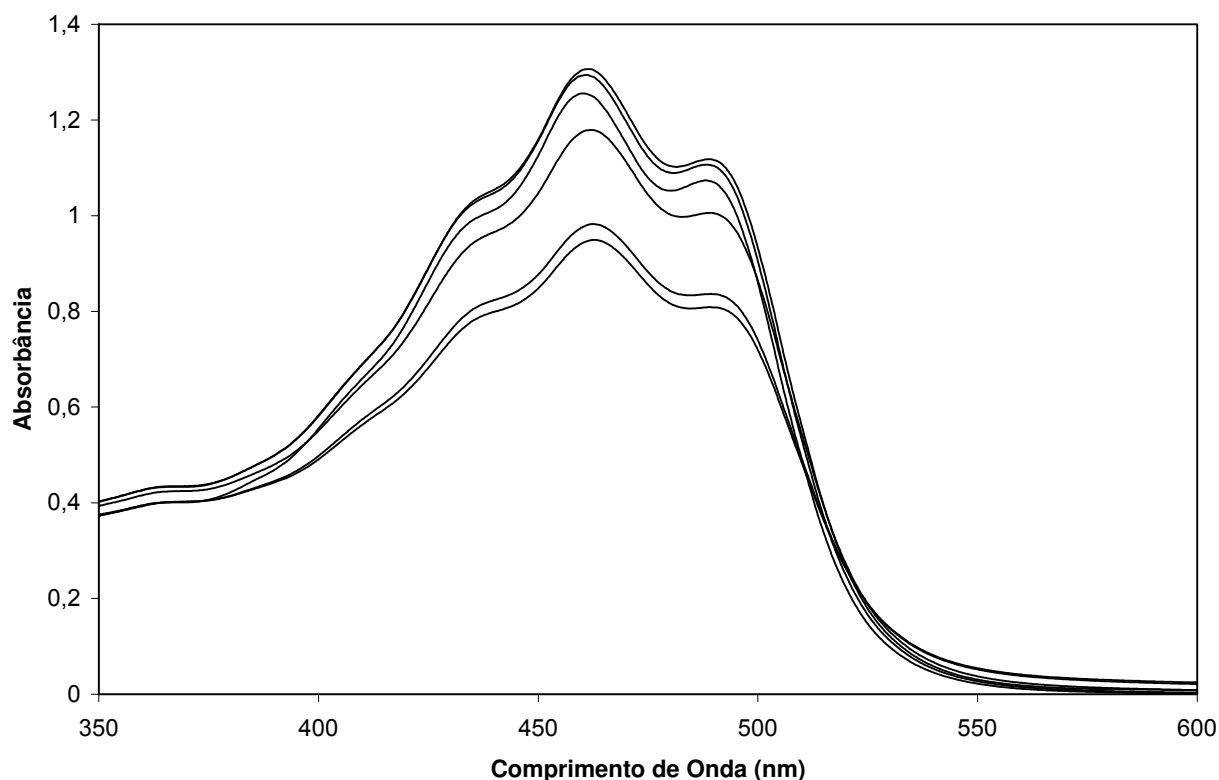
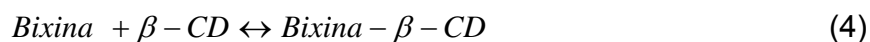


Figura 18: Espectro de absorção de bixina em várias concentrações de β -CD: de baixo para cima, 0; $5,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $1,5 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; Concentração de bixina fixa de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.2- Determinação da Constante de Formação Aparente para a Bixina

Nas pesquisas realizadas em material de literatura e bancos de dados, não se encontram aspectos sobre a formação de complexo Bixina- β -CD. No entanto, Lyng et al (2005) assumem ter realizado esta complexação, mas não fornecem detalhes quanto à proporção estequiométrica e outros dados de relevância. Desta maneira, foram testadas as mesmas proporções estequiométricas usadas para as curcumina. Assim assumindo que a bixina forma complexo de inclusão com a β -ciclodextrina na proporção de 1:1 tem-se o equilíbrio representado pela equação (4):



e a constante de formação aparente (K_f) do complexo seria dada por:

$$K_f = [Bixina - \beta - CD] / [Bixina][\beta - CD] \quad (5)$$

onde, [Bixina- β -CD], [Bixina] e [β -CD] estão em equilíbrio.

Desta forma de acordo com Szente & Szejtli (2004), a relação observada entre a absorvância e a concentração de β -CD é dada pela equação:

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{(A_\infty - A_0)K_f[\beta - CD]} + \frac{1}{A_\infty - A_0} \quad (6)$$

onde, A_∞ é a absorvância quando todas as moléculas de bixina são efetivamente complexadas, assim seis concentrações de bixina foram utilizadas com o intuito de construir um gráfico que demonstrasse qual a relação estequiométrica obtida durante a complexação.

Assim quando se plotam graficamente valores de $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]$ observa-se uma relação linear o que reflete a formação de complexo na razão estequiométrica de 1:1 com valor de $R^2 = 0,9981$, como apresentado na **figura 19a**.

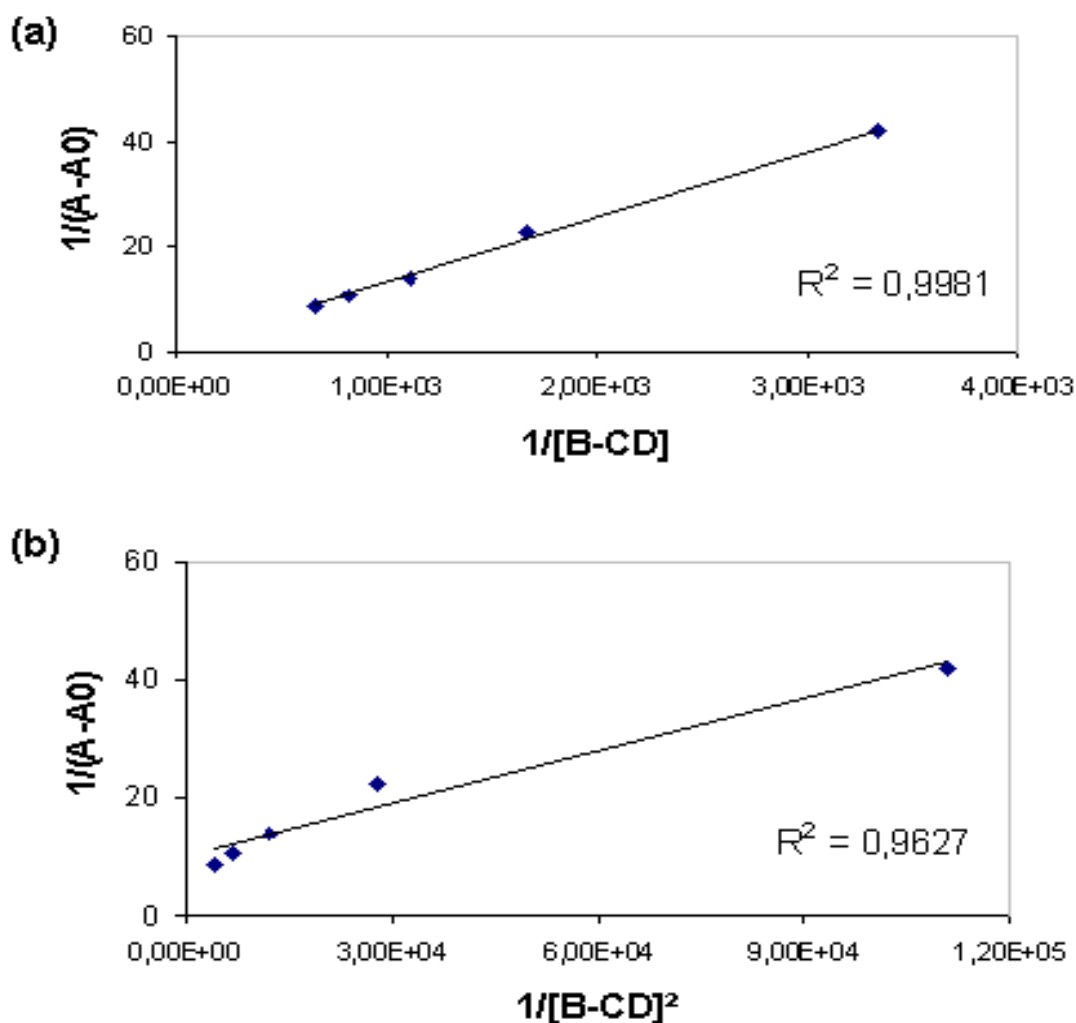


Figura 19: Determinação da estequiometria do complexo de inclusão bixina-β-CD pelo método de Benesi-Hildebrand's utilizando-se solução em metanol: a) $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]$ (hipótese de formação de complexo 1:1); b) $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]^2$ (hipótese de formação de complexo 1:2).

Para realmente descartar a possibilidade de formação de um complexo de ordem estequiométrica 1:2, testou-se a hipótese 1:1 plotando no gráfico valores de $1/(A - A_0)$ em função de $1/[\beta - CD]^2$, conforme estudos apresentados por Mesplet et al (2005). Como resultado uma relação não linear foi obtida (**figura 19b**), descartando esta hipótese. Os resultados apontados foram realizados

baseando-se numa solução metanólica de bixina que apresentou valor de $K_f = 3,34 \times 10^2 \text{ mol.L}^2$.

4.2.3- Formação do Complexo de Inclusão

Para a formação do complexo de inclusão foram utilizados os métodos de co-precipitação, mistura física com amassamento e mistura física simples além da técnica de dióxido de carbono supercrítico, dentre todas estas técnicas apenas a de co-precipitação foi possível ser analisada previamente quanto à provável formação de complexo.

A última etapa do processo de formação do complexo pelo método citado envolve um armazenamento em ambiente refrigerado por uma noite, sendo que, passado este tempo o complexo é filtrado e seco. Desta forma uma maneira de analisar a formação de complexo seria pela medida espectrofotométrica do sobrenadante obtido após a coleta do pó complexado. Estes valores obtidos demonstraram que do total de bixina colocado no processo aproximadamente 22% restaram neste líquido, ou seja, estavam livres. A outra parcela 78% estava na forma de pó, não podendo ser garantido que todo o corante estivesse realmente encapsulado dentro da molécula de β -CD. No entanto, isto apresenta um bom indicativo de formação de complexo, precisando outras análises como DSC, TGA e RMN para a confirmação.

4.2.4- Análise dos Complexos Formados por TGA

As curvas termogravimétricas da bixina e da β -ciclodextrina são apresentadas na **figura 20**.

As análises referentes ao termograma da molécula de β -CD já foram descritas no item 4.1.4 e se repetem aqui, não sendo necessário mencioná-las novamente (**figura 20**). Já para o corante bixina observa-se que a perda de massa

até a temperatura de 150°C é 1,7%, o que determina que a molécula não possui água na sua estrutura cristalina. A perda de massa significativa começa a ocorrer próximo a 190°C em uma linha descendente menos acentuada do que a molécula de β -CD que cai verticalmente. Observa-se também que a 450°C a molécula cessa a perda de massa e estabelece-se um platô de manutenção referente à presença de cinzas na amostra.

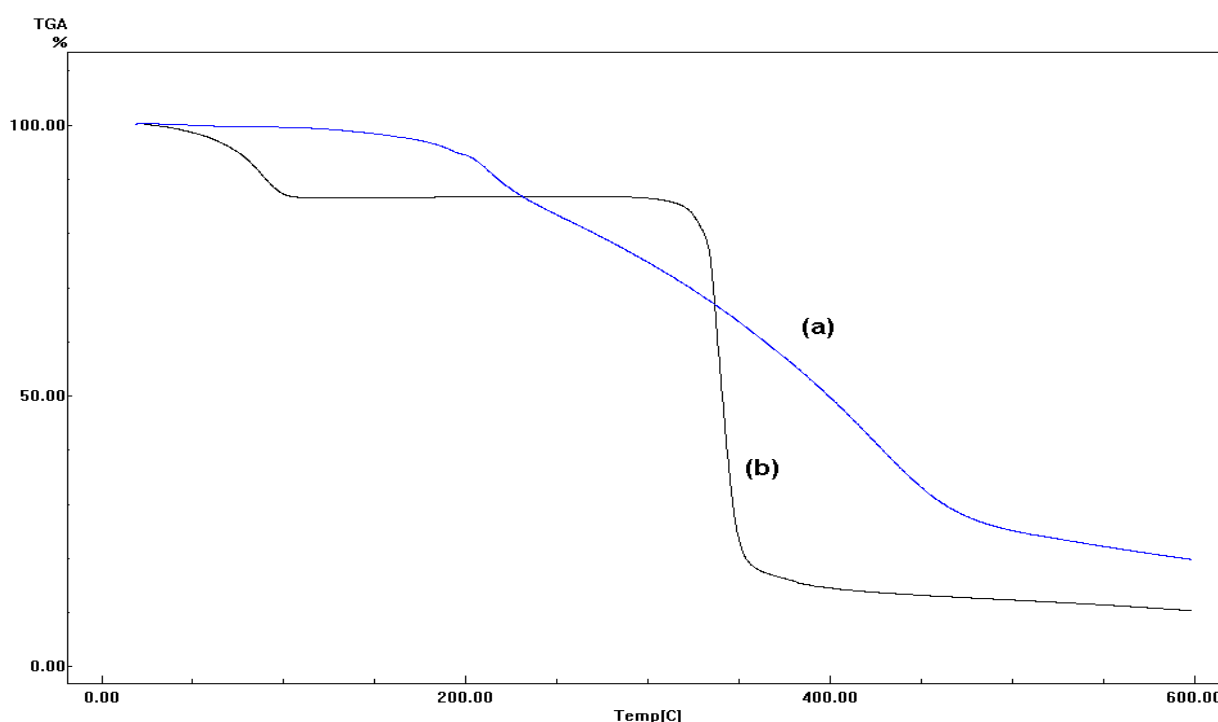


Figura 20: Curvas termogravimétricas das substâncias: bixina (a) e β -CD (b);

A partir de análises das curvas termogravimétricas da **figura 21** e dos dados mostrados na **tabela 5**, pode-se verificar que as curvas da β -CD e da bixina mistura física com amassamento, praticamente se sobrepõem o que denota a presença de β -CD na forma livre. No entanto o mais interessante é que para a curva b se observa uma perda de água de 6,5%, sabendo-se que a porcentagem de água da β -CD é de 13,3%, com formação de complexo 1:1. Todas as curvas deveriam perder exatamente a metade deste valor (se houvesse a formação do complexo), no entanto isso só é observado para a linha b.

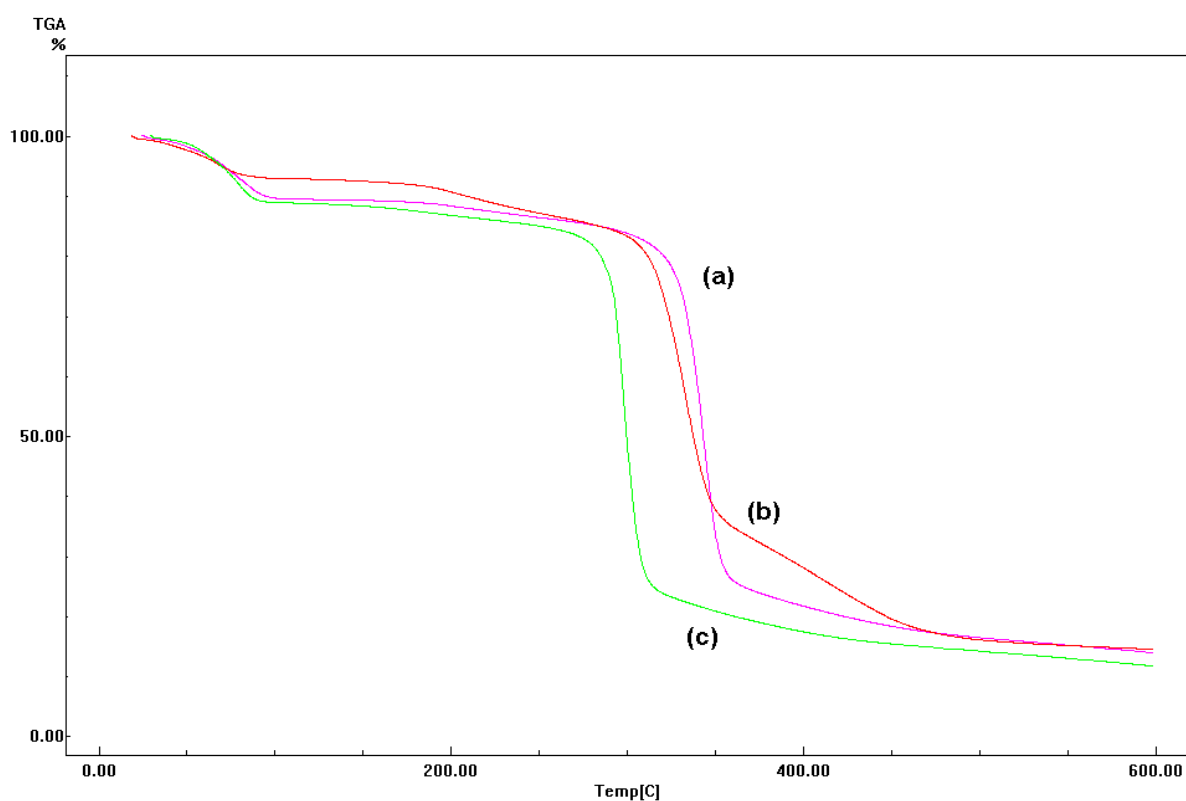


Figura 21: Curvas termogravimétricas dos produtos complexados, sendo que as letras correspondem respectivamente a: a) bixina- β -CD mistura física com amassamento, b) bixina- β -CD co-precipitação e c); bixina- β -CD mistura física simples;

Um fator que indica com mais precisão a formação de complexo é a mudança de características físicas como o ponto de decomposição. Segundo a **tabela 5**, para Bixina- β -CD co-precipitação tem um acréscimo de 4°C para o início da decomposição. Todavia o dado mais relevante está na diferenciação da curva a e b próximo à temperatura de decomposição da β -CD, onde verifica-se uma inclinação da linha da curva b que significa decomposição mais lenta nesta fase, mostrando a interferência do corante na degradação da molécula hospedeira. Com relação à linha c em todos os aspectos esta se mostra termodinamicamente menos estável do que as duas anteriores excluindo a possibilidade de interação por esta técnica de complexação.

Tabela 5: Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão.

Sistema	Técnica	T °C de decomposição	Estágio	TGA (faixa de temperatura °C)	Perda de massa (%)
Bixina	-	190	1	20-180	3,6
			2	180-480	69,7
			3	480-600	7,3
β-CD	-	300	1	24,7-104,0	13,3
			2	250-387	71,8
			3	387-600	4,7
Bixina-β-CD (1:1)	Co-precipitação	194	1	24,7-104	6,5
			2	184-387	61,6
			3	387-600	15,9
	Mistura física amassamento	181	1	24,7-104	10,2
			2	184-387	66,2
			3	387-600	8,8
	Mistura física simples	190	1	24,7-104	11,3
			2	184-387	69,3
			3	387-600	6,2

4.2.5- Análise dos Complexos Formados por DSC

As análises do termograma de DSC referente à β-CD já foram descritas anteriormente no item 4.1.5.

No termograma apresentado na **figura 22** observam-se as curvas referentes à β-CD e à bixina. O corante apresenta um pico endotérmico observado a 68°C, que muito provavelmente se deve à perda de água na substância já que este se inicia de maneira semelhante ao da β-CD, que faz neste ponto perda de umidade. Outro pico é observado a 185°C sendo representativo da degradação térmica do corante. Desta forma, observa-se que a bixina não tem ponto de fusão, não sendo possível atestar a formação de complexo com este corante. A **figura 23** mostra as curvas de DSC para os complexos feitos por diferentes métodos na proporção estequiométrica 1:1.

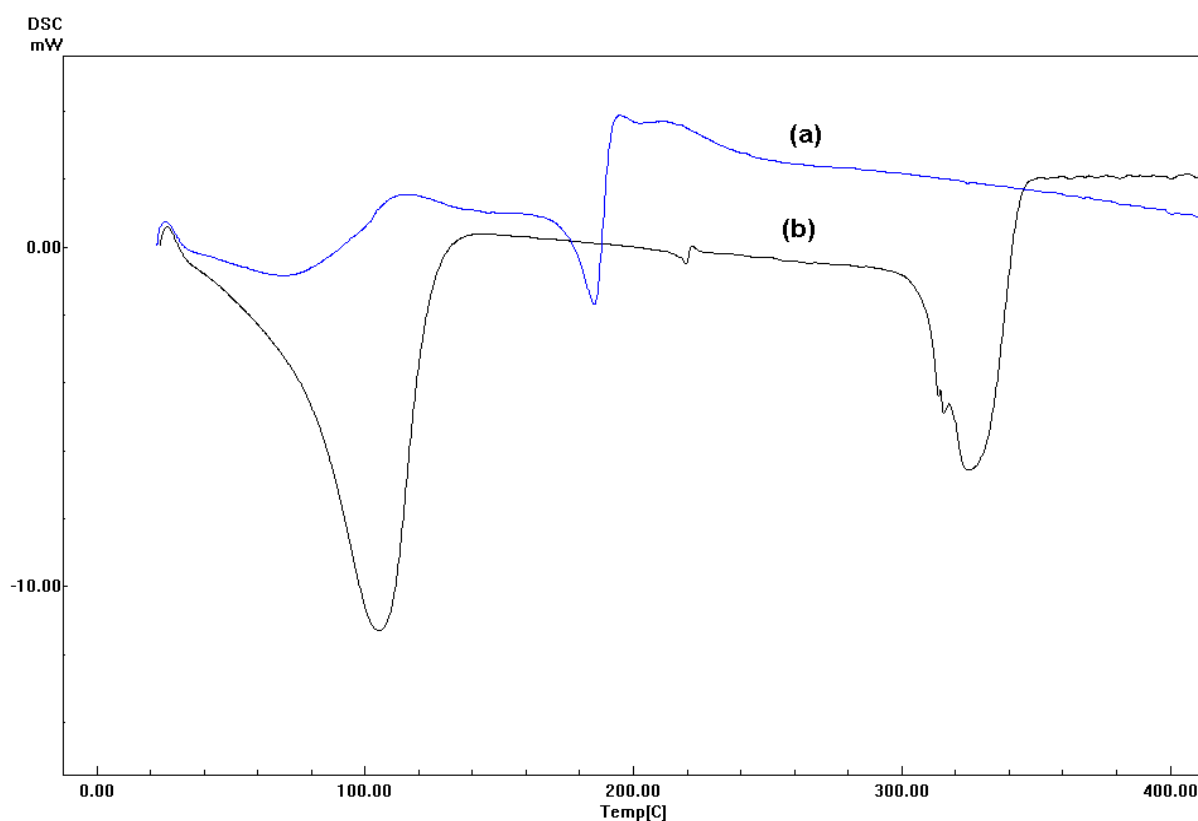


Figura 22: Curvas de DSC para componentes puros, bixina (a) e β -CD (b);

Os dados da **tabela 6** juntamente com a análise da **figura 23** fornecem parâmetros para a avaliação dos três prováveis produtos de complexação obtidos por diferentes técnicas.

Tabela 6: Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão da bixina- β -CD. MFA (Mistura física com amassamento); CP (Co-precipitação) e MFS (mistura física simples).

	β -CD	Bixina	MFA	CP	MFS
Temp. (°C) evaporação da água	104,7	68	107,3	93	101
ΔH do pico de evaporação da água	439,2	100,6	395,5	263	390,8
Temp. (°C) degradação bixina	-	185,5	184,2	182,8	165,9
ΔH da degradação da bixina	-	58,6	7	22	1,3
Temp. (°C) degradação da β -CD	326	-	314	298,5	315,5
ΔH da degradação da β -CD	177	-	92	126,4	23,9

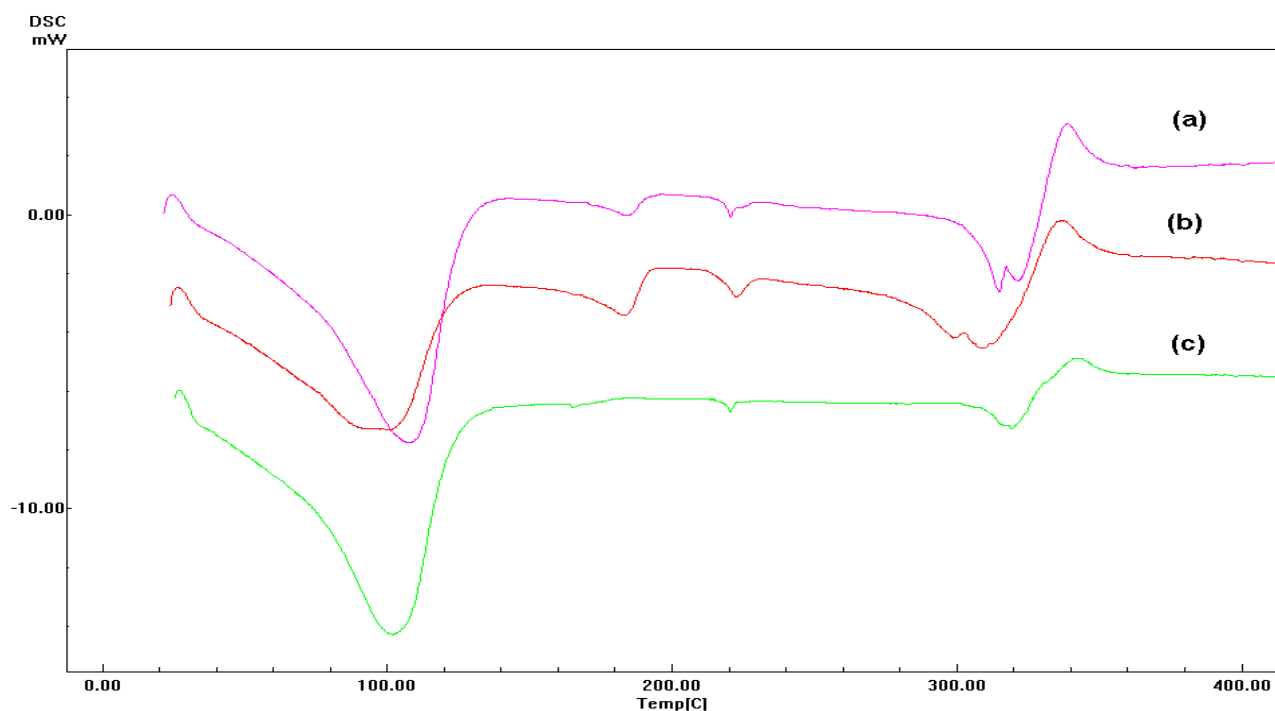


Figura 23: Curvas de DSC para os produtos da complexação bixina- β -CD pelos métodos, (a) mistura física com amassamento, (b) co-precipitação e (c) mistura física simples;

Como já citado anteriormente segundo Brady & Humiston (2003), quanto maior as variações de temperatura e entalpia dos sistemas de picos, maiores as possibilidades de formação de complexo por alterações de características físicas. Com base na **tabela 6** e analisando os dados da **figura 23** pode-se observar que, no que se refere à evaporação de água, comparativamente, a técnica de co-precipitação fornece uma variação física de aproximadamente 12°C sendo a mais relevante entre as técnicas analisadas. A variação de entalpia também foi energeticamente menor quando comparada aos demais, indicando uma melhor integração entre a bixina e a β -CD. Com relação à degradação da bixina pode-se notar que entre os possíveis complexos não ocorrem diferenças significativas. Já para o item degradação da β -CD pode-se observar que, novamente, o complexo que apresenta maior variação comparado ao produto puro é o obtido por co-precipitação, reafirmando sua capacidade de alteração física. O corante produzido pela mistura física simples acaba sendo menos efetivo termodinamicamente, pois

a bixina passa a ser degradada a 165°C e não mais a 185°C, verificando-se uma redução de aproximadamente 20°C durante este processo.

4.2.6- Análise dos Complexos Formados por RMN

A **figura 24** complementada com os dados da **tabela 7** fornece elementos para as análises dos possíveis complexos formados pela técnica de RMN- H^1 . A **figura 24** representa o complexo obtido por co-precipitação, este foi escolhido para ser exposto segundo dados preliminares das análises feitas por TGA e DSC que referiam o corante como o mais estável e provável de formação de complexo.

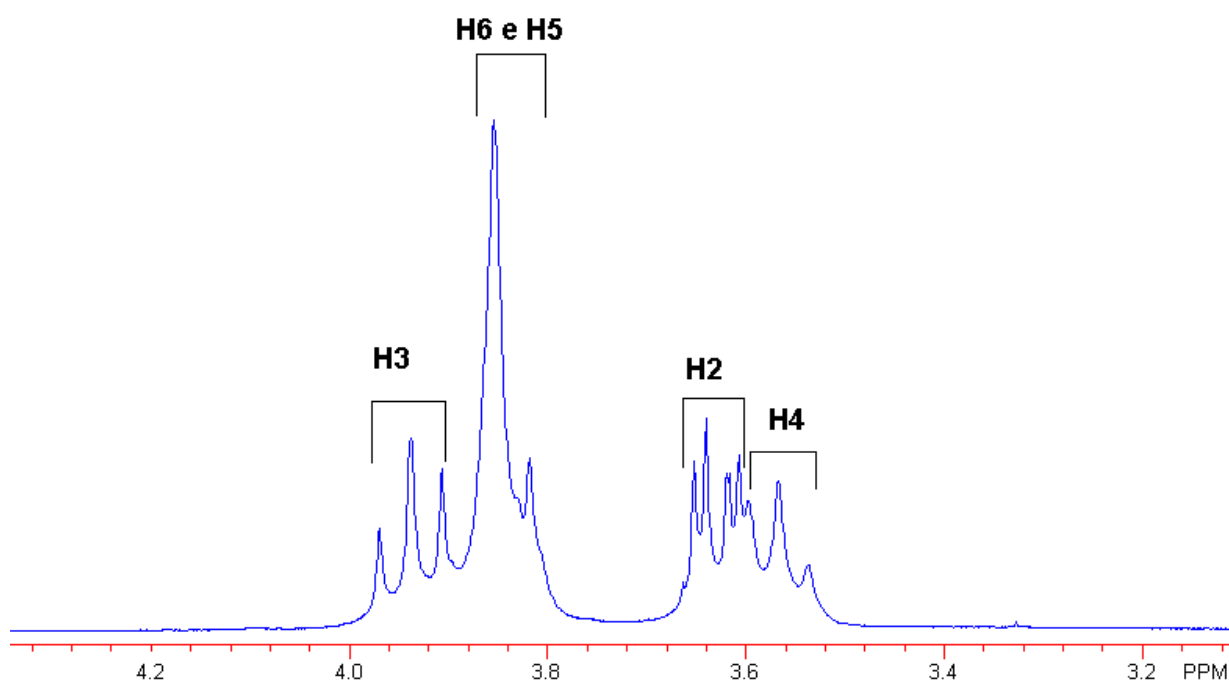


Figura 24: Espectro de RMN- H^1 de Bixina- β -CD em água deuterada.

Com base nos dados da **tabela 7** verifica-se que a alteração de pico pelo contato da molécula hóspede com a β -CD é pequena ou nenhuma, assim significativamente não há como afirmar a formação de complexo pela utilização

deste método, e as prováveis justificativa são a mesmas apresentadas no item 4.1.6 por Wimmer (2002) e Szejtli (1988).

Tabela 7: Pico de RMN-H¹ para substâncias puras e possíveis complexos, MFA (Mistura Física com amassamento), CP (Co-precipitação), MFS (Mistura Física Simples) e DSC (Dióxido de carbono supercrítico) (outros RMN-H¹ em Anexo).

	H3	H6 e H5	H2	H4
Bixina	-	-	-	-
β-CD	3,983	3,865	3,655	3,599
	3,952	3,836	3,642	3,588
	3,921	3,825	3,621	3,537
MFA	3,980	3,863	3,658	3,604
	3,949	3,841	3,647	3,572
	3,917		3,626	3,542
CP	3,970	3,854	3,653	3,598
	3,938	3,819	3,641	3,567
	3,907		3,620	3,537
MFS	3,981	3,863	3,659	3,604
	3,949	3,842	3,647	3,573
	3,904	3,830	3,626	3,542
DCS	3,984	3,865	3,659	3,603
	3,953	3,845	3,647	3,572
	3,921	3,832	3,626	3,542

A partir dos resultados apresentados pode-se inferir que a proporção estequiométrica de um possível complexo de inclusão bixina:β-CD é de 1:1. O método de co-precipitação é o mais viável por possibilitar maiores garantias de probabilidade de formação do complexo.

4.3- Resultado das Análises Realizadas para o Corante Beterraba

Ao contrário dos dois corantes anteriormente discutidos, para o corante à base de beterraba não foi necessária a pesquisa de solventes adequados para as análises espectrofotométricas já que este se mostra solúvel em água.

Henry (1996) mostra em seu trabalho uma varredura para a betanina apresentada na **figura 25**.

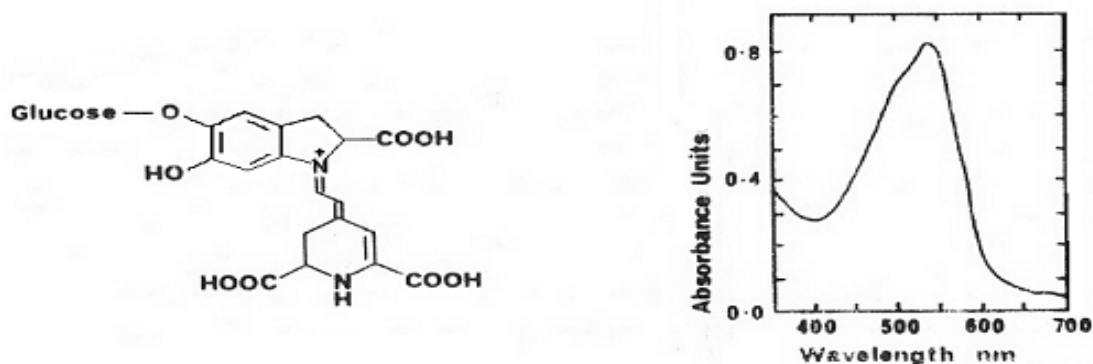


Figura 25: Espectro de absorvância de betanina em água a 0,00075%, com absortividade de 530nm.

Preparou-se uma solução mãe de corante betanina em água com concentração de 2×10^{-2} molar de onde foram retiradas três alíquotas com diluições em água destilada e agitação e verificou-se durante a varredura feita entre 190-1100nm uma concordância do pico de absorvância na faixa espectral da substância, cerca de 530nm, com os valores mostrados na **figura 26**. Estas três alíquotas ilustram a **figura 30**, que apresenta somente os principais pontos variando de 350-700nm mostrando o comportamento deste corante durante a varredura realizada.

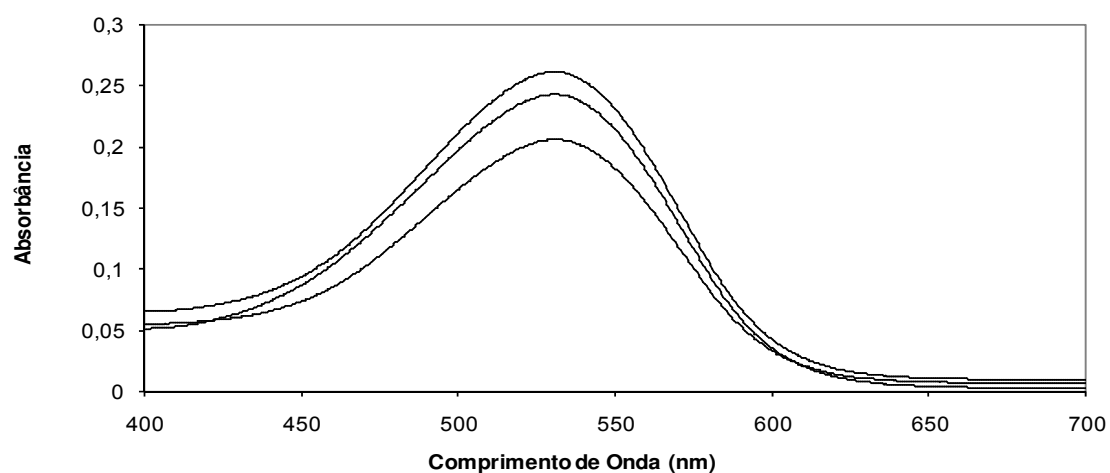


Figura 26: Aumento do pico de absorção em função do acréscimo da concentração de betanina;

4.3.1- Espectro de Absorção

Ao contrário do comportamento das demais substâncias já trabalhadas, o corante de betanina não apresentou o mesmo comportamento frente à presença da β -CD. Enquanto os corantes anteriores mostravam uma linha crescente e linear de absorvância com o acréscimo de β -CD, a betanina, por sua vez não exibe o mesmo padrão de comportando apresentando-se aleatoriamente, como mostrado na **figura 27**, com um valor de $R^2 = 0,4734$.

Segundo Henry (1996), a betanina pode ser influenciada diretamente pelo pH e a mesma se adequa melhor a pHs mais ácidos, desta maneira, dois valores 4,0 e 2,0, foram testados na busca de uma estabilização de valores de absorvância o que não foi comprovado.

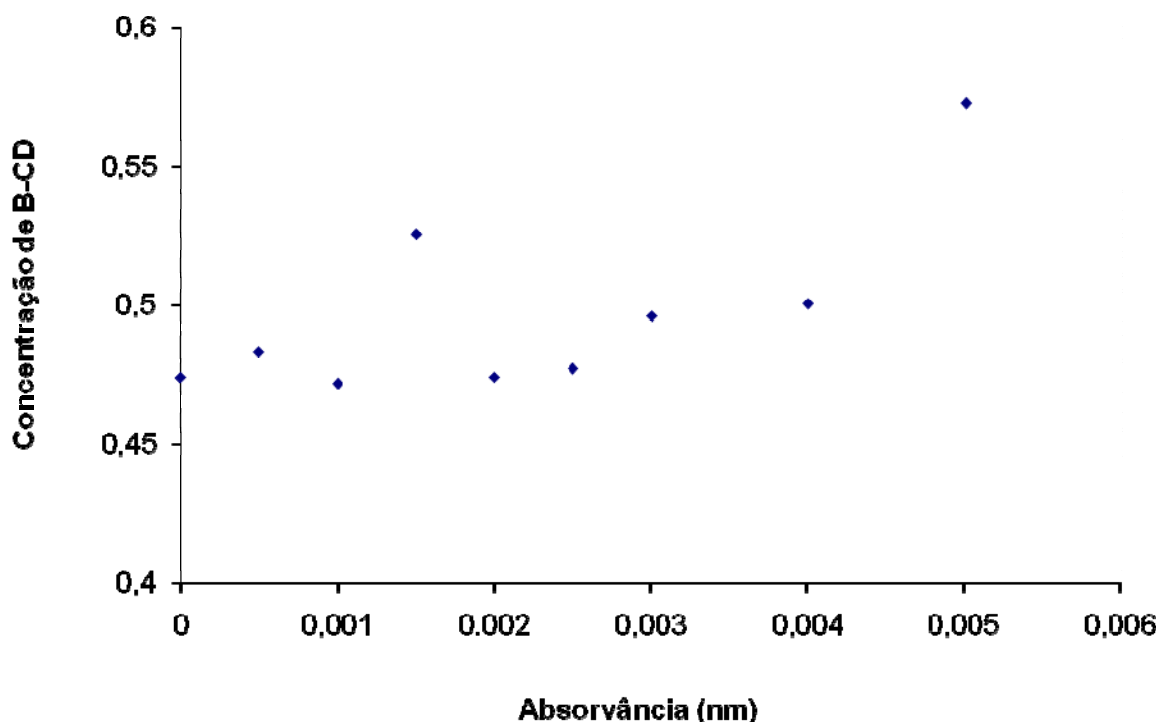


Figura 27: Valores de concentração de β -CD em função da absorvância de betanina, utilizando pH 4,0.

Buscando uma alternativa para este problema testou-se em lugar da β -CD uma outra ciclodextrina, mais solúvel em água, α -CD, com intuito de verificar a melhor estabilização do corante e evidenciar um possível indicativo de formação de complexo. A **figura 28** sumariza estes dados e mostra que a troca de ciclodextrina não foi efetiva e a absorvância aleatória continuou acontecendo, sendo que o valor de $R^2 = 0,4329$ confirma a não formação de reta para os pontos testados. Devido a estes problemas encontrados na análise deste corante, a determinação da constante aparente de formação não pode ser feita, bem como também não foi possível estabelecer estequiometricamente qual seria a proporção de betanina para as moléculas de α -CD ou β -CD utilizadas.

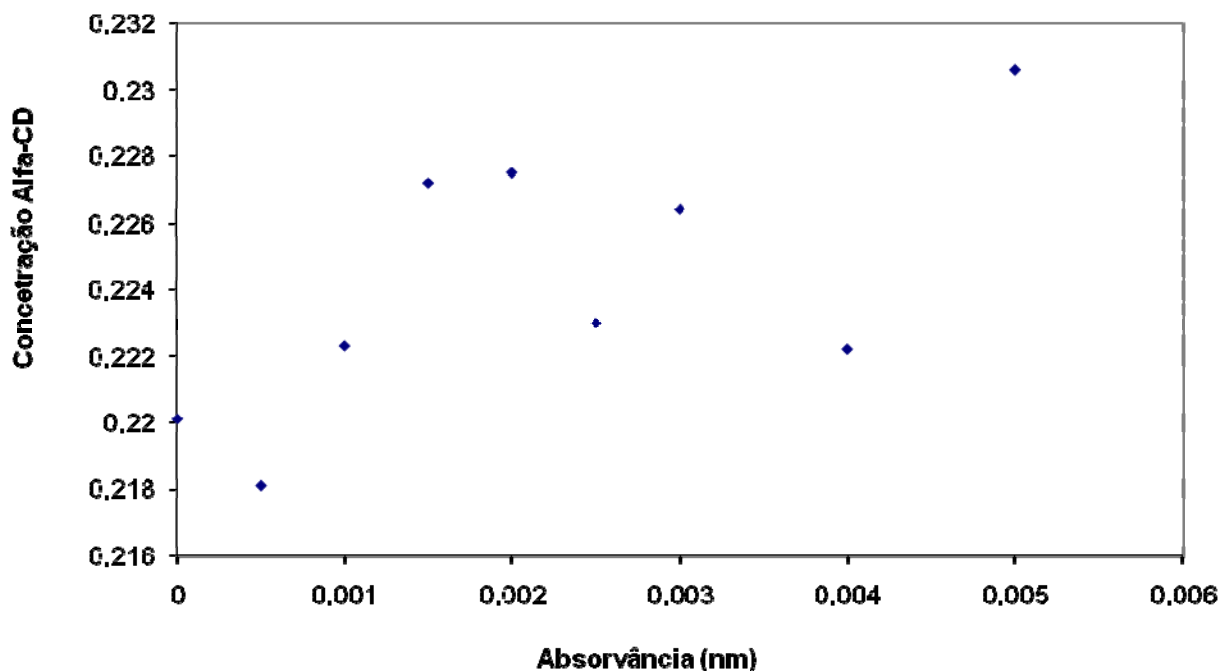


Figura 28: Valores de concentração de α -CD em função da absorvância de betanina, utilizando pH 4,0.

4.3.2- Formação do Complexo de Inclusão

Para a formação do complexo de inclusão foram utilizados os métodos de co-precipitação, mistura física com amassamento e mistura física simples além da técnica de dióxido de carbono supercrítico.

Durante o processo de co-precipitação como ambas as moléculas, β -CD e betanina são solúveis em água, não houve formação de precipitado, o que indica claramente a não formação de complexo. Mesmo assim, ainda foram testados os processos de mistura física com amassamento e mistura física simples que serão analisados nos itens subseqüentes. Já para o método de dióxido de carbono supercrítico, não foi possível a formação de complexo, pois quando exposta a altas pressões a molécula do corante de beterraba se funde e não permite a

volatilização pelo CO₂. Yamada et al, (1980) ao tentarem a formação de complexos notaram a descoloração dos extratos em maior intensidade ao usar β -CD e um pouco menos com o uso de α -CD que retornavam parte da coloração com a acidificação do meio. No entanto, os autores obtiveram apenas indicação da formação do complexo de inclusão e não chegaram a analisá-lo segundo técnicas físico-químicas mais apuradas, baseando-se somente em dados colorimétricos.

4.3.3- Análise dos Complexos Formados por TGA

As curvas termogravimétricas da betanina, da α e da β -ciclodextrina são apresentadas na **figura 29**.

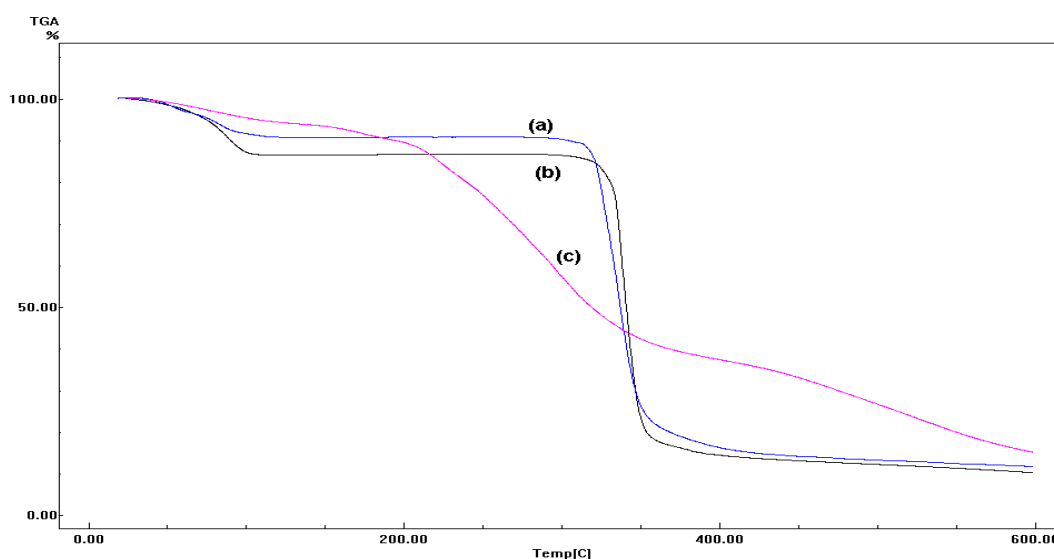


Figura 29: Curvas termogravimétricas das substâncias usadas para a formação de complexos, sendo que as letras correspondem respectivamente a: a) α -CD, b) β -CD e c) betanina;

Pode-se observar pela análise da **figura 29** que os termogramas das duas ciclodextrinas apresentadas são basicamente iguais, variando com relação à

porcentagem de água contida na α -CD que é menor (9,4%) do que a da β -CD (13,6%) o que explica o desnível no início das linhas, agora com relação à decomposição e degradação térmica, as linhas das ciclodextrinas praticamente se sobrepõem o que justifica um comportamento semelhante em ambos os casos.

Com relação ao corante nota-se que sua curva apresenta vários ombros durante a análise térmica o que é explicado pela falta de pureza da substância (corante beterraba 4%) que segundo o fornecedor contém açúcares variados em sua composição, que ao se degradarem demonstram este ombro característico da substância.

Já na **figura 30** é notório que as curvas praticamente se sobrepõem e não se observa ganhos ou proteção do ponto de vista térmico, já que os açúcares se degradando na mesma temperatura também fazem com que as CD comecem a se degradar antes do previsto. Esta análise não fornece indicativos confiáveis de formação de complexo.

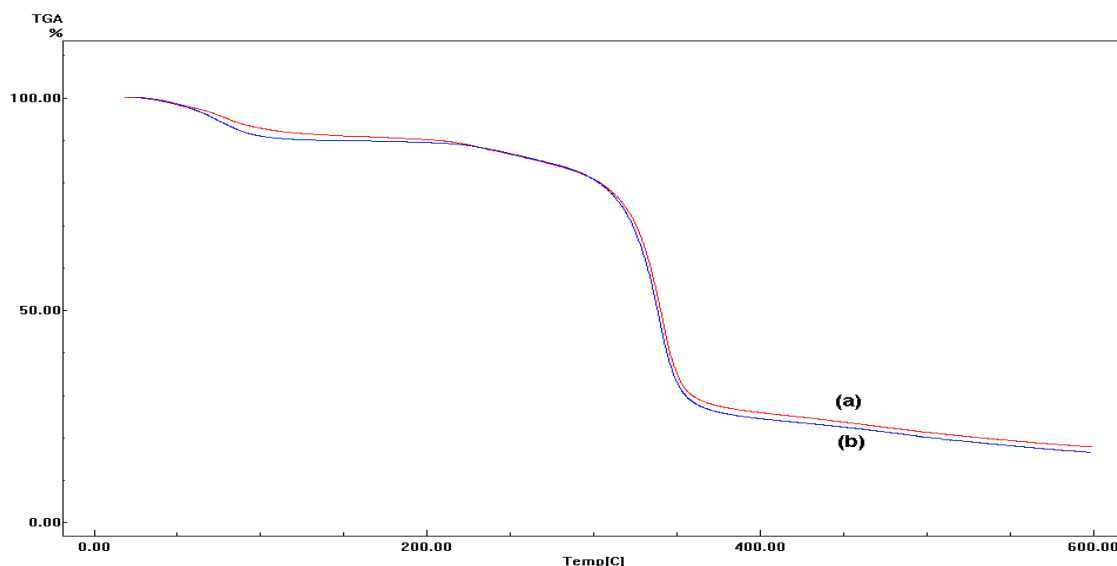


Figura 30: Curvas termogravimétricas dos produtos complexados, sendo que as letras correspondem respectivamente a: a) betanina- α -CD mistura física com amassamento, b) betanina- β -CD mistura física com amassamento.

4.3.4- Análise dos Complexos Formados por DSC

No termograma apresentado na **figura 31** observam-se as curvas referentes à β -CD, α -CD e à betanina. O corante apresenta um pico endotérmico observado a 75,5°C, que muito provavelmente se deve à perda de água na substância já que este se inicia de maneira semelhante ao da β -CD e da α -CD que faz neste ponto perda de umidade. Juntamente com este pico existe sobreposição de outro que se refere à fusão dos açúcares contidos na amostra. Estas constantes sobreposições dificultam ou praticamente impossibilitam as análises. O outro pico ocorre a 136°C sendo representativo da degradação térmica do corante.

Os dados da **tabela 8** combinados as linhas da **figura 31** promovem a análise dos prováveis complexos obtidos com as diferentes CDs utilizadas.

Tabela 8: Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão da betanina- β -CD. MFA (Mistura física com amassamento) e betanina- α -CD. MFA (Mistura física com amassamento).

	β -CD	α -CD	Betanina	β -CDMFA	α -CDMFA
Temp. °C evaporação da água	104,7	103,7	75,5	80,4-109	77 -102,3
ΔH do pico de evaporação da água	439,2	430,7	97	363,6	294,6
Temp. °C degradação betanina	-	-	135	-	-
ΔH da degradação da betanina	-	-	15,2	-	-
Temp. °C degradação da CD	326	321	-	-	-
ΔH da degradação da CD	177	259,8	-	-	-

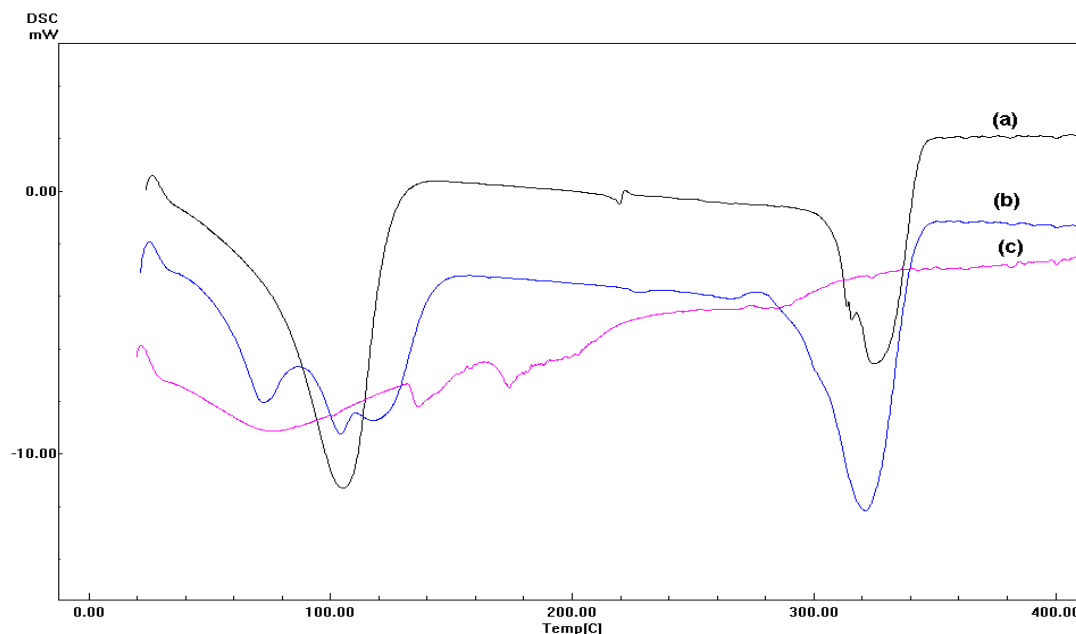


Figura 31: Curvas de DSC para os produtos puros. (a) β -CD, (b) α -CD e (c) betanina.

As linhas da **figura 32** apresentam claramente o fenômeno de sobreposição de picos que impossibilita a sua análise. As informações úteis que podem ser tiradas são que com o uso de β -CD a decomposição parece começar um pouco depois, ou seja, passa de 77°C para 80,5°C mostrando um incremento da proteção quando se usa esta ciclodextrina. Todos os demais dados estão comprometidos pela sobreposição de picos.

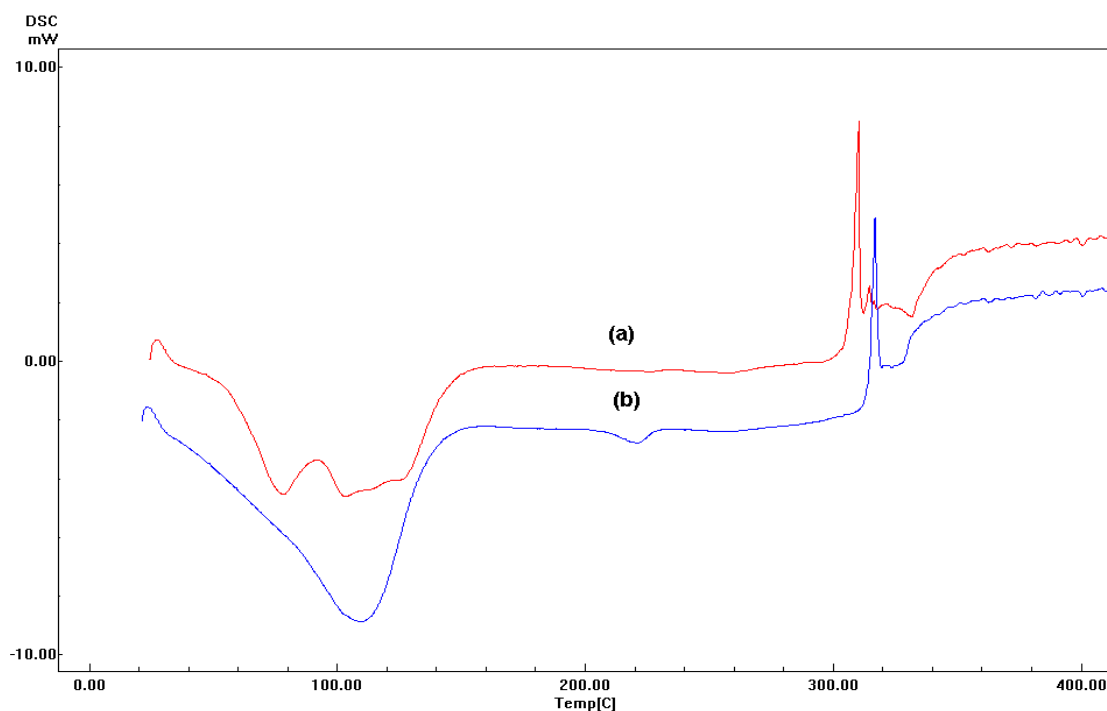


Figura 32: Curvas de DSC para produtos da complexação. (a) betanina- α -CD, (b) betanina- β -CD.

A partir dos resultados apresentados não foi possível inferir a proporção estequiométrica de um possível complexo de inclusão betanina: β -CD ou betanina: α -CD, supõem-se que devido a intensa solubilidade do corante em meio aquoso a realização do método de co-precipitação ficou dificultada, sendo que mesmo com testes de outros métodos de complexação não foi possível atingir resultados satisfatórios que garantissem uma interação entre corante e as CDs.

4.4-Teste de Estabilidade

Análises com intervalos semanais foram realizadas para quantificação dos corantes complexados e não complexados apresentando os resultados a seguir:

4.4.1- Corante Curcumina e Curcumina Complexada

Para a curcumina armazenada na presença e ausência de luz pode ser observado pela **figura 33** um decaimento de até 40% na intensidade de cor apresentada pelo corante durante o período de teste. No entanto, percebe-se também que a luz não é o maior fator interferente neste processo de queda, já que o corante armazenado no escuro tem valores de quedas muito próximos ao armazenado frente à luz natural.

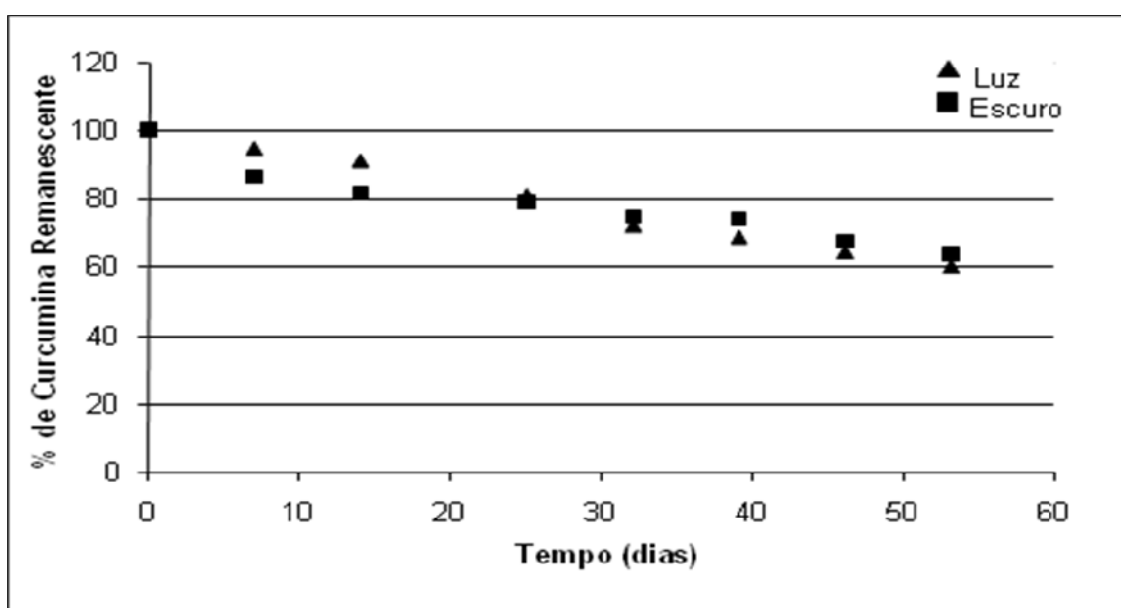


Figura 33: Porcentagem remanescente de curcumina durante o tempo de armazenamento na presença e ausência de luz.

Quando se analisa o corante complexado, não é possível afirmar que o emprego da ciclodextrina melhore sua conservação frente à luz. Comparando a **figura 33** com a **figura 34** percebe-se que mesmo complexado o decaimento da curcumina chega à cerca de 40% tanto para o armazenamento frente à luz, quanto no escuro, o que demonstra valores muito próximos ao declínio apresentado pelo corante sem complexação.

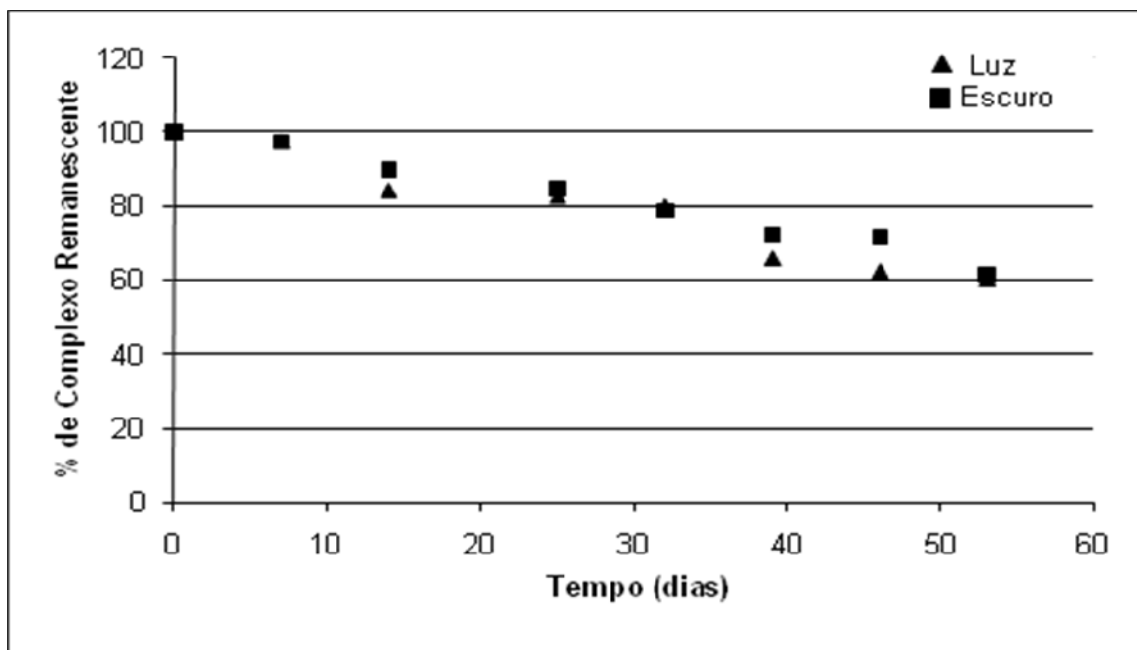


Figura 34: Porcentagem remanescente de curcumina complexada com β -CD durante tempo de armazenamento na presença e ausência de luz.

4.4.2- Corante Bixina e Bixina Complexada

A bixina armazenada na presença de luz, durante o tempo de análise, mostrou um decaimento de cerca de 75%, enquanto o armazenamento na ausência de luz mostrou uma queda de aproximadamente 50%, o que demonstra que a luz influi de maneira importante na conservação da integridade deste corante (**figura 35**).

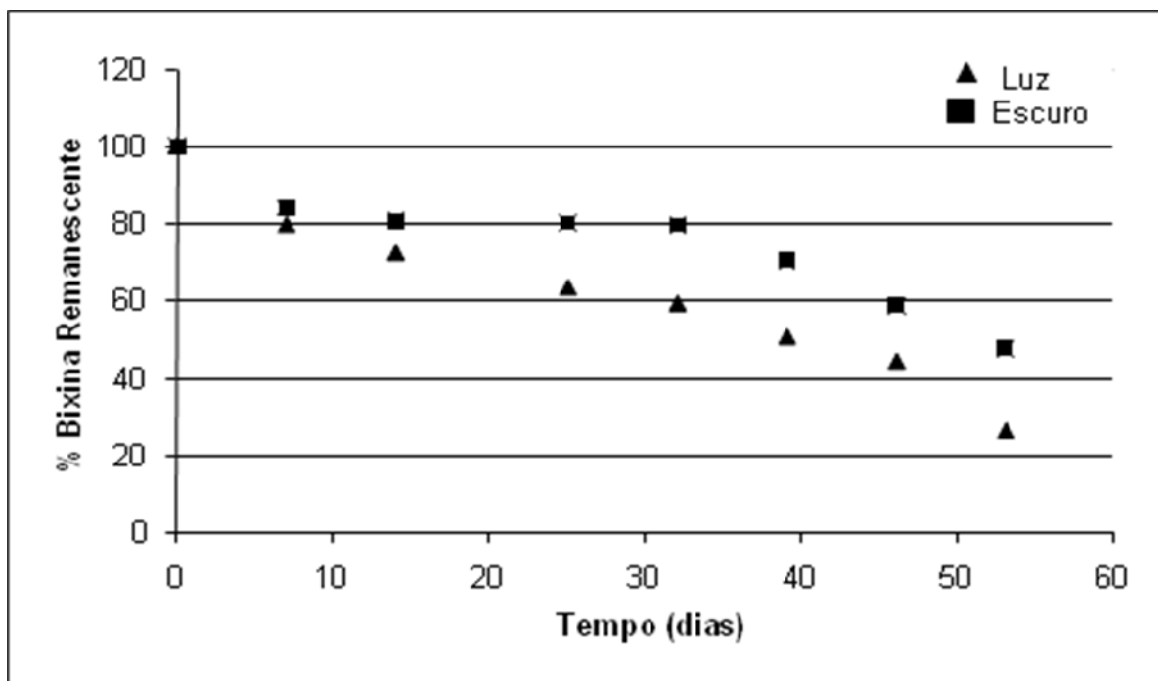


Figura 35: Porcentagem remanescente de bixina durante o tempo de armazenamento na presença e ausência de luz.

A partir de análise da **figura 36** pode-se perceber que a complexação do corante com a β -CD confere ao mesmo uma proteção frente à luz, pois seu índice de decaimento de cor é cerca de 30% menor que o corante sem complexação. Quando se compara o armazenamento no escuro percebe-se que a diferença entre complexo e corante sem complexação é ligeiramente menor que o apresentado no claro, o que sugere a ação protetora frente à luz exercida pela molécula de β -CD.

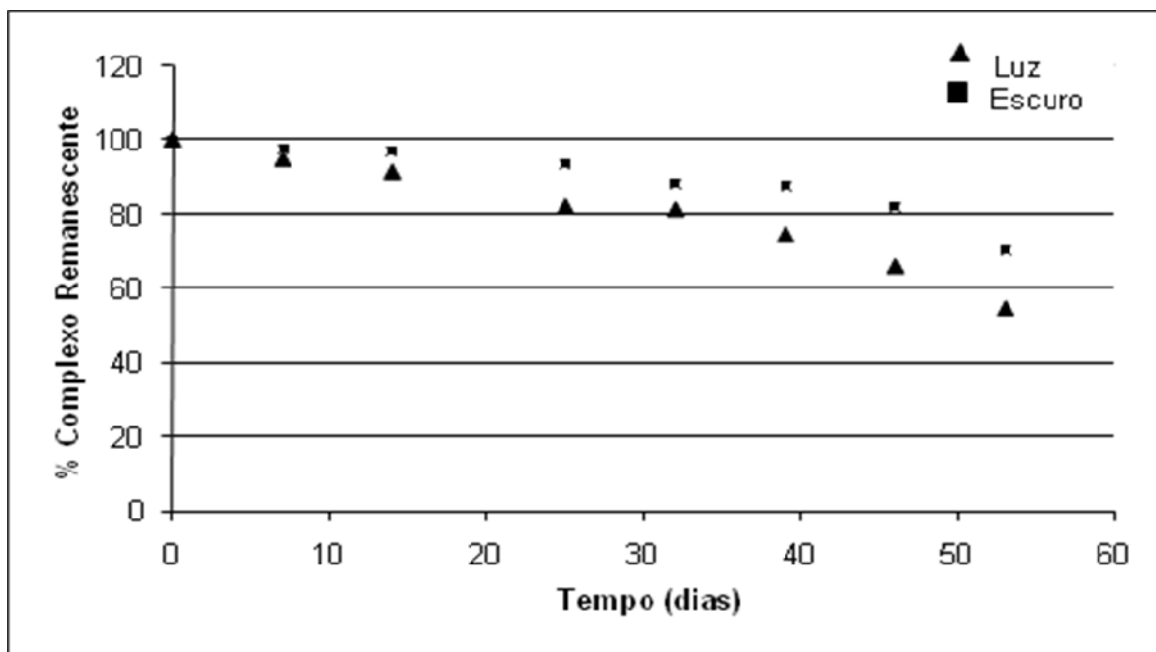


Figura 36: Porcentagem remanescente de bixina complexada com β -CD durante tempo de armazenamento na presença e ausência de luz.

4.5-Aplicação do Corante Fabricado

Os corantes produzidos por complexação e também os não complexados foram aplicados em alimentos para uma melhor visualização das diferenças existentes. Os produtos lácteos são citados em literatura como boas fontes de aplicação destes corantes, por isto o queijo tipo minas frescal, o requeijão e iogurte foram escolhidos para utilização.

4.5.1- Análise Sensorial

O queijo minas frescal com adição de curcumina- β CD foi bem aceito, recebendo nota média de 6,7 numa escala de 7 pontos, ressaltando ainda que 39% dos provadores disseram consumir este produto diariamente. Quando foi solicitado aos provadores que citassem os atributos que mais gostaram nesta formulação, destacou-se a aprovação pelo sabor do produto (60%), sendo ainda

citados a cor e o fator de ser saudável (43%). Em relação aos atributos que menos gostaram, poucas foram as citações e estas não tiveram representatividade junto aos provadores.

O requeijão com adição de bixina- β CD também foi bem aceito, recebendo nota média de 5,6 numa escala de 7 pontos, ressaltando ainda que 23% dos provadores disseram consumir este produto apenas 2 ou 3 vezes por semana. Quando foi solicitado aos provadores que citassem os atributos que mais gostaram nesta formulação, destacou-se a aprovação pelo sabor do produto (78%), sendo ainda citados a cor e o fator de ser saudável (25%). Em relação aos atributos que menos gostaram também, poucas foram as citações e sem representatividade.

4.5.2- Análise Instrumental da Cor e Textura

4.5.2.1- Queijo Minas Frescal

Com base nos dados da **tabela 9** pode-se perceber que o queijo sem corante curcúmina apresenta luminosidade significativamente maior que o queijo com corante ou com complexo. Mas ao analisar o interior, verifica-se que o queijo com complexo apresenta luminosidade significativamente menor que os demais. O parâmetro (a^*) praticamente apresentou diferença significativa em todas as situações. Contudo, o parâmetro que mais chamou a atenção foi o (b^*) referente à intensidade de cor amarela, o qual percebe-se uma diferença estatisticamente significativa entre o corante e o complexo evidenciando o maior poder corante do complexo, fato que pode ser observado também na **figura 37** com a visualização dos produtos.

Tabela 9: Parâmetros da cor superfície externa e interna do queijo tipo minas frescal, quando do uso do corante curcumina.

Amostra de Queijo	Casca			Dentro		
	(L*)	(a*)	(b*)	(L*)	(a*)	(b*)
Queijo com Curcumina	85 ±0,7 ^b	-1,5±0,05 ^a	17±0,1 ^b	87±0,9 ^a	-1,7±0,03 ^b	22±0,6 ^b
Queijo com Curcumina-βCD	83±1 ^b	-3,4±0,7 ^b	43±1 ^a	84±0,5 ^b	-3,2±0,2 ^c	43±0,3 ^a
Queijo sem Corante	89±0,5 ^a	-0,7±0,2 ^b	13±0,9 ^c	87±0,7 ^a	-0,8±0,2 ^a	13±0,6 ^c

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$). L* = Luminosidade (0=preto; 100=branco); a* = componente vermelho-verde; b* = componente amarelo-azul.

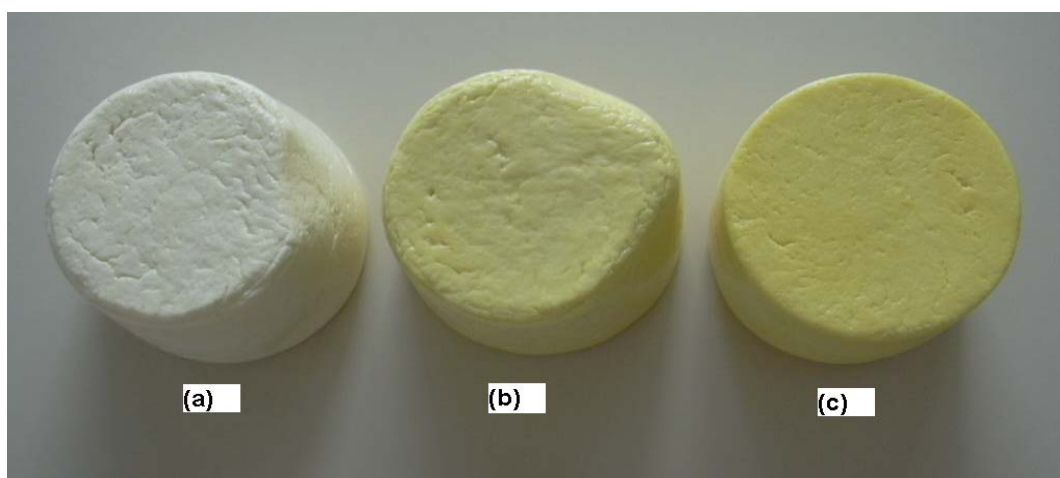


Figura 37: Queijo minas frescal, (a) queijo sem adição de corante, (b) queijo acrescido de 20ppm de curcumina, e (c) queijo acrescido de 20ppm de complexo CP curcumina-β-CD.

A análise da **tabela 10** demonstra que quanto à textura não foram encontradas diferenças significativas entre os queijos adicionados de corante e complexo.

Tabela 10: Parâmetros de textura para queijo tipo minas frescal, quando do uso do corante curcumina.

Amostra de Queijo	Dureza	Adesividade	Elasticidade	Matigabilidade
Queijo com Curcumina	22,1±1,8 ^a	-0,1±0,08 ^a	0,9±0,03 ^a	16,9±1,3 ^a
Queijo com Curcumina-βCD	23,0 ±2,8 ^a	-0,07±0,06 ^a	0,9±0,05 ^a	18,2±2,9 ^a

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$).

4.5.2.2- Iogurte

Com base nos dados apresentados na **tabela 11** pode-se perceber que a alteração significativa na luminosidade ocorre no produto sem corante curcumina em relação aos demais, contudo, não é uma alteração relevante. O parâmetro (a^*) praticamente apresentou diferença significativa em todas as situações, mas também sem relevância. O parâmetro (b^*) novamente chamou atenção, pois os três produtos apresentaram diferenças significativas, contudo, no produto com complexo esta diferença foi muito mais marcante fato que pode ser observado na **figura 38** com a visualização dos produtos.

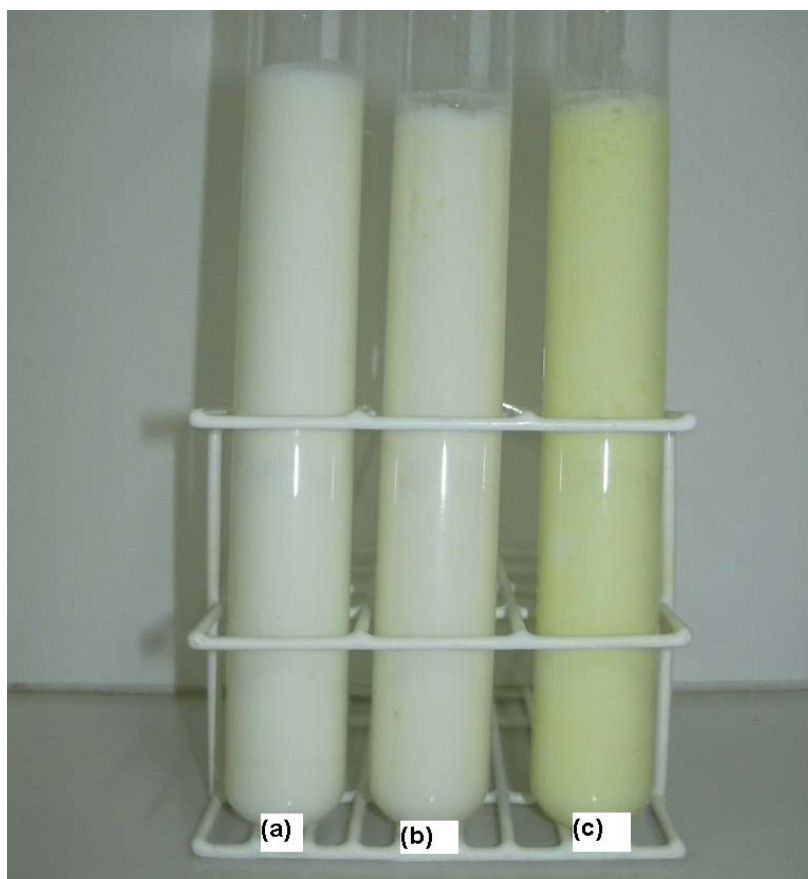


Figura 38: Tubos de ensaio contendo iogurte, tubo (a) iogurte natural sem adição de corante, tubo (b) iogurte natural acrescido de 5ppm de curcumina, e tubo (c) iogurte natural acrescido de 5ppm de complexo CP curcumina- β -CD.

Tabela 11: Parâmetros da cor para iogurte, quando do uso do corante curcumina.

Amostra de iogurte	(L*)	(a*)	(b*)
iogurte com Curcumina	79,6±0,1 ^b	-2,8±0,1 ^a	9,2±0,1 ^b
iogurte com Curcumina-βCD	79,7±0,1 ^b	-7,1±0,1 ^c	24,2±0,0 ^a
iogurte sem Corante	80,8±0,1 ^a	-3,2±0,1 ^b	7,2±0,1 ^c

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$). L* = Luminosidade (0=preto; 100=branco); a* = componente vermelho-verde; b* = componente amarelo-azul.

4.5.2.3- Requeijão

Com base nos dados mostrados na **tabela 12** pode-se perceber uma diferença significativa em relação ao parâmetro (L*) e (a*) em praticamente todas as situações estudadas. Quanto ao parâmetro (b*), referente à intensidade de cor amarela, observa-se o maior poder corante do complexo, quando comparado com as demais situações. Também é possível observar que o requeijão com complexo têm uma maior proximidade na intensidade de cor com o requeijão tipo cheddar. As diferenças entre o requeijão adicionado de complexo e corante são visualizadas na **figura 38**.

Tabela 12: Parâmetros da cor superfície externa e interna de requeijão quanto ao estudo do corante bixina.

Amostra de requeijão	Casca			Dentro		
	(L*)	(a*)	(b*)	(L*)	(a*)	(b*)
Requeijão com bixina	66±0,3 ^d	8±0,1 ^c	36±0,5 ^c	69±0,4 ^d	6±0,3 ^c	29±0,2 ^b
Requeijão complexo bixina	71±0,3 ^b	10±0,1 ^b	40±0,4 ^b	75±0,4 ^b	7±0,2 ^b	40±0,4 ^a
Requeijão sem corante	81±0,5 ^a	-2±0,0 ^d	17±0,0 ^d	84±1,1 ^a	-2±0,1 ^d	18±0,9 ^c
Requeijão cheddar	69±0,4 ^c	11±0,1 ^a	44±0,6 ^a	72±0,1 ^c	13±0,2 ^a	41±0,1 ^a
Requeijão de corte (mercado)	73±0,2 ^b	-3±0,1 ^e	14±0,6 ^e	74±0,2 ^{b,c}	-4±0,0 ^e	16±0,4 ^c

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$). L* = Luminosidade (0=preto; 100=branco); a* = componente vermelho-verde; b* = componente amarelo-azul.

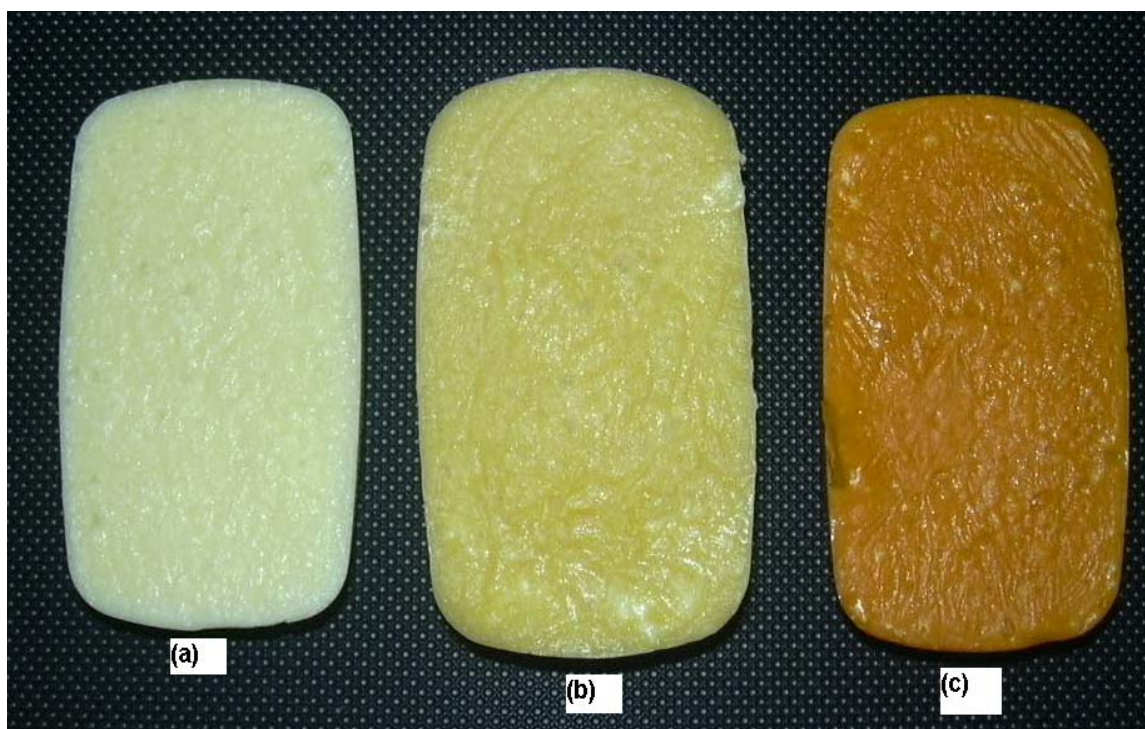


Figura 39: Requeijão, (a) sem adição de corante, (b) acrescido de 20ppm de bixina, e (c) acrescido de 20ppm de complexo CP bixina- β -CD

A análise da **tabela 13** demonstra que quanto à textura não foram encontradas diferenças significativas entre os requeijões adicionados de corante e complexo.

Tabela 13: Parâmetros de textura para requeijão quanto ao estudo com corante bixina.

Amostra de Requeijão	Dureza	Adesividade	Elasticidade	Matigabilidade
Requeijão sem corante	14,0 $\pm$ 0,4 ^a	-0,1 $\pm$ 0,0 ^a	0,8 $\pm$ 0,0 ^a	7,7 $\pm$ 0,3 ^a
Requeijão com Bixina	14,0 $\pm$ 0,4 ^a	-0,1 $\pm$ 0,0 ^a	0,7 $\pm$ 0,0 ^b	6,9 $\pm$ 0,2 ^a
Requeijão com Bixina- β CD	15,0 $\pm$ 0,2 ^a	-0,1 $\pm$ 0,0 ^a	0,8 $\pm$ 0,0 ^a	7,5 $\pm$ 0,2 ^a

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$).

5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Desta maneira baseado em todos os estudos realizados com os corantes curcumina, bixina e beterraba pode-se concluir que:

1. Para o corante curcumina o melhor método de complexação dentre os testados, foi o de co-precipitação, sendo que as análises de caracterização do complexo apresentaram fortes indícios da ocorrência da formação do complexo de inclusão. Cabe ainda ressaltar que o valor da constante de formação aparente, K_f foi significativa sendo de $1,45 \times 10^5 \text{ mol}^{-2} \cdot \text{L}^2$ mesmo sem informações relevantes sob a formação do complexo pela análise por RMN- ^1H . Para este corante ainda, ficou estabelecido uma relação estequiométrica de 1:2 entre curcumina e β -CD.
2. Ainda para a curcumina foi possível observar visualmente uma imensa melhora na solubilidade e capacidade de coloração para o complexo de co-precipitação testado em alimentos, o que vislumbra para a indústria a possibilidade de usá-lo com segurança e confiabilidade obtendo uma melhora da pigmentação nas mesmas concentrações.
3. Para o corante bixina, o método de complexação mais eficiente em termos de proteção térmica e indicio de formação de complexos foi também o de co-precipitação com valor de constante de formação aparente, K_f , de $3,34 \times 10^2 \text{ mol/L}$. A provável diferença deste valor para o conseguido com a curcumina, talvez seja explicado pela interação da molécula do corante com a CD que no caso da bixina é menos intensa na cavidade interior da CD, mesmo assim, o poder de solubilização em meio aquoso aumentou e a capacidade corante em alimentos com algum teor de gordura cresceu consideravelmente capacitando este complexo para uso industrial. Estabeleceu-se para este corante uma relação estequiométrica de 1:1, referente à interação bixina- β -CD.

4. Para o mesmo corante ainda pode-se observar que as técnicas de caracterização demonstraram o efeito de proteção térmica e interação de hóspede e hospedeiro, com exceção do método de RMN-H¹.
5. Já para o corante beterraba não foram obtidos resultados relevantes, ficou comprovado que devido à baixa pureza do composto e a presença de muitas moléculas interferentes, na sua maioria, açúcares impediram definir ao certo qual a interação do corante com a molécula da CD, pois, durante a realização de formação do complexo não se pode ter a certeza de qual molécula interagiu com a CD e os valores aleatórios de absorvância destes compostos em UV visível comprovam esta teoria.
6. Os testes de estabilidade demonstraram uma influencia bastante forte da luz na decomposição da bixina e sua complexação promoveu uma melhora significativa na manutenção da intensidade da cor. Para a curcumina percebeu-se que a luz não é o único fator que influencia no processo de descoloração do produto.
7. Os testes instrumentais de cor comprovaram a maior capacidade colorante dos complexos frente ao corante puro. Os testes de análise instrumental de textura demonstraram que a inclusão do complexo na formulação do produto não altera suas características iniciais.
8. Os estudos de análise sensorial demonstraram uma ótima aceitação para o queijo tipo minas frescal, equivalente a uma nota media de 6,7 pontos numa escala hedônica de 7 pontos. Para o requeijão a aceitação também foi relevante apresentando uma nota media de 5,6.
9. Recomenda-se que outras técnicas de inclusão sejam utilizadas, como lipossomas, por exemplo, tanto para os corantes onde se conseguiu

determinar qual melhor complexo a ser utilizado, como no caso da beterraba, para que os novos complexos formados ao serem analisados por RMN tragam informações complementares.

10. Para implementar ainda mais a solubilização da bixina, sugere-se também o uso de outras CDs para o processo de complexação, a título de curiosidade, pois estas encareceriam demais o corante para fins industriais.

6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Especificação de cores de acordo com o sistema de notação Munsell** – NBR 12694, Rio de Janeiro, nov, 1992.
2. ANTUNES, L.M.G.; ARAUJO, M.C.P. Magenicidade e mutagenicidade dos principais corantes de alimentos. **Revista de Nutrição**, v.13, p. 81-88, 2000.
3. ANZALDUA-MORALES, A. **La evaluacion de los alimentos en la teoria y la pratica**. Zaragoza: Editora Acribia, 1994, 198p.
4. ARABSHAHI, A.; LUND, D.B. Considerations in calculating kinetic parameters from experimental data. **Journal of Food Process Engineering**, p.239-251, 1985.
5. BAGLOLE, K.N.; BOLAND, P.G.; WAGNER, B.D.; Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v.173, p. 230-237, 2005.
6. BALASWAMY, K.; RAO, PGP; SATYANARAYANA, D.G. Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. **LWT**, v.39, p.952-956, 2006.
7. BARANAC, J.; AMIC, D.; VUKADINOVIC, V. Spectrophotometric study of the influence of individual substituted positions on flavylum chromophore stability **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 932-936, 1990.

8. BARBOSA, M.I.M.J.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Research International**, v.38, p. 989-994, 2005.
9. BARETH, A.; STROHMAR, W.; KITZELMANN, E. HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese. **European Food Research Technology**, n.215, p.359-364, 2002.
10. BEKERS, O. UIJTENDAAL, E. V.; BEIJNEN, J. H. et al. Cyclodextrin in pharmaceutical fields. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.17, p.1503-1549, 1991.
11. BERGAMASCO, R.C. Complexação de sulfluramida em ciclodextrina. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá, área de Engenharia Química, 2003.
12. BRADY, J.E.; HUMISTON, G.E. **Química Geral**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, Editora S.A., v.1, p.45, 2003.
13. BRESSANI, R.; BARNEON, F.P.E.; BRABAM, J.E.; ELIAS, L.G.; GOMEZ-BRENES, R. Composición química, contenido de aminoácidos y valor nutritivo de la proteína de semilla de achiote (*Bixa orellana*, L.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.33, n.2, p.356-376, 1983.
14. CHANDRA, A.; NAIR, G.M.; TEZZONI, A.F. Isolation and stabilization of anthocyanins from tart cherries (*Prunus cerasus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1062-1065, 1993.
15. CITERNESI, U.; SCIACCHITANO, M. Ciclodextrinas em dermocosméticos funcionais. **Cosmetics & Toiletries**, v.7, p. 50-55, 1995.

16. CLYDESDALE, J.M. Color measurement. In: GUIENWEDEL D.W.; WHITAKER, J.R. **Food Analysis: principles and techniques**. New York: Marcel Dekker, 1984, p. 95-150. v.1 Physical characterization.
17. DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, R.; PAREDES-LOPEZ, O. Natural Pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains- Characteristics, biosynthesis, processing and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.
18. DEL VALLE, M. Cyclodextrin and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.
19. DUCHÊNE, D.; DEBRUERES, B.; BRETILLON, A. Les cyclodextrines nature, origine et intérêt en pharmacie galénique. **Labo-Pharma-Probl. Tech**, v. 32, p. 843-850, 1984.
20. FAO/WHO. Specification for the identity and purity of some food colours, flavour enhancer, thickening agents and certain other food additives. **Nutrition Meeting Report Series**, v. 54, p. 4-11, 1999.
21. FRANCIS, J. Foods colorants today. **World of Ingredients**, v.11, p.8-9, 1994.
22. FERREIRA, V.L.P.; TEIXEIRA-NETO, R.O.; MOURA, S.C.S.; SILVA, M.S. Cinética de degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetido a tratamento térmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.19, n.1, p.37-42, 1999.
23. FIRACE. **Generalidades sobre urucum**. Disponível em <http://www.firace.com.br/urucum.html> consulta em janeiro, 2008.

24. FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.
25. FRANCIS, F.J. Less common natural colorants. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J.D. (Ed). **Natural Food Colorants**. London: Blakie Academic & Professional, p. 40-79, 1996.
26. FRÖMMING, K.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrin in pharmacy**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 224p.
27. FURUTA, T.; YOSHII, H.; MIYAMOTO.; YASUNISHI, A.; HIRANO, H. Effects of water of inclusion complex of d-limonene and cyclodextrin. **Supramolecular Chemistry**, v.1, p. 321-325, 1993.
28. FUKAZAWA, T. Japan patent n. 70024672, 1970.
29. GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 513-516, 2003.
30. GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric- chemistry, technology and quality. **Critical Review Food and Science Nutrition**, v.12, n.3, p. 199-301, 1980.
31. GOYLE, A.; GUPTA, G. Use of synthetic colour in foods. **Science and Culture**, v.64, p. 241-243, 1998.
32. HALLAGAN, J.B.; ALLEN, D.C.; BORZELLECA, J.F. The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics colour additives exempt from certification. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 33 n. 6, p.515-528, 1995.

33. HANDELMAN, G.J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**, v. 17, n.10, p. 818-822, 2001.
34. HENRY, B.S. Natural food colours. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J.D. (Ed). **Natural Food Colorants**. London: Blakie Academic & Professional, p. 40-79, 1996.
35. HUMEAU, C.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M. Enzymatic etherification of bixin by L-ascorbic acid. **Biotechnology Letters**, v.22, p. 165-168, 2000.
36. IBGE Disponível em: www.ibge.gov.br Consultado em 05 de abril de 2008.
37. IFT. Sensory evaluation guide for testing food beverage products. **Food Technology**, v.35, n.5, p. 50-59, 1981.
38. ILKER, R. In-vitro pigment production: an alternative to colour synthesis. **Food Technology**, v. 41, n.4, p.70-72, 1987.
39. JACHMAN, R.L.; SMITH, J.L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J.D. (Ed). **Natural Food Colorants**. London: Blakie Academic & Professional, p. 244-309, 1996.
40. JACK, F.R.; PIGGOTT, J.R.; PATERSON, A. Discrimination of texture and appearance in cheddar cheese using consumer free-choice profiling. **Journal of Food Sensory Studies**, v.8, n.2, p.167-176, 1993.
41. JASIM, S.; ALI, F. A novel rapid method for the spectrofluorometric determination of curcumin in curcumin spices and flavors. **Microchemistry Journal**, v.46, p. 209-214, 1992.

42. JUHASZ, A.; SALGO, A.; SEBOK, A. Application of beta cyclodextrin in meat industry. In: HUBER, O.; SZEJTLI, J. **Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers , 1988, p. 551-555.

43. KAWASHIMA, K. Prevention of discoloration of food colorants. **Japanese Kokai**, v.49, p. 170-173, 1980.

44. KONNO, A.; MIYAWAKI, M.; MISAKI, M. Bitterness reduction of citrus fruits by β -Cyclodextrin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, p.2341-2342, 1981.

45. LAWLESS, H.T.; HEYMMAN, H. **Sensory Evaluation of Food**. New York: Chapman & Hall, 1998, 819p.

46. LESHNIK, R.R. European Patent n. 37204, 1982;

47. LEWIS, C.E.; WALKER, J.R.L. Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 54, p.315-319, 1995.

48. LINDNER, K.; SZENT. L.; SZEJTLI, J. Food flavouring with β -CD complexed flavor substances. **Acta Alimentaria**, v.10, p. 175-186, 1981.

49. LOFTSSON, T.; OLAFSDOTTIR, B.J.; JONSDOTTIR, S. Cyclodextrin complexation of NSAIDS: physicochemical characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v.1, p. 95-101, 1993.

50. LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical application of cyclodextrin: drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

51. LOFTSSON, T.; MASSON, M.; BREWSTER, M.E.; Self-association of cyclodextrin and cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 91, p. 1091-1099, 2004.
52. LYNG, S.M. Atividade antioxidante de carotenóides naturais e modificados. Tese de doutorado submetida à Universidade Federal do Paraná, área de Bioquímica, 2004, 184p.
53. LYNG, S.M.; PASSOS, M.; FONTANA, J.D. Bixin and alfa-cyclodextrin inclusion complex stability tests. **Process Biochemistry**. v.40, p.865-872, 2005.
54. MAING, Y.; MILLER, I. European Patent, n. 25637, 1981.
55. MANZAN, A.C.C. M.; TANILOLO, F.S.; BREDOW, E.; NOV, N. P. Extraction of essential oil and pigments from *Curcuma Longa (L)* by steam distillation and extraction with volatile solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 6802-6807, 2003.
56. MASSON, M.; LOFTSSON, T.; JONSDOTTIR, S.; FRIDRIKSDOTTIR, H. PETERSEN, D.S. Stabilization of drugs through complexation with non ionic and ionic cyclodextrins. **International Journal of Pharmacies**, v.164, p. 45-55, 1998.
57. MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. 124p, Editora UEM, 2000.

58. MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: estudo da estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, p. 197-203, 2002.
59. MENDES, A.M.S.; FIGUEIREDO, A.F.; DA SILVA, J.F. Crescimento e maturação dos frutos e sementes do urucum. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.133-141, 2006.
60. MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.1, n.2, p.193-196, 2001.
61. MESPLET, N.; MORIN, P.; RIBET, J. Spectrofluorimetric study of eflocimibe- γ -cyclodextrin inclusion complex. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.59, p. 523-526, 2005.
62. MINGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MENDEZ, D.; GARRIDO-FERNANDEZ, J. Direction of bixin, lycopene, canthaxanthin and b-apo-8'-carotenal in products derived from red pepper. **Journal of the AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 491-496, 1995.
63. MINOLTA – Disponível em: www.miolta.it/specifich.asp Consultado em 12 de março de 2008.
64. MURRAY, J.R. DELAHUNT, C.M.; BAXTER, I.A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. **Food Research International**, v.34, n.6, p. 461-471, 2001.
65. NAGAMOTO, S. Cyclodextrin: expanding the development of their functions and applications. **Chemical Economic & Engineer Review**. v.17, p.28, 1985.

66. NAJAR, S. V.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). **Food Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 283-289, 1988.
67. NAVAS-DIAZ, A.; RAMOS-PEINADO, M.C. Fluorometric determination of curcumin in yogurt and mustard. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, p.56-59, 1992.
68. OLIVEIRA, J.S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana*). Universidade Federal de Santa Catarina, área de Engenharia Química, 2005.
69. PAUMGARTTEN, F. J. R.; CARVALHO, R. R.; ARAÚJO, I. B.; PINTO, F. M.; BORGES, O. O.; SOUZA, C.A. M.; KURIYAMA, S. N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p.1505-1601, 2002.
70. PHITA, J.; HOSHINO, T. Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hidroxypropylcyclodextrin with testosterone or with methyl orange. **International Journal of Pharmacies**, v.80, p. 243-251, 1992.
71. POMERANZ, Y; MELOAN, C.E. **Food Analysis: theory and practices**. 3^oed. New York: Capman & Hall, 1994, p. 87-98.
72. PONS, M.; FISZMAN, S.M. Instrumental texture profile analysis with particular references of gelled systems. **Journal of Texture Studies**, v.27, n. 6, p. 597-624, 1996.
73. QI, A.D.; LI, L.; LIU, Y.; The binding ability and inclusion complexation behavior of curcumin with natural alfa-, beta-, gamma-cyclodextrin in

- organoseleniun-bridges bis (beta-cyclodextrin). **Journal of Chinese Pharmacy Science**, v. 12, p. 15-20, 2003.
74. RAO, P.G.P.; JYOTHIRMAYI, T.; BALASWAMY, K.; SATYANARAYANA, D.G. Effect of processing conditions on the stability of annatto (*Bixa orellana* L.) dye incorporated into some foods. **LWT**, v.38, p. 779-784, 2005.
75. REITH, J.F.; GILIEN, J.W. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extract. **Journal of Food Science**, v.36, n.6, p.861-864, 1971.
76. ROSALEN, D.; SIMÃO, S.; HAAG, H. Considerações sobre a cultura do urucum (*Bixa orellana* L.), Informativo Técnico da Universidade de São Paulo, n. 12, 42p, 1991.
77. SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY, N.; SOWBAGYA, H.B.; SHANKARANA-RAYANA, M.L. Studies on quality of turmeric (*Curcuma longa* L) in relation to curing methods. **Journal of Food Science and Technology**, v.25, n.3, p.152-155, 1988.
78. SANDI, M.P. El Achiote. **Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento Uso de la Biodiversidad**. Ano 7, n. 46, 7-11, 2003.
79. SILVA, C.R.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological Research**, v.43, n.6, p. 561-566, 2001.
80. SHEWFELT, R.T.; THAI, C.N.; DAVIS, J.W. Prediction of changes in color of tomatoes during ripening of different constant temperatures. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1433-1437, 1988.

81. SIMPSON, S.J.; PIGGOTT, J.R. WILLIAMS, S.A.R. Sensory analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v.33, n.1, p. 7-18, 1998.
82. SOWBHAGYA, H.B.; SMITHA, S.; SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY, N.; BHATTACHARYA, S. Stability of water-soluble turmeric colourant in an extruded food product during storage. **Journal of Food Engineering**, v.67, p. 367-371, 2005.
83. SPECHET, M.; ROTHE, M.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Removal of phenylalanine from protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 516-521, 1981;
84. STAFF ARTICLE. Production and potential food application of cyclodextrins. **Food Technology**, v.42, n.2, p.96-100, 1988.
85. STATISTICA. Statistica 7.0 Software. Tulsa: StatSoft, 2003.
86. STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory Evaluation Practices**, London: Academic Press, 1985, 310p.
87. SZEJTLI, J. Cyclodextrin food, cosmetics and toiletries. **Starch/Starke**. v.11, p. 397, 1982.
88. SZEJTLI, J. **Cyclodextrin technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. 450p.
89. SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Review**, v. 98, p.1743-1753, 1998.

90. SZEJTLI, J. SZENTE, L.; BANK-ELOD, E. Molecular encapsulation of volatile, easily oxydizable flavor substances by cyclodextrin. **Acta Chimica Science**, v. 101, p. 27-46, 1979.
91. SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrin as food ingredients. **Food Science & Technology**, v.15, p. 137-142, 2004.
92. TANG, B.; MA, L.; WANG, H.; ZHANG, G. Study on the supramolecular interaction of curcumin and β -cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1355-1361, 2002.
93. TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z.; Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em colorificos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol 1, p. 310-313, 2001.
94. TOMREN, M.A.; MASSON, M.; LOFTSSON, T.; TONNESEN, H.H. Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.338, p.27-34, 2007.
95. TONNESEN, H.H.; Studies on curcumin and curcuminoids XXVIII. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactants solutions. **Pharmazie**, v. 27, p. 820-824, 2002.
96. TONNESEN, H.; MASSON, M.; THORSTEINN, L. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation; solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, p. 127-135, 2002;

97. TOTTERMAN, A.M.; SCHIPPER, N.D. THOMPSON, D.O.; MANNERMAA, J.P. Intestinal safety of water-soluble β -cyclodextrins in paediatric oral solution of spironolactone: effects in human intestinal epithelial caco-2 cell. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol 49, p. 43-48, 1997.
98. VAN HESS, T.; BARILLARO, G.; PIEL, G.; BERTHOLET, S.; HARRY DE HASSONVILLE, S.; EVARD, B.; DELATTRE, L. Application of supercritical carbon dioxide for the preparation of drug/cyclodextrin inclusion compounds. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.44, p. 271-274, 2002.
99. WIMMER, R.; AACHMANN, F.L.; LARSEN, K. L.; PETERSEN, S.B. NMR diffusion as a novel tool for measuring the associations constant between cyclodextrin and guest molecules. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 841-849, 2002.
100. YAMADA, T.; KOMYIA, T.; AKAKI, M. Formation of an inclusion complex of anthocyanins with cyclodextrins. **Agricultural Biological Chemistry**, v.44, n.6, p. 1411-1413, 1980.
101. YOSHII, H.; FURUTA, T.; YASUNISHI, A. Oxidation stability of eicoosapentaenoic and docosahexaenoic acid included in cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 127-135, 1997;
102. YU, E.K. Novel decaffeination process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 546-551, 1988.

Anexo I

(Gráficos de RMN- H^1)

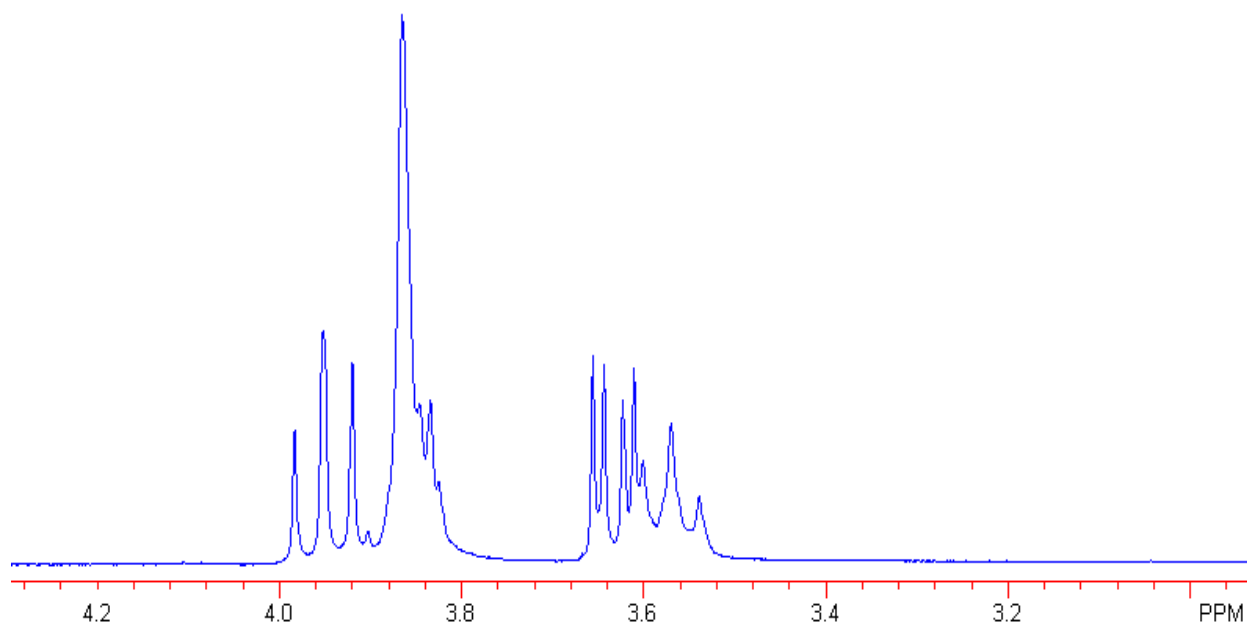


Figura 40: RMN- H^1 para complexo Curcumina- β -CD método de co-precipitação.

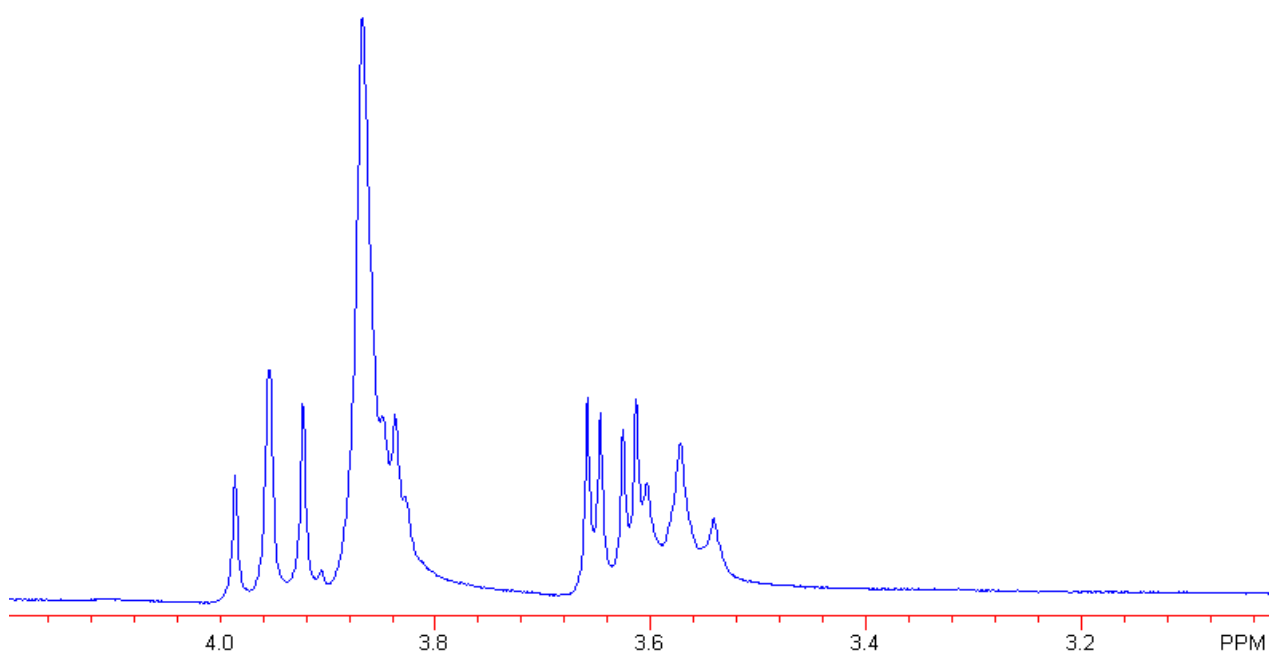


Figura 41: RMN- H^1 para complexo Curcumina- β -CD método de mistura física simples.

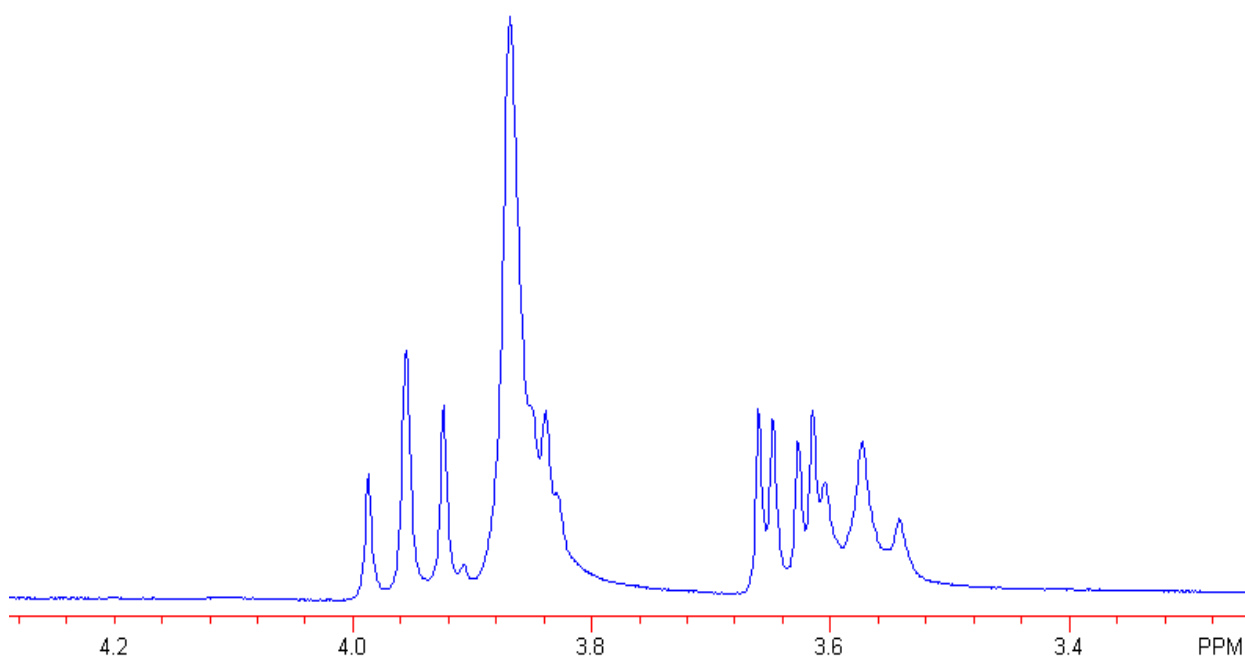


Figura 42: RMN- H^1 para complexo Curcumina- β -CD método de mistura física com amassamento.

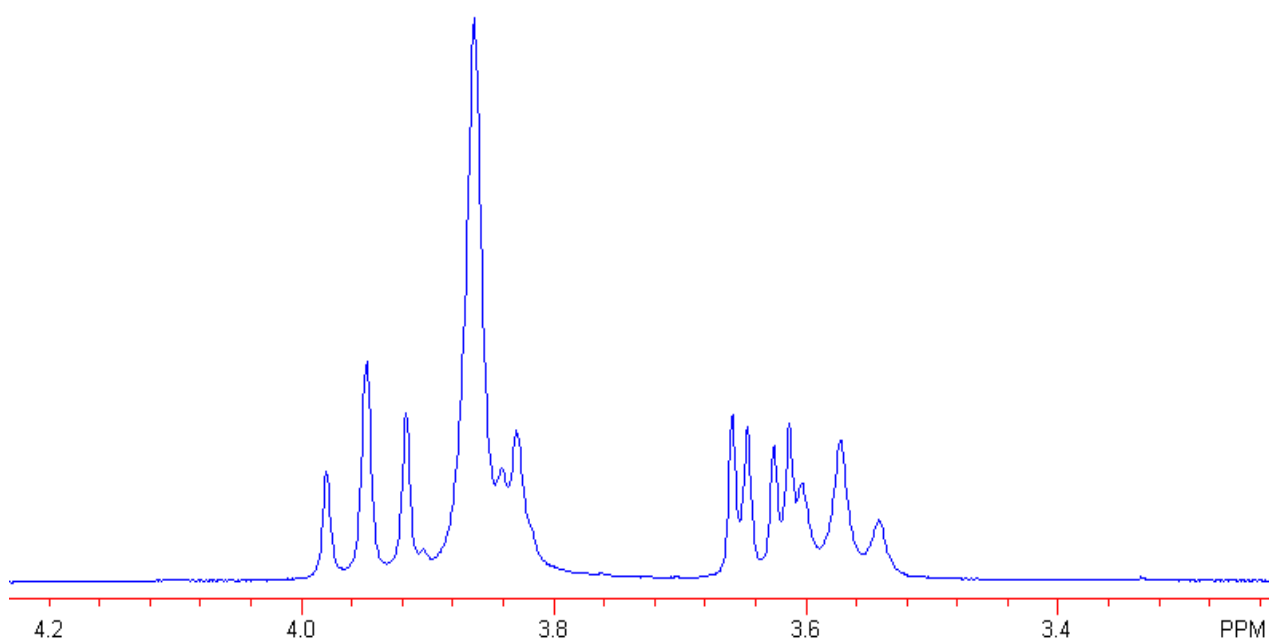


Figura 43: RMN- H^1 para complexo Bixina- β -CD método de mistura física simples.

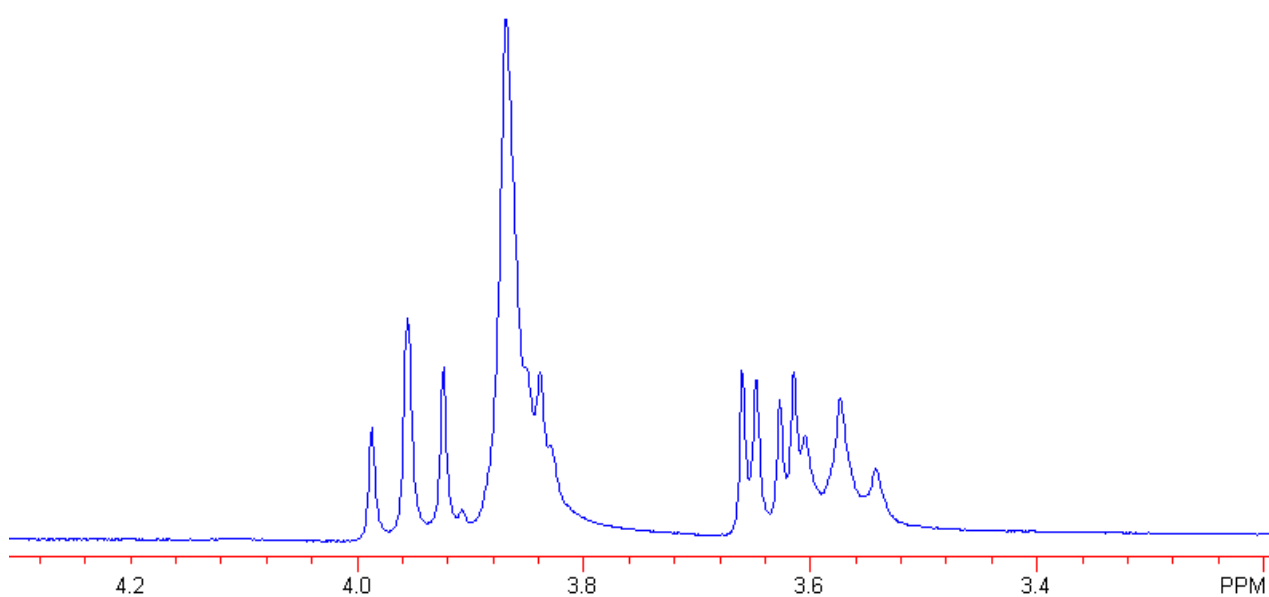


Figura 44: RMN- H^1 para complexo Bixina- β -CD método de mistura física com amassamento.

Anexo II

**(Questionário de Aceitação dos Novos
Produtos e Intenção de Compra)**

É consumidor de queijo (tipo minas frescal): () sim () não

Com que frequência:

() diariamente () 1 vez por semana
() 2 a 3 vezes por semana (.....) quinzenalmente
(.....) uma vez por mês

Você está recebendo uma amostra. Por favor, prove e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou.

7- gostei muito

6-

5 -

4 - nem gostei/nem desgostei

3 -

2 -

1 - desgostei muito

Compraria esse produto? () sim () não

Por que ? _____

É consumidor de requeijão de corte: () sim () não

Com que frequência:

() diariamente () 1 vez por semana
() 2 a 3 vezes por semana (.....) quinzenalmente
(.....) uma vez por mês

Você está recebendo uma amostra. Por favor, prove e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou.

7- gostei muito

6-

5 -

4 - nem gostei/nem desgostei

3 -

2 -

1 - desgostei muito

Compraria esse produto? () sim () não

Por que ? _____