



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

SUIANE SAVAZZI

DESENVOLVIMENTO DE NANOESFERAS DE BIXINA E NORBIXINA PARA  
INCORPORAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS DE ALGINATO DE SÓDIO

Porto Alegre  
2024

SUIANE SAVAZZI

DESENVOLVIMENTO DE NANOESFERAS DE BIXINA E NORBIXINA PARA  
INCORPORAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS DE ALGINATO DE SÓDIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como um dos requisitos para a obtenção do grau  
de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira  
Rios

Porto Alegre  
2024

CIP - Catalogação na Publicação

Savazzi, Suiane  
Desenvolvimento de Nanoesferas de Bixina e  
Norbixina para Incorporação em Filmes Biodegradáveis  
de Alginato de Sódio / Suiane Savazzi. -- 2024.  
127 f.  
Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. embalagens. 2. compostos bioativos. 3. urucum.  
4. casting. 5. nanotecnologia. I. de Oliveira Rios,  
Alessandro, orient. II. Título.

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

Autora: Suiane Savazzi

Título da tese: Filmes biodegradáveis ativos à base de alginato de sódio incorporados com  
nanoesferas de bixina

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
DOUTORA EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprovada em: ...../...../.....

Homologada em: ...../...../.....

Pela banca examinadora:

Por:

---

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de  
Oliveira Rios, Docente do Instituto de  
Ciência e Tecnologia de Alimentos  
PPGCTA/UFRGS

---

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues  
Coordenador do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos PPGCTA/UFRGS

---

Banca: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Florencia Cladera  
Olivera, Dr<sup>ª</sup> em Engenharia Química pela  
UFRGS

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Florencia Cladera Olivera,  
Diretora do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS

---

Banca: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elessandra da Rosa  
Zavareze, Dr<sup>ª</sup> em Engenharia e Ciência de  
Alimentos pela FURG

---

Banca: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aline Oliveira e Silva  
Ianhke, Dr<sup>ª</sup> em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos pela UFRGS

*Dedico este trabalho a meu pai Adalto, dono desse sonho que agora eu realizo e a minha mãe Gildete, que fez do impossível possível para eu chegar até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Gildete, em todos os momentos não mediu esforços para que pudéssemos realizar nossos objetivos e na maior parte da minha vida fez isso sozinha, com uma força e determinação incríveis. Você é a força que me motiva a alcançar os mais altos voos. Obrigada pela resiliência, paciência e presença mesmo de longe. Amo você incondicionalmente. E ao meu pai, Adalto, que um dia sonhou em ser Doutor, mas o tempo dele foi curto. O meu título ofereço a ele, tudo que almejei nasceu dele e por isso eu só posso agradecer.

À minha irmã, Mestra Kamirri Savazzi, que sempre foi minha companheira e meu exemplo, guerreira e bondosa, nos presenteou com meus sobrinhos amados Helena e Heitor, que trouxeram luz e alegria para nossas vidas, para vocês três todo meu amor e carinho! Espero que eles possam entender a ausência da “Madi”.

À minha prima, irmã, amiga, “roommate”, Amanda, que desde a infância está presente em todos os momentos bons e ruins, me ajudando ou comemorando comigo, sem medir esforços. Estivemos sempre juntas mesmo com distâncias e quando chegou o momento de estarmos juntas, me recebeu com os braços e o coração aberto para dividirmos o lar em Porto Alegre. Obrigada por tudo, prima!

Ao meu namorado, Lucas, que apareceu na minha vida como um sopro de ar fresco num momento em que era perigoso respirar. Me ensinou amar e a receber amor. Me manteve lúcida e feliz nos momentos mais difíceis dos últimos anos. Evitou que eu abandonasse tudo, em momentos de desespero e ansiedade, foi luz e calma. Obrigada, meu amor. Te amo para sempre!

Aos meus amigos Renato e Carlos, um agradecimento especial pela parceria e pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, sem vocês talvez eu não conseguisse. E obrigada pela amizade na vida, quero leva-los para sempre comigo, assim como minhas amigas Fernanda e Natália, obrigada por tudo!

Ao meu orientador Prof. Alessandro de Oliveira Rios, que aceitou me orientar mesmo sem me conhecer e saber do meu trabalho e ainda vindo de longe, me recebeu bem e me guiou. Obrigada pela disponibilidade, compreensão e paciência, fez o que podia mesmo em prazos apertados. Desculpa por isso e obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Compostos Bioativos (Lab 211), pela parceria, apoio, ajuda e conhecimento. Às bolsistas de iniciação científica, Jéssica e Alina, obrigada pela ajuda e empenho na bancada para realização deste trabalho.

UFRGS, ICTA, PPGCTA e técnicos, meu agradecimento por todo suporte, disposição e contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES que foi responsável pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À banca examinadora, pela disponibilidade, dedicação e contribuição para o enriquecimento deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

Embalagens plásticas derivadas de petróleo geram graves consequências ao meio ambiente, devido à dificuldade de degradação. Uma alternativa sustentável é o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis, com adição de compostos bioativos, capazes de melhorar suas propriedades e adicionar funcionalidade, como a atividade antioxidante. A bixina e a norbixina são pigmentos antioxidantes naturais muito utilizados como corantes naturais, porém muito suscetíveis a degradação por fatores ambientais. Técnicas de encapsulamento têm sido elaboradas para melhorar a estabilidade desses compostos. O alginato de sódio é um polímero natural com alta capacidade de formação de hidrogéis e de solução filmogênica, muito utilizado para aplicação em encapsulamento e desenvolvimento de filmes. O objetivo do presente trabalho foi elaborar nanoesferas de alginato de sódio com bixina e norbixina, avaliar sua liberação em simulantes de alimentos e aplicar em filmes biodegradáveis de alginato de sódio. Foram elaboradas nanoesferas de alginato de sódio pelo método de emulsificação/gelificação interna com adição de bixina e norbixina em diferentes concentrações ( $1,25 \times 10^{-3}$ ,  $2,5 \times 10^{-3}$ ,  $5,0 \times 10^{-3}$  e  $7,5 \times 10^{-3}$  g/g de biopolímero). As melhores eficiências de encapsulamento (EE) foram obtidas nas formulações com maior concentração de pigmentos, tanto para bixina como para norbixina (37,9% e 51,5%, respectivamente) e esta foi a formulação para realizar as análises de caracterização das nanoesferas. A distribuição de tamanho de partícula apresentou valores de  $741,9 \pm 41,0$  nm,  $622,9 \pm 71,0$  nm e  $589,5 \pm 99,1$  nm para nanoesferas controle, de bixina e de norbixina, respectivamente. As nanoesferas encapsuladas apresentaram coloração vermelho-alaranjado, com diferença de cor significativa entre elas. A análise térmica indicou um aumento na estabilidade térmica dos pigmentos após o encapsulamento e as nanoesferas apresentaram capacidade de sequestrar o radical livre ABTS<sup>+</sup>. O ensaio de liberação em simulante de alimentos gordurosos (etanol 95%) mostrou uma rápida liberação nas primeiras horas, as nanoesferas de bixina apresentaram melhor liberação e, portanto, foram escolhidas para aplicação nos filmes. Filmes biodegradáveis de alginato de sódio com nanoesferas de bixina em diferentes concentrações de (1, 5 e 10 % m/m biopolímero) foram desenvolvidos pela técnica de *casting* com duas etapas de complexação com cloreto de cálcio. Os filmes com a maior concentração de nanoesferas de bixina mostraram uma melhora das propriedades mecânicas, uma diferença visível na cor e uma maior opacidade. A incorporação das nanoesferas reduziu significativamente a permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade dos filmes em água, e manteve a estabilidade térmica dos filmes. Além disso, os filmes biodegradáveis de alginato de sódio com 10% de nanoesferas de bixina mostraram um efeito

protetivo contra oxidação lipídica do óleo de girassol em condições aceleradas de oxidação. Portanto, foi possível produzir nanoesferas de bixina e norbixina que protegeram o pigmento da degradação térmica e com capacidade de liberação nos alimentos e nanoesferas de bixina foram aplicadas na em filmes biodegradáveis para proteção de alimentos ricos em lipídeos.

**Palavras-chave:** embalagens; compostos bioativos; *casting*; urucum; polímeros; nanotecnologia.

## ABSTRACT

Petroleum-derived plastic packaging generates severe environmental consequences due to the difficulty of degradation. A sustainable alternative is the development of biodegradable packaging with bioactive compound incorporation, capable of improving its properties and adding functionality, such as antioxidant activity. Bixin and norbixin are natural antioxidant pigments widely used as natural dyes, but they are very susceptible to degradation by environmental factors. Encapsulation techniques have been developed to improve the stability of these compounds. Sodium alginate is a natural polymer with a high capacity for forming hydrogels and film-forming solutions, widely used for encapsulation and film development. The objective of the present work was to prepare sodium alginate nanospheres with bixin and norbixin, evaluate their release in food simulants, and apply them to biodegradable sodium alginate films. Sodium alginate nanospheres were prepared using the emulsification/internal gelation method with the incorporation of bixin and norbixin in different concentrations ( $1.25 \times 10^{-3}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$ ,  $5.0 \times 10^{-3}$  and  $7.5 \times 10^{-3}$  g/g of biopolymer). The best encapsulation efficiencies (EE) were obtained in formulations with the highest concentration of pigments, both for bixin and norbixin (37.9% and 51.5%, respectively), and this was the formulation used for the characterization analyses of the nanospheres. The particle size distribution showed  $741.9 \pm 41.0$  nm for control nanospheres,  $622.9 \pm 71.0$  nm for bixin nanospheres, and  $589.5 \pm 99.1$  nm for norbixin nanospheres. The encapsulated nanospheres showed a red-orange color, with a significant color difference. Thermal analysis indicated an increase in the thermal stability of the pigments after encapsulation, and the nanospheres showed the ability to scavenge the ABTS<sup>+</sup> free radical. The release test in a fatty food simulant (95% ethanol) showed a rapid release in the first hours. The bixin nanospheres showed better release and were chosen for application in the films. Biodegradable sodium alginate films with bixin nanospheres in different concentrations (1, 5, and 10% w/w biopolymer) were developed using a casting technique with two complexation steps with calcium chloride. Films with the highest concentration of bixin nanospheres showed mechanical properties improvement, a visible color difference, and higher opacity. Nanosphere incorporation significantly reduced the water vapor permeability and solubility of the films in water and maintained their thermal stability. Furthermore, biodegradable sodium alginate films with 10% bixin nanospheres showed a protective effect against lipid oxidation of sunflower oil under accelerated oxidation conditions. Therefore, it was possible to produce bixin and norbixin nanospheres that protected

the pigment from thermal degradation and with the ability to release into food, and bixin nanospheres were applied to biodegradable films to protect foods rich in lipids.

**Keywords:** Packaging; bioactive compounds; casting; annatto; polymers; foods; nanotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

<b>Figura 1.</b> Estrutura da bixina nas formas <i>cis</i> - e <i>trans</i> .....	25
<b>Figura 2.</b> Estrutura da norbixina nas formas <i>cis</i> - e <i>trans</i> .....	26
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática de um nanoagregado (a), nanocápsula (b), nanoesfera com interior estruturado (c) e nanocápsula com interior estruturado (d)..	28
<b>Figura 4.</b> Estrutura molecular do alginato .....	30

### CAPÍTULO III: ARTIGO CIENTÍFICO

#### **Nanoencapsulation of bixin and norbixin in sodium alginate: preparation, characterization, and release in food simulant**

<b>Figure 1.</b> Particle size distribution of the control, bixin and norbixin nanospheres (Control, NB e NN, respectively).....	61
<b>Figure 2.</b> Thermogravimetric curves (TGA) for control, bixin (NB) and norbixin (NN) nanospheres. ....	65
<b>Figure 3.</b> Release of pigment from bixin nanospheres (NB) and norbixin nanospheres (NN) at 25 °C and 40 °C in ethanol 95%.....	67

#### **Development of biodegradable sodium alginate films with antioxidant properties containing bixin nanospheres**

<b>Figure 1.</b> Biodegradable sodium alginate films incorporated with 1, 5, and 10% (w/w of biopolymer) of bixin nanospheres (BN).....	81
<b>Figure 2.</b> Stress–Hencky strain curves of the sodium alginate films incorporated with 1, 5, and 10% of bixin nanospheres (BN). ....	87
<b>Figure 3.</b> Light transmission of the sodium alginate films incorporated with 1, 5, and 10% of bixin nanospheres (BN). ....	91
<b>Figure 4.</b> TGA (A) and DTG (B) curves of the sodium alginate films incorporated with 1, 5, and 10% of bixin nanospheres (BN). ....	93
<b>Figure 5.</b> DSC curves of the sodium alginate films incorporated with 1, 5, and 10% of bixin nanospheres (BN). ....	94

<b>Figure 6.</b> Optical microscopy images of biodegradable alginate films (left column: 10x; right column: 100x). Control samples (a,b), and incorporated with 1% (c,d), 5% (e,f) and 10% (g,h) of bixin nanospheres. ....	95
<b>Figure 7.</b> Biodegradability of the sodium alginate films incorporated with 1, 5, and 10% of bixin nanospheres (BN) after 15 days. ....	96
<b>Figure 8.</b> The appearance of 5 and 15-day degradation of the biodegradable alginate films incorporated with 1, 5 and 10% of bixin nanospheres (BN) after 15 days. ....	96
<b>Figure 9.</b> Peroxide index of sunflower oil stored in different packaging. BN 10%: sodium alginate films incorporated with 10% of bixin nanospheres; PET: polyethylene terephthalate bottle; WP: without packaging. ....	98
<b>Figure 10.</b> Conjugated dienes and conjugated trienes during storage of sunflower oil. BN 10%: sodium alginate films incorporated with 10% of bixin nanospheres; PET: polyethylene terephthalate bottle; WP: without packaging. ....	99

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III: ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### **Nanoencapsulation of bixin and norbixin in sodium alginate: preparation, characterization, and release in food simulant**

<b>Table 1.</b> Encapsulation efficiency (EE) of bixin nanospheres (NB) and norbixin nanospheres (NN) with different quantities of pigments. ....	59
<b>Table 2.</b> Color parameters of control (C), bixin (NB), and norbixin (NN) nanospheres.....	62
<b>Table 3.</b> Thermal parameters obtained from the thermograms (TGA/DSC) of control, bixin (NB) and norbixin (NN) nanospheres. ....	64
<b>Table 4.</b> Radical ABTS <sup>+</sup> scavenging capacity. ....	65
<b>Table 5.</b> Release kinetics parameters of bixin and norbixin nanospheres. ....	68

#### **Development of biodegradable sodium alginate films with antioxidant properties containing bixin nanospheres**

<b>Table 1.</b> Physicochemical properties (moisture content, water solubility index, and swelling capacity) of sodium alginate films incorporated with bixin nanospheres. ....	88
<b>Table 2.</b> Water vapor permeability, thickness and mechanical properties of sodium alginate films incorporated with bixin nanospheres.....	86
<b>Table 3.</b> Optical properties: color and opacity of the films. ....	91
<b>Table 4.</b> Thermal parameters obtained from the thermograms (TGA/DSC).....	92

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1	Objetivo geral .....	20
2.2	Objetivos específicos .....	20
	<b>CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
3.1	Carotenoides .....	22
3.2	Bixina e norbixina.....	25
3.3	Nanoencapsulamento .....	27
3.4	Nanopartículas de alginato.....	30
3.5	Filmes biodegradáveis .....	32
3.6	Filmes biodegradáveis de alginato de sódio ativos.....	34
	<b>CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	Materiais .....	38
4.2	Extração da bixina e conversão em norbixina .....	38
4.3	Quantificação por análise espectrofotométrica UV/visível .....	39
4.4	Elaboração das nanoesferas de alginato de sódio contendo bixina ou norbixina .....	39
4.5	Caracterização das nanoesferas.....	40
4.5.1	Eficiência do encapsulamento .....	40
4.5.2	Distribuição do tamanho de partícula.....	40
4.5.3	Análises colorimétricas.....	41
4.5.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	41
4.5.5	Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	42
4.5.6	Liberação de carotenoides em líquido simulante de alimentos .....	42
4.5.7	Capacidade antioxidante.....	43
4.6	Elaboração dos filmes de alginato de sódio incorporados com nanoesferas de bixina.....	43
4.7	Caracterização dos filmes de alginato de sódio incorporados com nanoesferas de bixina.....	44
4.7.1	Espessura e propriedades mecânicas .....	44
4.7.2	Umidade e solubilidade em água dos filmes .....	44
4.7.3	Capacidade de inchamento .....	45
4.7.4	Permeabilidade ao vapor de água .....	45

4.7.5	Propriedades ópticas .....	46
4.7.5.1	Cor .....	46
4.7.5.2	Transmissão de luz e opacidade .....	46
4.7.6	Propriedades térmicas.....	47
4.7.6.1	Análise termogravimétrica (TGA).....	47
4.7.6.2	Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	47
4.7.7	Morfologia .....	47
4.7.8	Biodegradabilidade.....	47
4.7.9	Atividade antioxidante.....	48
4.7.9.1	Índice de peróxidos.....	48
4.7.9.2	Dienos e trienos conjugados .....	49
4.8	Análise estatística .....	49
<b>CAPÍTULO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>		<b>50</b>
<b>5 Nanoencapsulation of bixin and norbixin in sodium alginate: preparation, characterization, and release in food simulant .....</b>		<b>51</b>
<b>Abstract .....</b>		<b>51</b>
<b>1 Introduction .....</b>		<b>52</b>
<b>2 Materials and methods.....</b>		<b>53</b>
2.1	Materials .....	53
2.2	Bixin extraction and conversion to norbixin.....	54
2.3	Quantification by UV/visible spectrophotometric analysis .....	54
2.4	Preparation of sodium alginate nanospheres containing bixin or norbixin.....	55
2.5	Characterization of the nanospheres .....	55
2.5.1	Encapsulation efficiency.....	55
2.5.2	Particle size distribution .....	55
2.5.3	Colorimetric analysis .....	56
2.5.4	Thermal properties.....	56
2.5.5	Differential scanning calorimetry (DSC) .....	57
2.5.6	Antioxidant capacity .....	57
2.5.7	Release of carotenoids in food simulants .....	57
2.6	Statistical analysis.....	58
<b>3 Results and discussion.....</b>		<b>58</b>
3.1	Encapsulation efficiency .....	58
3.2	Particle Size Distribution .....	60
3.3	Colorimetric analysis .....	62

3.4	Thermal properties .....	63
3.5	Antioxidant capacity .....	65
3.6	Release of carotenoids .....	66
<b>4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>69</b>
	<b>References.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Development of biodegradable sodium alginate films with antioxidant properties containing bixin nanospheres .....</b>	<b>77</b>
	<b>Abstract .....</b>	<b>77</b>
<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>78</b>
<b>2</b>	<b>Materials and methods.....</b>	<b>79</b>
2.1	Materials .....	79
2.2	Bixin extraction.....	80
2.3	Preparation of sodium alginate nanospheres containing bixin by internal gelation method .....	80
2.4	Preparation of sodium alginate films with bixin nanospheres .....	81
2.5	Thickness and mechanical properties .....	82
2.6	Moisture and solubility in water .....	82
2.7	Swelling capacity .....	83
2.8	Water vapor permeability .....	83
2.9	Color .....	83
2.10	Light transmission and opacity .....	84
2.11	Thermal properties.....	84
2.12	Morphology .....	85
2.13	Biodegradability.....	85
2.14	Antioxidant activity: stability of the sunflower oil under oxidation conditions .....	85
2.15	Statistical analysis.....	86
<b>3</b>	<b>Results and discussion.....</b>	<b>86</b>
3.1	Thickness and mechanical properties .....	86
3.2	Moisture content, solubility in water, swelling capacity and water vapor permeability.....	88
3.3	Optical properties.....	90
3.4	Thermal analysis.....	92
3.6	Biodegradation of the films .....	95
3.7	Oxidative stability of sunflower oil packaged in active sodium alginate films.....	97
<b>4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>99</b>
	<b>References.....</b>	<b>100</b>

<b>CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>105</b>
<b>7 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>106</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>111</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides são uma classe de compostos bioativos usualmente utilizados como corantes naturais e apresentam alta atividade antioxidante. A bixina e a norbixina são os principais carotenoides presentes nas sementes da planta de urucum (*Bixa orellana* L.), as quais possuem um revestimento resinoso de coloração avermelhada, a partir do qual o pigmento comercial é extraído. Além de possuírem cor, a bixina e a norbixina possuem propriedades antioxidantes devido ao sistema de ligações duplas conjugadas presentes em sua estrutura, capazes de desativar eficientemente íons radicais e espécies reativas de oxigênio (EROS) (CHISTÉ *et al.*, 2011).

Técnicas de encapsulamento têm sido estudadas como alternativas para aumentar a estabilidade destes pigmentos e protegê-los da degradação (LOBATO *et al.*, 2015; TUPUNA *et al.*, 2018). O encapsulamento é um processo que envolve a cobertura de uma substância líquida, sólida ou gasosa na matriz polimérica circundante. A aplicação desse método permite obter um produto com menor volume, o que reduz os custos de transporte e armazenamento, facilitando também sua dosagem, e mais importante, o material encapsulado é protegido de fatores externos, o que resulta na estabilização de substâncias instáveis (JANISZEWSKA-TURAK, 2017).

Além disso, a rápida urbanização e crescimento econômico conduziram a um aumento drástico na produção e consumo de plástico em todo o mundo. Essas enormes quantidades de plástico, sem grandes alternativas para sua deposição no meio ambiente, falta de tecnologias de reciclagem adequadas e a não degradabilidade desse material, podem gerar consequências desastrosas, como poluição, contaminação da cadeia alimentar e quebra da biodiversidade (KONG *et al.*, 2017).

O setor de alimentos é o maior consumidor de embalagens plásticas do mundo, visto que estes materiais têm um papel importante no armazenamento, transporte e manutenção da qualidade dos produtos (EUROPEAN; PARLIAMENT, THE COUNCIL, 2018). Atualmente, os consumidores buscam reduzir os problemas ambientais e demandam materiais biodegradáveis. Os filmes biodegradáveis podem representar uma alternativa para substituir ou minimizar o uso de polímeros sintéticos derivados do petróleo.

A adição de compostos bioativos em filmes biodegradáveis pode melhorar suas propriedades físicas e mecânicas. Tais compostos também podem incorporar propriedades funcionais a estes materiais e permitir a interação embalagem-alimento pela inclusão, por

exemplo de atividade antioxidante (ASSIS *et al.*, 2021; PAGNO *et al.*, 2016; STOLL *et al.*, 2018; ZHANG, Y. *et al.*, 2015).

A incorporação de atividade antioxidante em embalagens pode evitar a oxidação e consequente degradação de alimentos, principalmente aqueles fotossensíveis ou ricos em conteúdo lipídico que são mais susceptíveis a esse tipo de deterioração. Os carotenoides são uma classe de compostos bioativos que são usualmente utilizados como corantes naturais e por apresentarem alta atividade antioxidante, podem ser utilizados para aplicações em embalagens ativas (STOLL *et al.*, 2018, 2019). Além disso, adição desses compostos em filmes pode fornecer maior barreira à luz visível e aos raios ultravioleta, menor permeabilidade ao vapor e consequentemente contribuir para uma maior estabilidade dos alimentos (ASSIS *et al.*, 2020a; FARIAS *et al.*, 2020; STOLL *et al.*, 2018, 2019; TUPUNA-YEROVI; SCHMIDT; RIOS, 2023).

O alginato de sódio é um dos polímeros mais amplamente utilizados para encapsulamento, pois forma uma matriz de gel altamente versátil, biocompatível e não tóxica que protege os componentes ativos de fatores adversos, com melhorias em sua estabilidade e biodisponibilidade, sendo que o método de gelificação iônica é o mais utilizado para produção de partículas a partir deste carboidrato (FUNAMI *et al.*, 2009; OZKAN *et al.*, 2019).

Além disso, características como ação de gelificação e espessamento, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, alta capacidade filmogênica e baixo custo, tornam o alginato de sódio um material com enorme potencial para aplicação em filmes biodegradáveis (VU; WON, 2013). O método comumente utilizado para preparação de filmes de alginato de sódio é o método por fundição ou *casting*, que consiste em formar uma dispersão aquosa com o polímero, com posterior evaporação do solvente. Esse método pode ser seguido de métodos de complexação com íons bivalentes que melhoram as propriedades mecânicas do filme (DEEPA *et al.*, 2016; HENG *et al.*, 2010).

Assim, o desenvolvimento de nanoesferas de alginato com bixina e norbixina pode representar uma alternativa para melhorar a estabilidade desses pigmentos e consequente desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de alginato com a incorporação nanoesferas com compostos ativos pode representar uma alternativa ao uso de embalagens não biodegradáveis para alimentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanoesferas de bixina e norbixina encapsuladas com alginato de sódio pelo método de emulsificação/gelificação interna e avaliar a liberação desses carotenoides em meio simulante de alimentos. Elaborar e caracterizar filmes biodegradáveis ativos à base de alginato de sódio incorporados nanoesferas de bixina, além de avaliar seu potencial antioxidante como embalagem ativa para alimentos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nanoesferas de alginato de sódio contendo os carotenoides bixina e norbixina através do método de emulsificação/gelificação interna.
- Analisar a eficiência de encapsulamento dos pigmentos nas nanoesferas.
- Caracterizar as nanoesferas de acordo com o tamanho, cor, análises termogravimétricas e capacidade antioxidante.
- Avaliar a liberação dos pigmentos carotenoides em simulante de alimentos gordurosos (etanol 95%).
- Elaborar filmes biodegradáveis à base alginato de sódio adicionados de três diferentes concentrações (1, 5 e 10% m/m de biopolímero) de nanoesferas de bixina ( $7,5 \times 10^{-3}$  g de bixina/ g de biopolímero).
- Avaliar as propriedades físico-químicas, mecânicas, de barreira, termogravimétricas, morfológicas dos filmes desenvolvidos.
- Avaliar a atividade antioxidante dos melhores filmes pelo armazenamento de óleo de girassol sob condições aceleradas de oxidação com luz e temperatura.

## **CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, sendo compostos que apresentam um esqueleto linear e simétrico básico formado por oito unidades de isoprenoides chamados de tetraterpenos (C<sub>40</sub>). Na natureza, existem principalmente na forma isomérica mais estável *all-trans*, mas podem ocorrer os isômeros *cis*. Estes pigmentos passam por reações de desidrogenação, ciclização, formação de derivados oxigenados ou combinações desses processos, que resultam em centenas de estruturas, sendo que mais 600 carotenoides já foram identificados na natureza e podem apresentar benefícios biológicos essenciais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Os carotenoides são sintetizados por plantas e microrganismos fotossintéticos, sendo o isopentenil-pirofosfato a unidade básica para a sua biossíntese. O esqueleto carbonado destes compostos é sintetizado por adição sucessiva das unidades de isopreno em C<sub>5</sub>, para alongamento da cadeia, produzindo na sequência os compostos C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub>, e o intermediário geranyl-geranyl-pirofosfato C<sub>20</sub>, o qual sofre dimerização originando a estrutura C<sub>40</sub> do fitoeno, o primeiro carotenoide (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

A introdução sequencial de ligações duplas dá origem aos variados tipos de carotenoides como o fitoflueno, neurosporeno e licopeno com 5, 9 e 11 ligações duplas respectivamente. Posteriormente, ocorrem as reações de ciclização com a formação dos compostos contendo o anel  $\beta$ -ionona, como o  $\beta$ -caroteno. Finalmente, ocorrem as reações de hidroxilação com a formação das xantofilas, os derivados oxigenados, como a luteína,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina (MORAIS; FERREIRA, 2010; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Carotenoides são responsáveis pela coloração vermelha, laranja e amarela de folhas, frutas e flores. Os longos sistemas de conjugação e os elétrons deslocalizados ao longo da cadeia dos carotenoides servem como cromóforos responsáveis pela sua absorção no espectro visível (400-500 nm), o que resulta em cores que variam de amarelo a laranja e vermelho. A ciclização também pode influenciar a cor do carotenoide, uma vez que a presença de diferentes anéis em suas estruturas pode modificar a cor de compostos com o mesmo número de ligações conjugadas, como por exemplo, o  $\beta$ -caroteno e o licopeno que possuem o mesmo número de conjugações e apresentam diferentes colorações. Sistemas com muitas duplas ligações conjugadas tendem a apresentar matizes mais avermelhadas, enquanto cadeias curtas de duplas

ligações cores mais próximas ao amarelo (RIVERA, 2012; RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008; SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017).

Os carotenoides são compostos importantes devido às suas várias funções. Em plantas atuam como pigmentos acessórios de coleta de luz no sistema fotossintético, ampliando a faixa efetiva de absorção de luz para a fotossíntese, além de atuarem como fotoprotetores contra danos oxidativos (YOUNG, 1991). Animais e humanos não podem sintetizar carotenoides, tendo que obter tais compostos através da dieta, além disso alguns têm função de pró-vitamina A no organismo humano (FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2012; OLSON, 1989).

As funções dos carotenoides também estão diretamente ligadas com a sua atividade antioxidante, porém o mecanismo exato de ação dos carotenoides como antioxidantes *in vivo* ainda não está completamente esclarecido. Estudos relatam a sua capacidade de interagir e desativar eficientemente íons radicais e espécies reativas do oxigênio (EROS), incluindo os radicais peróxil e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), e essa característica também está associada ao conjunto de ligações duplas conjugadas presentes em sua estrutura (STAHL; SIES, 2003).

As EROS são geradas naturalmente no organismo, porém o acúmulo destes radicais pode levar ao estresse oxidativo e, portanto, reagir com enzimas, ácidos nucleicos, células e ácidos graxos presentes nas membranas celulares. Dessa forma, devido ao seu potencial antioxidante, os carotenoides têm sido relacionados com a prevenção e redução do risco de certas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce, prevenção de câncer e fortalecimento do sistema imunológico (JANISZEWSKA-TURAK, 2017; LERFALL, 2015).

Para carotenoides são sugeridos três mecanismos de desativação de radicais: (a) transferência de elétrons; (b) abstração de hidrogênio alílico; e (c) adição do radical às ligações duplas conjugadas. Através da transferência de elétrons, acontece a desativação do oxigênio singlete pela transferência de energia entre o  $^1\text{O}_2$  e o carotenoide, com a formação do oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ). O carotenoide consegue retornar ao seu estado fundamental a partir da dissipação da energia através de interações rotacionais e vibratórias da sua cadeia poliênica. O mecanismo de abstração do hidrogênio afeta apenas os hidrogênios em posições alílicas a uma ligação dupla, que são propensos a reagir com radicais peróxil levando a formação e continuidade da propagação do radical. No mecanismo de adição do radical ( $\text{ROO}\cdot$ ), à cadeia poliênica ocorre a oxidação do carotenoide por adição radical e a geração de um radical estabilizado por ressonância, que reage facilmente com o oxigênio e leva à obtenção de um radical peróxila. Se a reação de adição ocorrer na posição de ligação dupla do anel, o produto resultante é uma espécie radical e o processo de auto oxidação é continuado (EL-AGAMEY *et al.*, 2004;

JOMOVÁ *et al.*, 2009; LERFALL, 2015; MONEGO; DA ROSA; DO NASCIMENTO, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2012; XAVIER; PÉREZ-GÁLVEZ, 2016).

De acordo com sua estrutura química, os carotenoides são divididos em dois grupos: os carotenos, que são constituídos apenas por carbono e hidrogênio; e as xantofilas que contêm oxigênio em sua estrutura. Além disso, alguns compostos são chamados de apocarotenoides, os quais possuem cadeia principal com menos de 40 carbonos, formados por sua clivagem oxidativa de algum caroteno inicial. A grande variedade destes compostos é consequência do grande número de precursores, das variações nos locais específicos de clivagem e das modificações após a clivagem. A conversão de carotenoides a apocarotenoides é realizada por oxigenases que visam diferentes ligações duplas da cadeia poliênica. Os precursores dos principais apocarotenoides são o licopeno, o caroteno e a zeaxantina (SCHWARTZ *et al.*, 2003; STANGE, 2016).

A bixina é um importante apocarotenoide de ocorrência natural, derivado da clivagem enzimática da parte central do licopeno (C40), sendo o principal pigmento encontrado nas sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). O corante comercial a base de urucum é amplamente utilizado em produtos alimentícios como queijos, sorvetes, manteigas e carnes, devido ao seu baixo custo e características sensoriais de alta qualidade (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008). Outro apocarotenoide encontrado na semente do urucum, em menores quantidades, é a norbixina, que pode também ser obtida a partir de um processo de saponificação da bixina (SCOTTER, 2009).

Como outros carotenoides, a bixina e norbixina são eficientes inibidores de oxigênio singlete e sequestradores de espécies reativas, entretanto são consideradas instáveis na presença de oxigênio, calor e luz (LOBATO *et al.*, 2013). Alguns estudos têm mostrado que as técnicas de encapsulamento diminuem a taxa de degradação dos carotenoides causada por fatores adversos (BARBOSA; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005; CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008; LOBATO *et al.*, 2015; LYNG; PASSOS; FONTANA, 2005).

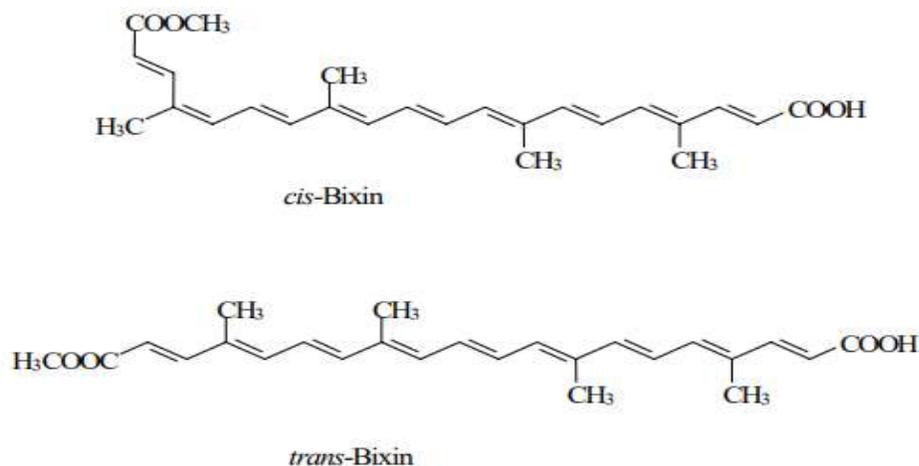
Por serem pigmentos naturais com excelente atividade antioxidante e baixo custo, a bixina e norbixina podem ser uma alternativa viável para aplicação em filmes biodegradáveis ativos. Sendo assim, o encapsulamento desses carotenoides pode aumentar sua estabilidade e modificar a sua liberação, principalmente quando utilizados como compostos ativos em filmes biodegradáveis com o intuito de aumentar a vida útil de alimentos embalados.

### 3.2 Bixina e norbixina

A produção de urucum (*Bixa orellana* L.) é realizada em diferentes regiões, sendo que em 2021 o Brasil produziu um total de 12.252 toneladas de sementes de urucum, em que o estado de São Paulo representou aproximadamente 38% da produção total, seguido da Bahia ( $\approx 15\%$ ) e Minas Gerais ( $\approx 14\%$ ) (IBGE, 2021). O urucum possui boas características sensoriais, alta pigmentação, baixo custo e alta qualidade, sendo, portanto, o principal corante natural utilizado em produtos alimentícios (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008).

O urucum é um corante natural utilizado em alimentos e apresenta pigmentos de coloração amarelo avermelhada atribuída à presença de *cis*-bixina (principalmente na configuração 9-*cis*) (Figura 1), com menores quantidades de *trans*-bixina e *cis*-norbixina (VAN SCHEPPINGEN; BOOGERS; DUCHATEAU, 2012).

**Figura 1.** Estrutura da bixina nas formas *cis*- e *trans*.



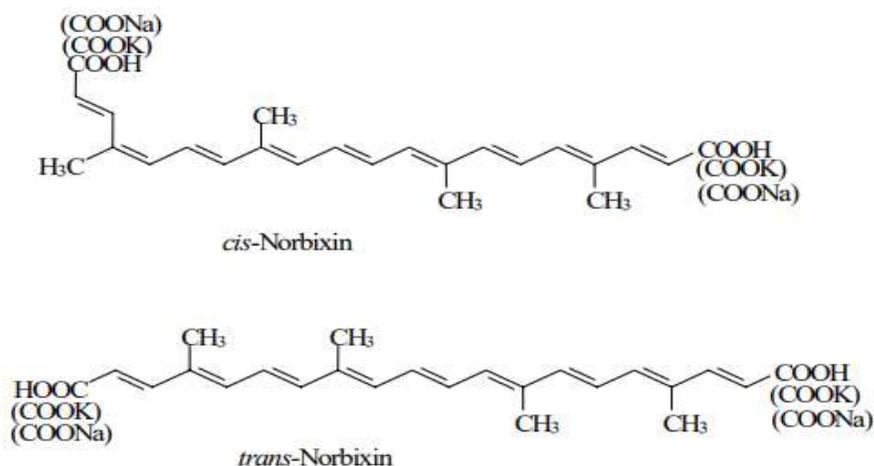
Fonte: Smith (2006)

A bixina ou *cis*-bixina (6-metil hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno6,6'-dioato) é o principal carotenoide das sementes de urucum, correspondendo a mais de 80% dos carotenoides encontrados. É um apocarotenoide (possui uma cadeia menor, com 25 átomos de carbono) formado por nove ligações duplas conjugadas e dois grupos carboxílicos. A *cis*-bixina é solúvel na maioria dos solventes orgânicos polares aos quais ela confere uma cor laranja, mas é largamente insolúvel em óleo vegetal. Pode ser prontamente convertida no isômero all-*trans* devido à sua instabilidade na forma isolada em solução. A *trans*-bixina é o isômero mais estável e possui propriedades similares ao isômero *cis*, mas exibe uma cor vermelha quando em solução e é solúvel em óleo vegetal. O sistema de duplas ligações conjugadas (cromóforo) presentes na

estrutura da bixina é responsável não só pela sua absorção de luz (cor) e atividade antioxidante, mas também pela sua fraca solubilidade em água, o que prejudica a sua utilização em alimentos com baixo teor de gordura e diminui sua estabilidade na presença de oxigênio, luz e calor (BARBOSA; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005).

A norbixina ou *cis*-norbixina (9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-ácido dioico) (Figura 2) é um derivado desesterificado da bixina, encontrado em pequenas quantidades nas sementes de urucum. A norbixina (*cis* e *trans*) também pode ser obtida através do processo de saponificação da bixina, que proporciona a hidrólise do grupamento éster metílico na presença de uma base forte originando um ácido dicarboxílico livre, que através de uma dissociação química pode ser obtido em solução aquosa-alcalina com o hidróxido de sódio (NaOH) ou o hidróxido de potássio (KOH), para formar o seu respectivo sal (SCOTTER, 2009; VAN SCHEPPINGEN; BOOGERS; DUCHATEAU, 2012).

**Figura 2.** Estrutura da norbixina nas formas *cis*- e *trans*.



Fonte: Smith (2006)

As diferenças estruturais conferem à bixina características lipossolúveis, devido à presença do éster metílico na molécula, enquanto a norbixina apresenta maior hidrossolubilidade em razão da presença do grupamento carboxila, sítio de interações com moléculas de água, a possibilidade de obter corantes solúveis em água, bem como corantes solúveis em óleo. Tais características fazem do urucum uma das fontes mais interessantes de corantes vegetais (RADDATZ-MOTA *et al.*, 2017).

Apesar de não apresentarem atividade pró-vitáminica A, esses pigmentos apresentam atividade antioxidante, sendo capazes de desativar espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, que são gerados constantemente no organismo, sendo que seu acúmulo pode

levar ao estresse oxidativo (LERFALL, 2015). A efetividade desses compostos em desativar essas espécies reativas já foram relatadas em diversos estudos (RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009; RIOS; MERCADANTE; BORSARELLI, 2007). Além disso, o uso de carotenoides como antioxidantes para produzir embalagens ativas tem sido avaliados e tem como objetivo principal estender o prazo de validade de produtos alimentícios suscetíveis à oxidação. Compostos como o tocoferol, astaxantina,  $\beta$ -caroteno e licopeno já foram introduzidos em diferentes polímeros para produzir materiais de embalagem antioxidantes (STOLL *et al.*, 2019).

Os carotenoides, como a bixina e norbixina são considerados instáveis e alterações na molécula podem levar à perda ou diminuição do poder corante, ou ainda podem levar à formação de compostos de baixo peso molecular que influenciam no aroma dos alimentos. Alguns estudos mostraram que as técnicas de complexação e encapsulamento diminuem a taxa de degradação, com melhorias na estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade das compostos bioativos (ANDRADE; FLO; RIOS, 2018; JANISZEWSKA-TURAK, 2017; LOBATO, K. B. de S. *et al.*, 2013; OZKAN *et al.*, 2019; PARIZE *et al.*, 2010; TUPUNA *et al.*, 2018).

### 3.3 Nanoencapsulamento

A nanotecnologia estuda materiais com tamanhos inferiores a 1000 nm e como eles podem ser produzidos, processados e aplicados na indústria em geral, bem como na indústria de alimentos (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006). Avanços nas técnicas de encapsulamento podem favorecer a indústria de alimentos, especialmente no processamento de alimentos e no desenvolvimento de novos produtos alimentícios buscando continuamente métodos mais baratos e eficientes para manter a qualidade nutricional, funcionalidade e vida útil dos produtos (MUHAMAD *et al.*, 2019).

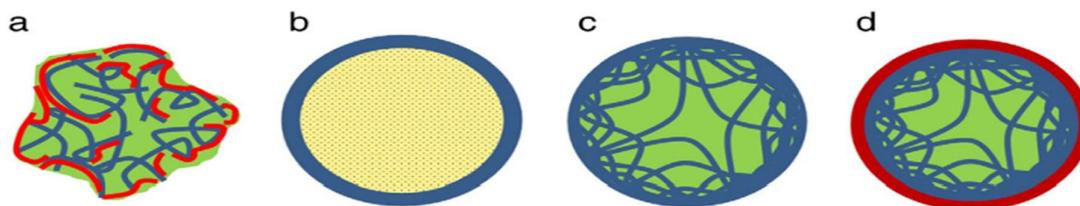
A técnica de nanoencapsulamento tem sido descrita principalmente como um processo no qual, pequenas substâncias ativas são envolvidas por um revestimento homogêneo ou heterogêneo, formando grânulos ou cápsulas com diversas aplicações (EZHILARASI *et al.*, 2013).

Na indústria de alimentos, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) definiu as partículas abaixo de 100 nm como nanopartículas. No entanto, em geral, partículas com tamanhos menores que 1000 nm podem ser consideradas nanopartículas (COMMITTEE, 2011).

Nanoagregados, nanocápsulas e nanoesferas (Figura 3) são sistemas nanométricos com diâmetros geralmente variando de 10 a 1000 nm de tamanho. Esses sistemas podem conter

compostos variados, como compostos bioativos, fármacos, proteínas e enzimas, células microbianas, e outros, ligados a matriz polimérica da partícula e o método utilizado para produzir a partícula determinará a estrutura da mesma (PAQUES *et al.*, 2014)

**Figura 3.** Representação esquemática de um nanoagregado (a), nanocápsula (b), nanoesfera com interior estruturado (c) e nanocápsula com interior estruturado (d).



Fonte: Paques et al. (2014).

Os nanoagregados são considerados sistemas coloidais nanométricos onde o composto encapsulado está fisicamente disperso enquanto que as nanocápsulas são sistemas vesiculares nos quais o composto está confinado a um núcleo líquido oleoso ou aquoso, circundado por uma membrana polimérica. As nanoesferas possuem um interior gelificado onde o composto fica fisicamente disperso e possuem estrutura esférica. Nanocápsulas com núcleo estruturado são frequentemente produzidos primeiramente pela preparação de uma nanoesfera e, posteriormente, de uma casca adicional que é formada na interface da nanoesfera (PAQUES *et al.*, 2014; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Dentre as diferentes técnicas, o encapsulamento é aplicável em diversas áreas como na agricultura, farmácia, biotecnologia e indústria têxtil. No que diz respeito à indústria de alimentos, os produtos encapsulados têm encontrado muitas aplicações para revestir corantes, sabores, vitaminas e outros ingredientes alimentares de baixa estabilidade. A aplicação de compostos bioativos em alimentos ou embalagens também pode ser favorecida, visto que a aplicação dos componentes puros, como os carotenoides, pode ser limitada devido a características específicas dessas substâncias como a baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade e fácil deterioração na presença das variações ambientais (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016; REZAUL *et al.*, 2018).

O processo de encapsulamento protege o material ativo do núcleo da degradação, reduzindo sua reatividade com o ambiente externo (por exemplo, calor, umidade, ar e luz), além disso, a taxa de vaporização ou transferência do material do núcleo para o ambiente externo é reduzida ou retardada, modificando assim a sua liberação (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016). No processo obtêm-se cápsulas que apresentam diâmetros

específicos, dependente do tipo de agente encapsulante e da técnica utilizada para sua obtenção, classificadas como microcápsulas ou nanocápsulas (TYAGI *et al.*, 2011).

Os componentes bioativos são diferentes em peso molecular, polaridade, solubilidade etc., o que implica que diferentes abordagens de encapsulamento precisam ser aplicadas para atender aos requisitos físico-químicos e moleculares específicos. A escolha da técnica e dos materiais de encapsulamento adequados para a preparação de um sistema de encapsulamento eficiente é essencial, além de ser importante considerar a funcionalidade, a concentração de encapsulamento, a liberação da substância ativa e os requisitos de estabilidade do sistema (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

A maioria dos materiais utilizados para encapsulamento no setor de alimentos são polímeros de carboidratos, proteínas, lipídios e outros materiais orgânicos e inorgânicos, como maltodextrinas (TUPUNA *et al.*, 2018), quitosana (PARIZE *et al.*, 2010), goma arábica (BARBOSA; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005), entre outros. Várias técnicas de encapsulamento podem ser utilizadas para encapsular compostos bioativos, como emulsificação, técnica de *spray-drying*, liofilização, técnicas baseadas em fluidos supercríticos, evaporação de solvente, coacervação, lipossomas, gelificação iônica, entre outras (OZKAN *et al.*, 2019; REZAUL *et al.*, 2018).

Existem muitas técnicas disponíveis de encapsulamento, mas nenhuma delas pode ser considerada um procedimento universalmente aplicável para componentes, uma vez que cada composto tem sua própria estrutura molecular característica. As técnicas de encapsulamento já foram empregadas com sucesso para diversos carotenoides como licopeno (ROCHA; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2012; SANTOS *et al.*, 2012),  $\beta$ -caroteno (MORAES *et al.*, 2018; PRIAMO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012), astaxantina (MACHADO *et al.*, 2014; MEZZOMO *et al.*, 2012), luteína (XIA *et al.*, 2012), bixina (BARBOSA; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005; LOBATO *et al.*, 2015; LOBATO *et al.*, 2013) e norbixina (TUPUNA *et al.*, 2018).

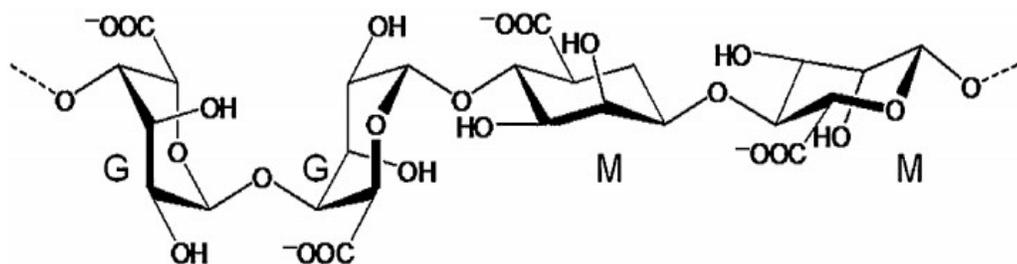
Dentre os diversos materiais utilizados na produção de nanopartículas, o alginato é capaz de formar uma matriz de gel altamente versátil, biocompatível e não tóxica que protege os componentes ativos de fatores como calor e umidade, melhorando a estabilidade e a biodisponibilidade (FUNAMI *et al.*, 2009; LEONG *et al.*, 2016). Além disso, a literatura mostra que o alginato tem muitas vantagens, tanto para consumo humano quanto para aplicação industrial, visto que alguns alginatos de baixo peso molecular já mostraram efeitos pré-bióticos para o organismo humano (GOH; HENG; CHAN, 2012; IMESON, 2009; LUPO *et al.*, 2014).

### 3.4 Nanopartículas de alginato

Os biomateriais, dentre eles, os polímeros formadores de gel obtidos a partir de fontes naturais representam uma classe importante para aplicações em encapsulamento devido à sua renovabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade. Nessa classe de polímeros, o alginato tem se destacado, provavelmente pela sua capacidade de formar hidrogéis principalmente por gelificação ionotrópica (capacidade dos polieletrólitos de reagir com moléculas de carga oposta como cátions, e sofrem transição sol-gel, resultando na formação de materiais físicos estruturados) com divalências (por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ) à temperatura ambiente, permitindo que o encapsulamento seja realizado sob condições amenas e seguras (GADZIŃSKI *et al.*, 2023; LEONG *et al.*, 2016).

O alginato está abundantemente disponível na natureza. Pode ser encontrado como um componente estrutural (parede celular e regiões intercelulares) de algas marinhas marrons, e algumas espécies bacterianas. O alginato é um copolímero que consiste em alternar o ácido b-mannurônico (M) e o ácido l-gulurônico (G) ligados por ligações glicosídicas do tipo 1–4. Essas unidades de ácidos urônicos são distribuídas ao longo da cadeia do alginato em um padrão de blocos: sequências homopoliméricas contendo apenas unidades de ácido manurônico (blocos M) e blocos gulurônico (blocos G) heteropoliméricos contendo unidades manurônicas e gulurônicas (blocos MG) (Figura 4) (SHILPA; AGRAWAL; RAY, 2003).

**Figura 4.** Estrutura molecular do alginato.



Fonte: Lertsutthiwong e Rojsitthisak (2011)

As propriedades físicas do alginato de sódio são dependentes da razão dos blocos M/G, sua sequência e do peso molecular. O mecanismo de gelificação é acionado pelas interações entre os blocos G que se associam para formar junções firmemente retidas devido a cátions divalentes como os íons de cálcio. Além dos blocos G, os blocos MG também participam, formando junções mais fracas. As ligações cruzadas do hidrogel de alginato envolvem

interações eletrostáticas, interações de hidrogênio e forças de *Van der Waals* (BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012; PAWAR; EDGAR, 2012).

Além de suas vantagens no método de produção, os hidrogéis de alginato possuem excelentes propriedades físicas, sendo capazes de formar géis muito rapidamente, mesmo em altas concentrações de sólidos. Além de serem termicamente estáveis, suas propriedades mecânicas, de transporte de massa e de desintegração são ajustáveis, produzem poros de tamanho pequeno (5–200 nm), e são hidrofílicos, tornando-os adequados para encapsular moléculas grandes ou materiais hidrofóbicos com eficiência superior a 90% (CHAN; LEE; HENG, 2002; MARTINSEN; SKJAK BRAEK; SMIDSRØD, 1987).

Os alginatos possuem uma larga gama de aplicação como matriz de encapsulamento, podendo ser utilizados para imobilizar enzimas, propiciar a liberação controlada de fármacos, e carrear compostos bioativos, células vivas, proteínas, ingredientes alimentares, compostos voláteis e catalisadores (LEONG *et al.*, 2016; OZKAN *et al.*, 2019).

Os principais métodos conhecidos para formação de nanopartículas de alginato são: a complexação, ou seja, a formação de complexos em solução aquosa formando nanoagregados de alginato ou na interface de uma gota de óleo formando nanocápsulas de alginato; e por emulsificação de alginato em óleo, acoplada à gelificação externa ou interna, formando nanoesferas de alginato (PAQUES *et al.*, 2014).

A gelificação iônica é uma das técnicas de encapsulamento baseada na capacidade de reticulação de polieletrólitos na presença de íons multivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ , pode ser aplicada por extrusão ou emulsificação seguido de gelificação, e é a técnica mais utilizada para formação de partículas de alginato (CHAN, 2011; CHAN; LEE; HENG, 2002; LEONG *et al.*, 2016).

A extrusão é o método usado para fabricar partículas de gel esféricas por meio de gotejamento de uma solução aquosa de polímero através de uma agulha de seringa ou um bico em um banho de gel contendo  $\text{CaCl}_2$ , que induz a gelificação. A principal limitação desta técnica é que o tamanho das esferas formadas depende do diâmetro da extrusora do bico, o que pode levar a formação de esferas muito grandes, e além disso, esse método pode ser difícil de ser reproduzido em grande escala, visto que as esferas são formadas uma a uma (CHAN *et al.*, 2009; LUPO *et al.*, 2014).

A técnica de emulsificação é o processo de dispersão, onde o alginato e o composto ativo são colocados juntos na fase dispersa, e quando ocorre a gelificação ionicamente induzida, o alginato forma a matriz polimérica prendendo o componente ativo no seu interior. A adição de um emulsificante favorece a formação e a estabilidade da emulsão, e sua natureza e concentração influenciam a distribuição do tamanho das partículas (DE VOS *et al.*, 2010).

A emulsificação/gelificação pode acontecer de duas formas, a gelificação externa ou interna, ambas utilizando sais de cálcio. Na gelificação externa forma-se uma emulsão entre uma solução aquosa do componente ativo de alginato e uma fase contínua não aquosa, adicionando posteriormente ao meio uma solução de  $\text{CaCl}_2$  para induzir a gelificação e promover a separação das microesferas formadas (GOUIN, 2004). Na emulsificação/gelificação interna, um sal de cálcio insolúvel ou parcialmente solúvel já está presente dentro das gotículas da água da emulsão; um ácido é então adicionado ao meio que deve se difundir ao longo da fase contínua das partículas (CHAN; LEE; HENG, 2002; SILVA *et al.*, 2006). O sucesso desses métodos de encapsulamento deve-se, em grande parte, por ser um processo seguro, simples, e de baixo custo (FUNDUEANU *et al.*, 1998; LEONG *et al.*, 2016).

Um dos principais aspectos do encapsulamento é melhorar a biodisponibilidade de antioxidantes alimentares (OZKAN *et al.*, 2019). O alginato de sódio tem sido aplicado no encapsulamento de vários compostos bioativos, como carotenoides (HUANG *et al.*, 2019; OTÁLORA *et al.*, 2016), compostos fenólicos (LUPO *et al.*, 2014; MOKHTARI; JAFARI; ASSADPOUR, 2017), e óleos essenciais (BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012; HOSSEINI *et al.*, 2013).

### 3.5 Filmes biodegradáveis

A embalagem de alimentos desempenha um papel importante no armazenamento, transporte e manutenção da qualidade durante a vida de útil dos produtos (ASSIS *et al.*, 2017; DILKES-HOFFMAN *et al.*, 2018). Os polímeros sintéticos são os principais materiais utilizados para embalagens na indústria de alimentos, pelo fato de serem produzidos de forma fácil, baixo custo, com matérias-primas uniformes, flexíveis e duráveis (MARINIELLO *et al.*, 2003). Entretanto, os problemas associados a não degradabilidade desses materiais levaram a necessidade de desenvolvimento de novas embalagens que promovam um aumento da qualidade e durabilidade dos produtos e tenham apelo ambiental é interesse tanto para a indústria como para o consumidor final (MAGNIER; SCHOORMANS, 2015).

Sendo assim, há um interesse crescente no desenvolvimento de embalagens ambientalmente amigáveis, e o desenvolvimento de filmes biodegradáveis pode representar uma alternativa atraente para reduzir ou substituir o emprego de plásticos sintéticos e não biodegradáveis, para permitir uma redução do impacto associados a estes polímeros. Deste modo, destaca-se que a biodegradabilidade não é apenas um requisito funcional, mas também

um importante atributo ambiental (CAMPO *et al.*, 2017; IAHNKE *et al.*, 2015; MARINIELLO *et al.*, 2003; SIRACUSA *et al.*, 2008).

Diversos materiais de embalagem de base biológica podem ser utilizados para aplicações e composição dos filmes biodegradáveis. Alguns materiais apresentam propriedades específicas que variam com o tipo de base utilizada podendo ser divididos em três categorias segundo sua composição: polissacarídeos (amidos, alginatos, pectinas, carragenas, ágar), proteicos (glúten, gelatina) e compostos lipídicos (ceras, ácidos graxos) (CHA; CHINNAN, 2010).

Entre os diversos materiais investigados para a produção de filmes biodegradáveis, o alginato é um polissacarídeo potencial, devido às suas propriedades coloidais únicas e bem estudadas, que incluem espessamento, estabilização, suspensão, formação de filme, produção de gel e estabilização de emulsão. Em comparação com os filmes de proteína e lipídicos, os filmes de polissacarídeos têm as vantagens de baixo custo de material, recursos abundantes, desempenho relativamente estável e boa capacidade de vedação ao calor e solubilidade em água (CARISSIMI; FLÔRES; RECH, 2018; SANTANA; KIECKBUSCH, 2013; ZACTITI; KIECKBUSCH, 2006).

Os filmes biodegradáveis em escala laboratorial geralmente são produzidos pela técnica tipo *casting*, na qual é produzida uma solução filmogênica através da solubilização do biopolímero em solvente adequado, ao qual podem ser incorporados diversos aditivos (plastificantes, agentes reticulantes, etc.). Em seguida, a solução formadora do filme é porcionada sobre suportes e submetida à secagem até uma condição que permita um fácil desprendimento do molde. Em escala industrial, algumas técnicas já utilizadas para a fabricação de filmes plásticos vêm sendo utilizadas para a produção de filmes biodegradáveis, tais como: técnicas de extrusão, coextrusão para filmes multicamadas e processo de secagem para a remoção do solvente da solução polimérica (DEBEAUFORT; VOILLEY, 2010; TURBIANI, 2007).

Normalmente, as embalagens de alimentos são barreiras inertes, sem qualquer interação com o alimento, apresentando apenas proteção do produto; sendo assim, há um crescente interesse no desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos, ou seja, um sistema em que ocorra interação entre embalagem e alimento. Com tal finalidade, tem-se adicionado aos polímeros agentes antioxidantes e/ou antimicrobianos que podem migrar da embalagem para o alimento (ou o espaço ocular circundante) para prolongar a vida de prateleira do produto embalado e para melhorar suas propriedades de segurança e qualidade (CARISSIMI; FLÔRES; RECH, 2018).

Ao considerar que a oxidação é uma das principais causas de deterioração de alimentos, vários antioxidantes naturais como carotenoides ( $\beta$ -caroteno, licopeno, bixina, astaxantina) têm sido incorporados em filmes biodegradáveis de diferentes matrizes como amido, alginato, gelatina, entre outros (ASSIS *et al.*, 2017, 2018; PAGNO *et al.*, 2016; STOLL *et al.*, 2019). Estudos demonstram que filmes biodegradáveis com adição de bioativos, como antioxidantes naturais, são capazes de apresentar maior atividade antioxidante e barreira a luz, o que auxilia no aumento da vida útil, aumento da estabilidade, manutenção da qualidade e reduz a necessidade de utilização de aditivos (ASSIS *et al.*, 2018).

### 3.6 Filmes biodegradáveis de alginato de sódio ativos

Alginatos são substâncias naturais e sua principal fonte é a parede celular das algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*), sendo que sua composição química e arranjo molecular vai depender da fonte biológica e dos fatores ambientes de crescimento desses organismos (DEEPA *et al.*, 2016; NORAJIT; MYONG; HYUNG, 2010). Com base em sua estrutura linear, o alginato pode formar filmes fortes e estruturas fibrosas adequadas no estado sólido, sendo considerado um bom material filmogênico, capaz de formar filmes com ótimas propriedades mecânicas e de barreira efetiva a gases como oxigênio (CAZÓN *et al.*, 2017).

O método comumente utilizado para preparação de filmes de alginato de sódio é o método por fundição ou *casting*. O método consiste em primeiramente formar uma dispersão de alginato de sódio em água, através de agitação para promover a hidratação das cadeias poliméricas do alginato. Em seguida, as dispersões são deixadas em repouso para acontecer a desaeração, para retirada das bolhas formadas durante a agitação, que podem interferir nas propriedades dos filmes. A próxima etapa é a moldagem e secagem dos filmes, em que as dispersões são despejadas em moldes e levadas para secagem da água ou solvente utilizado na dispersão (JANJARASSKUL; KROCHTA, 2010; TAVASSOLI-KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; MASOUDPOUR-BEHABADI, 2016).

A adição de íons divalentes nos filmes pode ser feitas de diferentes formas, com a adição dos íons na dispersão do alginato (BENAVIDES *et al.*, 2016), após a secagem, via imersão em soluções contendo os íons (LILING *et al.*, 2016), via aspersão de solução de íons na superfície dos filmes (ZACTITI; KIECKBUSCH, 2006) ou de forma combinada (SANTANA; KIECKBUSCH, 2013).

A adição de elementos ativos a filmes produzidos com alginato tem sido estudada para melhorar a qualidade dos filmes e introduzir a interação alimento-embalagem. Zhang *et al.*

(2015) adicionaram óleo de casca de canela e óleo de soja em filmes de alginato de sódio para avaliar a atividade antibacteriana e as propriedades físicas dos filmes. De acordo com os resultados, os filmes preparados com 2% de óleo de casca de canela mostraram eficácia contra patógenos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos, e a incorporação de óleo de soja reduziu a evaporação do óleo de canela durante o armazenamento de filmes, mantendo assim a atividade antimicrobiana. Benavides et al. (2012) também demonstraram que a adição de óleo essencial de orégano em filme de alginato de sódio melhorou as propriedades físicas e mecânica dos filmes e demonstrou alta atividade antibacteriana.

A incorporação de carotenoides de urucum também tem demonstrado ser útil na formulação de filmes. Farias *et al.* (2020) estudou diferentes concentrações de norbixina livre em filmes de alginato de sódio complexados com cloreto de cálcio, e observou que o carotenoide possui boa compatibilidade com a matriz filmogênica formando uma estrutura homogênea e lisa. O autor também relatou que a adição dos sais de norbixina alterou algumas características de interesse tecnológico, como aumento da coloração (atrativa), diminuição da transparência e consequente aumento da barreira de transmissão da luz UV-visível, além da diminuição da permeabilidade ao vapor de água quando comparada com o controle, o que agrega valor as embalagens biodegradáveis de alginato de sódio. Além disso, os filmes apresentaram atividade antioxidante, diminuindo a formação de compostos de degradação oxidativa de lipídios no óleo de girassol, e mostrou que a norbixina pode migrar para o alimento aumentando a capacidade antioxidante do filme.

Outras matrizes também já foram estudadas com a incorporação de carotenoides do urucum, no formato de nanocápsulas de bixina, que foram incorporadas em filmes biodegradáveis de amido e glicerol, e demonstraram capacidade de retardar o processo de oxidação do óleo de girassol em 13 dias e diminuir a concentração de peróxidos no óleo, evidenciando a atividade antioxidante da bixina presente no filme (PAGNO et al., 2016).

Stoll et al. (2018) avaliaram a aplicação de extrato de bixina livre em filmes de ácido poli lático, e em análise espectrofotométrica os filmes apresentaram barreira à luz de 70%, sendo capazes de proteger alimentos fotossensíveis. Entretanto a coloração amarela do pigmento diminuiu com o tempo de exposição à luz e temperatura (21 dias a 40 °C sob luz), mostrando uma degradação do pigmento de 28 a 30%.

Sendo assim, com o potencial antioxidante já demonstrado dos pigmentos carotenoides do urucum, e sua capacidade de interagir bem com os alimentos e com os filmes de alginato, e considerando o aumento da estabilidade do pigmento através do encapsulamento, pode ser

possível produzir um filme biodegradável ativo de alginato de sódio incorporado com nanoesferas de bixina.

## **CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

As sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) e o óleo de girassol foram adquiridos no comércio local de Porto Alegre, RS, Brasil. Alginato de sódio (DINÂMICA), cloreto de cálcio dihidratado (NEON), Tween 80 (NEON), carbonato de cálcio (SYNTH), e óleo de soja foram utilizados para a preparação das nanoesferas. Para elaboração dos filmes foram utilizados também alginato de sódio como biopolímero, cloreto de cálcio dihidratado como agente reticulante e glicerol (DINÂMICA) como agente plastificante.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com as seguintes purezas:

- Acetato de etila (ÊXODO): 99,9%
- Acetona (ÊXODO): 99,5%
- Ácido acético glacial (SYNTH): 99,7%
- Álcool etílico (ÊXODO): 95%
- Álcool Metílico (ÊXODO): 99,8%
- Clorofórmio (ÊXODO): 100%
- Éter de petróleo PA (DINÂMICA)
- Éter etílico (ÊXODO): 98%
- Hexano (ÊXODO): 95%
- Hidróxido de potássio (DINÂMICA): 85%

### 4.2 Extração da bixina e conversão em norbixina

A extração de bixina e a conversão em norbixina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rios e Mercadante (2004). As sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) (25 g) foram previamente submetidas a duas extrações com hexano e metanol para eliminação de lipídios e compostos polares, contendo 50 mL de cada solvente, respectivamente. O extrato obtido em cada etapa foi filtrado e descartado, e nas sementes remanescentes foi adicionado acetato de etila (50 mL) para extração da bixina. Todas as etapas foram realizadas sob agitação magnética por 15 minutos. O extrato final contendo os cristais de bixina foi filtrado, concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador ( $T < 30$  °C) (Fisatom modelo 801/802, São Paulo, SP, Brasil), transferido para um frasco âmbar para secagem em fluxo de nitrogênio e armazenado em freezer (-18 °C).

Para a conversão em sais de norbixina, os cristais de bixina foram adicionados de 100 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio (10% m/v) e armazenados na ausência de luz, em repouso, temperatura ambiente por 12 horas para completa saponificação. Posteriormente, em funil de separação, o extrato saponificado contendo os sais de norbixina foi adicionado de água destilada (50 mL), éter etílico (50 mL), acetato de etila (50 mL) e ácido acético glacial até a fase inferior alcançar pH 3,5 e haver transferência da norbixina (coloração vermelho intenso) para a fase superior. Finalmente, foram realizadas lavagens sucessivas com água destilada até a fase inferior atingir pH 6,0. A fase superior contendo os sais de norbixina foi separada, concentrada em rotaevaporador (Fisatom M802, Brasil) ( $T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), transferida para um frasco âmbar para secagem em fluxo de nitrogênio e armazenada em freezer ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.3 Quantificação por análise espectrofotométrica UV/visível

Uma alíquota do extrato previamente preparado de bixina e norbixina foi evaporada em fluxo de nitrogênio, o solvente de referência de cada pigmento (solução aquosa de KOH 0,5% para norbixina e clorofórmio PA para bixina) foi adicionado à amostra seca e, em seguida, analisado usando um espectrofotômetro CPS-240A (Shimadzu, Japan). A concentração foi determinada através da Equação 1 e dos seguintes parâmetros: para norbixina ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ : 3473,  $\lambda$ : 453 nm) e bixina ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ : 2826,  $\lambda$ : 470 nm).

$$X = \frac{Abs \times \gamma \times 10^6}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100} \quad (1)$$

Onde:

Abs: medida da absorbância

$\gamma$ : diluição (mL KOH 0,5% ou clorofórmio P.A)

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ : coeficiente de absorvidade

#### 4.4 Elaboração das nanoesferas de alginato de sódio contendo bixina ou norbixina

O método de emulsificação/gelificação interna descrito por Martín et al. (2015) foi utilizado com modificações para elaborar as nanoesferas carregadas de bixina ou norbixina. A fase interna da emulsão água em óleo (A/O) foi preparada com solução aquosa de alginato de sódio (1,5% m/v – 40 mL), 0,12 g de  $\text{CaCO}_3$ , pigmentos bixina ou norbixina em agitação mecânica por 15 min a 700 rpm (Fisatom 713D, Brasil). Os pigmentos (bixina e norbixina) foram quantificados previamente como descrito anteriormente (item 4.3) e adicionados nas seguintes concentrações:  $1,25 \times 10^{-3}$ ,  $2,5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$  e  $7,5 \times 10^{-3}$  g/g de alginato de sódio

para análise prévia de eficiência de encapsulamento. As nanoesferas controle foram elaboradas sem adição de pigmento. Como fase externa foram utilizados óleo de soja (100 mL), Tween 80 (0,3% m/v) e ácido acético glacial (400  $\mu$ L), fase esta que foi gotejada no sistema de fase interna durante agitação constante a 750 rpm e permaneceu sob agitação durante 10 min até completa emulsificação. Finalmente, a solução de CaCl<sub>2</sub> 5% (p/v) foi misturada na emulsão A/O para separar as nanoesferas pré-gelificadas da dispersão em óleo. As nanoesferas de alginato de sódio foram centrifugadas em 10000  $\times$  g por 10 min (Hitachi, modelo CR 21GIII, Japão), coletadas, lavadas com água destilada por filtração a vácuo e armazenadas a -18 °C.

#### 4.5 Caracterização das nanoesferas

##### 4.5.1 Eficiência do encapsulamento

O método descrito por Stoll et al. (2016), com algumas modificações, foi usado para avaliar a eficiência de encapsulamento (EE). A extração exaustiva dos pigmentos foi feita através da adição de acetato de etila (10 mL) em aproximadamente 5 a 6 g de nanoesferas contendo bixina ou norbixina. Cada amostra foi misturada por 2 min à temperatura ambiente em um vórtex, centrifugada (10000  $\times$  g, 10 min, 4 °C) (Hitachi, modelo CR 21GIII, Japão) e o sobrenadante foi coletado. Em uma segunda etapa, as nanoesferas foram misturadas novamente com acetato de etila por 2 min em Ultra-Turrax IKA T25 (Taiwan, China) à temperatura ambiente, e então centrifugadas (10000  $\times$  g, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi coletado, armazenado em um frasco âmbar e a concentração dos carotenoides retidos foi analisada através de um espectrofotômetro CPS-240A (Shimadzu, Japão). Uma alíquota do extrato foi retirada, seca em corrente de nitrogênio, adicionada do solvente de referência e a concentração foi determinada como descrito no Tópico 4.3. A eficiência de encapsulamento (%) foi determinada pela quantidade de bixina e norbixina liberadas como uma porcentagem da quantidade inicial usada nas formulações (REIS *et al.*, 2007; STOLL *et al.*, 2016a)

##### 4.5.2 Distribuição do tamanho de partícula

A distribuição do tamanho de partícula foi determinada através da técnica de difração a laser com o uso do equipamento Mastersizer 2000 Malvern Instruments Ltd. O diâmetro médio ponderado por volume foi expresso como diâmetro D [4,3], que é o diâmetro médio ponderado volumétrico, assumindo-se partículas esféricas com o mesmo volume das partículas reais (TUPUNA et al., 2018). O cálculo da distribuição de tamanho de partícula foi obtido de acordo com a Equação 2.

$$Span = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad (2)$$

Onde  $d(0,9)$ ,  $d(0,1)$ , and  $d(0,5)$  são os diâmetros a 90%, 10% e 50% da curva de distribuição cumulativa de tamanho, respectivamente.

#### 4.5.3 Análises colorimétricas

A cor das nanoesferas foi avaliada no dia do preparo (dia zero). A cor foi determinada através de um colorímetro Chromameter CR-400 (Konica Minolta, Japão) segundo os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  de acordo com sistema CIELab. O parâmetro  $L^*$  indica o nível de luminosidade (0 = preto; 100 = branco),  $a^*$  estabelece a variação entre verde ( $-a^*$ ) e vermelho ( $+a^*$ ), e  $b^*$  a variação entre azul ( $-b^*$ ) e amarelo ( $+b^*$ ). O valor do ângulo Hue ( $h_{ab}^\circ$ ) e fator Chroma ( $C^*$ ), os quais indicam a tonalidade da amostra (0 ou  $360^\circ$  = vermelho,  $90^\circ$  = amarelo,  $180^\circ$  = verde, e  $270^\circ$  = azul) e a intensidade da saturação da cor, respectivamente, foram calculados usando as Equações 3 e 4 (KIM; PARK; HWANG, 2002).

$$h_{ab}^\circ = \tan^{-1} b^*/a^* \quad (3)$$

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

E a diferença de cor ( $\Delta E$ ) foi obtida a partir da Equação (5):

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (5)$$

Onde:

$L_0^*$ ,  $a_0^*$  e  $b_0^*$ : parâmetros de cor das nanoesferas controle;

$L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ : parâmetros de cor das nanoesferas encapsuladas.

#### 4.5.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada em um analisador termogravimétrico (Perkin Elmer - Pyris 1 TGA®), a fim de se determinar a estabilidade térmica e as faixas de temperatura de início e fim dos processos de degradação da cadeia polimérica. Para a condução da análise as nanoesferas foram previamente liofilizadas e entre 5 a 10 mg de amostra foram utilizadas. Os ensaios foram realizados sob as seguintes condições: faixa de temperatura de 30 a  $650^\circ\text{C}$ , taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e atmosfera de nitrogênio de  $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os resultados foram expressos como a perda de massa (%) em função da temperatura.

#### 4.5.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise de Calorimetria diferencial de varredura (DSC) permite avaliar a quantidade de calor liberado ou absorvido por uma amostra quando esta passa por eventos térmicos. Por eventos térmicos entende-se temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_f$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), as quais representam transformações físicas, químicas ou físico-químicas. Para esta análise, uma quantidade entre 5 e 10 mg de nanoesferas liofilizadas foram utilizadas e escaneadas em uma panela de alumínio hermeticamente fechada, e uma panela de alumínio vazia foi usada como referência. A calorimetria de varredura diferencial (DSC) foi determinada pelo Calorímetro de Varredura Diferencial (modelo DSC 8500, Perkin Elmer Corporation, Wellesley, EUA), sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL.min<sup>-1</sup>. Os termogramas foram obtidos com aquecimento de 30 °C a 300 °C (10°C.min<sup>-1</sup>).

#### 4.5.6 Liberação de carotenoides em líquido simulante de alimentos

De acordo com o Regulamento (UE) nº 10/2011, para análise de migração em meios simulantes de alimentos, a água destilada é estabelecida como um simulador de alimentos aquosos não-ácidos (pH > 4,5), a solução em água destilada de ácido acético 3% (m/v) é um simulante de alimentos aquosos ácidos (pH < 4,5) e etanol 95% (v/v) pode demonstrar a migração em matrizes de alimentos ricos em lipídios. Análises anteriores em água destilada e em solução de ácido acético (3%, m/v) não obtiveram resultados detectáveis e, portanto, o etanol foi o simulante selecionado continuar a análise. Aproximadamente 1 g de nanoesferas de bixina ou norbixina foram colocadas em frascos âmbar com 15 mL do meio simulante, adicionados de nitrogênio para criar uma atmosfera inerte e fechados. As amostras foram armazenadas em uma câmara sob temperatura controlada (25 °C e 40 °C) e sem luz durante 10 dias, em que em tempos pré-determinados uma alíquota (2 mL) foi retirada para quantificar a concentração dos pigmentos liberados.

A concentração dos pigmentos foi determinada através de espectrofotômetro CPS-240A (Shimadzu, Japão) e utilização de curvas padrão (absorbância × concentração) para cada carotenoide em etanol 95% (v/v): bixina de 0,25 a 6 µg.mL<sup>-1</sup> ( $R^2$ : 0,995,  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 453 nm) e norbixina de 0,25 a 6 µg.mL<sup>-1</sup> ( $R^2$ : 0,998;  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 458 nm). O resultado foi expresso como a porcentagem do antioxidante natural liberado ao longo do tempo. Os dados obtidos foram ajustados a várias equações cinéticas (ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas) (MALEKJANI; JAFARI, 2021) para descrever o mecanismo de liberação dos carotenoides das nanoesferas. O maior R-quadrado ajustado (Adj.  $R^2$ ) foi considerado como critério para selecionar o melhor modelo.

#### 4.5.7 Capacidade antioxidante

A capacidade de desativar o radical 2,2' -azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico – ABTS<sup>+</sup>) foi determinada de acordo com o método descrito por Re et al., 1999. O radical foi preparado através da reação de 5 mL ABTS (7 mmol.L<sup>-1</sup>) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mmol.L<sup>-1</sup>), em que ambas soluções foram previamente preparadas. A mistura foi armazenada a temperatura ambiente em ausência de luz por 16 horas antes de ser usada. A solução de ABTS<sup>+</sup> foi diluída em etanol até atingir uma absorbância de  $0,700 \pm 0,020$  a 734 nm, avaliada mediante o uso de um espectrofotômetro CPS-240A (Shimadzu, Japão). Os extratos das amostras foram preparados de duas formas: primeiro, foram pesados aproximadamente 2 g de nanoesferas controle (NC), nanoesferas de bixina (NB) e nanoesferas de norbixina (NN) que foram dispersas em 15 mL de água. Em seguida, foram pesados também 2 g de NB e NN para a extração do pigmento através de lavagem com álcool etílico, de 10 em 10 mL, com 2 minutos no vórtex, e depois centrifugado, até 50 mL. Finalmente, 100 µL desses extratos obtidos foram adicionados de 1 mL do ABTS<sup>+</sup> diluído e o valor de absorbância foi registrado após 6 min. A curva padrão foi desenvolvida com diferentes concentrações de Trolox (11 a 176 mmol.L<sup>-1</sup>) e os resultados expressos como µmol TE.g<sup>-1</sup> amostra.

#### 4.6 Elaboração dos filmes de alginato de sódio incorporados com nanoesferas de bixina

Primeiramente, o alginato de sódio (1%, m/v) foi solubilizado em água destilada, com adição de 60% de glicerina em relação a massa do alginato (m/m de biopolímero), como plastificante para aumentar o alongamento do filme, e mantido sob agitação mecânica de 800 rpm durante 20 minutos ou até total solubilização. Uma solução aquosa de cloreto de cálcio (1%, m/v) foi preparada antecipadamente e mantida sob refrigeração a 5 °C. Em seguida, a solução de alginato de sódio e glicerina foi colocada sob aquecimento e agitação (800 rpm) até atingir a temperatura de 70°C. Ao atingir essa temperatura e sob contínua agitação, foi feita a primeira complexação, onde a solução de cloreto de cálcio (1%, m/v) foi misturada numa proporção de 0,04 g.mL<sup>-1</sup> de dispersão de alginato de sódio e glicerol, com vazão controlada em torno de 1 mL.min<sup>-1</sup>, para o processo de formação de géis estruturados na solução filmogênica. O hidrogel formado continuou sendo agitado por pelo menos 20 minutos, até completa homogeneização da solução. Em seguida, a solução foi colocada em banho de gelo até atingir temperatura abaixo de 35°C para preservação dos carotenoides. Sendo assim, as nanoesferas de bixina foram adicionadas nas concentrações de 1, 5 e 10% (m de nanoesferas/m de alginato) e a solução foi mantida em repouso, no vácuo, para retirada de todas as bolhas e

microbolhas que aparecem durante a agitação. Filmes obtidos sem adição de nanoesferas de carotenoides foram usados como controle.

Os filmes foram obtidos pela técnica de *casting*. Alíquotas das dispersões reticuladas formadoras de filme (0,48 g.cm<sup>-2</sup>) foram despejadas em placas de Petri de poliestireno (diâmetro = 14 cm) e secadas lentamente a 36 °C em estufa com circulação forçada de ar (De Leo TLK48, Brasil) por aproximadamente 18 horas.

Na segunda etapa, foi realizada uma reticulação complementar, adicionando-se 40 mL de uma solução aquosa de cloreto de cálcio 5% (m/v) e glicerina 10% (m/v) em cada placa com os filmes, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Após o período de reticulação, a solução adicionada aos filmes foi descartada e os filmes foram levados novamente à estufa (35 °C) por 1 hora ou até completa secagem.

Os filmes, após secos, foram retirados das placas e armazenados em dessecador para o processo de estabilização da umidade durante pelo menos 48 horas, a temperatura ambiente e umidade relativa controlada de 58% (TUPUNA-YEROVI; SCHMIDT; RIOS, 2023).

#### 4.7 Caracterização dos filmes de alginato de sódio incorporados com nanoesferas de bixina

##### 4.7.1 Espessura e propriedades mecânicas

A espessura dos filmes foi medida com um micrômetro digital de alta precisão (Digimess IP40, Brazil). As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas quanto a sua resistência à tração e porcentagem de alongação, conforme a metodologia ASTM D882-99 (ASTM D 882-02, 2002). Previamente, 10 tiras de cada formulação foram cortadas em forma retangular para formar corpos de prova de 100 mm x 20 mm, sua espessura foi medida em três pontos diferentes de cada tira para uma melhor representação populacional. As análises foram realizadas em texturômetro (Stable Micro Systems TA.XT2i, Surrey, UK) a 25 °C, com separação inicial das garras de 50 mm e velocidade de 80 mm.s<sup>-1</sup>. Os parâmetros foram determinados a partir das curvas de estresse-deformação obtidas.

##### 4.7.2 Umidade e solubilidade em água dos filmes

O teor de umidade e a solubilidade em água dos filmes foram determinados de acordo com o método descrito por Assis et al. (2017), com algumas modificações. Para determinar o teor de umidade, as amostras foram cortadas em quadrados (2 cm x 2 cm), pesadas ( $m_i$ ) e

submetidas à secagem a 105 °C por 24 h (DeLeo, TLK48, Brasil). Depois da secagem os filmes foram pesados novamente ( $m_f$ ) e a umidade calculada pela Equação 6.

$$Umidade (\%) = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (6)$$

As amostras secas e pesadas foram usadas para análise de solubilidade ( $m_{si}$ ) e imersas em 30 mL de água destilada. Os recipientes contendo as amostras foram agitados continuamente por 24 horas em temperatura controlada de 25 °C. Após a solubilização, os filmes foram retirados dos tubos e a água do recipiente filtrada, a fim de averiguar a presença de fragmentos de filme não solubilizados na água. Os filtros com os filmes após solubilização foram submetidos à secagem a 105 °C por 24 h, e novamente pesados ( $m_{sf}$ ) para determinar a massa da matéria seca que não se dissolveu em água. A solubilidade em água foi então calculada através da seguinte Equação 7.

$$Solubilidade = \left( \frac{m_{si} - m_{sf}}{m_{si}} \right) \times 100 \quad (7)$$

#### 4.7.3 Capacidade de inchamento

A capacidade de inchamento dos filmes foi determinada através da imersão das amostras cortadas em quadrados (2 cm x 2 cm) em água destilada (30 mL), temperatura controlada (25 °C) e agitação contínua. Após dois períodos (5 e 24 h), as amostras foram filtradas, secas suavemente com papel toalha e pesadas. O cálculo foi realizado através da seguinte Equação 8 (FARIAS *et al.*, 2020).

$$CI = \left( \frac{m_t - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad (8)$$

Sendo  $m_t$  a massa da amostra após o período determinado e  $m_i$  a massa inicial da amostra.

#### 4.7.4 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes com nanoesferas de bixina foi avaliada através do método descrito pela ASTM 96-05 (ASTM, 2000). Os filmes foram fixados em cápsulas de permeação de alumínio (diâmetro interno: 63 mm; altura: 25 mm) com cloreto de cálcio granular anidro (0% UR) em seu interior, e mantidos em cuba de vidro com temperatura controlada (25°C). Uma solução saturada de cloreto de sódio foi usada para alcançar um gradiente de umidade relativa de 0 a 75%. O ganho de massa do conjunto cápsula:filme:CaCl<sub>2</sub> foi avaliado através da pesagem de cada conjunto em balança analítica

(AY Shimadzu, Japão) no início da análise e após 24h de incubação. Para a determinação da PVA, a seguinte Equação 9 foi utilizada:

$$PVA = \frac{W \times L}{A \times t \times \Delta p} \quad (9)$$

Onde W: é a massa de água permeada através do filme (g) dada pela diferença de peso após 24 horas; L: é a espessura do filme (mm); A: é a área de permeação (m<sup>2</sup>); t: é o tempo de permeação (h); Δp: é a diferença de pressão de vapor entre os dois lados do filme (kPa).

#### 4.7.5 Propriedades ópticas

##### 4.7.5.1 Cor

A cor dos filmes de alginato de sódio com nanoesferas de bixina e dos filmes de alginato de sódio controle foi avaliada após as 48 h de repouso dos filmes para estabilização da umidade (58% UR). A cor foi determinada através de um colorímetro Chromameter CR-400 (Konica Minolta, Japão) segundo os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  de acordo com sistema CIELab. O parâmetro  $L^*$  indica o nível de luminosidade (0 = preto; 100 = branco),  $a^*$  estabelece a variação entre verde ( $-a^*$ ) e vermelho ( $+a^*$ ), e  $b^*$  a variação entre azul ( $-b^*$ ) e amarelo ( $+b^*$ ). As leituras foram realizadas em pontos aleatórios dos filmes. O valor do ângulo Hue ( $h^{\circ}_{ab}$ ), o fator Chroma ( $C^*$ ), e a diferença de cor ( $\Delta E$ ) foram calculados usando as Equações 3, 4 e 5 (item 4.5.3) (KIM; PARK; HWANG, 2002).

##### 4.7.5.2 Transmissão de luz e opacidade

A análise de transmissão de luz foi realizada através de uma varredura em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu, modelo UV-1800, Japão) na região de 200 nm a 800 nm. A leitura foi realizada em cubeta de quartzo, os filmes foram previamente cortados em retângulos (1cm x 5cm), colocados na parede interna da cubeta e submetidos a leitura no equipamento. Uma cubeta de quartzo vazia foi utilizada como controle (FANG *et al.*, 2002). A opacidade mede a absorvância do filme em 210 e 500 nm, calculada conforme Equação 10.

$$Opacidade (mm^{-1}) = \frac{Abs_{\left(\frac{210}{500}\right)}}{x} \quad (10)$$

Onde  $Abs_{(210/500)}$  é o valor da absorvância em 210 e 500 nm e x é a espessura do filme (mm).

#### 4.7.6 Propriedades térmicas

##### 4.7.6.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) serve para a avaliação da estabilidade térmica de um polímero e para determinar as faixas de temperatura de início e fim dos processos degradativos da cadeia polimérica. A análise foi realizada com equipamento termogravimétrico (Perkin Elmer - Pyris 1 TGA®), com uma vazão de nitrogênio gasoso de 40 mL.min<sup>-1</sup>, uma taxa de calor constante de 10 mL.min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de 25 até 600°C. Para a condução da análise os filmes com umidade estabilizada (58% UR - 48h) foram cortados em quadrados (1 cm x 1cm) e os resultados foram expressos como a perda de massa (%) em função da temperatura.

##### 4.7.6.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi determinada em um Q20 DSC (TA Instruments, Estados Unidos) sob atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Para esta análise, os filmes com umidade estabilizada (58% UR - 48h) foram cortados em quadrados (1 cm x 1cm). Os termogramas foram obtidos com aquecimento de -30 °C a 300 °C (10 °C.min<sup>-1</sup>), e seguinte resfriamento de 300 a -30 °C (10 °C.min<sup>-1</sup>).

#### 4.7.7 Morfologia

Os filmes foram cortados em quadrados de 2 cm x2 cm para preparação das lâminas em três repetições de cada tratamento. As imagens de microscopia óptica foram obtidas em microscópio Leica (DM 2500), equipado com câmera Leica ICC50 HD e software LAS (Leica Application Suite) Interactive Measurement, com lentes de ampliação de 10x e 100x.

#### 4.7.8 Biodegradabilidade

Os filmes de alginato de sódio com nanoesferas de bixina foram avaliados quanto a sua taxa de biodegradabilidade, através da perda de massa quando submetidos ao contato com solo durante 15 dias (MARTUCCI; RUSECKAITE, 2009). Amostras dos filmes (2 cm x 3 cm) foram previamente submetidos à secagem por 24 h em estufa à 60 °C (DeLeo modelo B5AFD, Porto Alegre, RS, Brasil). Os filmes foram armazenados em telas de alumínio previamente secas e pesadas (conjunto tela/filme) e colocadas em compartimentos preenchidos com terra vegetal TERRAL (aproximadamente 4 cm de profundidade). Durante o estudo e em períodos pré-determinados (5°, 10° e 15° dia de análise) as amostras foram retiradas, lavadas com água

para retirada do solo aderido à tela e submetidas à secagem por 24 h (60 °C). A perda de massa dos filmes ao longo do estudo foi determinada através da Equação 11.

$$\text{Biodegradabilidade} = \left( \frac{m_0 - m_t}{m_t} \right) \times 100 \quad (11)$$

Onde:  $m_0$  é massa da amostra (g) no dia zero, e  $m_t$  massa da amostra (g) após contato com o solo no tempo  $t$ .

#### 4.7.9 Atividade antioxidante

A partir da caracterização, os filmes de alginato de sódio incorporados com 10% (g/g de alginato) de nanoesferas de bixina mostraram as melhores características quanto às propriedades físico-químicas, mecânica e de barreira. Sendo assim, a atividade antioxidante desses filmes foi avaliada através do armazenamento de óleo girassol sem adição de antioxidantes sintéticos sob condições controladas para oxidação. As amostras foram armazenadas em uma câmara (Tecnal, modelo TE-402, Brasil) com temperatura (30 °C), luz (900 - 1000 Lux) e umidade (75% UR) controladas. O óleo (10 mL) foi inserido nos filmes na forma de sachê (selados com seladora térmica manual), e com dimensão de 5 cm x 5 cm (25 cm<sup>2</sup>). Como controles o óleo também foi armazenado em frasco plástico (PET) simulando a embalagem convencional do produto, e em uma placa exposta (sem embalagem) (ASSIS *et al.*, 2017). Em tempos pré-determinados, ao longo do período de armazenamento, as amostras foram analisadas quanto a sua estabilidade oxidativa através da determinação do índice de peróxidos, dienos e trienos conjugados (AOCS, 1994).

##### 4.7.9.1 Índice de peróxidos

Aproximadamente 5g do óleo de girassol, armazenado nos sachês e embalagens controle, foi pesado em erlenmeyer, adicionado de 30 mL de solução ácido acético-clorofórmio (3:2 v/v) para dissolver a amostra e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após 1 min de repouso, adicionou-se 30 mL de água destilada e 1 mL de solução indicadora de amido (1% m/v) e finalmente, a amostra foi titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N, até o desaparecimento da coloração escura (AOCS, 1994). O índice de peróxidos foi expresso de acordo com a Equação 12.

$$\text{Índice de Peróxidos (mEq. kg}^{-1}\text{)} = \frac{(V - V_b) \times N \times F_c \times 1000}{m} \quad (12)$$

Onde  $V$  é volume da solução de tiosulfato de sódio gasto para a titulação da amostra (mL);  $V_b$  é volume da solução de tiosulfato de sódio gasto para a titulação do branco (mL);  $N$

é concentração da solução de tiosulfato de sódio;  $F_c$  é fator de correção da solução de tiosulfato de sódio; e  $m$  é a massa da amostra (g).

#### 4.7.9.2 Dienos e trienos conjugados

Foram pesados 0,25 g do óleo armazenado nas embalagens e dissolvidos em 25 mL do solvente de referência (isooctano: 2,2,4-trimetilpentano) em balão volumétrico. A presença de dienos ( $\lambda = 232$  nm) e trienos conjugados ( $\lambda = 268$  nm) formados durante a oxidação foi determinada através da leitura da absorvidade na região do ultravioleta em um espectrofotômetro CPS-240A (Shimadzu, Japão). Os coeficientes de extinção nos diferentes comprimentos de onda foram obtidos de acordo com a Equação 13 (AOCS, 1994).

$$K_y = \frac{A_\lambda}{c \times l} \quad (13)$$

Onde:  $K_\lambda$  é a extinção específica no comprimento de onda de 232 ou 268 nm;  $A_\lambda$  é a absorbância no comprimento de onda de 232 ou 268 nm;  $c$  é a concentração da solução (g/100 mL); e  $l$  é o caminho óptico da cubeta (1 cm).

#### 4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando ANOVA e teste de Tukey para comparação das médias ao nível de 5% de significância, através do programa Statistica 12.0 (Statsoft, São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

### **CAPÍTULO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS**

---

## 5 Nanoencapsulation of bixin and norbixin in sodium alginate: preparation, characterization, and release in food simulant

Artigo publicado na revista "Current Bioactive Compounds"  
DOI: 10.2174/0115734072265200230925062619

Suiane Savazzi<sup>a</sup>, Renato Queiroz Assis<sup>b</sup>, Alessandro de Oliveira Rios<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup> Institute of Exact and Earth Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Av. Valdón Varjão, 6390, 78600-000, Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil.

### Abstract

**Aims:** Bixin and norbixin are natural antioxidants used as pigments in the food industry, but their chemical structure makes them susceptible to environmental factors (light, oxygen, and temperature).

**Background:** Nanoencapsulation techniques can improve the stability and solubility of these compounds in addition to reducing particle size which can increase the surface-to-volume ratio and provide many attractive and unique properties to the nanoparticles.

**Objective:** In this study, sodium alginate was used as wall material for the encapsulation of bixin and norbixin in different concentrations ( $1.25 \times 10^{-3}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$  and  $7.5 \times 10^{-3}$  g/g of biopolymer), by emulsification/internal gelation method.

**Methods:** The emulsification/internal gelation method was used to elaborate bixin or norbixin loaded nanospheres. The internal phase of the water-in-oil (W/O) emulsion was prepared with an aqueous solution of sodium alginate (1.5% w/v - 40 mL), 0.12 g of CaCO<sub>3</sub>, bixin or norbixin pigments, and mechanically stirred for 15 min at 700 rpm.

**Results:** Nanospheres containing the highest concentration of both carotenoids showed better encapsulation efficiency, with 37.86% for bixin and 51.47% for norbixin, and these formulations were used for characterization analyses. The mean size of the nanospheres was  $741.9 \pm 41.0$  nm,  $622.9 \pm 71.0$  nm, and  $589.5 \pm 99.1$  nm for control particles, bixin, and norbixin, respectively. The addition of both carotenoids resulted in particles with a yellow-red color, which demonstrates the encapsulation of natural antioxidants. The thermal analysis results may indicate an increase in the thermal stability of the pigments after encapsulation, in addition, the nanospheres exhibited the ability to scavenge the ABTS<sup>+</sup> radical. Carotenoids release test in food simulant (95% ethanol) presented a rapid release in the first hours and maintenance of concentration for 10 days.

**Conclusion:** Results showed that these nanospheres could be an alternative to the application of these carotenoid pigments in food matrices and food packaging.

**Keywords:** Bixin, norbixin, nanospheres, nanoencapsulation, pigments, nanoparticles.

## 1 Introduction

Annatto seeds (*Bixa orellana* L.) are widely used in the food industry as a source of natural yellow-reddish pigments for application in cheeses, ice creams, yogurts, sausages, margarines, snacks, sauces, and other products. The main carotenoid found in annatto seeds is bixin (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>), an acyclic structure molecule with nine conjugated double bonds and a hydrophobic character. Bixin can be easily converted into a de-esterified derivative through the saponification process in the presence of a strong base, obtaining the hydrophilic carotenoid identified as norbixin (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) (SATYANARAYANA; RAO; RAO, 2003; SCOTTER, 2009; TUPUNA *et al.*, 2018).

Norbixin and bixin, like all carotenoids, are known to have a high antioxidant capacity through the deactivation of radical ions and reactive oxygen species (ROS). This behavior is associated with the conjugated double bonds present in the carbon chain, which are capable of conferring color and high reactivity. In addition, annatto extracts are relatively easy to obtain and have low cost compared to other natural dyes, which increases their use and commercial relevance (BITENCOURT *et al.*, 2018; CHISTÉ *et al.*, 2011; RIOS; MERCADANTE; BORSARELLI, 2007).

Carotenoids are considered unstable when exposed to several factors (light, temperature, and oxygen), which can lead to degradation reactions and result in the loss of color, antioxidant capacity, and formation of low molecular weight compounds that influence the aroma of foods (PRAJAPATI; JADEJA, 2022; SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016). Several studies evaluate techniques to reduce/or prevent these problems, such as the nanoencapsulation of bioactive compounds. Nanoencapsulation is an important application of nanotechnology with great interest for implementation in the food industry and involves the design, synthesis, characterization, and application of particles or systems with dimensions less than 1 µm (MOKHTARI; JAFARI; ASSADPOUR, 2017; SANTOS *et al.*, 2016). Overall, in addition to contributing to the protection against external factors, encapsulation can also promote the modified release of these compounds over time and a better application/compatibility of hydrophobic compounds in hydrophilic matrices or hydrophilic compounds in hydrophobic matrices (DE CAMPO *et al.*, 2018; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; LOBATO *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2012a; SRIDHAR; INBARAJ; CHEN, 2021).

One of the materials commonly used as an encapsulant is sodium alginate. Alginate is an anionic polysaccharide of (1–4)-linked β-D- mannuronic acid (M) and α-L-guluronic acid (G) widely used in encapsulation, mainly because it is a non-toxic, biodegradable, and

biocompatible polysaccharide that can form hydrogels at room temperature by ionotropic gelation with divalent ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) (FUNAMI *et al.*, 2009; OZKAN *et al.*, 2019; PAQUES *et al.*, 2014; RAHNEMOON *et al.*, 2021). Researchers have attempted to encapsulate various active compounds and produce smaller particle sizes with alginate as wall material, and the emulsification/internal gelation method showed promising results (AHMED *et al.*, 2013; LI; ZHANG; SHI, 2011; LUPO *et al.*, 2015; MARTÍN-VILLENA *et al.*, 2013). Among different encapsulation techniques, the emulsification/internal gelation method is the dispersion/internal gelation of a polysaccharide in an oil phase with the retention of some active compound in the structuring material.

This technique consists of trapping the active compound through gelation, which occurs with the formation of a W/O emulsion of an alginate aqueous solution emulsified in an oil phase in the presence of a surfactant and a source of calcium. With the addition of acid, the pH is reduced and  $\text{Ca}^{2+}$  ions are released establishing desirable interactions with the chains of the wall material initiating the internal gelation process. This is a simple and economical method that is associated with a natural and biodegradable encapsulating agent that can favor obtaining nanometric particles on a large scale without using high temperature, promoting the stability of thermolabile compounds during preparation. (AHMED *et al.*, 2013; MOKHTARI; JAFARI; ASSADPOUR, 2017; PAIBOON *et al.*, 2023; SADEGHI *et al.*, 2021).

The study aims to use emulsification/internal gelation for nanoencapsulation of bioactive compounds with alginate as the polymer matrix, which may represent an alternative to promote better application and compatibility with different food matrices. Therefore, sodium alginate nanospheres containing bixin and norbixin as bioactive compounds were used to prepare and characterize their physicochemical properties, thermal stability, and the release of carotenoids to high-fat food simulant identifying the relationship between structural properties of the polymeric carrier and bioactive compound release based on classical diffusion theory.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Materials**

Annatto seeds (*Bixa orellana* L.) were purchased from local markets in Porto Alegre, RS, Brazil. Sodium alginate (DYNAMICS), calcium chloride (NEON), Tween 80 (NEON), calcium carbonate (SYNTH), and soybean oil were used to prepare the nanospheres. All reagents used were of analytical grade.

## 2.2 Bixin extraction and conversion to norbixin

Annatto seeds (*Bixa orellana* L.) (25 g) were previously subjected to two extractions with both hexane and methanol (50 mL) to eliminate lipids and polar compounds. The extract obtained in each step was filtered, and discarded, and ethyl acetate (50 mL) was added twice to the remaining seeds for bixin extraction. The steps were carried out under magnetic stirring (15 min). A final extract containing the bixin was filtered, concentrated in a rotary evaporator (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil) under reduced pressure ( $T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), transferred to an amber flask for drying in a nitrogen flow and then stored in a freezer ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). In the conversion into norbixin salts, the isolated bixin extract was added to a methanolic solution of potassium hydroxide (10% w/v) and stored in the dark for 12 hours at room temperature for complete saponification. Subsequently, in a separatory funnel, the saponified extract containing the norbixin salts was added with distilled water (50 mL), ethyl ether (50 mL), ethyl acetate (50 mL), and glacial acetic acid until the lower phase reached pH 3.5 and the transference of norbixin (intense red color) to the upper phase occurred. Finally, successive washings were performed with distilled water until the lower phase reached pH 6.0. The upper phase containing the norbixin salts was separated, concentrated in a rotary evaporator (Fisatom M802, Brazil) ( $T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), transferred to an amber flask for drying under nitrogen flow, and stored in a freezer ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (RIOS; MERCADANTE, 2004; TUPUNA *et al.*, 2018).

## 2.3 Quantification by UV/visible spectrophotometric analysis

An aliquot of a previously prepared ethyl acetate extract of bixin and norbixin was dried in a stream of nitrogen, then 2 mL of the reference solvent (KOH 0.5% for norbixin and Chloroform P.A for bixin) was added to the dry pigment for dilution and analyzed using a CPS-240A spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The concentration was determined through the following parameters (RIOS; MERCADANTE, 2004): for norbixin ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3473$ ,  $\lambda=453\text{ nm}$ ), for bixin ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2826$ ,  $\lambda=470\text{ nm}$ ), and the following equation (1).

$$X = \frac{Abs \times \gamma \times 10^6}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100} \quad (1)$$

Where:

Abs: absorbance measurement

$\gamma$ : dilution (mL KOH 0.5% or Chloroform P.A)

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ : absorptivity coefficient

## 2.4 Preparation of sodium alginate nanospheres containing bixin or norbixin

The emulsification/internal gelation method was used to elaborate bixin or norbixin-loaded nanospheres (MARTÍN *et al.*, 2015). The internal phase of the water-in-oil (W/O) emulsion was prepared with an aqueous solution of sodium alginate (1.5% w/v – 40 mL), 0.12 g of CaCO<sub>3</sub>, bixin or norbixin pigments, and mechanical stirring for 15 min at 700 rpm (Fisatom 713D, Brazil). The pigments (bixin and norbixin) were quantified by spectrophotometry as previously described and added at the concentration of  $1.25 \times 10^{-3}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$  and  $7.5 \times 10^{-3}$  g/g of biopolymer. Soybean oil (100 mL), Tween 80 (0.3% w/v), and glacial acetic acid (400  $\mu$ L) were used as the external phase and was dripped into the internal phase system during constant stirring at 750 rpm for 10 min until complete emulsification. Finally, the 5% (w/v) CaCl<sub>2</sub> solution was mixed into the W/O emulsion to separate the pre-gelled nanospheres from the oil dispersion. Sodium alginate nanospheres were centrifuged at 10000g for 10 min (Hitachi, model CR 21GIII, Japan), collected, then washed with petroleum ether (50 mL) to remove the remaining oil, and later with distilled water (50 mL) by vacuum filtration, and stored in amber flasks at -18 °C.

## 2.5 Characterization of the nanospheres

### 2.5.1 Encapsulation efficiency

The efficiency of encapsulation (EE) was performed by exhaustive extraction that consisted of adding 10 mL of ethyl acetate to approximately 5 g of nanospheres containing bixin or norbixin, each sample was mixed for 2 min in a vortex, centrifuged (10000g, 10 min, 4 °C) (Hitachi, model CR 21GIII, Japan), and the supernatant was collected. In a second step, the nanospheres were mixed, again, with ethyl acetate (10 mL) for 2 min in Ultra-Turrax IKA T25 (Taiwan, China), and then centrifuged (10000  $\times$  g, 10 min, 4 °C). The supernatant was collected, and stored in an amber bottle, and the concentration of retained carotenoids was analyzed using a CPS-240A spectrophotometer (Shimadzu, Japan), as described previously. Encapsulation efficiency (%) was determined by bixin and norbixin released as a percentage of the initial amount used in the formulations (REIS *et al.*, 2007; STOLL *et al.*, 2016a).

### 2.5.2 Particle size distribution

The particle size distribution was determined by laser diffraction technique, using Mastersizer 2000 Malvern Instruments Ltd equipment. The volume-weighted mean diameter was expressed as diameter D<sub>[4,3]</sub>, which is the volume-weighted mean diameter, assuming

spherical particles with the same volume as the real particles (TUPUNA *et al.*, 2018). The calculation of the particle size distribution was obtained according to equation (2):

$$Span = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad (2)$$

Where  $d(0.9)$ ,  $d(0.1)$ , and  $d(0.5)$  are the diameters at 90%, 10%, and 50% of the cumulative size distribution curve, respectively.

### 2.5.3 Colorimetric analysis

The color of the nanospheres was evaluated on the day of preparation (day zero) and determined according to the CIELab system with  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  parameters, using a Chromameter CR-400 colorimeter (Konica Minolta, Japan). The equipment was calibrated with a white control plate ( $L^*$ : 97.5,  $a^*$ : 0.1 and  $b^*$ : 1.7). The  $L^*$  parameter indicates the brightness level (0 = black; 100 = white),  $a^*$  establishes the variation between green ( $-a^*$ ) and red ( $+a^*$ ), and  $b^*$  the variation between blue ( $-b^*$ ) and yellow ( $+b^*$ ). The value of the Chroma factor ( $C^*$ ) and Hue angle ( $h^{ab}$ ) indicates the intensity of color saturation and the hue of the sample (0 or  $360^\circ$  = red,  $90^\circ$  = yellow,  $180^\circ$  = green, and  $270^\circ$  = blue), respectively, and were calculated using the following equations (3) and (4) (KIM; PARK; HWANG, 2002):

$$Hue\ angle = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (3)$$

$$Chroma\ factor = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

And the color difference ( $\Delta E$ ) will be obtained from the following equation (5):

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (5)$$

Where:

$L_0^*$ ,  $a_0^*$ , and  $b_0^*$ : color parameters of the control nanospheres.

$L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$ : color parameters of the encapsulated nanospheres.

### 2.5.4 Thermal properties

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed in a thermogravimetric analyzer (Perkin Elmer - Pyris 1 TGA®) to determine the thermal stability and the temperature ranges at the beginning and end of the polymer chain degradation processes. The nanospheres were

previously lyophilized, and 5-10 mg of sample were used for the analysis. The tests were carried out under the following conditions: nitrogen atmosphere of 20 mL.min<sup>-1</sup>, temperature range from 30 to 650 °C and heating rate of 10 °C.min<sup>-1</sup>. Results were expressed as mass loss (%) as a function of temperature.

#### 2.5.5 Differential scanning calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry (DSC) was determined by a Differential scanning calorimeter (DSC 8500 model, Perkin Elmer Corporation, Wellesley, USA) under a nitrogen atmosphere with a flow rate of 20 mL.min<sup>-1</sup>. For this analysis, an amount between 5 and 10 mg of lyophilized nanospheres was used and scanned in a hermetically sealed aluminum pan, and an empty aluminum pan was used as a reference. Thermograms were obtained by heating to 30 °C – 300 °C (10 °C.min<sup>-1</sup>), cooling to -30 °C (10 °C.min<sup>-1</sup>).

#### 2.5.6 Antioxidant capacity

The ability to deactivate the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS) was analyzed. First, the radical was prepared by reacting 5 mL ABTS (7 mmol.L<sup>-1</sup>) with 88 µL of potassium persulfate (140 mmol.L<sup>-1</sup>). Before use, this mixture was stored at room temperature in the dark for 16 hours. The ABTS<sup>+</sup> solution was diluted in ethanol until an absorbance of 0.700 ± 0.020 at 734 nm, evaluated using a CPS-240A spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Two sample extracts were prepared: first, approximately 2 g of control nanospheres (NC), bixin nanospheres (NB), and norbixin nanospheres (NN) were weighed and dispersed in 15 mL of water. Then, 2 g of NB and NN were also weighed for the extraction of the pigment by washing with ethyl alcohol every 10 mL, for 2 minutes in the vortex, up to 50 mL, and then centrifuged. Finally, 100 µL of these obtained extracts were added to 1 mL of diluted ABTS<sup>+</sup> and the absorbance value was observed after 6 min. The standard curve was developed with different concentrations of Trolox (11 to 176 µmol.L<sup>-1</sup>) and the results were expressed as µmol TE.g<sup>-1</sup> sample (RE *et al.*, 1999).

#### 2.5.7 Release of carotenoids in food simulants

According to Regulation (EU) No. 10/2011, for migration analysis in food simulants, distilled water is established as a non-acidic aqueous foods simulant (pH > 4.5), 3% (w/v) acetic acid solution in distilled water as an acidic aqueous foods simulant (pH < 4.5) and ethanol 95% (v/v) demonstrates the migration in rich-in-lipids food matrices. Previous analyses in distilled water and acetic acid solution showed undetectable results, and therefore, ethanol was the

selected food simulant to carry the analysis further (ASSIS *et al.*, 2021). Approximately 1 g of bixin or norbixin nanospheres were placed in amber flasks with 15 mL of the simulant. The samples were stored under controlled temperatures (25 °C and 40 °C) and without light for 24 hours. An aliquot (2 mL) was removed to quantify the concentration of released pigments at predetermined time. Pigment concentration was determined using a CPS-240A spectrophotometer (Shimadzu, Japan) and standard curves (absorbance  $\times$  concentration) for each carotenoid in 95% ethanol: bixin from 0.25 to 6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $R^2$ : 0.996;  $\lambda_{\text{max}}$ : 453 nm) and norbixin from 0.25 to 6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $R^2$ : 0.998;  $\lambda_{\text{max}}$ : 458 nm). The result was presented as the percentage of the pigments released over time. The obtained data were fitted to various kinetic equations (zero order, first order, Higuchi, and Korsmeyer-Peppas) (MALEKJANI; JAFARI, 2021) to describe the mechanism of the carotenoids release from nanospheres. The highest adjusted R-squared (Adj.  $R^2$ ) was considered as a criterion to select the best model.

## 2.6 Statistical analysis

All analyzes were performed in triplicate and results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The results obtained were submitted to statistical analysis using ANOVA and Tukey's test to compare the means at a 5% significance level, using the Statistica 12.0 program (Statsoft, São Paulo, Brazil).

## 3 Results and discussion

### 3.1 Encapsulation efficiency

Nanospheres with different amounts of bixin (NB) or norbixin (NN) were produced and encapsulation efficiency (EE) results are shown in Table 1. There was a high encapsulation efficiency for the formulations with high pigment concentration. Norbixin nanospheres showed higher encapsulation effectiveness, significantly differing ( $p < 0.05$ ) from the same pigment-amount bixin nanospheres, which can be attributed to the lipophilic character and pigment migration into the oil. Bixin and norbixin, although chemically similar, exhibit differences in solubility and stability due to their chemical structures (SCOTTER, 2009), the end-group being the main difference for each molecule. For bixin, the presence of a methyl ester gives it a lipophilic character, making it highly soluble in nonpolar solvents and oils. However, for norbixin, the ester ending is replaced by a carbonyl, resulting in a more hydrophilic molecule (RADDATZ-MOTA *et al.*, 2017; SCOTTER, 2009). In encapsulation by emulsification/internal gelation, the particle formation process occurs during emulsification.

Thus, lipophilic compounds can migrate to the oil phase instead of being encapsulated, decreasing the efficiency. Hydrophilic compounds, on the other hand, would have an affinity with the aqueous phase (sodium alginate), remaining in solution during particle formation (KUROZAWA; HUBINGER, 2017).

**Table 1.** Encapsulation efficiency (EE) of bixin nanospheres (NB) and norbixin nanospheres (NN) with different quantities of pigments.

<b>Bixin nanospheres (x 10<sup>-3</sup> g bixin/ g of biopolymer)</b>	<b>EE (%)</b>	<b>Norbixin nanospheres (x 10<sup>-3</sup> g norbixin/ g of biopolymer)</b>	<b>EE (%)</b>
1.5	21.41 ± 1.00 <sup>bB</sup>	1.5	28.71 ± 1.35 <sup>bA</sup>
2.5	9.21 ± 2.31 <sup>cB</sup>	2.5	23.21 ± 3.78 <sup>bA</sup>
5	17.81 ± 1.10 <sup>bcB</sup>	5	29.89 ± 2.78 <sup>bA</sup>
7.5	37.86 ± 3.26 <sup>aB</sup>	7.5	51.47 ± 3.05 <sup>aA</sup>

\*Different superscripts letters within the same column indicate statistically significant different values ( $p < 0.05$ ); \*\*Different superscripts capital letters within the same line indicate statistically significant different values ( $p < 0.05$ ).

Parameters used for the emulsification/internal gelation methodology (sodium alginate concentration, surfactant, and CaCO<sub>3</sub> concentrations, cross-linking time, agitation speed, aqueous:oil phase ratio, acid concentration, and others) have already been evaluated by many authors to show the influence on the EE and the characteristics of the spheres produced (CHEN; SUBIRADE, 2006; UYEN *et al.*, 2020a; YADAV *et al.*, 2018).

The encapsulation of insulin (dilution media:zinc acetate at 0, 0.2, 0.4, and 0.6 mmol.L<sup>-1</sup>) in alginate microspheres showed that increasing Zn/insulin ratio did not change the protein encapsulation (SILVA *et al.*, 2006) and curcumin encapsulated in alginate microspheres reported that the low EE could be attributed to the small amount of curcumin (3.6 mg) used in the fabrication of the microspheres (UYEN *et al.*, 2020b). However, characterization with different concentrations of the encapsulated compound still needs more investigation.

The efficiency values found were similar to existing results shown in previous studies for this method of encapsulation. Some authors who have applied the emulsification/internal gelation method using bioactive compounds and polymeric matrix showed that hydrophilic molecules produce better EE (KUROZAWA; HUBINGER, 2017). Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying showed an EE of 70.07% (ZHANG *et al.*, 2020). For microspheres encapsulated with recombinant insulin, EE varied from 65 to 79% and was especially affected by the parameters

of alginate gelation, such as calcium/alginate, acid/calcium, and mass ratios (SILVA *et al.*, 2006a).

Alginate microparticles produced by internal gelation to encapsulate a phenolic-compounds-rich extract from olive leaves obtained low EE for Oleuropein ( $\approx 25\%$ ) and Verbascoside ( $\approx 30\%$ ) which have more hydrophobic chemical structures, and high EE for Hydroxytyrosol (83%) that is a simple hydrophilic compound (FLAMMINII *et al.*, 2021). Both internal and external gelation method was used to encapsulate ethanolic extract from anatto seeds with high concentrations of bixin and phenolic compounds. The results also showed that the higher the concentration of bixin, the better the encapsulation efficiency (NARANJO-DURÁN *et al.*, 2021).

Nanocarriers containing peppermint phenolic extract prepared by internal gelation technique, and the composition of 0.5% alginate, 400 mL oil,  $0.05 \text{ mol.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , and 100 mL surfactant was recognized as the optimized treatment with a reasonable EE of 5.6% (MOKHTARI; JAFARI; ASSADPOUR, 2017). Therefore, particles with a diameter range in the nanoscale are still poorly produced with high efficiency by the emulsification/internal gelation methodology.

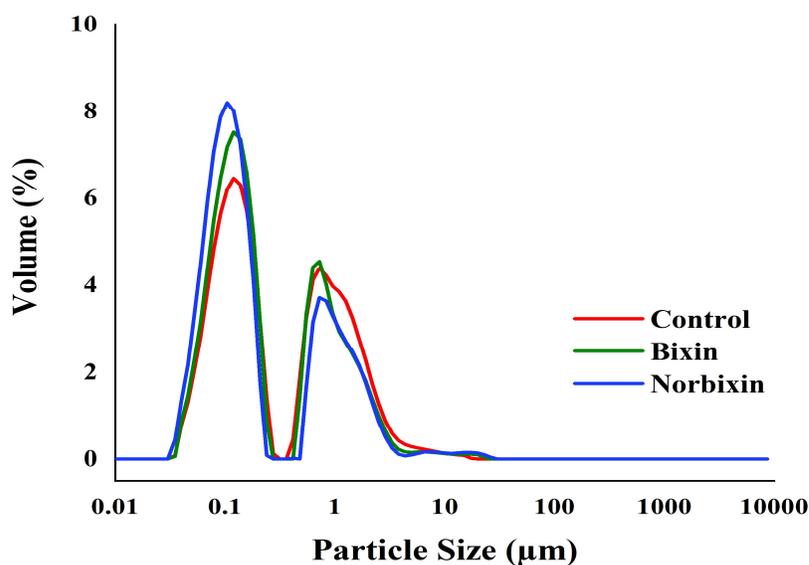
The method of emulsification/internal gelation is also based on the release of calcium ions ( $\text{CaCO}_3$  - an acid-soluble calcium salt), that are homogeneously dispersed in the alginate solution, during the emulsification with the oil-acid partitions and initiate alginate gelation (CHEN; SUBIRADE, 2006). During this process, there is also the liberation of carbon dioxide that helps the formation of a more porous and loose gel matrix, which contributes to smaller efficiency values (LEONG *et al.*, 2016).

According to the EE analysis, the samples that obtained the best characterization were chosen to perform the following analysis: particle size distribution, colorimetry, thermal analysis (TGA and DSC), the release of carotenoids in food simulants, and antioxidant capacity. Therefore, from now on, NB and NN refer to bixin nanospheres and norbixin nanospheres, respectively, produced with  $7.5 \times 10^{-3}$  g/g of biopolymer.

### 3.2 Particle Size Distribution

The particle size distribution of the nanospheres showed a bimodal distribution (Fig. 1). The distribution exhibited mean diameter sizes significantly different ( $p < 0.05$ ), of  $741.9 \pm 41.0$  nm,  $622.9 \pm 71.0$  nm, and  $589.5 \pm 99.1$  nm for control, bixin, and norbixin particles, respectively. The results showed that the formulation parameter combinations used in this work

can produce particles on the nanometer scale. The emulsification/internal gelation method uses a poorly soluble calcium salt that helps to control the size of the spheres after encapsulation by avoiding clustering aggregation (DENG *et al.*, 2019). Typically, alginate spheres prepared by internal gelation with  $\text{CaCO}_3$  have been showing diameters at the micrometer sizes of 20 to 3500  $\mu\text{m}$  (PONCELET *et al.*, 1992; QUONG *et al.*, 1998; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004; SILVA *et al.*, 2006b; VANDENBERG; DE LA NOÛE, 2001).



**Figure 1.** Particle size distribution of the control, bixin and norbixin nanospheres (Control, NB e NN, respectively).

With different ranges of agitation of the system during W/O emulsion formation capsules with mean diameters of 30 to 100  $\mu\text{m}$  can be produced. During emulsification, the particle diameter and droplet size are determined by the relationship between the dispersive forces and the surface tension of water and oil phases, therefore, the amount of emulsifier, its adsorption, and concentration, can affect particle size distributions (CHEN; SUBIRADE, 2006; UYEN; HAMID; NURAZREENA, 2019). Studies have also shown that alginate concentration has a more direct effect on particle size, the higher the concentration, the highest the particle size (ATHAMNEH *et al.*, 2019; UYEN; HAMID; NURAZREENA, 2019; YADAV *et al.*, 2018).

When producing nanospheres containing peppermint phenolic extract with a mean nanoparticle size of 785 nm was reported that nanoparticles decreased at higher oil and surfactant levels, higher molarity of  $\text{CaCl}_2$  and lower alginate concentrations, and increasing

the alginate concentration resulted in a transition from nanoparticles to microparticles (MOKHTARI; JAFARI; ASSADPOUR, 2017).

The bixin-rich ethanolic extract was encapsulated in alginate with the emulsification/internal gelation method and produced spheres with a particle size of  $697.1 \pm 20.3 \mu\text{m}$ . Even though we produced particles with a similar method and encapsulated compound, it resulted in much larger particle sizes. The difference could be explained by different proportions of alginate:CaCO<sub>3</sub>:acid:surfactant used in the process of encapsulation (NARANJO-DURÁN *et al.*, 2021).

### 3.3 Colorimetric analysis

Color parameters for the alginate nanospheres incorporated with bixin or norbixin are shown in Table 2. Statistics showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between control nanospheres and nanospheres containing the carotenoids for all the color parameters. When natural antioxidants were incorporated there was an increase in color intensity, evidenced by an increment in the  $a^*$  and  $b^*$  parameter values. Carotenoids are a large group of natural pigments, ranging from red to orange, to yellow colors. Apocarotenoids are carotenoid-derived compounds, formed by oxidative cleavage of plant carotenoids and are widely distributed in nature, they have important and diverse biological functions and pigmentation properties (NAWADE *et al.*, 2020).

**Table 2.** Color parameters of control (C), bixin (NB), and norbixin (NN) nanospheres.

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$h^{\circ}_{ab}$ (°)	$C^*$	$\Delta E_1$	$\Delta E_2$
<b>C</b>	$45.6 \pm 2.1^a$	$-0.7 \pm 0.1^a$	$3.1 \pm 0.5^a$	$76.5 \pm 0.4^a$	$3.2 \pm 0.4^a$	-	-
<b>NB</b>	$35.8 \pm 2.1^b$	$11.0 \pm 2.4^b$	$17.6 \pm 2.5^b$	$58.2 \pm 2.3^b$	$20.7 \pm 3.5^b$	$21.4 \pm 2.4^a$	-
<b>NN</b>	$35.7 \pm 3.1^b$	$12.3 \pm 2.0^b$	$17.3 \pm 3.9^b$	$54.4 \pm 1.8^b$	$21.3 \pm 4.3^b$	$22.4 \pm 2.9^a$	$6.4 \pm 1.7$

\*Mean values of 3 replications ( $\pm$ SD). Different lowercase superscript letters in the same column indicate statistically significant differences between treatments by the Tukey's test ( $p < 0.05$ ).  $L^*$ , brightness;  $a^*$ , redness/greenness;  $b^*$ , yellowness/blueness;  $h^{\circ}_{ab}$ , hue angle;  $C^*$ , chroma factor;  $\Delta E_1$ , color difference between control and encapsulated nanospheres;  $\Delta E_2$ , color difference between bixin and norbixin nanospheres.

The encapsulated nanospheres were compared to the control, and high  $\Delta E$  ( $24.3 \pm 2.1$  and  $22.9 \pm 3.0$ ) values were observed. The color difference between bixin and norbixin nanospheres was also calculated ( $6.4 \pm 1.7$ ). The  $\Delta E$  value is calculated to demonstrate the difference in color between two samples to show how perceptible this difference is to the human eye. An observer sees the difference in color as follows:  $0 < \Delta E < 1$ : observer does not notice the difference;  $1 < \Delta E < 2$ : only an experienced observer can notice the difference;  $2 < \Delta E <$

3.5: an inexperienced observer can notice the difference;  $3.5 < \Delta E < 5$ : the clear color difference is noticed;  $\Delta E > 5$ : observer notices two different colors (MOKRZYCKI; TATOL, 2011). A high  $\Delta E$  thus, implies a significant color variation.

The Bixin (C25) and norbixin (C24) are shorter than the usual carotenoids (C40) but are also formed by a chain of alternate nine double conjugated chemical bonds (chromophore) responsible for their intense color (varying between red and orange) and antioxidant capacity (SCOTTER, 2009). Although very similar, bixin and norbixin can present different variations in color depending on pigment concentration and type of solvent or encapsulant (LYNG; PASSOS; FONTANA, 2005). The results showed that it was possible to observe the color difference between encapsulated and control nanospheres and between bixin and norbixin nanospheres. These variations are associated with the conjugated double bonds in the chemical structure of the carotenoids and their ability to confer color (showing that the pigments are present in the alginate matrix of the nanosphere) (GHOSH *et al.*, 2022). In the future, the ability of encapsulation to protect the pigments from oxidation processes can be investigated.

#### 3.4 Thermal properties

There are various analytical techniques for physicochemical analysis of nanoparticles. Two of these techniques are DSC and TGA, commonly applied for stability measurements (GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010; HOSSEINI; JAVIDI; REZAEI, 2016; STOJANOVIC *et al.*, 2012). TGA and DSC analysis were conducted to study the thermal behavior of the encapsulating systems. The TGA curves are shown in Fig. (2), and the parameters obtained from the thermograms of both analyses are shown in Table 3. The results of weight loss in TGA analysis showed that all nanospheres samples exhibited four events of the decomposition process. Since samples were lyophilized the first event already shows the initial degradation process of the polymer chain. The thermal data of nanospheres was consistent with their DSC behavior and the temperatures converged with the peaks found.

The DSC thermograms of control, bixin, and norbixin nanospheres exhibited endothermic peaks at 243.2 °C, 257.0 °C, and 262.1 °C, respectively. Some authors assigned weight loss at approximately 250 °C to the thermal degradation of the sodium alginate, associated with the process of alginate pyrolysis related to depolymerization reactions and destruction of the glucosidic chains, and all the subsequent thermal events are associated with the thermal degradation of the polymer chain (MARTÍN-VILLENA *et al.*, 2013; ROSS *et al.*, 2011; YADAV *et al.*, 2018). The nanospheres were fully degraded at approximately 500 °C, resulting in a residual mass of 30.8, 22.4 and 28.2 g (C, NB, and NN, respectively).

**Table 3.** Thermal parameters obtained from the thermograms (TGA/DSC) of control, bixin (NB) and norbixin (NN) nanospheres.

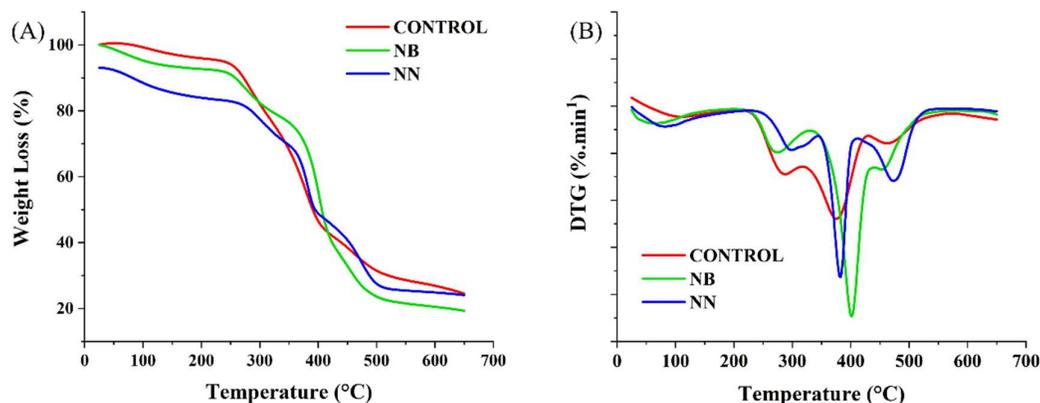
Analysis		Parameters	Control	NB	NN
DSC	Peak <sub>exo</sub>	T <sub>on</sub> (°C)	243.2	236.1	262.1
		T <sub>p</sub> (°C)	252.0	257.0	265.0
		ΔH (J.g <sup>-1</sup> )	-0.55	-8.60	-0.29
TGA Events		WL (%)	4.7	7.9	11.7
		T <sub>p</sub> (°C)	243.2	236.1	262.1
		WL (%)	31.6	26.9	27.8
		T <sub>p</sub> (°C)	343.9	371.2	358.4
		WL (%)	59.1	69.1	56.4
		T <sub>p</sub> (°C)	426.3	451.5	447.3
		WL (%)	69.2	77.6	71.8
		T <sub>p</sub> (°C)	499.3	504.0	504.4

\*Abbreviations: Peak<sub>exo</sub>, exothermic peak; T<sub>on</sub>, onset temperature; T<sub>p</sub>, peak temperature; ΔH, enthalpy variation; WL, weight loss; T, temperature.

In general, the lower enthalpy, the lower the interaction among the molecules, and the higher the temperature, the better the stability of the compound. Thus, the increase in peak temperature of bixin and norbixin nanospheres and the enthalpy values can indicate an improvement in thermal stability compared to the control. Bixin nanospheres showed a higher enthalpy value, although norbixin nanospheres showed higher temperature of degradation, which indicates that bixin nanospheres need more starting energy to initiate the degradation (MUHAMAD *et al.*, 2019).

The thermal analysis of the carotenoids bixin and norbixin has already been studied and shows thermal degradation temperatures of 195 °C and 174 °C, respectively, exhibited by sharp peaks in their thermograms (DE SOUSA *et al.*, 2020; PASCOAL *et al.*, 2021; PINZÓN-GARCÍA *et al.*, 2017). The bioactive molecules, being well dispersed throughout the matrices, melted together with the encapsulation polymers (ZHANG; ZHONG, 2013). The DSC thermograms of the encapsulated nanospheres did not exhibit peaks at these known degradation temperatures of bixin and norbixin. The absence of the typical compound peak as the modification of peak size and shape after encapsulation suggests the occurrence of

encapsulation and the improvement of the thermal stability of the bioactive compounds (VALLEJO-CASTILLO *et al.*, 2020).



**Figure 2.** Thermogravimetric curves (TGA) for control, bixin (NB) and norbixin (NN) nanospheres.

### 3.5 Antioxidant capacity

Table 4 shows the results of the radical ABTS<sup>+</sup> scavenging capacity of the nanospheres. The antioxidant capacity analysis was performed by two processes: the first consisted of an aqueous suspension of nanospheres, and the second of an ethanolic extraction of the natural antioxidants from the nanospheres. Results show higher values of antioxidant capacity for nanosphere aqueous dispersion, and that the pigments enhanced this capability, compared to the control nanospheres.

**Table 4.** Radical ABTS<sup>+</sup> scavenging capacity.

	ABTS <sup>+</sup> (μmol TE.g <sup>-1</sup> )	
	Aqueous Dispersion	Ethanol Extraction
Control Nanospheres	9.62 ± 0.92 <sup>c</sup>	-
Bixin Nanospheres	29.5 ± 1.6 <sup>aA</sup>	17.6 ± 1.6 <sup>aB</sup>
Norbixin Nanospheres	23.9 ± 1.7 <sup>bA</sup>	12.9 ± 0.7 <sup>bB</sup>

\*Different superscripts letters within the same column indicates statistically significant different values (p<0.05).

\*\*Different superscripts capital letters within the same line indicates statistically significant different values (p<0.05).

Comparing measurements found for the ethanolic extract (NB: 17.6 ± 1.6 μmol TE.g<sup>-1</sup>; NN: 12.9 ± 0.7 μmol TE.g<sup>-1</sup>), indicates that the polymer itself shows some capacity to scavenge the radical ABTS<sup>+</sup> (9.6 ± 0.9 μmol TE.g<sup>-1</sup>). Although values found for the nanospheres

are much lower than the antioxidant capacity evaluated for the annatto seeds extract in the literature (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008), it is important to consider that most bioactive compounds could have remained encapsulated in the nanospheres.

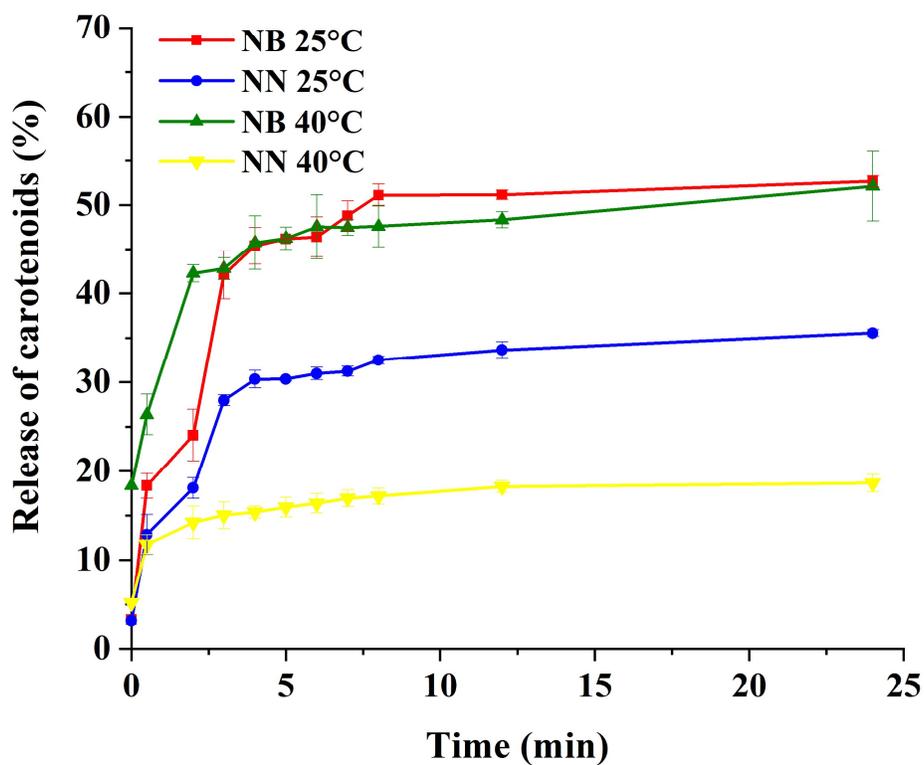
Trolox equivalent antioxidant capacity is a standardized method developed for a quick, simple, and reliable quantification of the antioxidant capacity of food products in general and consists of an electron-transfer donation from an antioxidant compound to an oxidant radical, in this case, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) synthetic radical cation (ABTS<sup>+</sup>) (MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011).

Carotenoids with more than seven conjugated double bonds have been shown to have a higher antioxidant ability, and this ability to quench <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and other free radicals is determined by the quantity of conjugated double bonds rather than the ionone ring of β-carotene (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989; KHOO *et al.*, 2011; KRINSKY, 1979). Thus, the ability of carotenes to scavenge ABTS<sup>+</sup> increases with the extension of the chromophore and a maximum overlap of the carbon-carbon double-bond molecular orbitals (MILLER *et al.*, 1996).

The results show that the technique used in this study for encapsulating carotenoids, such as bixin and norbixin, can maintain the antioxidant capacity of these natural pigments, in addition to developing particles on the nanometric scale. Thus, the encapsulation of natural antioxidants can expand their use in different food matrices and reduce the use of synthetic antioxidants. In addition, the interaction between the carotenoid and the encapsulating material can form complexes and enhance the antioxidant capacity (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; MIRANDA *et al.*, 2020).

### 3.6 Release of carotenoids

Fig. (3) shows the percentage of carotenoid release in ethanol 95%, employed as a simulant for high-fat content foods, as a function of time and temperature (25 °C and 40 °C). All nanospheres showed a quick release of natural antioxidants in the first hours. The nanospheres presented maximum release on the first day (for both temperatures 25 °C and 40 °C). A higher release of bixin was observed ( $52.7 \pm 1.4$  % - 25 °C and  $50.7 \pm 4.15$  - 40 °C) when compared to norbixin (25 °C –  $35.6 \pm 0.9$ % and 40 °C –  $18.6 \pm 0.5$ %) ( $p < 0.05$ ). Burst release might likely be due to rapid diffusion and desorption of the surface-adsorbed carotenoids. The initial high release rate in the beginning stage could have caused an accumulation of the pigments in the foods simulant and, consequently, caused the subsequent dispersion in the pores and inner core of the nanospheres very difficult, especially after 12 h, as shown in other studies. (GUAN *et al.*, 2011; YADAV *et al.*, 2018).



**Figure 3.** Release of pigment from bixin nanospheres (NB) and norbixin nanospheres (NN) at 25 °C and 40 °C in ethanol 95%.

Many factors could influence the addition and release of active compounds, like the interaction between polymer matrix and additive, the biopolymer solubility, polymer matrix mobility within the food simulant, temperature, time, and the additive solubility in food simulant (MIRZAEI-MOHKAM *et al.*, 2019).

The kinetics models applied to the release of carotenoids were zero-order, first-order, Higuchi, and Korsmeyer-Peppas, on the premise that they behave like spherical devices (Table 5). These equations are useful for predicting the impact of the particle characteristics on the release rate of encapsulated bioactive agents. The kinetic model that best described the experimental data was selected based on the highest correlation coefficients ( $R^2$ ) - an indicator of the suitability of the mathematical model for a given dataset.

The release curve of the carotenoids in high-fat food simulant showed a high fit to the Higuchi kinetics model, which describes a system where the drug concentration in the matrix is less than its solubility, and release occurs through a porous system, revealing the characteristics of the matrix of the nanospheres and that the release mechanism is primarily diffusion-controlled. With that said, the Korsmeyer-Peppas model, generally used to analyze

the release of active compounds from polymeric micro/nanocapsules when the release mechanism is not very understood or when there is more than one type of release mechanism (PEPPAS; SAHLIN, 1989; TAVARES *et al.*, 2016), was used to identify which type of diffusion is involved in the release by calculating the diffusional exponent (n) (MALEKJANI; JAFARI, 2021; TANQUARY; LACEY, 1974-) and showed an even better fit.

**Table 5.** Release kinetics parameters of bixin (NB) and norbixin (NN) nanospheres.

Samples	MATHEMATICAL MODELS									
	Zero Ordem		First Ordem		Higuchi $M_t/M_\infty = k_H t^{1/2}$		Korsmeyer-Peppas $M_t/M_\infty = kt^n$			D $k_H \cdot \pi \cdot r / 4^*$
	R <sup>2</sup>	k (mgh.mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	K (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	k <sub>H</sub> (h <sup>-1/2</sup> )	R <sup>2</sup>	K <sub>kp</sub> (h <sup>-n</sup> )	n	x10 <sup>-5</sup> (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
NB 25 °C	0.466	1.545	0.305	0.064	0.769	12.117	0.798	1.006	0.689	5.927
NB 40 °C	0.402	0.899	0.339	0.025	0.690	9.313	0.797	1.416	0.262	4.556
NN 25 °C	0.482	0.983	0.321	0.056	0.779	7.813	0.810	0.914	0.599	3.636
NN 40 °C	0.497	0.370	0.354	0.029	0.752	3.514	0.830	0.933	0.305	1.635

\*(MALEKJANI; JAFARI, 2021)

The release profile of both bixin and norbixin nanospheres at 25 °C, when the n-value is between 0.5 and 1, is called anomalous or non-Fickian transfer. The mechanism involved is both diffusion and swelling of hydrophilic polymer chains where the polymeric chains rearrange slowly, and simultaneously, the diffusion process results in a time-dependent anomalous effect (release depends on both solvent transport rate and polymer relaxation rate) (MALEKJANI; JAFARI, 2021). Moreover, bixin and norbixin nanospheres exposed to 40 °C temperature presented n-values below 0.5. These values indicate what is called pseudo-Fickian behavior. The term pseudo-Fickian has been used to describe sorption-desorption curves of the same general shape and disposition of the Fickian behavior, but for which the initial portion persists for a shorter time (CRANK, 1975). Theoretical predictions using the above mathematical models suggest that even when hydrogel particles have relatively small pore sizes, the release of small bioactive molecules would be fast (ZHANG, Z. *et al.*, 2015).

When the pore size is much larger than the bioactive dimensions, the diffusion coefficient of the molecule is high and related to the porosity and tortuosity of the hydrogel network. In this case, the diffusion coefficient (D) was smaller in the norbixin nanospheres (that have smaller diameters sizes) than the bixin nanospheres. The affinity of each carotenoid for ethanol could explain the differences in release profiles amongst the pigments. Bixin presents a methyl ester end-group in its chemical structure, which may exhibit better interaction with ethanol since it simulates food with a high-fat content (KOOP *et al.*, 2022; MONGE NETO *et al.*, 2021). In addition to the lipophilic character of bixin facilitating the diffusion of the pigment

in alcohol, the greater affinity of norbixin with the alginate solution that promoted a greater encapsulation efficiency could also help retain this pigment in the nanosphere (LIU *et al.*, 2022).

Analyses conducted with acid and non-acid food simulants (acetic acid solution and distilled water, respectively) did not show the release of bixin and norbixin pigments, which could indicate that bixin and norbixin nanospheres could have a better application among lipid-rich foods.

#### **4 Conclusion**

The results from the present study demonstrated that it was possible to produce bixin and norbixin nanospheres using sodium alginate by the emulsification/internal gelation method. Norbixin nanospheres presented a better encapsulation efficiency, showing that hydrophilic compounds are more suitable for this encapsulation method. The thermal properties indicate an increase in the thermal stability of the bioactive compounds. Additionally, obtained results suggest some antioxidant capacity and a great release of the carotenoids in fat food simulant, which turns bixin and norbixin nanospheres into a promising and attractive natural additive to incorporate into food matrices or food packaging.

#### **Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

#### **Human and animal rights**

No animals/humans were used for studies that are the basis of this research.

#### **Consent for publication**

Not applicable.

#### **Funding**

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) for providing financial support.

#### **Availability of data and materials**

Not applicable.

#### **Conflict of interest**

None.

## Acknowledgements

We thank Dra. Karina Paese of the Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos in the Pharmacy Department of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) for the assistance in particle size distribution analysis equipment.

## References

- AHMED, M. M. *et al.* Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium-sodium alginate microparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 61–69, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.004>.
- ASSIS, R. Q. *et al.* Active food packaging of cellulose acetate: Storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants. **Food Chemistry**, v. 349, n. July 2020, p. 129140, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129140>.
- ATHAMNEH, T. *et al.* Alginate and hybrid alginate-hyaluronic acid aerogel microspheres as potential carrier for pulmonary drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 150, p. 49–55, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.04.013>.
- BITENCOURT, A. P. R. *et al.* Preparation of aqueous nanodispersions with annatto (*Bixa orellana* L.) extract using an organic solvent-free and low energy method. **Food Chemistry**, v. 257, n. February, p. 196–205, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.067>.
- CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. de T.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1689–1693, 2008.
- CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4646–4654, 2006.
- CHISTÉ, R. C. *et al.* In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.
- CRANK, J. **THE MATHEMATICS OF DIFFUSION**. 1975.
- DE CAMPO, C. *et al.* Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: Characterization and stability evaluation under different temperatures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 558, n. May, p. 410–421, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.009>.
- DE OLIVEIRA, G. L. R. *et al.* Antioxidant stability enhancement of carotenoid rich-extract from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.) nanoencapsulated in gelatin under different storage conditions. **Food Chemistry**, v. 348, n. December 2020, 2021.
- DE SOUSA, R. C. *et al.* Characterization and assessment of the genotoxicity and biocompatibility of poly (Hydroxybutyrate) and norbixin membranes. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1–12, 2020.

DENG, Z. *et al.* Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application. **Food Hydrocolloids**, v. 89, n. November 2018, p. 691–699, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.031>.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, n. 2, p. 532–538, 1989.

FLAMMINI, F. *et al.* Alginate-based microparticles structured with different biopolymers and enriched with a phenolic-rich olive leaves extract: A physico-chemical characterization. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 698–706, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.10.001>.

FUNAMI, T. *et al.* Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1746–1755, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.014>.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GHOSH, S. *et al.* Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. **Lwt**, v. 153, n. July 2021, p. 112527, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112527>.

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, n. 1, p. 167–193, 2010.

GUAN, H. *et al.* Encapsulated eddyson by internal gelation of alginate microspheres for controlling its release and photostability. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 1, p. 94–101, 2011.

HOSSEINI, S. F.; JAVIDI, Z.; REZAEI, M. International Journal of Biological Macromolecules Efficient gas barrier properties of multi-layer films based on poly (lactic acid) and fish gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1205–1214, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.034>.

KHOO, H. *et al.* Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables, p. 1710–1738, 2011.

KIM, S.; PARK, J. B.; HWANG, I. K. Quality attributes of various varieties of Korean red pepper powders (*Capsicum annuum* L.) and color stability during sunlight exposure. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2957–2961, 2002.

KOOP, B. L. *et al.* Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: Sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. **Food Research International**, v. 153, n. January, 2022.

KRINSKY, N. I. Carotenoid protection against oxidation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 649–660, 1979.

KUROZAWA, L. E.; HUBINGER, M. D. Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic

gelation. **Current Opinion in Food Science**, v. 15, p. 50–55, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.004>.

LEONG, J. Y. *et al.* Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44–60, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2015.09.004>.

LI, R.; ZHANG, X.; SHI, H. Effect of manufacturing parameters on the release profiles of casein-loaded alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 152 Suppl, n. 2011, p. e154–e155, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.058>.

LIU, H. *et al.* Utilization of protein nanoparticles to improve the dispersibility, stability, and functionality of a natural pigment: Norbixin. **Food Hydrocolloids**, v. 124, n. PB, p. 107329, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107329>.

LOBATO, K. B. de S. *et al.* Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3906–3912, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.135>.

LUPO, B. *et al.* Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 25–34, 2015.

LYNG, S. M. O.; PASSOS, M.; FONTANA, J. D. Bixin and  $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 865–872, 2005.

MALEKJANI, N.; JAFARI, S. M. Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 3–47, 2021.

MARTÍN-VILLENA, M. J. *et al.* Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.005>.

MARTÍN, M. J. *et al.* Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 140–149, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.032>.

MILLER, N. J. *et al.* Antioxidant Properties of Carotenes and Xanthophylls. **FEBS Letters**, v. 384, n. 3, p. 240–242, 1996.

MIRANDA, C. G. *et al.* Influence of nanoencapsulated lutein on acetylcholinesterase activity: In vitro determination, kinetic parameters, and in silico docking simulations. **Food Chemistry**, v. 307, n. March 2019, p. 125523, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125523>.

MIRZAEI-MOHKAM, A. *et al.* Optimisation, antioxidant attributes, stability and release behaviour of carboxymethyl cellulose films incorporated with nanoencapsulated vitamin E. **Progress in Organic Coatings**, v. 134, n. April, p. 333–341, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.05.026>.

MOKHTARI, S.; JAFARI, S. M.; ASSADPOUR, E. Development of a nutraceutical nano-delivery system through emulsification/internal gelation of alginate. **Food Chemistry**, v. 229, p. 286–295, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.071>.

MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. Color difference Delta E - A survey colour difference  $\Delta E$  - A survey faculty of mathematics and Informatics. **Machine Graphics and Vision**, v. 20, n. 4, p. 383–411, 2011.

MONGE NETO, A. Á. *et al.* Direct microencapsulation of an annatto extract by precipitation of psyllium husk mucilage polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 112, n. September 2020, 2021.

MUHAMAD, I. I. *et al.* **Improving the delivery system and bioavailability of beverages through nanoencapsulation**. Elsevier Inc., 2019. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816677-2.00010-7>.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 139–148, 2011.

NARANJO-DURÁN, A. M. *et al.* **Modified-release of encapsulated bioactive compounds from annatto seeds produced by optimized ionic gelation techniques**. 2021.

NAWADE, B. *et al.* Analysis of apocarotenoid volatiles during the development of *Ficus carica* fruits and characterization of carotenoid cleavage dioxygenase genes. **Plant Science**, v. 290, n. September 2019, p. 110292, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110292>.

OZKAN, G. *et al.* A review of microencapsulation methods for food antioxidants : Principles , advantages , drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, n. February 2018, p. 494–506, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205>.

PAIBOON, N. *et al.* Internal gelation of alginate microparticle prepared by emulsification and microfluidic method: Effect of Ca-EDTA as a calcium source. **Food Hydrocolloids**, v. 141, n. March, p. 108712, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108712>.

PAQUES, J. P. *et al.* Nanospheres of alginate prepared through w/o emulsification and internal gelation with nanoparticles of CaCO<sub>3</sub>. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 182–188, 2014.

PASCOAL, K. L. L. *et al.* Physical-chemical characterization, controlled release, and toxicological potential of galactomannan-bixin microparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1239, p. 130499, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130499>.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169–172, 1989.

PINZÓN-GARCÍA, A. D. *et al.* Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded PCL nanofibers in diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 7, p. 1938–1949, 2017.

- PONCELET, D. *et al.* Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 39–45, 1992.
- PRAJAPATI, R. A.; JADEJA, G. C. Natural food colorants: Extraction and stability study. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.151>.
- QUONG, D. *et al.* External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 4, p. 438–446, 1998.
- RADDATZ-MOTA, D. *et al.* Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1729–1741, 2017.
- RAHNEMOON, P. *et al.* Nano-encapsulation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract and evaluation of its antimicrobial properties on coated chicken meat. **Food Bioscience**, v. 43, n. August, p. 101331, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101331>.
- RE, R. *et al.* ABTS Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999. Disponível em: [papers2://publication/uuid/D19B31A4-6A88-4AED-B42A-6459E2D35AA0](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10811411/).
- REIS, C. P. *et al.* Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 5, p. 392–397, 2007.
- RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. **Biomaterials**, v. 25, p. 4363–4373, 2004.
- RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 2, p. 125–133, 2004.
- RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. **Dyes and Pigments**, v. 74, n. 3, p. 561–565, 2007.
- RODRIGUES, E. *et al.* Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 704–711, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.163>.
- ROSS, A. B. *et al.* Influence of cation on the pyrolysis and oxidation of alginates. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 91, n. 2, p. 344–351, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2011.03.012>.
- SADEGHI, D. *et al.* Preparation of internally-crosslinked alginate microspheres: Optimization of process parameters and study of pH-responsive behaviors. **Carbohydrate Polymers**, v. 255, n. November, p. 117336, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117336>.
- SANTOS, P. P. dos *et al.* Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 23–33, 2016.

SATYANARAYANA, A.; RAO, P. G. P.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of Annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 131–141, 2003.

SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: A review. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 26, n. 8, p. 1123–1145, 2009.

SHAHID-UL-ISLAM; RATHER, L. J.; MOHAMMAD, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 499–514, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>.

SILVA, C. M. *et al.* Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1–2, p. 1–10, 2006.

SILVA, C. M. *et al.* Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 148–159, 2006.

SRIDHAR, K.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Recent advances on nanoparticle based strategies for improving carotenoid stability and biological activity. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, 2021.

STOJANOVIC, R. *et al.* Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 685–696, 2012.

STOLL, L. *et al.* Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films, **Food Bioprocess Technology**, p. 172–181, 2016.

TANQUARY, A. C.; LACEY, R. E. **Controlled release of biologically active drugs**. 1974-. ISSN 00482986.v. 47

TAVARES, J. K. *et al.* Modeling of the controlled release of betacarotene into anhydrous ethanol from microcapsules. **OpenNano**, v. 1, p. 25–35, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.onano.2016.05.001>.

TUPUNA, D. S. *et al.* Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops & Products**, v. 111, n. July 2017, p. 846–855, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.001>.

UYEN, N. T. T. *et al.* Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 1035–1046, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233>.

UYEN, N. T. T. *et al.* Synthesis and characterization of curcumin loaded alginate microspheres for drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, n. April, p. 101796, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101796>.

UYEN, N. T. T.; HAMID, Z. A. A.; NURAZREENA, A. Fabrication and characterization of alginate microspheres. **Materials Today: Proceedings**, v. 17, p. 792–797, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.364>.

VALLEJO-CASTILLO, V. *et al.* Development of alginate-pectin microcapsules by the extrusion for encapsulation and controlled release of polyphenols from papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1–17, 2020.

VANDENBERG, G. W.; DE LA NOÛE, J. Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 4, p. 433–441, 2001.

YADAV, S. K. *et al.* Design, optimization and characterizations of chitosan fortified calcium alginate microspheres for the controlled delivery of dual drugs. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 1180–1193, 2018.

ZHANG, Z. *et al.* Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 698–716, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.013>.

ZHANG, R. *et al.* Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/internal gelation followed by spray/freeze-drying techniques: Characterization, stability and bioaccessibility. **Lwt**, v. 123, n. September 2019, p. 109097, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109097>.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 1–9, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.009>.

## **CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## 7 DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, devido aos problemas enfrentados com o descarte do lixo e decorrentes consequências ao meio ambiente, os plásticos sintéticos derivados de petróleo têm se tornado cada vez mais uma preocupação recorrente. Apesar de já existirem métodos eficazes de reciclagem, apenas uma pequena porcentagem do plástico descartado é reciclada e a grande maioria são produzidos para suprir necessidades da indústria alimentícia e de bebidas. Portanto, embalagens produzidas de fontes poliméricas biodegradáveis e renováveis podem ser alternativas importantes para indústria de alimentos. Além disso, a incorporação de compostos que podem melhorar a qualidade da embalagem e além disso atribuir uma funcionalidade, como atividade antioxidante, pode agregar ainda mais valor na manutenção da qualidade dos alimentos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes biodegradáveis a partir de alginato de sódio com incorporação de compostos bioativos encapsulados em matriz polimérica de alginato de sódio. Sendo assim, foram desenvolvidas nanoesferas de alginato de sódio incorporadas de bixina e norbixina em diferentes concentrações ( $1,25 \times 10^{-3}$ ,  $2,5 \times 10^{-3}$ ,  $5,0 \times 10^{-3}$  e  $7,5 \times 10^{-3}$  g/g de biopolímero). Em seguida, a eficiência de encapsulamento desses compostos nas nanoesferas foi analisada, e a concentração com maior eficiência foi escolhida para demais análises de caracterização em relação ao tamanho de partícula, cor, propriedades térmicas, capacidade antioxidante e também a liberação desses carotenoides em meio simulante de alimentos ricos em lipídeos, e as nanoesferas de alginato de sódio incorporadas com bixina ( $7,5 \times 10^{-3}$  g/g de biopolímero) obtiveram uma melhor liberação. Com esses resultados, as nanoesferas com maior concentração de bixina foram escolhidas para serem incorporadas em filmes biodegradáveis de alginato de sódio elaborados por casting com dupla complexação, para avaliação da interação desses compostos encapsulados com a matriz polimérica através da determinação das propriedades físico-químicas, térmicas e de barreira dos filmes. Enfim, de acordo com os resultados obtidos foram desenvolvidos dois artigos científicos:

- Nanoencapsulation of bixin and norbixin in sodium alginate: preparation, characterization, and release in food simulant.
- Development of biodegradable sodium alginate films with antioxidant properties containing bixin nanospheres.

A primeira etapa do trabalho foi o encapsulamento dos compostos bioativos, bixina e norbixina. A bixina e a norbixina são apocarotenoides presentes nas sementes da planta urucum, com alta capacidade de pigmentação (em cores que variam do amarelo ao vermelho) e já são

amplamente utilizados como pigmentos naturais na indústria alimentícia, devido a fácil obtenção e baixo custo. Sua propriedade de interesse, assim como outros carotenoides, é a sua alta capacidade antioxidante. O alginato de sódio é um biopolímero, biodegradável, extraído de algas marrons, de baixo custo e atóxico, tem sido muito utilizado para encapsulamento e produção de filmes biodegradáveis. Portanto, o alginato de sódio foi utilizado como matriz polimérica para a elaboração de nanoesferas de bixina e norbixina através do método de emulsificação/gelificação interna. Esse método foi escolhido por ser um método simples, em que são utilizados equipamentos de fácil acesso, reagentes de grau alimentício e temperatura ambiente (importante para conservar a estrutura dos compostos ativos).

Foram produzidas nanoesferas com diferentes concentrações de pigmentos, e a maior concentração ( $7,5 \times 10^{-3}$  g/g de biopolímero) utilizada apresentou melhor eficiência de encapsulamento, tanto para bixina, quanto para norbixina, mas em comparação, a norbixina apresentou a melhor eficiência. Isso se deve ao fato da norbixina possuir uma carbonila substituído o terminal éster metil presente na bixina, tornando-a uma molécula mais hidrofílica, melhorando a interação com a fase aquosa do alginato no processo de emulsificação/gelificação interna. A partir disso, as nanoesferas de bixina e norbixina com maior concentração de pigmento foram analisadas quanto ao tamanho de partícula, análise colorimétrica, propriedades térmicas, capacidade antioxidante e liberação em simulante de alimentos ricos em lipídeos.

A distribuição do tamanho de partícula mostrou diferença significativa nos tamanhos de diâmetros médios (741,9 nm, 622,9 nm, e 589,5 nm, para as nanoesferas controle, de bixina e de norbixina, respectivamente). Os resultados mostraram que os parâmetros utilizados e o método de emulsificação/gelificação interna foram capazes de produzir partículas de ordem nanométricas. A bixina e a norbixina afetaram as cores das nanoesferas, com diferenças visíveis entre elas. O encapsulamento desses compostos ativos com alginato de sódio pode ter aumentado a estabilidade térmica dos pigmentos, visto que o evento termal que indica degradação da bixina e norbixina foi deslocado para a temperatura de degradação do alginato de sódio. A bixina e a norbixina possuem uma longa cadeia carbônica e 9 ligações conjugadas capazes de sequestrar radicais livres e espécies reativas de oxigênio e dissipar sua energia, portanto, assim como esperado, as nanoesferas de bixina e norbixina apresentaram capacidade antioxidante.

A liberação dos carotenoides em simulante de alimentos ricos em lipídeos (etanol 95%) pode indicar a interação das nanoesferas com esses alimentos, para que esses compostos exerçam suas propriedades em contato com os alimentos. Depois de um período de 24h, tanto as nanoesferas de bixina como norbixina já haviam atingido o máximo de liberação tanto em

25 °C quanto 40 °C. Entretanto, a nanoesferas de bixina apresentaram maiores valores de liberação (maiores que 50%). A liberação rápida inicialmente pode ser devido à rápida difusão e desorção dos carotenoides adsorvidos na superfície da nanoesferas, e a alta taxa de liberação inicial pode ter causado um acúmulo dos pigmentos no líquido simulante e dificultado a posterior dispersão nos poros e no núcleo interno das nanosferas, principalmente após 12 h.

Modelos matemáticos foram aplicados para entender melhor a cinética de liberação dos compostos no líquido simulante. A curva de liberação apresentou melhor ajuste ao modelo cinético de Higuchi, onde a liberação ocorre através de um sistema poroso e que o mecanismo de liberação é principalmente controlado por difusão. Com isso, a curva foi ajustada ao modelo Korsmeyer-Peppas também, por ser utilizado para analisar a liberação de compostos ativos a partir de micro/nanocápsulas e para identificar qual tipo de difusão está envolvida na liberação por meio do cálculo do expoente difusional ( $n$ ). Para os perfis de liberação das nanoesferas de bixina e norbixina a 25 °C (valor  $n$ : entre 0,5 e 1,0), existe uma transferência anômala ou não-Fickiana (a liberação depende da taxa de transporte do solvente e da taxa de relaxamento do polímero). E para os perfis de liberação das nanoesferas de bixina e norbixina em 40 °C, os valores de  $n$  foram abaixo de 0,5, que indicam o comportamento pseudo-Fickiano. Em conclusão, as previsões teóricas obtidas pela aplicação dos modelos matemáticos sugerem que mesmo que as partículas tenham tamanhos de poros relativamente pequenos, a liberação de pequenas moléculas de compostos bioativos seria rápida. Afinidade da bixina com solventes lipofílicos também pode explicar a diferença nos perfis de liberação da nanoesfera de bixina e norbixina. Além disso, o caráter hidrofílico da norbixina com a solução de alginato que promoveu maior eficiência de encapsulamento também poderia ajudar a reter esse pigmento na nanoesfera. Análises prévias foram realizadas com simuladores de alimentos ácidos e não ácidos (solução de ácido acético e água destilada, respectivamente) e não foi possível detectar a liberação, o que indica que as nanoesferas de bixina e norbixina poderiam ter melhor aplicação entre alimentos ricos em lipídios.

Devido ao bom desempenho das nanoesferas de bixina em alimentos ricos em lipídeos e a intenção de avaliar a aplicação dos filmes biodegradáveis de alginato nesse tipo de alimentos, elas foram escolhidas para serem incorporadas aos filmes com a intenção de trazer atividade antioxidante para aplicação em alimentos gordurosos susceptíveis a oxidação lipídica.

Os resultados do trabalho mostraram que foi possível obter filmes biodegradáveis de alginato de sódio incorporados de nanoesferas de bixina em diferentes concentrações (1, 5 e 10%, m de nanoesfera/m de biopolímero) usando a técnica de casting com um estágio extra de complexação. Para analisar o comportamento dos filmes em relação a água, importante para

entender a relação da embalagem com o alimento (que pode ser rico em água ou não) e com o ambiente, foram analisados a umidade dos filmes, a solubilidade em água, a capacidade de inchamento e a permeabilidade ao vapor de água.

Com a adição das nanoesferas houve uma diminuição na umidade dos filmes quando comparados com o filme controle. Além disso, solubilidade dos filmes com 10% de nanoesferas bixina em água também diminuiu consideravelmente. Essa é uma característica importante, pois, a maioria dos filmes biodegradáveis apresentam alta solubilidade em água, e por isso há uma dificuldade de utilização dos mesmos em alimentos úmidos. Houve também uma diminuição na capacidade de inchamento do filme e da permeabilidade ao vapor de água, mais uma indicação de que a adição da nanoesferas mudou a matriz polimérica e o filme com maior concentração de nanoesferas ficou menos hidrofílico, sendo assim as nanoesferas de bixina podem ter aumentado as forças iônicas nas cadeias poliméricas do alginato, compactando a estrutura do filme e diminuindo os espaços intersticiais. Assim como a solubilidade em água, a permeabilidade ao vapor de água também é importante na embalagem para garantir a manutenção da estabilidade dos alimentos quanto a umidade relativa do ar, principalmente no caso de alimentos com baixa atividade de água.

Os resultados também mostraram um aumento da espessura do filme com a adição de nanoesferas de bixina, que está relacionado com a melhora das propriedades mecânicas, em comparação com os filmes de alginato de sódio controle, principalmente os filmes adicionados de 10% de nanoesferas de bixina, que apresentaram propriedades mecânicas moderadas, com um aumento da resistência à tração e do alongamento na ruptura comparado aos filmes de controle.

Devido a capacidade de a bixina conferir cor, foram analisadas a cor, opacidade e transmissão de luz dos filmes. Apenas a adição de 10% de nanoesferas de bixina produziu diferença considerada visível a olho nu nos filmes e diferença significativa nos incrementos de intensidade de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ). O aumento da concentração também levou a uma maior barreira à transmissão de luz e maior opacidade. Uma melhor barreira é importante para manutenção da qualidade e estabilidade de produtos susceptíveis a fotodegradação, como por exemplo alimentos com alto teor de lipídeos. A análise térmica mostrou que a adição das nanoesferas não prejudicou a estabilidade térmica dos filmes, e a bixina seguiu preservada em concentrações maiores que 5%.

A análise de biodegradabilidade dos filmes é importante para analisar como é a perda de massa em ambiente que simula o local onde os resíduos são depositados. Os filmes de alginato de sódio sem complexação são altamente solúveis em água e se degradam totalmente

em menos de um mês, entretanto, filmes com dois estágios de complexação com cloreto de cálcio e plastificantes já se mostraram mais resistentes a degradação, assim como o produzido nesse trabalho. A adição das nanoesferas diminuiu a perda de massa com o tempo também. Esse resultado está diretamente relacionado com as mudanças nas propriedades do filme, como solubilidade principalmente, e sugerem que a estrutura química dos filmes sofreu alterações que levaram ao formam de um filme mais resistente e capaz de manter sua integridade estrutural por quinze dias. O filme com maior concentração de nanoesferas (10%) mostrou melhores resultados na maioria das análises e foi escolhido para ser aplicado na análise antioxidante do filme.

Além da caracterização e determinação de todos as propriedades dos filmes, é importante avaliar sua interação e potencial aplicação como embalagem de alimentos. A atividade antioxidante da embalagem foi analisada através do armazenamento do óleo de girassol sob condições controladas para oxidação nos filmes. Alimentos com alto teor de lipídeos, como o óleo de girassol, quando expostos a altas temperaturas e alta incidência de luz podem sofrer foto e termodegradação, e a oxidação desses compostos leva à formação de compostos como peróxidos, dienos e trienos conjugados. Os filmes biodegradáveis de alginato de sódio com adição de 10% de nanoesferas de bixina mostraram melhor efeito protetor contra a oxidação do óleo de girassol durante o armazenamento por 12 dias, e garantiram a manutenção da estabilidade e qualidade oxidativa do óleo.

Portanto, o estudo mostrou que o alginato de sódio é um importante polímero biodegradável que pode ser aplicado tanto para o encapsulamento de compostos bioativos como para a fabricação de filmes e embalagens com boas propriedades físico-químicas, mecânicas e de barreira, e que compostos com alta capacidade antioxidante quando encapsulados ou incorporados em embalagens ainda podem exercer seu papel de desativar espécies reativas. É importante o estudo de novas alternativas e substituições a embalagens derivadas de petróleo, que podem trazer melhoria para a manutenção da qualidade dos alimentos e do meio ambiente.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo demonstraram que o alginato de sódio representa um biopolímero importante para o encapsulamento de compostos bioativos e para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis para aplicação em alimentos. Foram produzidas nanoesferas de bixina e norbixina pelo método de emulsificação/gelificação interna, onde as nanoesferas de norbixina apresentaram melhor eficiência de encapsulamentos, mostrando que compostos hidrofílicos são mais apropriados para encapsulamento por essa metodologia, mas que ela permite também o encapsulamento de composto lipofílicos como a bixina. A nanoesfera aumentou a estabilidade térmica dos pigmentos, e além disso, apresentou capacidade antioxidante e boa liberação em meio simulante de alimentos ricos em lipídeos. Foram produzidos filmes biodegradáveis de alginato de sódio com incorporação de nanoesferas de bixina, que melhorou as propriedades mecânicas e de barreira do filme e mostrou atividade antioxidante ao proteger o óleo de girassol contra a oxidação durante o armazenamento. Portanto, os filmes de alginato de sódio com adição de nanoesferas de bixina podem ser uma alternativa biodegradável, sustentável e ativa para embalagem de alimentos ricos em lipídeos.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para melhor entender a potencial uso do alginato de sódio como matriz polimérica em processos de nanoencapsulamento e produção de embalagens biodegradáveis. Além de avaliar a adição de carotenoide como antioxidantes naturais encapsulados e avaliar sua estabilidade e interação com o polímero, com o meio, e com os alimentos. Assim, para dar continuidade, complementar e aprofundar este trabalho, pode-se sugerir:

- Estudo do encapsulamento de diferentes carotenoides com alginato de sódio pelo método de emulsificação/gelificação interna para produção de nanoesferas;
- Avaliar a aplicação das nanoesferas em diferentes alimentos e bebidas, e a liberação de antioxidantes nos alimentos;
- Estudo da adição das nanoesferas em filmes com outras matrizes poliméricas, para aumentar a concentração dos compostos bioativos;
- Aplicação da bixina livre em filmes de alginato de sódio;
- Avaliação da estabilidade dos filmes durante o armazenamento;
- Aplicação dos filmes com nanoesferas de bixina como embalagem para diferentes matrizes alimentícias e seu efeito na vida útil destes alimentos;
- Determinação da permeabilidade a gases, principalmente ao oxigênio, para complementar a caracterização dos filmes e sua indicação/direcionamento na aplicação como materiais de embalagens;
- Avaliar a característica morfológica dos filmes através de análises como microscopia eletrônica de varredura.

**REFERÊNCIAS**

AHMED, M. M. *et al.* Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium-sodium alginate microparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 61–69, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.004>.

ANDRADE, L. D. A.; FLO, S. H.; RIOS, A. D. O. Nanoencapsulation of carotenoids: a focus on different delivery systems and evaluation parameters. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. October, p. 3851–3860, 2018.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. ed.: AOCS Press, 1994.

ARZATE-VÁZQUEZ, I. *et al.* Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 289–299, 2012.

ASSIS, R. Q. *et al.* Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. **Industrial Crops & Products**, v. 109, n. March, p. 818–827, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.043>.

ASSIS, R. Q. *et al.* Active food packaging of cellulose acetate: Storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants. **Food Chemistry**, v. 349, n. July 2020, p. 129140, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129140>.

ASSIS, R. Q. *et al.* Biodegradable packaging of cellulose acetate incorporated with norbixin, lycopene or zeaxanthin. **Industrial Crops and Products**, v. 147, n. January, p. 112212, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112212>.

ASSIS, R. Q. *et al.* Synthesis of biodegradable films based on cassava starch containing free and nanoencapsulated  $\beta$  - carotene. **Packaging Tecnology and Science**, v. 2018, n. August, p. 1–10, 2018.

ASTM. ASTM E96-95. ASTM, 2000. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/336879226>.

ASTM D 882-02. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International. ASTM, p. 1–12, 2002. Disponível em: <http://www.ansi.org>.

ATHAMNEH, T. *et al.* Alginate and hybrid alginate-hyaluronic acid aerogel microspheres as potential carrier for pulmonary drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 150, p. 49–55, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.04.013>.

BARBOSA, M. I. M. J. 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, n. 8–9, p. 989–994, 2005.

BEKIN, S. *et al.* Dielectric, Thermal, and Swelling Properties of Calcium Ion-Crosslinked Sodium Alginate Film. **POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE**, p. 1372–1382, 2014.

BENAVIDES, S. *et al.* Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77–83, 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.104>.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical , mechanical and antibacterial properties of alginate film : Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 232–239, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.023>.

BITENCOURT, A. P. R. *et al.* Preparation of aqueous nanodispersions with annatto (*Bixa orellana* L.) extract using an organic solvent-free and low energy method. **Food Chemistry**, v. 257, n. February, p. 196–205, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.067>.

BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, n. 5628, p. 2089–2091, 2003.

CAMPO, C. De *et al.* Gelatin capsule waste: new source of protein to develop a biodegradable film. **Polímeros**, v. 27, n. 2, p. 100–107, 2017.

CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. de T.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1689–1693, 2008.

CARISSIMI, M.; FLÔRES, S. H.; RECH, R. Effect of microalgae addition on active biodegradable starch film. **Algal Research**, v. 32, n. January, p. 201–209, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.001>.

CAZÓN, P. *et al.* Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136–148, 2017.

CHA, D. S. U.; CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging : a review Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging : A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, 2010.

CHAN, E. S. *et al.* Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 1, p. 63–72, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.05.027>.

CHAN, E. S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1267–1275, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.015>.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1–2, p. 259–262, 2002.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4646–4654, 2006.

CHISTÉ, R. C. *et al.* In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.

COMMITTEE, E. S. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and

nanotechnologies in the food and feed chain. **EFSA Journal**, v. 9, n. 5, p. 1–36, 2011.

COSTA, M. J. *et al.* Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 442–448, 2018.

CRANK, J. **THE MATHEMATICS OF DIFFUSION**. 1975.

DE CAMPO, C. *et al.* Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: Characterization and stability evaluation under different temperatures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 558, n. May, p. 410–421, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.009>.

DE OLIVEIRA, G. L. R. *et al.* Antioxidant stability enhancement of carotenoid rich-extract from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.) nanoencapsulated in gelatin under different storage conditions. **Food Chemistry**, v. 348, n. December 2020, 2021.

DE SOUSA, R. C. *et al.* Characterization and assessment of the genotoxicity and biocompatibility of poly (Hydroxybutyrate) and norbixin membranes. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1–12, 2020.

DE VOS, P. *et al.* Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292–302, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Edible films and coatings : tomorrow's packagings : a review. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, n. 4, p. 299–313, 2010.

DEEPA, B. *et al.* Biodegradable Nanocomposite films based on sodium alginate and cellulose nanofibrils. **Materials**, v. 9, n. 50, p. 1–11, 2016.

DENG, Z. *et al.* Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application. **Food Hydrocolloids**, v. 89, n. November 2018, p. 691–699, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.031>.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, n. 2, p. 532–538, 1989.

DILKES-HOFFMAN, L. S. *et al.* Environmental impact of biodegradable food packaging when considering food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 325–334, 2018.

DOH, H.; DUNNO, K. D.; WHITESIDE, W. S. Cellulose nanocrystal effects on the biodegradability with alginate and crude seaweed extract nanocomposite films. **Food Bioscience**, v. 38, n. October, 2020.

DURSUN CAPAR, T. Characterization of sodium alginate-based biodegradable edible film incorporated with *Vitis vinifera* leaf extract: Nano-scaled by ultrasound-assisted technology. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 37, n. May 2022, p. 101068, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101068>.

EL-AGAMEY, A. *et al.* Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties.

**Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, n. 1, p. 37–48, 2004.

EUROPEAN, C. F. T. C. T. T.; PARLIAMENT, THE COUNCIL, T. E. E. A. S. C. A. T. C. O. T. R. A European Strategy for Plastics in a Circular Economy. **EUROPEAN COMMISSION**, v. 30, n. 11, p. 577–580, 2018.

EZHILARASI, P. N. *et al.* Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628–647, 2013.

FANG, Y. *et al.* Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 188–193, 2002.

FARIAS, Y. B. *et al.* Biodegradable sodium alginate films incorporated with norbixin salts. **Journal of Food Process Engineering**, v. 43, n. 2, 2020.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. *et al.* Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 438–450, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.007>.

FLAMMINI, F. *et al.* Alginate-based microparticles structured with different biopolymers and enriched with a phenolic-rich olive leaves extract: A physico-chemical characterization. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 698–706, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.10.001>.

FUNAMI, T. *et al.* Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1746–1755, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.014>.

FUNDUEANU, G. *et al.* Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, n. 1, p. 11–21, 1998.

GADZIŃSKI, P. *et al.* Iontropic gelation and chemical crosslinking as methods for fabrication of modified-release gellan gum-based drug delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, 2023.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GHOSH, S. *et al.* Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. **Lwt**, v. 153, n. July 2021, p. 112527, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112527>.

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, n. 1, p. 167–193, 2010.

GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 1–12, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.012>.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 7–8, p. 330–347, 2004.

- GUAN, H. *et al.* Encapsulated ecdysone by internal gelation of alginate microspheres for controlling its release and photostability. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 1, p. 94–101, 2011.
- HADI, A. *et al.* Alginate/aloe vera films reinforced with tragacanth gum. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 4, n. March, p. 100105, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100105>.
- HENG, P. W. S. *et al.* Formation of alginate microspheres produced using emulsification technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 3, p. 401–413, 2010.
- HOSSEINI, S. M. *et al.* Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 582–588, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054>.
- HOSSEINI, S. F.; JAVIDI, Z.; REZAEI, M. Efficient gas barrier properties of multi-layer films based on poly (lactic acid) and fish gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1205–1214, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.034>.
- HUANG, J. *et al.* Development and evaluation of lutein-loaded alginate microspheres with improved stability and antioxidant. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 11, p. 5195–5201, 2019.
- IAHNKE, A. O. e S. *et al.* Residues of minimally processed carrot and gelatin capsules: Potential materials for packaging films. **Industrial Crops & Products**, v. 76, p. 1071–1078, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.025>.
- IMESON, A. **Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents**. 2009.
- JANISZEWSKA-TURAK, E. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. **Food Research International**, v. 99, p. 891–901, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.001>.
- JANJARASSKUL, T.; KROCHTA, J. M. Edible Packaging Materials. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 415–448, 2010.
- JOMOVÁ, K. *et al.* Electron transfer from all-trans  $\beta$ -carotene to the t-butyl peroxy radical at low oxygen pressure (an EPR spectroscopy and computational study). **Chemical Physics Letters**, v. 478, n. 4–6, p. 266–270, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2009.07.088>.
- KHABBAZ, E. S.; JALDANI, S.; FARHOOSH, R. Unusual multiphase peroxidation of sunflower oil: A kinetic study. **Lwt**, v. 184, n. June, 2023.
- KHOO, H. *et al.* Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables, p. 1710–1738, 2011.
- KIM, S.; BAEK, S. K.; SONG, K. Bin. Physical and antioxidant properties of alginate films prepared from *Sargassum fulvellum* with black chokeberry extract. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, n. October, p. 157–163, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.008>.

KIM, S.; PARK, J. B.; HWANG, I. K. Quality attributes of various varieties of Korean red pepper powders (*Capsicum annuum* L.) and color stability during sunlight exposure. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2957–2961, 2002.

KONG, S. C. *et al.* Emerging practices in scholarship of learning and teaching in a digital era. **Emerging Practices in Scholarship of Learning and Teaching in a Digital Era**, n. February, p. 1–373, 2017.

KOOP, B. L. *et al.* Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: Sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. **Food Research International**, v. 153, n. January, 2022.

KRINSKY, N. I. Carotenoid protection against oxidation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 649–660, 1979.

KUROZAWA, L. E.; HUBINGER, M. D. Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. **Current Opinion in Food Science**, v. 15, p. 50–55, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.004>.

LEONG, J. Y. *et al.* Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44–60, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2015.09.004>.

LERFALL, J. **Carotenoids: Occurrence, Properties and Determination**. 1. ed. Elsevier Ltd., 2015. *E-book*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00119-7>.

LI, R.; ZHANG, X.; SHI, H. Effect of manufacturing parameters on the release profiles of casein-loaded alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 152 Suppl, n. 2011, p. e154–e155, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.058>.

LILING, G. *et al.* Effects of ionic crosslinking on physical and mechanical properties of alginate mulching films. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 259–265, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.034>.

LIU, F. *et al.* Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 212–221, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.004>.

LIU, H. *et al.* Utilization of protein nanoparticles to improve the dispersibility, stability, and functionality of a natural pigment: Norbixin. **Food Hydrocolloids**, v. 124, n. PB, p. 107329, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107329>.

LOBATO, K. B. de S. *et al.* Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3906–3912, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.135>.

LOBATO, K. B. de S. *et al.* Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 8–14, 2015.

LUPO, B. *et al.* Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 25–

34, 2015.

LUPO, B. *et al.* Food Hydrocolloids Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. **Food hydrocolloids**, v. 38, p. 56–65, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.003>.

LYNG, S. M. O.; PASSOS, M.; FONTANA, J. D. Bixin and  $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 865–872, 2005.

MACHADO, F. R. S. *et al.* Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17–21, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.007>.

MAGNIER, L.; SCHOORMANS, J. Consumer reactions to sustainable packaging: The interplay of visual appearance, verbal claim and environmental concern. **Journal of Environmental Psychology**, v. 44, p. 53–62, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvp.2015.09.005>.

MALEKJANI, N.; JAFARI, S. M. Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 3–47, 2021.

MARANGONI JÚNIOR, L. *et al.* Improving the mechanical properties and thermal stability of sodium alginate/hydrolyzed collagen films through the incorporation of SiO<sub>2</sub>. **Current Research in Food Science**, v. 5, n. December 2021, p. 96–101, 2022.

MARINIELLO, L. *et al.* Preparation and mechanical properties of edible pectin–soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 191–198, 2003. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165603000257>.

MARTÍN-VILLENA, M. J. *et al.* Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.005>.

MARTÍN, M. J. *et al.* Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 140–149, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.032>.

MARTINSEN, A.; SKJAK BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate as Immobilization Material: I. Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads. **Biotechnol. Bioeng**, v. 33, p. 79–89, 1987.

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 8, p. 1307–1313, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.03.018>.

MEZZOMO, N. *et al.* Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 342–349, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.08.006>.

MILLER, N. J. *et al.* Antioxidant Properties of Carotenes and Xanthophylls. **FEBS Letters**, v. 384, n. 3, p. 240–242, 1996.

MIRANDA, C. G. *et al.* Influence of nanoencapsulated lutein on acetylcholinesterase activity: In vitro determination, kinetic parameters, and in silico docking simulations. **Food Chemistry**, v. 307, n. March 2019, p. 125523, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125523>.

MIRZAEI-MOHKAM, A. *et al.* Optimisation, antioxidant attributes, stability and release behaviour of carboxymethyl cellulose films incorporated with nanoencapsulated vitamin E. **Progress in Organic Coatings**, v. 134, n. April, p. 333–341, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.05.026>.

MOKHTARI, S.; JAFARI, S. M.; ASSADPOUR, E. Development of a nutraceutical nano-delivery system through emulsification/internal gelation of alginate. **Food Chemistry**, v. 229, p. 286–295, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.071>.

MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. Color difference Delta E - A survey colour difference  $\Delta E$  - A survey faculty of mathematics and informatics. **Machine Graphics and Vision**, v. 20, n. 4, p. 383–411, 2011.

MONEGO, D. L.; DA ROSA, M. B.; DO NASCIMENTO, P. C. Applications of computational chemistry to the study of the antiradical activity of carotenoids: A review. **Food Chemistry**, v. 217, p. 37–44, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.073>.

MONGE NETO, A. Á. *et al.* Direct microencapsulation of an annatto extract by precipitation of psyllium husk mucilage polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 112, n. September 2020, 2021.

MORAES, T. De *et al.* Food hydrocolloids active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. **Food Hydrocolloids**, v. 74, n. 2018, p. 139–150, 2018.

MORAIS, H.; FERREIRA, F. Carotenoids Biosynthesis – a review. **Revista Lusófona de Humanidades e Tecnologias**, v. 10, p. 22–42, 2010.

MUHAMAD, I. I. *et al.* **Improving the delivery system and bioavailability of beverages through nanoencapsulation**: Elsevier Inc., 2019. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816677-2.00010-7>.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 139–148, 2011.

NARANJO-DURÁN, A. M. *et al.* Modified-release of encapsulated bioactive compounds from annatto seeds produced by optimized ionic gelation techniques. **Nature**, 2021.

NAWADE, B. *et al.* Analysis of apocarotenoid volatiles during the development of *Ficus carica* fruits and characterization of carotenoid cleavage dioxygenase genes. **Plant Science**, v. 290, n. September 2019, p. 110292, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110292>.

NORAJIT, K.; MYONG, K.; HYUNG, G. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 377–384, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.015>.

OECD. **Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options**. Paris: OECD Publishing, 2022.

OLSON, J. A. Biological Actions of Carotenoids. **American Institute of Nutrition**, n. February, p. 94–95, 1989.

OTÁLORA, M. C. *et al.* Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. **Food Chemistry**, v. 202, p. 373–382, 2016.

OZKAN, G. *et al.* A review of microencapsulation methods for food antioxidants : Principles , advantages , drawbacks and applications. **Food Chemistry** , v. 272, n. February 2018, p. 494–506, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205>.

PAGNO, C. H. *et al.* Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules. **Journal of Food Science and Tecnology**, v. 53, n. August, p. 3197–3205, 2016.

PAIBOON, N. *et al.* Internal gelation of alginate microparticle prepared by emulsification and microfluidic method: Effect of Ca-EDTA as a calcium source. **Food Hydrocolloids**, v. 141, n. March, p. 108712, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108712>.

PAQUES, J. P. *et al.* Nanospheres of alginate prepared through w/o emulsification and internal gelation with nanoparticles of CaCO<sub>3</sub>. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 182–188, 2014.

PAQUES, J. P. *et al.* Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163–171, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.009>.

PARIZE, A. L. *et al.* Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 17, p. 3107–3114, 2010.

PASCOAL, K. L. L. *et al.* Physical-chemical characterization, controlled release, and toxicological potential of galactomannan-bixin microparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1239, p. 130499, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130499>.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3279–3305, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>.

PEPPAS, N. A.; KHARE, A. R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, n. 1–2, p. 1–35, 1993.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p.

169–172, 1989.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D. *et al.* Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488–495, 2017.

PINZÓN-GARCÍA, A. D. *et al.* Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded PCL nanofibers in diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 7, p. 1938–1949, 2017.

PONCELET, D. *et al.* Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 39–45, 1992.

PRAJAPATI, R. A.; JADEJA, G. C. Natural food colorants: Extraction and stability study. **Materials Today: Proceedings**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.151>.

PRIAMO, W. L. *et al.* Precipitation and encapsulation of  $\beta$ -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 103–109, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2010.02.013>.

QUONG, D. *et al.* External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 4, p. 438–446, 1998.

RACMAYANI, N.; HUSNI, A. Effect of different formulations on characteristic of biobased alginate edible films as biodegradable packaging. **E3S Web of Conferences**, v. 147, 2020.

RADDATZ-MOTA, D. *et al.* Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1729–1741, 2017.

RAHNEMOON, P. *et al.* Nano-encapsulation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract and evaluation of its antimicrobial properties on coated chicken meat. **Food Bioscience**, v. 43, n. August, p. 101331, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101331>.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>.

RE, R. *et al.* ABTS Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999. Disponível em: <papers2://publication/uuid/D19B31A4-6A88-4AED-B42A-6459E2D35AA0>.

REIS, C. P. *et al.* Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 5, p. 392–397, 2007.

REZAUL, M. *et al.* Trends in Food Science & Technology Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, n. May, p. 34–60, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>.

- RHIM, J. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **Swiss Society of Food Science and Technology**, v. 37, p. 323–330, 2004.
- RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. **Biomaterials**, v. 25, p. 4363–4373, 2004.
- RIOS, A. de O.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. de L. P. Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin-DNA interaction. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1113–1118, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.084>.
- RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 2, p. 125–133, 2004.
- RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. **Dyes and Pigments**, v. 74, n. 3, p. 561–565, 2007.
- RIVERA, S. M. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1224, p. 1–10, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.025>.
- ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 37–42, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.001>.
- RODRIGUES, E. *et al.* Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 704–711, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.163>.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. 2001.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *et al.* Journal of Food Composition and Analysis Updated Brazilian database on food carotenoids : Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 2008, p. 445–463, 2008.
- RODRÍGUEZ, J. *et al.* Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41–59, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>.
- ROSS, A. B. *et al.* Influence of cation on the pyrolysis and oxidation of alginates. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 91, n. 2, p. 344–351, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2011.03.012>.
- RUSSO, R.; MALINCONICO, M.; SANTAGATA, G. Effect of Cross-Linking with Calcium Ions on the Physical Properties of Alginate Films. **Biomacromolecules**, p. 3193–3197, 2007.
- SADEGHI, D. *et al.* Preparation of internally-crosslinked alginate microspheres: Optimization of process parameters and study of pH-responsive behaviors. **Carbohydrate Polymers**, v. 255, n. November, p. 117336, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117336>.

- SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development - a food industry perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 10, p. 547–556, 2006.
- SANTANA, A. A.; KIECKBUSCH, T. G. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 04, p. 835–845, 2013.
- SANTOS, L. G. *et al.* A novel sodium alginate active films functionalized with purple onion peel extract (*Allium cepa*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, n. July, 2021.
- SANTOS, P. P. dos *et al.* Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 23–33, 2016.
- SANTOS, D. T. *et al.* Production of stabilized sub-micrometric particles of carotenoids using supercritical fluid extraction of emulsions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 167–174, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.09.011>.
- SANTOS, L. G.; ALVES-SILVA, G. F.; MARTINS, V. G. Active-intelligent and biodegradable sodium alginate films loaded with *Clitoria ternatea* anthocyanin-rich extract to preserve and monitor food freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, n. August, p. 866–877, 2022.
- SATYANARAYANA, A.; RAO, P. G. P.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 131–141, 2003.
- SCHWARTZ, S. H. *et al.* Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1619, n. 1, p. 9–14, 2003.
- SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: A review. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 26, n. 8, p. 1123–1145, 2009.
- SHAHID-UL-ISLAM; RATHER, L. J.; MOHAMMAD, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 499–514, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>.
- SHILPA, A.; AGRAWAL, S. S.; RAY, A. R. Controlled delivery of drugs from alginate matrix. **Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews**, v. 43, n. 2, p. 187–221, 2003.
- SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 261–280, 2017.
- SILVA, C. M. *et al.* Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1–2, p. 1–10, 2006.
- SILVA, C. M. *et al.* Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 148–159, 2006.

SILVA, M. A. da; BIERHALZ, A. C. K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca<sup>2+</sup> ions: Effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 736–742, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.014>.

SIRACUSA, V. *et al.* Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 12, p. 634–643, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SRIDHAR, K.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Recent advances on nanoparticle based strategies for improving carotenoid stability and biological activity. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, 2021.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular aspects of medicine**, v. 24, n. 6, p. 345–351, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585305>.

STANGE, C. **Carotenoids in Nature**. 1st. ed., 2016.

STOJANOVIC, R. *et al.* Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 685–696, 2012.

STOLL, L. *et al.* Carotenoids extracts as natural colorants in poly ( lactic acid ) films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 46585, p. 1–9, 2018.

STOLL, L. *et al.* Microencapsulation of Anthocyanins with Different Wall Materials and Its Application in Active Biodegradable Films. **Food Bioprocess Technology**, p. 172–181, 2016a.

STOLL, L. *et al.* Microencapsulation of Anthocyanins with Different Wall Materials and Its Application in Active Biodegradable Films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 1, p. 172–181, 2016b.

STOLL, L. *et al.* Poly ( acid lactic ) films with carotenoids extracts : Release study and effect on sun flower oil preservation. **Food Chemistry**, v. 281, n. 2019, p. 213–221, 2019.

TANQUARY, A. C.; LACEY, R. E. **Controlled release of biologically active drugs**, 1974-. ISSN 00482986.v. 47

TAVARES, J. K. *et al.* Modeling of the controlled release of betacarotene into anhydrous ethanol from microcapsules. **OpenNano**, v. 1, p. 25–35, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.onano.2016.05.001>.

TAVASSOLI-KAFRANI, E.; SHEKARCHIZADEH, H.; MASOUDPOUR-BEHABADI, M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 360–374, 2016.

TONG, W. Y. *et al.* Development of sodium alginate-pectin biodegradable active food packaging film containing cinnamic acid. **Chemosphere**, v. 336, n. May, p. 139212, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139212>.

TUPUNA-YEROVI, D. S. *et al.* Addition of norbixin microcapsules obtained by spray drying in an isotonic tangerine soft drink as a natural dye. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 3, p. 1021–1031, 2020.

TUPUNA-YEROVI, D. S.; SCHMIDT, H.; RIOS, A. de O. Biodegradable sodium alginate films incorporated with lycopene and  $\beta$ -carotene for food packaging purposes. **Food Science and Technology International**, 2023.

TUPUNA, D. S. *et al.* Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops & Products**, v. 111, n. July 2017, p. 846–855, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.001>.

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio**. 2007. 108 f. 2007.

TURGUT DUNFORD, N. Oxidative Stability of Sunflower Seed Oil. **Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization**, p. 465–489, 2015.

TYAGI, V. V. *et al.* Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 2, p. 1373–1391, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.10.006>.

UYEN, N. T. T. *et al.* Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 1035–1046, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233>.

UYEN, N. T. T. *et al.* Synthesis and characterization of curcumin loaded alginate microspheres for drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, n. April, p. 101796, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101796>.

UYEN, N. T. T.; HAMID, Z. A. A.; NURAZREENA, A. Fabrication and characterization of alginate microspheres. **Materials Today: Proceedings**, v. 17, p. 792–797, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.364>.

VALLEJO-CASTILLO, V. *et al.* Development of alginate-pectin microcapsules by the extrusion for encapsulation and controlled release of polyphenols from papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1–17, 2020.

VAN SCHEPPINGEN, W. B.; BOOGERS, I. A. L. A.; DUCHATEAU, A. L. L. Study on decomposition products of norbixin during bleaching with hydrogen peroxide and a peroxidase by means of UPLC-UV and mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1354–1359, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.118>.

VANDENBERG, G. W.; DE LA NOÛE, J. Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 4, p. 433–441, 2001.

VU, C. H. T.; WON, K. Novel water-resistant UV-activated oxygen indicator for intelligent food packaging. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1–2, p. 52–56, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.056>.

WANG, L. F.; SHANKAR, S.; RHIM, J. W. Properties of alginate-based films reinforced with cellulose fibers and cellulose nanowhiskers isolated from mulberry pulp. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 201–208, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.041>.

XAVIER, A. A. O.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids in Nature. **Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation, and function**, v. 79, p. 377–414, 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-39126-7>.

XIA, F. *et al.* Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 2, p. 456–463, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.014>.

YADAV, S. K. *et al.* Design, optimization and characterizations of chitosan fortified calcium alginate microspheres for the controlled delivery of dual drugs. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 1180–1193, 2018.

YOUNG, A. J. What s New in Plant Physiology The photoprotective role of carotenoids in Mgher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 702–708, 1991.

ZACTITI, E. M.; KIECKBUSCH, T. G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films : Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 462–467, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.07.015>.

ZHANG, Z. *et al.* Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 698–716, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.013>.

ZHANG, R. *et al.* Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/internal gelation followed by spray/freeze-drying techniques: Characterization, stability and bioaccessibility. **Lwt**, v. 123, n. September 2019, p. 109097, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109097>.

ZHANG, Y. *et al.* Physical and antibacterial properties of alginate films containing cinnamon bark oil and soybean oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 423–430, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.008>.

ZHANG, M.; CHEN, H. Development and characterization of starch-sodium alginate-montmorillonite biodegradable antibacterial films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 233, n. January, 2023.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 1–9, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.009>.