



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANTÔNIO PAULO RIBEIRO BITENCOURT

**OBTENÇÃO DE NANODISPERSÕES AQUOSAS CONTENDO
EXTRATO DE URUCUM (*Bixa orellana* L.) COM POTENCIAL
APLICAÇÃO EM ALIMENTOS**

**Macapá
2017**

ANTÔNIO PAULO RIBEIRO BITENCOURT

**OBTENÇÃO DE NANODISPERSÕES AQUOSAS CONTENDO
EXTRATO DE URUCUM (*Bixa orellana* L.) COM POTENCIAL
APLICAÇÃO EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes

**Macapá
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

641.303

B624o Bitencourt, Antônio Paulo Ribeiro.

Obtenção de nanodispersões aquosas contendo extrato de urucum (Bixa orellana L.) com potencial aplicação em alimentos / Antônio Paulo Ribeiro Bitencourt; orientador, Caio Pinho Fernandes. – Macapá, 2017.

70 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Urucum. 2. Alimentos – Aditivos. 3. Alimentos – Análise. I. Fernandes, Caio Pinho, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Antônio Paulo Ribeiro Bitencourt

Orientador(a): Caio Pinho Fernandes



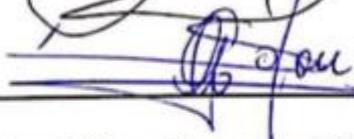
Profa. Dr. Caio Pinho Fernandes (Orientador)

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Junior (Avaliador 1)

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA)



Profa. Dra. Lilian Grace da Silva Solon (Avaliador 2)

Professora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá
(UNIFAP)

Data: 27/04/2017

Dedico este trabalho aos meus amados pais...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* primeiramente por ter me dado saúde e sabedoria para transpor as dificuldades encontradas durante dois anos de mestrado.

Aos meus amados pais que sempre me incentivaram a continuar no caminho dos estudos. Vocês são minhas maiores inspirações para seguir em frente.

Aos meus familiares de Macapá que me acolheram nesta cidade. A companhia e ajuda de vocês foram cruciais para que tudo desse certo no decorrer da graduação e do mestrado. Serei eternamente grato a todos vocês, tios, primos e avós.

A minha namorada Julianne Góes de Miranda e familiares por terem sido uma “segunda família” ao longo de 5 anos. Meu imenso agradecimento pelo carinho e zelo que sempre demonstraram ter por mim.

Agradeço imensamente ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes por ter depositado confiança no meu trabalho desde a graduação. Você tem grande parcela de responsabilidade por eu ter seguido o caminho da pesquisa científica. Espero retribuir os ensinamentos passando a frente os conhecimentos aprendidos.

Ao grupo “Nanofito” pelo companheirismo do dia-a-dia. Agradeço aos professores do laboratório, em especial ao amigo Dr. Rodrigo Cruz pela ajuda prestada nos momentos de dificuldade. Aos colegas de pesquisa por alegrarem a rotina e tornar os dias de trabalho mais agradáveis.

Ao apoio institucional da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), através do Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica (Nanofito), Laboratório de Pesquisa em Fármacos (LPFar) e Grupo de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica (BIORG), que disponibilizaram a infraestrutura, material e equipamentos necessários para a execução do projeto de pesquisa.

A Universidade Federal do Pará (UFPA) através do Laboratório de P & D por ter me recebido durante duas semanas e pela grande contribuição com algumas análises da dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) por proporcionar a realização desta pesquisa.

E por fim, um agradecimento especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização da bolsa de estudos para viabilização da realização e concretização do projeto de pesquisa.

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | <i>Bixa orellana</i> L..... | 1 |
| 1.2 | USO POPULAR E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO URUCUM..... | 2 |
| 1.3 | CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Bixa orellana</i> L..... | 3 |
| 1.4 | APLICAÇÕES DO CORANTE OBTIDO DO URUCUM..... | 7 |
| 1.5 | NANOTECNOLOGIA E NANODISPERSÕES..... | 9 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 12 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 12 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 12 |
| 3 | ARTIGO 1 – PREPARATION OF AQUEOUS NANODISPERSIONS WITH ANNATTO (<i>Bixa orellana</i> L) EXTRACT USING NA ORGANIC SOLVENT-FREE AND LOW ENERGY METHOD..... | 13 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 44 |
| | REFERÊNCIAS..... | 45 |
| | ANEXO A – NORMAS PARA A SUBMISSÃO À REVISTA <i>Food Chemistry</i>..... | 50 |
| | ANEXO B – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 51 |

Obtenção de nanodispersões aquosas contendo extrato de urucum (*Bixa orellana* L.) com potencial aplicação em alimentos

Introdução: A espécie *Bixa orellana* L. é endêmica do Brasil e popularmente conhecida como urucum. O extrato obtido das sementes possui majoritariamente o carotenóide bixina e apresenta alto potencial corante. A baixa solubilidade em água dos carotenóides torna a sua utilização em produtos aquosos um grande desafio tecnológico. Nanodispersões contendo carotenóides são consideradas alternativas viáveis para disponibilização dessas substâncias de origem natural em meio aquoso. **Objetivo:** O presente trabalho tem o intuito de obter nanodispersões contendo extrato de urucum (*Bixa orellana* L.), com potencial aplicação em produtos alimentícios. **Metodologia:** O extrato de sementes de urucum foi obtido por maceração. A caracterização deste foi realizada por espectrofotometria por UV/Vis, espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TG) e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As nanodispersões foram preparadas por método de baixo aporte de energia, sem uso de solvente orgânico, variando-se a proporção da mistura de tensoativos. Avaliou-se também a influência da adição de uma solução aquosa de monooleato de polietilenoglicol 400 nas nanodispersões formadas. Elas foram caracterizadas através do método de espalhamento dinâmico da luz para medição do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Após a escolha da formulação com melhores características (nanodispersão otimizada), avaliou-se o efeito da exposição ou não a luz e a influência da temperatura (25-80°C) nos parâmetros físicos da nanodispersão escolhida. Análise de variância (Anova One-way) foi realizada para avaliar todos os parâmetros. **Resultados e discussões:** No extrato foi possível identificar a presença de bixina e do terpenóide geraniogeraniol. Não foi verificada diferença significativa na distribuição do tamanho de partícula da nanodispersão preparada com os tensoativos monooleato de sorbitano/polisorbato 80 (equilíbrio hidrofílico-lipofílico igual a 13), quando comparados os sistemas diluídas em água ou solução aquosa de monooleato de polietilenoglicol 400 (1%). A nanodispersão otimizada (EHL 13 diluída em água) apresentou aspecto homogêneo, fino e alaranjado, sendo observada maior perda de coloração quando exposta a luz. Na diluição de 1:10, ela manteve características satisfatórias de tamanho de partícula e potencial zeta até 35 °C. **Conclusão:** O presente trabalho demonstrou que é possível obter nanodispersões a base de urucum por técnica de baixo custo, livre de solventes orgânicos durante a etapa de geração de nanoestruturas.

Palavras-Chave: *Bixa orellana* L., bixina, geraniogeraniol, nanodispersão.

Agradecimentos: CAPES, UNIFAP e UFPA.

Obtaining aqueous nanodispersions containing urucum extract (*Bixa orellana* L.) with potential application in food

Introduction: The vegetal species *Bixa orellana* L. is endemic to Brazil and popularly known as annatto. The extract obtained from the seeds has the carotenoid bixin and it has high potential dye. The low water solubility of carotenoids makes their use in aqueous products a major technological challenge. Nanodispersions containing carotenoids are considered viable alternatives for the availability of these substances of natural origin in aqueous medium. **Objective:** In this context, the present work intends to obtain nanodispersions containing urucum extract (*Bixa orellana* L.), with potential application in food products. **Methodology:** Urucum extract was obtained by maceration. The characterization was performed by UV / Vis spectrophotometry with Fourier transform infrared (FTIR), thermogravimetry (TG) and Gas Chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The nanodispersions were prepared by low energy method, without using organic solvent, varying the proportion of the mixture of surfactants. The influence of the addition of an aqueous solution of polyethyleneglycol monooleate 400 on the formed nanodispersions was also evaluated. They were characterized by the dynamic scattering method for measuring particle size, polydispersity index and zeta potential. After the choice of the formulation with better characteristics (optimized nanodispersion), the effect of the exposure or not the light and the influence of the temperature (25-80°C) on the physical parameters of the chosen nanodispersão were evaluated. Analysis of variance (Anova One-way) was performed to evaluate all parameters. **Results and discussions:** In the extract it was possible to identify the presence of bixin and the terpenoid geranylgeraniol. No significant difference in the particle size distribution of the nanodispersion prepared with the sorbitan monooleate / polysorbate 80 surfactants (hydrophilic-lipophilic equilibrium equal to 13), when compared to systems diluted with water or aqueous solution of polyethylene glycol 400 (1) monooleate (%). The optimized nanodispersion (EHL 13 diluted in water) presented homogenous, fine and orange appearance, being observed greater loss of coloration when exposed to light. At the 1:10 dilution, it maintained satisfactory particle size and zeta potential characteristics up to 35 ° C. **Conclusion:** The present work demonstrated that it is possible to obtain nanodispersions based on annatto by low cost technique, free of organic solvents during the stage of nanostructures generation.

Keywords: *Bixa orellana* L., bixin, geranylgeraniol, nanodispersion

Acknowledgements: CAPES, UNIFAP and UFPA.

1.1 *Bixa orellana* L.

A espécie *Bixa orellana* (Linnaeus) apresenta-se como uma árvore de pequeno porte e pertence à família Bixaceae (SILVA et al., 2009; JOSEPH; SIRILL, 2014), e tem como provável ancestral a espécie selvagem *Bixa urucurana* (MOREIRA et al., 2015). É nativa do Brasil, ocorrendo em todas as regiões, encontrada e domesticada principalmente na região amazônica, sendo popularmente conhecida como colorau e urucum (LHERAS, 2005; MOREIRA et al., 2015). Esse nome popular deriva da palavra tupi “ru-ku”, que significa “vermelho” (VILAR et al., 2014). Em outras culturas, o urucum é conhecido como achiote ou annatto (inglês); rocou (francês); orleansstrauch (alemão) e anato ou bijol (espanhol). Foi levado para a Europa desde o século XVII e é mundialmente empregado como corante de diversos fins.

As sementes de *B. orellana* foram amplamente utilizadas por maias e astecas, principalmente como corante em produtos têxteis, alimentos e para pintura do corpo (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003), sendo atualmente muito utilizado por indústrias alimentícias como corante natural (RAMAMOORTHY et al., 2010).

O urucunzeiro (figura 1) apresenta frutos castanho avermelhados ou vermelhos quando maduros, apresentando na parte externa pseudoespinhos curtos. A abertura do fruto ocorre de forma espontânea quando está amadurecido, e dentro deste pode-se observar sementes, que variam de 10 a 50 unidades, cobertas por uma resina alaranjada. As sementes são comumente retiradas dos frutos manualmente, visto como melhor opção de manuseio para menor perda de pigmentos. O corante das sementes é proveniente principalmente de frutos maduros, pois na fase final de desenvolvimento é o momento em que se obtém coloração avermelhada mais intensa. O Brasil está entre os maiores produtores de sementes desta espécie no mundo (MERCADANTE et al., 1996; MATH et al., 2016). Além da utilização do corante proveniente da superfície externa das sementes (PAULA, 2009), os resíduos (grãos e óleos) não são descartados, pois tem servido como fonte de alimentos para animais por sua variedade de nutrientes (SILVA, 2006; BRITO et al., 2015).

Figura 1. (A) Arbusto com frutos dispostos em cachos; (B) Folhas glabras e flores rosadas dispostas em panículas terminais viscosas; (C) E dentro do fruto com espinhos inofensivos, as sementes.



Fonte: Acervo do autor, 2017.

1.2 USO POPULAR E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO URUCUM

Nas Américas central e do Sul é relatado o uso do urucum, considerando todas as partes da planta, como laxativo, afrodisíaco, cardiotônico, expectorante, anti-inflamatório, antipirético, antidiabético e antidiarreico. A utilização das sementes de urucum como corante é feita há tempos por indígenas brasileiros, para embelezamento da pele em rituais religiosos e para proteção contra raios ultravioleta e mosquitos oriundos das florestas (VILAR et al, 2014).

A atividade antioxidante do urucum, considerada uma das mais potenciais desta espécie, está relacionada a presença de carotenóides e compostos fenólicos, que agem estabilizando moléculas eletronicamente excitadas (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008; CRISTÉ et al., 2011; PARK; MATHISON; CHEW, 2016). A forte

atividade antioxidante do urucum ocorre, principalmente, pela presença de dois carotenóides: bixina e norbixina. Em geral, a redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares envolve a inibição de reações oxidativas por meio da captura de oxigênio singleto e eliminação de radicais livres (CHISTÉ et al., 2011). Estas substâncias, Segundo Kiokias & Gordon (2003), apresentam maior atividade quando comparado ao beta-caroteno e ao licopeno. A capacidade de captar radicais livres dos carotenóides presentes nas sementes de urucum também já foi utilizado na incorporação em embalagens de quitosana, demonstrando que pode ser utilizada para armazenar alimentos lipídicos, como óleos e gorduras para evitar a oxidação destes (SANTANA et al., 2013).

Estudos com o extrato das folhas de *Bixa orellana* demonstraram atividade antimicrobiana em relação a uma variedade de bactérias gram-positivas (*Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*) e gram-negativas (*Escherichia coli*), e fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus níger*) (FLEISCHER et al., 2003; STOHS, 2014), também o estudo realizado por Yong e colaboradores (2013) aponta atividade antiinflamatória em ratos do extrato das folhas do urucum. Além disso, extratos de *B.orellana* têm revelado atividade antiprotozoaria em relação a *Tripanossoma cruzi* (BARRIO et al., 2004) e antileishmania em relação a *L. amazonensis* (MONZOTE et al., 2014).

Devido a sua ampla atividade antioxidante e antibacteriana, e também propriedade corante, extratos polares das sementes têm demonstrado grande potencial como estabilizante e corante natural em matrizes alimentares (CARDARELLI et al., 2008; VIUDA-MARTOS; CIRO-GOMEZ; RUIZ-NAVAJAS, 2012; CUONG; CHIN, 2016), e também a associação dos carotenóides presente na planta com outros antioxidantes apresenta elevada eficácia no aumento do tempo de conservação de óleos ou emulsões (OLEGÁRIO; SANTOS, 2014). Além das demais atividades biológicas, foi detectado em ensaio com animais que as proteínas presentes nas sementes do urucum possuem a capacidade de reduzir os níveis de creatinina no organismo sem que haja qualquer dano hepático (VALÉRIO et al., 2015).

1.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Bixa orellana* L.

As principais substâncias encontradas em *B. orellana* são os carotenóides. A bixina é um carotenóide lipofílico, muito empregado para tingir materiais em couro e colorir produtos lácteos. A norbixina, apocarotenóide solúvel em água, é um potente corante

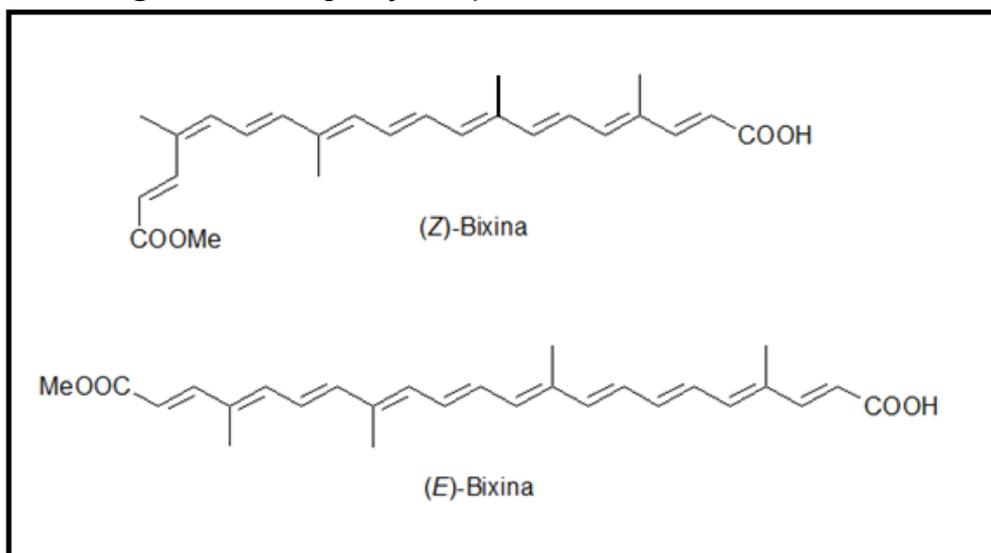
capaz de colorir toneladas de queijo mesmo em pequenas quantidades. Este é obtido através de extração por saponificação. Ambos os carotenóides têm sido utilizados como corantes, entretanto a indústria também utiliza o potencial antioxidante proporcionado pela estrutura química de tais constituintes para conservar produtos industrializados, evitando desta maneira o uso de antioxidantes sintéticos (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003; GARCIA et al., 2012). A bixina é utilizada normalmente em produtos com base lipídica e a norbixina é empregada em matrizes com elevada quantidade de água (OLIVEIRA, 2005).

Quanto maior a concentração de bixina e norbixina no urucum, mais forte será o potencial corante do extrato. A coloração amarelada indica grande presença de norbixina e a cor vermelha demonstra presença de bixina, enquanto que a cor alaranjada indica um equilíbrio entre os dois carotenóides presente no extrato (SATYANARAYANA; RAO; RAO, 2010).

A bixina, presente nas sementes de urucum, foi isolada pela primeira vez em 1825 por Boussingault. No ano de 1961 foi determinada sua estrutura química e estereoquímica através de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . A bixina pertence a uma pequena classe de apocarotenóides naturais que são formados a partir da de degradação oxidativa de carotenóides com 40 unidades de carbono (LOBATO et al., 2013).

A bixina (figura 2) consiste em uma cadeia de 25 carbonos e tem uma fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$ (MW = 394,51). Essa substância possui um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades da cadeia carbônica. A bixina ocorre de forma natural na forma 16-Z (cis), mas durante a extração esta configuração isomeriza resultando na forma 16-E (trans), que é chamada de isobixina (LOBATO et al., 2013; VILAR et al., 2014).

Figura 2. Configurações químicas do carotenóide bixina.

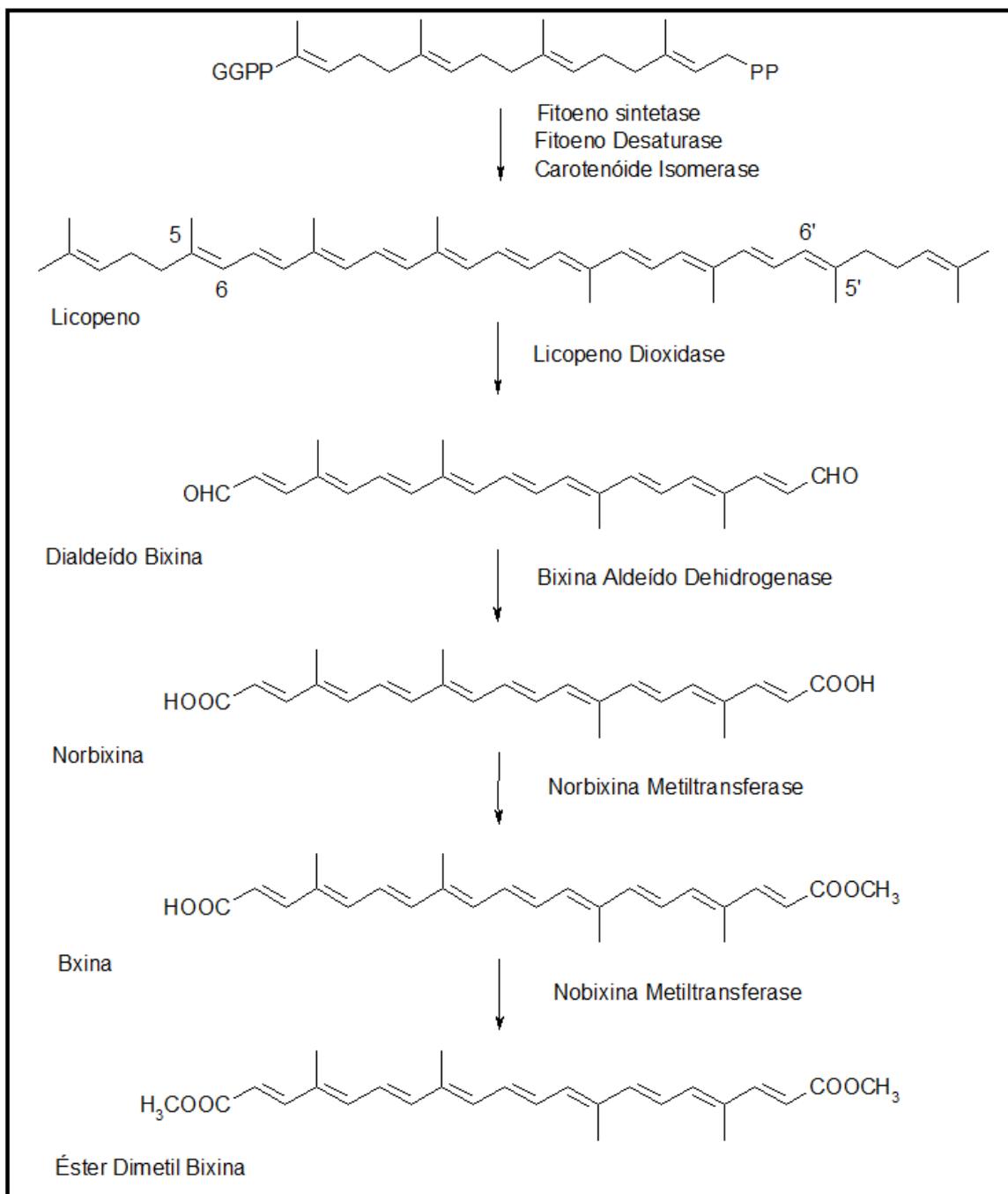


Fonte: Acervo do autor, 2017.

A bixina é o componente majoritário de *Bixa orellana*. Apresenta características de hidrofobicidade que impossibilita a solubilização em água e em produtos com baixo teor lipídico (LOBATO et al., 2013). O cromóforo, representado pela cadeia insaturada dessas substâncias, é responsável pela absorção na região do ultravioleta ou no visível (ALLINGER et al, 1978).

O teor de bixina encontrado nas sementes de *B. orellana* está relacionado com um gene que sincroniza outros genes responsáveis pela quantidade de bixina, estando envolvidas a rota genética dos carotenóides e a rota do metil-d-eritritol 4-fosfato (MEP) (RIVERA-MADRID et al., 2016). É sugerido que a rota biosintética da bixina (figura 3) se inicia com a quebra do licopeno e envolve a enzima carotenóide oxigenase, que cliva o licopeno nas duplas ligações 5-6 e 5'-6', seguida de um aldeído oxidase e uma metil transferase (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003). A biosíntese da bixina envolve uma remodelagem do licopeno, um intermediário comum que é precursor do beta-caroteno, provitamina A (BOUVIER; DOGBO; CAMARA, 2003; RAMAMOORTHY et al., 2010). Neste contexto, esses estudos podem contribuir para a viabilização econômica de produção de bixina a partir do licopeno como precursor, utilizando ferramentas de biologia molecular para acúmulo de biomassa e geração de bons rendimentos.

Figura 3. Rota biosintética da bixina.



Fonte: GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003.

Segundo Taham e colaboradores (2015) a extração a frio utilizando etanol é mais efetiva do que em outros métodos e/ou com a utilização de outros solventes. O rendimento da extração de bixina por maceração usando clorofórmio foi de 2,47%. A maceração é um excelente método para obtenção de teor significativo de bixina, pois garante que não haja degradação química. A maceração é mais eficiente em relação a outros métodos de extração, como por exemplo extração por fluido supercrítico (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

Anualmente a produção de urucum ultrapassa 10000 toneladas, sendo que deste total a planta é negociada em relação as sementes (2/3) e ao extrato das sementes (1/3). O valor estipulado para a venda está relacionado, na maioria dos casos, ao teor de bixina presente nos extratos, que comumente apresenta a média de 2,7% (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003). Além de estar presente em *Bixa orellana*, foi revelada a presença de bixina em *Crocus sativus* e *Vitis vinifera* (RAMAMOORTHY et al., 2010).

Além da presença dos carotenóides, as sementes são ricas em proteínas, minerais (sódio e potássio em maior quantidade), carboidrato e fibras. Foi identificado na pesquisa realizada por Rao et al. (2015) que, especificamente nas sementes, há a presença de ácidos graxos. Há também em sua constituição os ácidos palmítico, oléico e linoleico nas respectivas proporções 16,4%, 33,9% e 34,3%. Devido a esta constituição química, os resíduos das sementes têm sido utilizados como uma fonte de lipídios nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e de móveis. Fatores não nutricionais como taninos, ácido fítico e protease não foram detectados (RAO et al., 2015; VALÉRIO et al., 2015). Foi quantificado nas sementes os valores de cinzas (3,82%), proteínas (10,34%), óleo (4,99%) e carboidratos (69,35%) (TAHAM et al., 2015). Outras substâncias foram relatadas através de análise fitoquímica das sementes, sendo os principais esteróis, compostos alifáticos e terpenos (SHAHID-UL-ISLAN; RATHER; MOHAMMAD., 2016), estando presente de forma marjoritária o diterpeno geranilgeraniol (COSTA; CHAVES, 2005).

O geranilgeraniol é encontrado em maior quantidade no óleo essencial das sementes do urucum, estando em grandes quantidades (COSTA; CHAVES, 2005). Este diterpeno é um componente de grande importância visto que, segundo Calixto et al. (2007), apresenta atividades farmacológicas como a anti-inflamatória e inibição das prostaglandinas.

1.4 APLICAÇÕES DO CORANTE OBTIDO DO URUCUM

O principal interesse na utilização do corante está intimamente ligado a “satisfação visual” do consumidor, que considera o alimento corado mais atrativo devido a associação da cor ao sabor (CUNHA, 2008; HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013). Tratando-se de fatores culturais, no Brasil observa-se que o uso de corante industrializado se tornou mais comum que a utilização do produto feito em casa. Tal prática mostra que a população muitas vezes opta pela praticidade ao invés da qualidade, mesmo que o hábito de produzir-lo em casa seja antigo e que seu modo de preparo ainda seja lembrado pelos

consumidores (MOREIRA et al., 2015), entretanto a busca por produtos menos agressivos e mais saudáveis vem contribuindo para que este quadro cultural se modifique.

Atualmente, a população tem buscado novas alternativas para manter a saúde, e desta forma minimizar o risco de doenças. Por esse motivo, está ocorrendo um crescimento da demanda de corantes naturais por não causar alergia, câncer nos consumidores, efeitos adversos e por possuir natureza biodegradável (CUNHA, 2008; CHENGAIHAH et al., 2010; SHAHID; SHAHID-UL-ISLAN; MOHAMMAD, 2013). Os corantes podem ser divididos em corantes naturais, sintéticos, inorgânicos e caramelos (LOBATO et al., 2013). Muitos dos corantes naturais têm sido considerados promissores pela menor incidência de efeitos adversos e tóxicos (CHENGAIHAH et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014). Os carotenóides merecem posição de destaque entre os corantes naturais, uma vez que as indústrias utilizam estas substâncias em larga escala (HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013).

O consumo de corantes extraído de plantas tem crescido gradativamente, em particular se tratando do uso do urucum (SILVA et al., 2009). Desta forma, Os corantes naturais são caracterizados por serem provenientes de vegetais, sendo este obtido através de processo tecnológico correto, e utilizado para acrescentar cor a materiais em geral (madeira, papel ou roupas), mas também tem sido empregado pelas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia, devido seu elevado valor nutritivo. Estes corantes, muitas vezes, apresentam atividades biológicas importantes que levam a sua utilização em várias áreas, incluindo a biotecnologia. Dessa maneira, a redução ou eliminação do uso de corantes sintéticos acontecerá espontaneamente ao longo do tempo. Entre as principais plantas com capacidade corante está o urucum (CHENGAIHAH et al., 2010; GARCIA et al., 2012; HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013), sendo um dos corantes e conservantes com maior uso mundialmente (OLIVEIRA, 2005).

O extrato de urucum pode ser encontrado em muitas formas nos mercados. Pode ser em forma de pó, pasta, óleo ou naco (MALA et al., 2015). Utilizado há centenas de anos na América do sul no preparo de diferentes tipos de carne com a intenção de deixar estes alimentos com aparência mais atrativa. O uso do extrato de urucum como corante e flavorizante tem sido acrescentado em vários produtos industrializados ou não, como por exemplo a manteiga, queijo, óleos, sorvetes, produtos de confeitaria, salsichas, derivados cárneos, “salgadinhos”, cereais e refrigerantes (GALINDO-CUSPINERA; LUBRAN; RANKIN, 2002; CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008; GARCIA et al., 2012), e também muito empregado em produtos para beleza e higiene pessoal (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003).. Além da aplicação do corante em alimentos, outras indústrias

já o utilizam para a produção de tintas e vernizes, e na confecção de produtos têxteis (OLIVEIRA, 2005). O uso das cores das sementes desta planta varia de país para país devido às diferentes culturas alimentares (MALA et al., 2015). A propriedade corante dos extratos de *B. orellana* pode ser medida através da determinação do teor do carotenóide bixina (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008).

No Brasil a produção e a exportação do corante proveniente das sementes de urucum têm crescido a cada ano, estando junto a este crescimento o aumento do investimento em pesquisa e inovação. Mundialmente, a utilização do corante ocorre devido a versatilidade das funções das substâncias presentes (OLEGÁRIO; SANTOS; 2014), visto que nos Estados Unidos o uso da bixina em alimentos e bebidas é permitido pelo FDA (SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016). Além disso, com o banimento do uso de corantes alimentícios artificiais na União Européia, por prováveis efeitos cancerígenos, fez com que as exportações de corante provenientes do urucum aumentassem cada vez mais (GIRIDHAR, 2014).

1.5 NANOTECNOLOGIA E NANODISPERSÕES

A nanotecnologia geralmente se refere a estruturas que se apresentam em escala nanométrica, e por este motivo apresentam funções diferenciadas e muito úteis para as mais diversas áreas. Os tamanhos diminutos das partículas possibilitam uma maior superfície de contato, resultando em uma maior interação com um alvo (SHARON; NICKOLS-RICHARDSON, 2007).

No âmbito farmacêutico, a nanotecnologia torna possível o desenvolvimento ou o melhoramento de novos produtos. Esta ciência, por exemplo, oportuniza a incorporação de substâncias ativas hidrofóbicas em meio aquoso (TAN; NAKAJIMA, 2005; IRACHE et al., 2011). A nanotecnologia tem se tornado muito importante para o setor alimentício devido a diversos fatores (SOZER; KOKINI, 2009).

As formulações denominadas dispersões possuem como características principais o tamanho reduzido de partículas e a estabilidade destas moléculas dispersas no meio, visto que há comumente duas fases líquidas com polaridades diferentes separadas por tensoativo ou mistura deste. Dependendo do tipo de formulação na qual se deseja produzir, define-se os valores de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) a ser atingido empregando proporções entre tensoativos diferentes para atingir valores ideais de equilíbrio. A definição deste valor é muito importante para a indústria por facilitar o

processo de produção com determinada substância ativa (JUNIOR et al., 2011; SEN et al., 2016).

Os processos utilizados para homogeneização são, em grande parte, responsáveis pela redução do tamanho médio de partícula, pela redução da variabilidade dos valores de distribuição de tamanho, o que leva a diminuição do número de micropartículas e do índice de polidispersão (CHEONG et al., 2008). Os métodos que utilizam baixo aporte de energia para formar formulações representam uma excelente alternativa para produzir dispersões com tamanhos diminutos e com alta estabilidade, visto que para alcançar tais resultados necessita apenas de equipamentos simples e relativamente baratos quando comparado a métodos com alto aporte de energia (SOLANS; SOLÉ, 2012).

No processo de preparo de uma dispersão a utilização de tensoativo ou mistura de tensoativos se faz necessária para oportunizar a homogeneização de líquidos imiscíveis. As nanodispersões são caracterizadas por serem transparentes, apresentar estabilidade termodinâmica e possuir gotículas na escala nanométrica (DAMASCENO et al., 2011). Por outro lado, os tensoativos são os responsáveis por diminuir a tensão interfacial entre a fase orgânica e a fase aquosa, reduzindo a carga energética necessária para romper as partículas e torná-las menores. A utilização destes está intimamente relacionada a obtenção de formulação estável, caracterizada por baixa aglomeração de partículas, sem separação de fases e que mantém o aspecto visual (aparência e cor) inalterado ao longo do tempo, estando todas estas vantagens ligadas a camada protetora formada ao redor das gotículas da formulação (JUNIOR et al., 2011; SILVA et al., 2011; HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013).

As nanodispersões podem ser facilmente produzidas em escala industrial, e devido sua estabilidade satisfatória sobre determinados tempos de estocagem e alta biodisponibilidade, eles têm representado ser importantes para carrear substâncias ativas como os carotenóides (RIBEIRO et al., 2008), permitindo diversas vantagens, como uma melhor biodisponibilidade (BARRIOS, 2010; TAN; NAKAJIMA, 2005). Neste contexto, a nanodispersão seria a forma farmacêutica alternativa e eficiente para veicular carotenóides, já que o preparo de formulação na escala nano é interessante principalmente para substâncias com baixa solubilidade em água, sensibilidade a luz, temperatura e mudanças de pH (IRACHE et al., 2011).

Pesquisas têm sido realizadas com a intenção de desenvolver formulações em escala nanométrica que sejam capazes de proteger a bixina, principal carotenoide que compõe a espécie *Bixa orellana*, de degradação química e da conseqüente perda de coloração

(TAKAMOTO, 2015). Zhang & Zhong (2013), por exemplo, obtiveram microcápsulas proteicas contendo bixina que se mostraram estáveis contra a perda de cor.

2.1 OBJETIVO GERAL

- Obter nanodispersões estáveis contendo extrato de urucum (*Bixa orellana* L.) com potencial aplicação em produtos alimentícios.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente e fisicamente o extrato de urucum;
 - Obter nanodispersões contendo extrato de urucum através de metodologia inovadora sem adição de solvente orgânico com baixo aporte de energia;
 - Avaliar a influência de diferentes proporções de tensoativos não iônicos na formação das nanodispersões;
 - Avaliação da influência da adição de uma solução aquosa de outro tensoativo não-iônico na estabilidade das nanodispersões;
 - Caracterizar fisicamente as nanodispersões obtidas;
 - Realizar o ensaio de fotoestabilidade na nanodispersão otimizada;
- Avaliar a influência da temperatura na estabilidade da nanodispersão otimizada.

Submetido para publicação ao periódico "Food Chemistry".

Preparation of aqueous nanodispersions with annatto (*Bixa orellana* L.) extract using an organic solvent-free and low energy method

Antônio P.R. Bitencourt^{1,2}, Jonatas L. Duarte², Anna E.M.F.M. Oliveira^{1,2}, Rodrigo A.S. Cruz^{1,2}, José C.T. Carvalho^{1,3}, Antônio T. A. Gomes⁴, Irlon M. Ferreira⁵, Roseane M. Ribeiro-Costa⁴, José O.C. Silva-Júnior⁶, Caio P. Fernandes^{1,2*}

¹Post-graduate Program on Pharmaceutical Sciences – Amapá Federal University – Campus Universitário Marco Zero do Equador – Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira – KM – 02 - Bairro Zerão – Zipcode: 68902-280 – Macapá – AP – Brazil. Emails: tonibitencourt@hotmail.com; annaeliza.maciel@gmail.com; r.a.s.cruz@gmail.com; jctcarvalho@gmail.com; caiofernandes@unifap.br

²Laboratory of Phytopharmaceutical Nanobiotechnology – Amapá Federal University – Campus Universitário - Marco Zero do Equador – Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira – KM – 02 - Bairro Zerão – Zipcode: 68902-280 – Macapá – AP – Brazil. Emails: tonibittencourt@hotmail.com; jonatasdlobato@gmail.com; annaeliza.maciel@gmail.com; r.a.s.cruz@gmail.com; jctcarvalho@gmail.com; caiofernandes@unifap.br

³Laboratory of Drug Research – Amapá Federal University – Campus Universitário - Marco Zero do Equador – Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira – KM – 02 - Bairro Zerão – Zipcode: 68902-280 – Macapá – AP – Brazil. Email: jctcarvalho@gmail.com

⁴Laboratory of Nanotechnology Pharmaceutical - Federal University of Pará - Rua Augusto Correa 01 – Zipcode: 66075110 – Belém – PA – Brazil. Email: rmrc@ufpa.br

⁵ Group of Biocatalysis and Biotransformation in Organic Chemistry - Amapá Federal University – Campus Universitário - Marco Zero do Equador – Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira – KM – 02 - Bairro Zerão – Zipcode: 68902-280 – Macapá – AP – Brazil. Email: irlon.ferreira@gmail.com

⁶Laboratory R&D Pharmaceutical and Cosmetic - Federal University of Pará - Rua Augusto Correa 01 – Zipcode: 66075110 – Belém – PA – Brazil. Email: carrera@ufpa.br

*Corresponding author: +55 (96) 40092927 / caiofernandes@unifap.br

ABSTRACT

The extract from seeds of *Bixa orellana* L. is widely used in food industry as natural colorant. A major technological challenge for its utilization on aqueous food products is the low water solubility. On this context, the present study aimed to obtain aqueous nanodispersions using this natural raw material. The carotenoid bixin and the terpenoid geranylgeraniol were found on the extract. Nanodispersions were prepared by addition of water on a mixture of extract and surfactant (s). Effect of surfactant and dilution on the annatto nanodispersions were evaluated. Particle size distribution and zeta potential were measured. Optimal results were achieved using polysorbate 80/sorbitan monooleate at hydrophile-lipophile balance of 13 (diluted in water, 1:10). The present paper shows for the first time the preparation of annatto aqueous nanodispersions by a low energy and organic solvent-free method. Thus, it is in accordance with an ecofriendly approach and opens perspective for its food applications.

Keywords: Bixin, Dynamic light scattering, Gas-chromatography couple to mass-spectrometry, Geranylgeraniol, Spectrophotometry, Thermogravimetry.

1. Introduction

Nowadays, people worldwide are interested in agents that induce less impairment to health. On this context, growing interest has been observed for natural colorants, mainly due to adverse effects of the chemicals that are used for this purpose, including potential induction of cancer, allergy and others problems. Most of them also present biological properties and substitution of synthetic chemicals by the natural products with coloring properties have been encouraged (Chengaiyah et al., 2010; Shahid et al., 2013). The carotenoids develop a main role as natural colorants and have great potential for industrial applications. Among the several plants that have these compounds and high colorant potential, annatto is one of most economic important plants (Chengaiyah et al., 2010). Annatto is the common name of the species *Bixa orellana* L. Its seeds are used for obtainment of carotenoid-rich natural products that is widely used in the food industry, as colorant of butter, cheese, bakery products, oils, ice creams, sausages, cereals and extruded products (Cardarelli et al., 2008).

Bixin is the most important carotenoid of annatto seeds and coloring potential of its extract is associated to this compound (Ramamoorthy et al., 2010). However, hydrophobicity of bixin is a major problem if solubilizing in water is required. Some strategies have been used to overcome this technological challenge, such preparation of water-soluble potassium carbonate or oil/water soluble propylene glycol formulations (Mala et al., 2015). Annatto seeds also have fatty acids, such as palmitic, oleic and linoleic acids (Rao et al., 2015), in addition to geranylgeraniol (Costa & Chaves, 2005), that also contributes to low water solubility of this extract, which is widely used as natural colorant.

Preparation of nanostructured systems as potential delivery systems, including as enhancers of water-solubility, is considered very promising, especially for food industry. Moreover, it offers additional advantages, including potential enhancement of bioavailability. The concept of aqueous nanodispersions containing natural products

involves oil in water nanoemulsions or polymeric nanoparticles disperse in water (Surassmo et al., 2010; Ribeiro et al., 2008). However, the term nanodispersion is more associated to disperse systems of non-liquid compounds on water and without any coating polymer (Tan & Nakajima, 2005; Anarjan et al., 2010; Leong et al., 2011; Silva et al., 2011; Shariffa et al., 2016; Tan et al., 2016a,b,c). Aqueous nanodispersions are colloidal systems containing dispersed particles with average size below 1000 nm. However, the issue related to the exact mean diameter that should be used to define nanodispersions is still nuclear. Several upper limits are accepted according to author criteria (eg. 500, 300, 200 and 100 nm). However, it can be highlighted that no major physical-chemical alterations may occur when it is below 1000 nm (Solans & Solé, 2012). Thus, in case of food products, this would not be a major issue if the aqueous nanodispersion has desired characteristics, such as physical stability, improved water solubility of the encapsulated compounds and, in case of colorants, satisfactorily homogeneity and expected colour appearance.

The nanodispersions prepared with some carotenoids, such as astaxanthin, have been well investigated as promising systems for application into food matrices (Delgado et al., 2017). The concept of utilization of an organic solvent during the preparation of nanodispersions for industrial application is a main approach (Silva et al., 2011). The organic phase constituted by a water-immiscible solvent (eg. hexane) is associated to an emulsification-evaporation method, while an organic phase constituted by water-miscible (eg. ethanol) solvent is associated to a solvent displacement method. However, in both cases the volatile organic solvent that is used for solubilizing of entrapped compounds must be removed (Leong et al., 2011). Despite the utilization of organic solvents can be considered an advantage in terms of obtainment of nano-scale dispersed system, the potential toxicity of residues even after evaporation must be considered (Kelman et al., 2007). Thus, as part of our ongoing investigations with annatto nanodispersions, the

present study aims to generate aqueous nanodispersions with annatto extract using a simple methodology without necessity of organic solvent, based on a green and ecofriendly concept.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Seeds of *Bixa orellana* L. were collected at the municipality of Macapá (S 00°01'07.5" W 051°06'18.4") at Amapá State (Brazil). Identification of plant material was performed by the botanist Rosângela Sarquis and a voucher specimen is deposited at the Herbário Amapaense (HAMAB) under register number 10068.

2.2. Chemicals

The non-ionic surfactants (sorbitan monooleate, polysorbate 80 and polyethylene glycol 400 monooleate) were obtained from Praid® Especialidade Químicas (SP, Brasil). Acetone used on the extraction of *B. orellana* (annatto) seeds was purchased from Vetec® (RJ, Brasil).

2.3. Annatto extract

Extraction of annatto seeds was performed according to a method described by Costa and Chaves (2005) with some modifications. The seeds (814.94 g) were removed from the fruits and immediately extracted with acetone by maceration. This procedure was successively performed with solvent renewal (7 L) until a clear filtrate was obtained. Extraction was performed under room temperature and protected from light. The filtrates were pooled together and concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator IKA® (modelo HB 05). Then, the concentrated extract was lyophilized in order to remove any trace of solvent and stored in amber glass flask at 4°C.

2.3.1. Determination of bixin content by UV/Vis spectrophotometric assay

The bixin content on the annatto extract was determined by a spectrophotometric assay (Costa & Chaves, 2005) with some modifications. Measurements were performed on an UV Mini spectrophotometer (Shimadzu, Japan) at 470 nm. It was solubilized with chloroform and bixin content was determined using the specific absorptivity coefficient of bixin ($2826 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in chloroform using a 1 cm cuvette. The analysis was performed in triplicate and result expressed as mean \pm standard deviation.

2.3.2. Infrared analysis

The annatto extract was analyzed by infrared spectroscopy using an attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectrophotometer (Shimadzu [®] Corporation IR Prestige 21 Cat. No. 206-73600-36-Kyoto-Japan). Spectral region was in the range of $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ with resolution of 4 cm and 32 scans.

2.3.3. Thermogravimetry analysis

Annatto extract was subjected to a thermal analyzer (Shimadzu [®], model TGA 50/50H). Experimental conditions were as follows: nitrogen and synthetic air atmosphere with flow rate of 50 mL/min, at a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ ratio on a temperature range of $25\text{-}600^\circ\text{C}$, using a platinum crucible.

2.3.4. Gas-chromatographic analysis

Annatto extract was analyzed using a GCMS-QP 2010 gas-chromatograph coupled to mass spectrometer (Shimadzu) using electron ionization (70 eV). It was solubilized in dichloromethane and experimental conditions were as follows: injector temperature, 270°C ; detector temperature, 270°C ; carrier gas, Helium; flow rate 1 mL/min; split injection

with split ratio 1:60. The oven temperature was programmed from 180 °C, with an increase of 10 °C/min to 270 °C, ending with a 20 min isothermal at this temperature; RTX-5MS column (i.d. = 0.25 mm, length 30 m, film thickness = 0.25 µm). Mass spectrometry (MS) conditions were ionization voltage, 70 eV and scan rate, 1 scan/s. Mass range was m/z from 50 to 600). Identification was performed by comparing to literature data.

2.4. Annatto aqueous nanodispersions

Stock solutions of annatto extract (0.100 g) suspended on surfactant (s) (2.9 g) were individually prepared after homogenization under magnetic stirring (400 rpm) for 2 hours. Then, the mixtures were centrifuged by 15 min and the supernatants were collected and used as oily phase for the preparation of the nanodispersions. The oily phase (2 g) was placed on a becker and distilled water (98 g) was added under controlled flow (2.8 mL/s) and constant magnetic stirring (500 rpm). Total homogenization process was performed for 1 hour. Then, annatto nanodispersions were diluted in deionized water (1:1) prior to storage.

2.4.1. Influence of different non-ionic surfactant blends on the annatto nanodispersions

Mixtures of sorbitan monooleate and polysorbate 80 were obtained at different ratios for preparation of the oily phase. Various hydrophile-lipophile balance values (HLB = 9-15) were achieved and calculated as follows:

$$HLB = \frac{HLBa \times ma + HLBB \times mb}{ma + mb}$$

Where HLB = hydrophile-lipophile balance of the surfactant of surfactant/co-surfactant mixture; HLBa = hydrophile-lipophile value of the most hydrophobic surfactant; HLBB = hydrophile-lipophile value of the most hydrophilic surfactant; ma = mass of the most hydrophobic surfactant and mb = the most hydrophylic surfactant.

2.4.2. Influence of addition of another non-ionic surfactant aqueous dispersion

The prompt prepared annatto nanodispersions were also diluted in polyethylene glycol 400 monooleate aqueous dispersion (1%, w/w) prior to storage (1:1), in order to evaluate the influence of aqueous surfactant dispersion prepared with another non-ionic surfactant on behavior of pre-formed annatto nanodispersions prepared with different blends of sorbitan monooleate/polysorbate 80.

2.4.3. Characterization of annatto-based aqueous nanodispersions

The annatto nanodispersions were characterized using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) equipped with a 10 mW “red” laser ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) and samples were measured at a 90° scattering detector angle for size measurements. They were diluted with distilled water prior to measurements, which were performed at different days (Day 0, 1, 7 and 21). Average particle size, polydispersity index and zeta potential were measured in triplicate and results are expressed as mean \pm standard deviation.

2.4.4. Optimal annatto aqueous nanodispersion

After evaluation of aforementioned parameters, optimal annatto aqueous nanodispersion was chosen based on the blend of sorbitan monooleate/polysorbate 80 that allowed achievement of best results. It was diluted with deionized water at different ratios (1:10, 1:20 and 1:50). Each diluted nanodispersion was hermetically stored at different conditions, being protected or unprotected from light under controlled temperature ($30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Particle size distribution and zeta potential were measured at different days (Day 0, 1, 7 and 21 and 30).

Analysis using a programmed linear ramp of temperature was also performed as follows: temperature ramp was $25 \text{ }^\circ\text{C}$ to $80 \text{ }^\circ\text{C}$, increased at $5 \text{ }^\circ\text{C}$ intervals (Oliveira et al.,

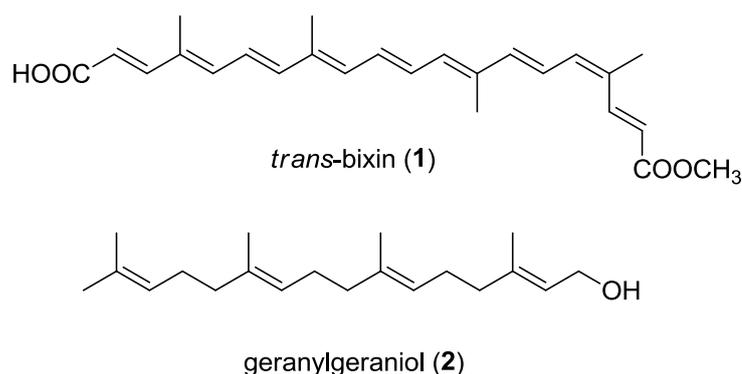
2017). Particle growth (PG) was determined (Mehmood, 2015; Guttoff et al., 2015) during temperature increase as follows: $PG = 100 \times [\text{mean particle size (t2)} - \text{mean particle size (t1)}] / \text{mean droplet size (t1)}$, where t2 = mean particle size after temperature increase and t1 = mean particle size on initial temperature.

2.5. Statistical analysis

Analysis of variance (One-way Anova) with 95% of confidence interval followed by Tukey test was performed using the Software R (R Core Team, 2013). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

Extraction of annatto seeds allowed obtainment of 31.993 g of an orange-red extract. Spectrophotometric analysis indicated a carotenoid content (expressed as bixin; w/w) of 2.09 ± 0.02 % on the extract. This yield is in accordance with literature data for carotenoid content (expressed as bixin) of annatto extracts obtained after extraction with acetone, which ranges between 1.2 – 2.3% (w/w) (Costa & Chaves, 2005).



The carotenoid *trans*-bixin (1) was identified on the infrared spectra (Fig. 1). The presence of characteristic peaks, such a large and intense absorption band at 3171 cm^{-1} correspondent to vibration of hydroxyl from the carbonyl group. The stretch vibration of -

CH bond was observed at 2922 cm^{-1} and 2854 cm^{-1} . The absorption band characteristic for C=O bond of aliphatic α,β -unsaturated esters was also observed at 1716 cm^{-1} . The peak at 1612 cm^{-1} was attributed to asymmetric axial deformation of C=C bond of conjugated alkenes and absorption bands of C—C(C=O)—C of α,β -unsaturated esters were observed within the range $1377\text{-}1159\text{ cm}^{-1}$. The vibrational band at 962 cm^{-1} was attributed to methylene group of *trans*-bixin. These assignments are in accordance with literature data of this compound (Rao et al., 2014; Rahmalia et al., 2015).

Curve of mass change versus temperature (TG) were obtained to allow drawing information on thermal stability of the annatto extract. TG curve (Fig. 2) presents four events characterized by weight loss. The first event occurred in the interval of $36^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ with 0.4% of mass loss, that until 100°C the mass loss corresponding to water and/or volatiles evaporation from the annatto extract. The second event of the occurred at the range of $179^{\circ}\text{C} - 222^{\circ}\text{C}$ with 27.8 % mass loss corresponding to start thermal degradation of the sample. The third event is observed at the interval $265^{\circ}\text{C}\text{-}310^{\circ}\text{C}$ with 31.9% mass loss of the materials. According to literature a temperature range of $155\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $310\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponds to the stage of thermal decomposition of carbohydrates and other organic compounds present in the species (Costa et al., 2013). From 460°C to 485°C a sudden mass loss (8.9%) of the annatto extract occurred, indicating the carbonization of the material. However, until 179°C the annatto extract present physical stability to be incorporated formulation. This is special important, since isomerization of bixin (*cis-trans*) occurs between $200\text{-}240\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Silva et al., 2005; Marcolino et al., 2011).

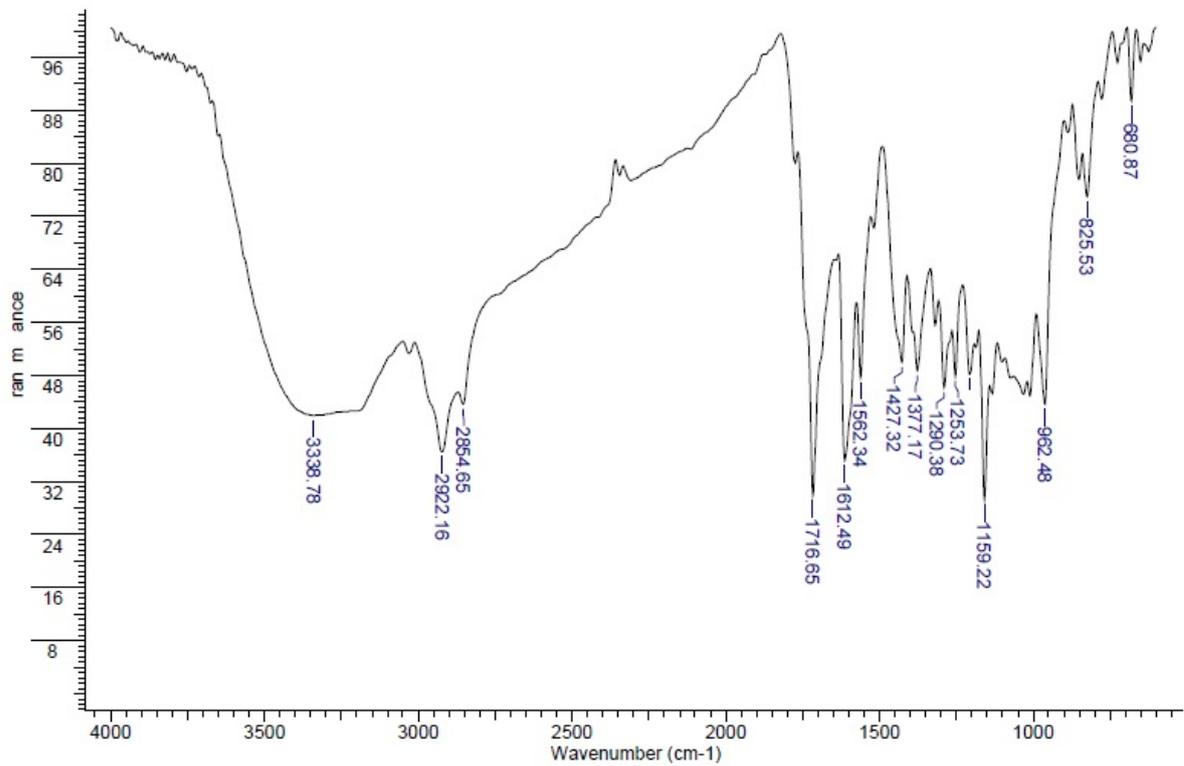


Fig 1. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTR) spectra of annatto extract.

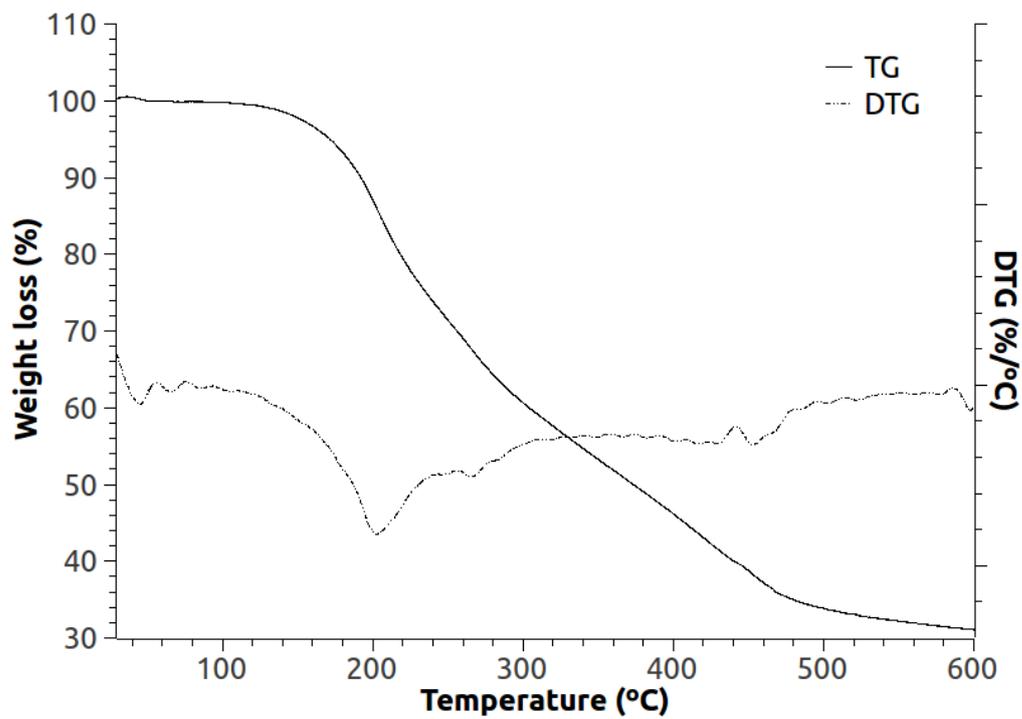


Fig 2. Thermogravimetry (TG) curve of annatto extract.

In order to detect the expected volatile compound on annatto extract, GC-MS analysis was carried out. Few compounds were able to elute under the experimental conditions, however, a remarkable peak with retention time (R_t) = 6.625 min was observed. Mass spectra of this compound revealed a fragmentation pattern with peaks at m/z 69 (base peak), 81, 107 and 55, which correspond to literature data of geranylgeraniol (2) (Teixeira, 2003). This terpenoids is the main constituent of annatto extract, being even more abundant than bixin (Costa & Chaves, 2005). Geranylgeraniol is a liquid that with intrinsic water-immiscibility, and therefore, co-generation of some nanodroplets together with nanoparticles in the annatto nanodispersions should be also considered, even if the extract that was used had a powder appearance.

Figure 3 (A, B and C) shows particle size distribution and zeta potential of annatto aqueous nanodispersions prepared with sorbitan monooleate and polysorbate 80 at different blends and diluted in deionized water. Immediately after preparation (Day 0), analysis of the nanodispersions indicated that the lowest mean droplet size were observed for nanodispersions at HLB 9 (358.9 nm \pm 18.96), HLB 10 (309.6 nm \pm 8.542), HLB 11 (384.9 nm \pm 37.49) and HLB 13 (337.4 nm \pm 64.79). The absence of major particle growth is considered a good indicative of stability of aqueous nanodispersions (Mehmood, 2015), highlighting the potential of this annatto nanodispersions. Higher mean droplet size was observed at HLB 15 (876.5 nm \pm 103.80). On Day 0, lowest polydispersity index was observed for nanodispersion at HLB 13 (0.483 \pm 0.038), which also presented lowest variation in this parameter during storage. Lower zeta potential values were observed for nanodispersions at HLB 12 to 9, which reached negative values below -30 mV. However, the nanodispersions at lower HLB values presented major variation during storage. Less variation of zeta potential during storage was observed for nanodispersion prepared at HLB 15 followed by nanodispersion prepared at HLB 13, which remained around - 17.5 to - 24.0 mV. This parameter is associated to surface charge of colloids and classification of

stability is established according to values follows: relatively stable ($\pm 10-20$ mV), moderately stable ($\pm 20-30$ mV) and highly stable ($> \pm 30$ mV) (Bhattacharjee, 2016).

Combining surfactant and co-surfactant with similarities in chemical structural is considered an advantage, since interaction between them would facilitate formation of stable dispersions (Asmaoglu et al., 2016). Moreover, the resulting HLB value of the mixture can be used to predict the formation of aqueous dispersions on the present study, utilization of sorbitan monooleate and polysorbate 80 in different blends using a wide range successfully allowed generation of nanodroplets. It is well known that the main problem related the physical stability of nanodispersions is associated to Ostwald ripening. On this issue, utilization of additional less polar oils and/or more lipophilic polymeric surfactant with low water-solubility is considered a good strategy to enhance the stability of the system (Tadros et al., 2004). The less alteration on particle size observed for nanodispersions that have blends of polysorbate 80/sorbitan monooleate instead of solely polysorbate 80 may be associated to these factors. Overall, considering aspects of all analyzed parameters, the nanodispersion prepared with HLB 13 should be highlighted, since it presented low mean droplet size, lower polydispersity index and zeta potential values in accordance with moderately stable systems during storage. The nanodispersions prepared at HLB 9-11 presented higher changes in polydispersity index than nanodispersion prepared at HLB 13, reaching high values (>0.500) during storage. This upper limit is related to broad size distributions (Cheong et al., 2008). However, considering high negative zeta potential values and particle size comparable to nanodispersion prepared at HLB 13, they also can be promising for further studies aiming to refine the nanodispersions, obtain narrower particle size distributions and more stable systems that also may be applicable on food products.

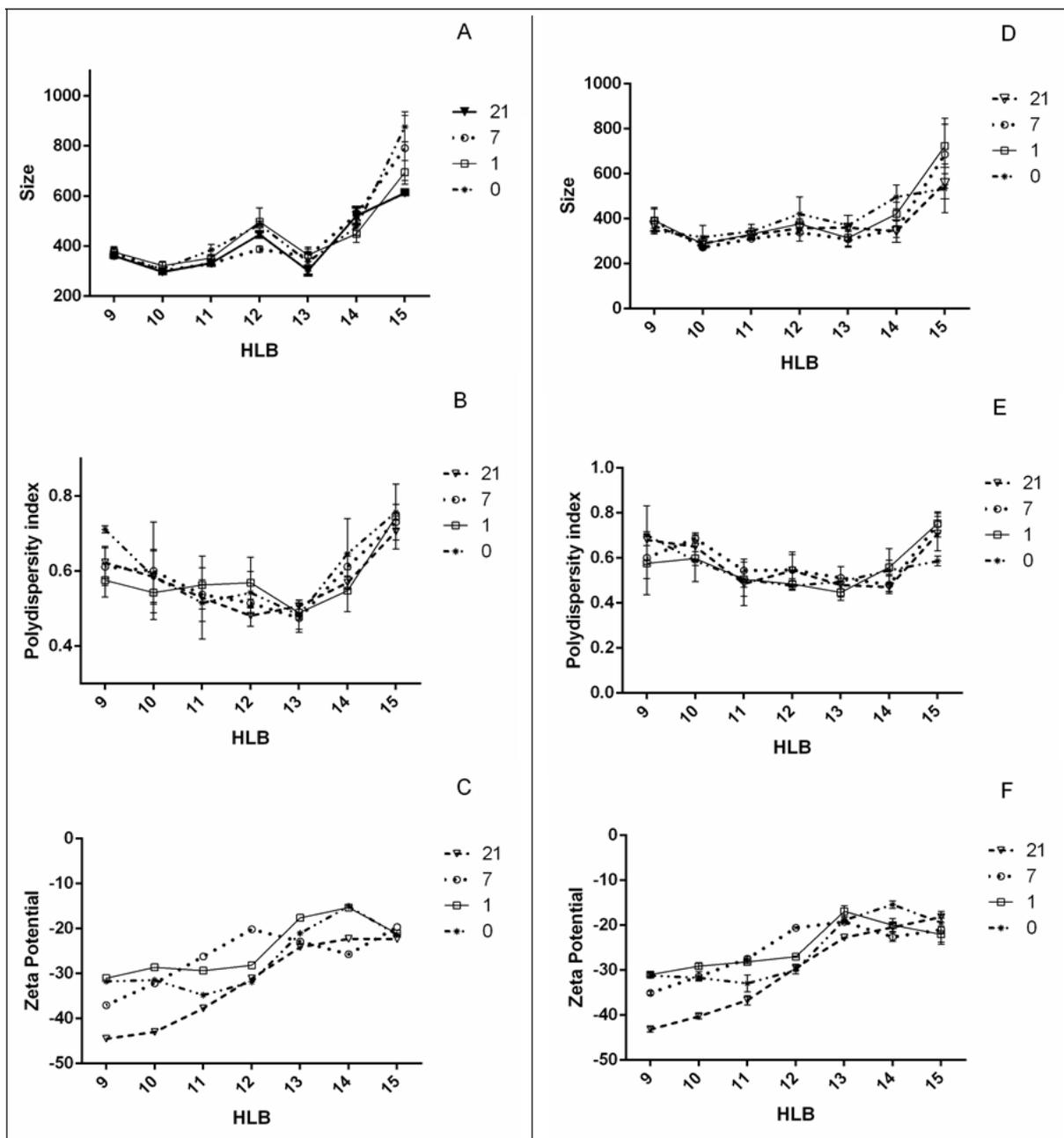


Fig 3. Characterization of annatto nanodispersions prepared with polysorbate 80/sorbitan monooleate at different hydrophile-lipophile balance (HLB). Results from nanodispersions diluted in deionized water A) droplet size (nm), B) polydispersity index and C) zeta potential (mV) or diluted in polyethylene glycol 400 (1%, w/w) aqueous dispersion D) droplet size (nm), E) polydispersity index and F) zeta potential (mV).

Figure 3 (D, E and F) shows particle size distribution and zeta potential of annatto nanodispersions prepared with sorbitan monooleate and polysorbate 80 at different blends after dilution with polyethylene glycol 400 aqueous dispersion (1% w/w) prior to storage (1:1). Similar profile after addition of this third non-ionic surfactant were

observed during storage. Comparing the particle size distribution of nanodispersions diluted with deionized water and aqueous solution of polyethylene glycol 400 (1% w/w), no statistical difference was observed on nanodispersions prepared at HLB 9, 10, 11 and 13. Statistical significant difference was observed on particle size of nanodispersion prepared at HLB 12 (Day 1; $p = 0.0327$), HLB 14 (Day 7; $p = 0.0029$ / Day 21; $p = 0.0024$) and HLB 15 (Day 0; $p = 0.0133$), while statistical significant differences on polydispersity index were observed on nanodispersions prepared at HLB 15 (Day 0; $p = 0.0133$). Only the nanoemulsions prepared at HLB 11 and 15 did not present statistical significant difference on zeta potential after dilutions.

Enhancement of stability of nanodispersions for food application by diluting the nanostructures solely with distilled water or with co-surfactants is a promising strategy (Guttoff et al., 2015). The effect of some components, such as glycerol (Saber et al., 2013a), propylene glycol and ethanol on diluted nanodispersions have been evaluated and improved stability was observed (Saber et al., 2013b). A previous study performed with annatto aqueous nanodispersions indicated that polyethylene glycol 400 allowed preparation of most stable nanodispersions, when compared to a series of nanodispersions prepared with single surfactants (Prada et al., 2016). This surfactant has not water-solubility at the same level of aforementioned substances, such as glycerol, propylene glycol and ethanol, since it spontaneously forma a dispersion in water (with a great tendency to sub-micron droplets). Despite this surfactant is widely used in cosmetics, to our knowledge, more studies should be carried out with this surfactant for its utilization in nanodispersions for food products.

Thus, the formulation prepared with sorbitan monooleate/polysorbate 80 at HLB 13 and diluted with water was considered the optimal annatto aqueous nanodispersion due to well-established use of these non-ionic surfactants as food grade additives and good performance on the analyzed parameters. Figure 4 (A, B and C) shows particle size

distribution and zeta potential of optimal annatto nanodispersions after different dilution ratios in water (1:10; 1:20; 1:50) protected from light. The particle size profile revealed a tendency, in all dilutions, to decrease to values close to 180 – 220 nm. (Fig. 4A). The polydispersity index of the nanodispersions diluted at 1:10 and 1:50 presented a similar profile along the storage until day 14. Their polydispersity index increased after seven days of storage. Then, a decrease was observed on nanodispersion diluted at 1:10 ratio, presenting the lowest pdi (0.432 ± 0.025) after 21 days of storage. (Fig. 4B). After reaching a minimum of zeta potential value after 14 days of storage ($- 26.9 \pm 0.758$ mV), the nanodispersion diluted at 1:10 increased to a value around -20 mV after 21 days of storage. The zeta potential values of the nanodispersion diluted at 1:50 presented a tendency for linear decrease and reached the smallest value after 21 days ($- 27.8 \pm 2.02$ mV) (Fig. 4C).

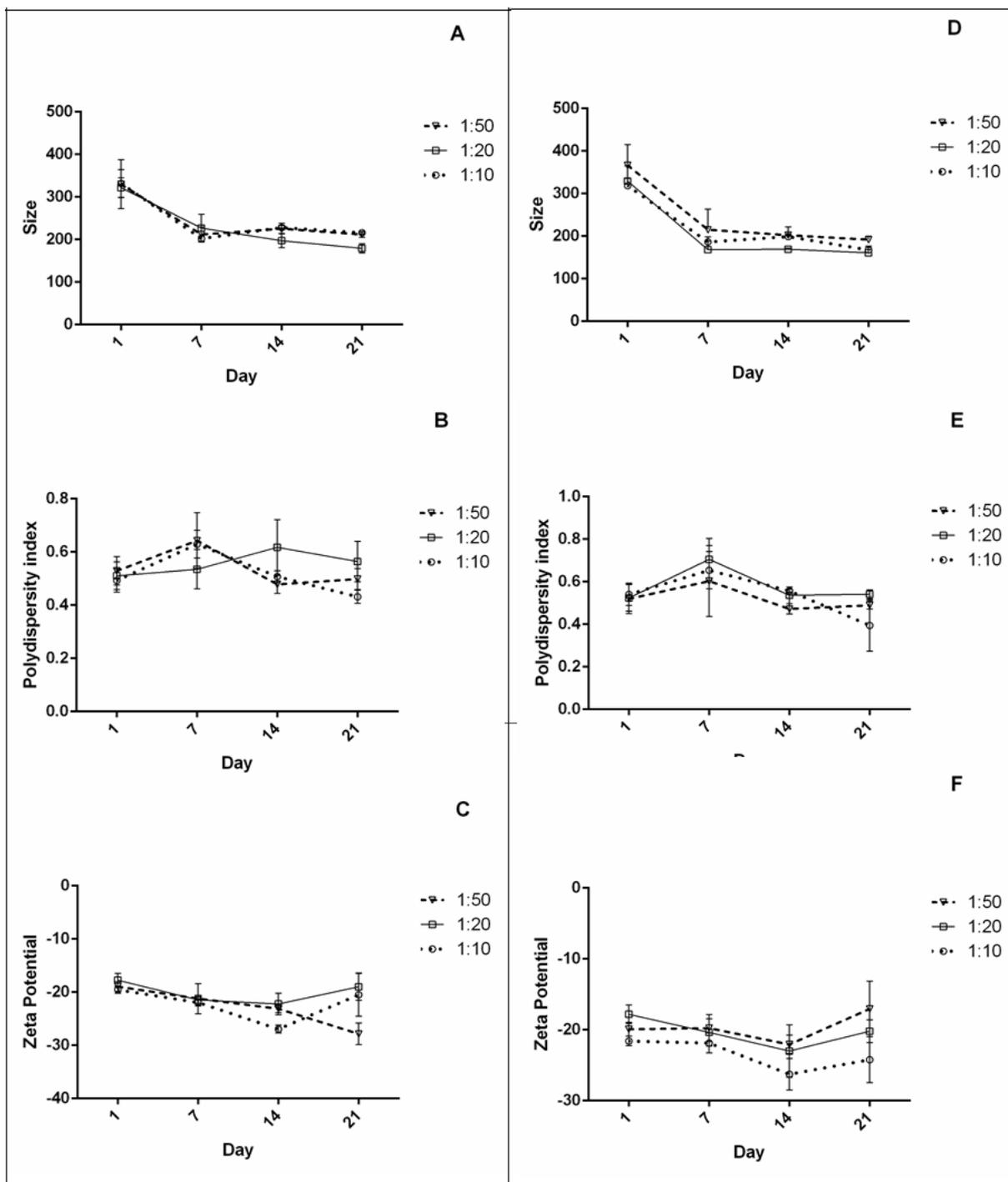


Fig 4. Characterization of optimized annatto aqueous nanodispersion (prepared with polysorbate 80/sorbitan monooleate at HLB 13) at different dilution ratios in water. Results from nanodispersions protected from light A) droplet size (nm), B) polydispersity index and C) zeta potential (mV) or unprotected from light D) droplet size (nm), E) polydispersity index and F) zeta potential (mV).

Similar profile was observed on particle size of the nanodispersions that were protected (Fig. 4A) or unprotected (Fig. 4D) from light. However, comparison between the analyzed parameter of nanodispersions protected and unprotected from light revealed

significant difference on size of nanodispersions at diluted ratios of 1:10 (Day 14; $p = 0.0038$ / Day 21; $p < 0.0001$) and 1:20 (Day 7; $p < 0.0001$). Regarding polydispersity index, difference was only observed for nanodispersion at dilution ratio of 1:20 (Day 7; $p = 0.0006$). Only this dilution did not present statistical significant difference ($p > 0.05$) on zeta potential, which was observed on nanodispersions at dilution ratios of 1:10 (Day 21; $p = 0.0088$) and 1:50 (Day 21; $p < 0.0001$).

Figure 5 shows the macroscopical appearance after storage of optimal annatto nanodispersions after different dilution ratios in water (1:10; 1:20; 1:50). Those protected from light maintained the initial organoleptic properties, with a remarkable orange colour and homogeneous aspect. It is more pronounced on the concentrated nanodispersion and gradually decreased as the system was diluted. The storage unprotected from light induced loss of colour in all nanodispersions, especially on the diluted systems, while the major colour intensity was observed on the concentrated nanodispersion. Highly diluted nanoemulsions may be used in food systems (Chang et al., 2015), including in commercial applications such as functional foods or beverages (Saber et al., 2013a,b) and an appropriate concentration that allow achievement of excellent final concentrations on the food product must be considered for the nano-additive (Davidov-Pardo et al., 2015). Thus, the present optimal nanodispersion in its concentrated form may be considered promising as a natural nano-colorant for further dilution and application on highly diluted food products.

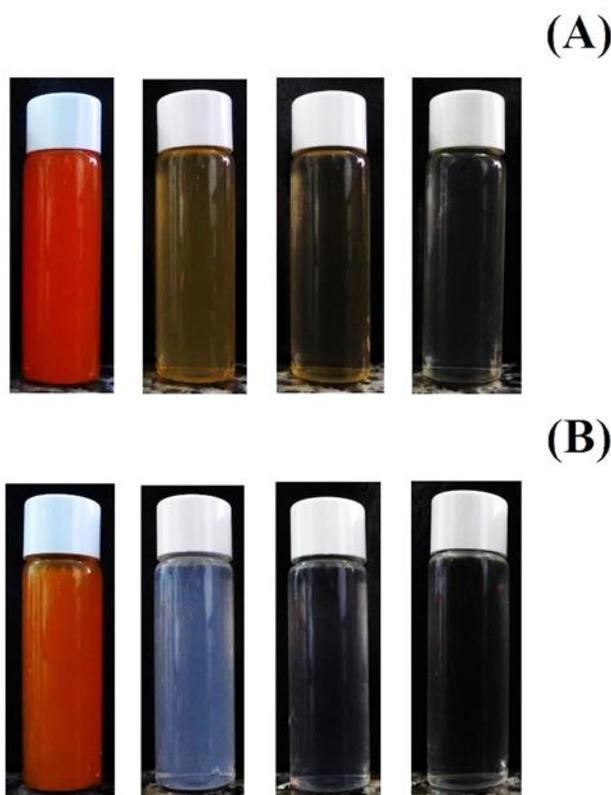


Fig 5. Macroscopical appearance of optimized annatto aqueous nanodispersion (prepared with polysorbate 80/sorbitan monooleate at HLB 13) at different dilution ratios in water (from the left to the right, respectively, concentrated nanodispersions and diluted nanodispersions at 1:10, 1:20 and 1:50) after storage. (A) protected from light and (B) unprotected from light.

Despite comparison of appearance of nanodispersion diluted at 1:10 ratio between the two conditions suggest photodegradation and alteration on colour, a bluish reflect still can be observed after storage. This is an indicative that colloidal system still are present in the formulation, since this appearance is characteristic for nanodispersions due to Tyndall effect.

Therefore, we chosen the optimal annatto aqueous nanodispersion diluted at 1:10 ratio for evaluation of the influence of the temperature on particle size distribution and zeta potential (Fig. 6A,B,C). Lowest particle growth was achieved until 35 °C (7.2%), while higher particle growth was observed until 40 °C (22.1 %) and 45 °C (41.6%). After the maximum that was reached at 45 °C (522.2 ± 25.3 nm), a tendency for linear decrease was observed until 80°C, reaching a minimum value size of 282.2 ± 13.02 nm at this

temperature. The polydispersity index presented a slight change from 25 to 30 °. Then a tendency for linear decrease was observed from 30-40 °C, reaching a minimum ($\text{pdi}_{40^{\circ}\text{C}} = 0.367 \pm 0.033$) followed by an overall increase until 80 °C, when it reached a value slightly lower ($\text{pdi}_{80^{\circ}\text{C}} = 0.446 \pm 0.033$) than the initial polydispersity index. Changes in particle size distribution may affect the polydispersity index, if a particle size population increases or decreases. This may be induced by rearrangement of particles due to release of some entrapped compounds or even alterations due to plasticity of the film formed by the surfactants. The zeta potential value remained around -17 mV to -15 mV until 50 °C, reaching the value $-12.7 \pm 0.61\text{mV}$ at 60 °C. Then, a rapid increase was observed, ending with zeta potential value of $5.12 \pm 0.85\text{ mV}$ at 80 °C. Slight particle growth (<10 %) together with acceptable polydispersity index suggest relative stability (Guttoff et al., 2015), while highly unstable systems are observed when zeta potential values are $\pm 0-10\text{ mV}$ (Bhattacharjee, 2016). Thus, considering this results, we can suggest that optimal storage conditions were observed on the temperature range of 25 to 35 °C, due to maintenance of droplet size and zeta potential values according to relative stability. However, due to relative stable behavior regarding zeta potential, further strategies aiming to generate narrower particle size distribution without any major particle growth could be performed for enhanced activity at least to 60 °C.

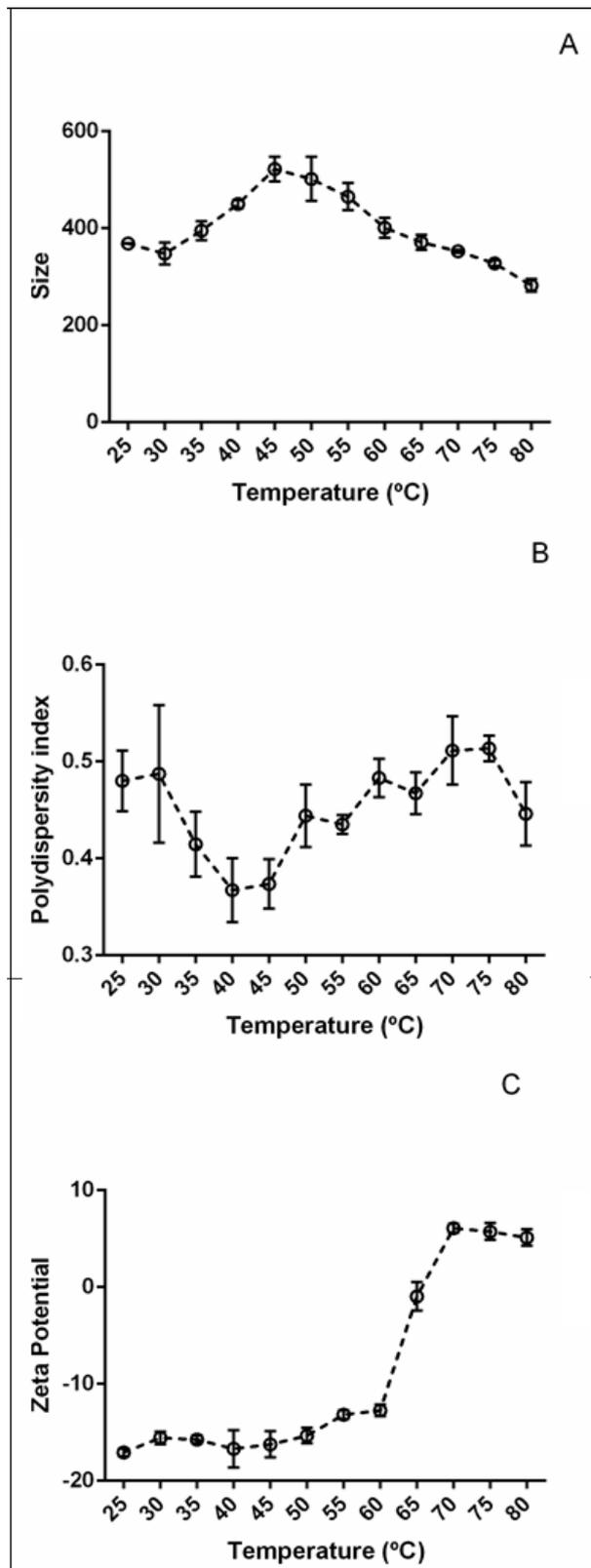


Fig 6. Evaluation of the influence of temperature increase on (A) droplet size, (B) polydispersity index and (C) zeta potential of optimized annatto aqueous nanodispersion (prepared with polysorbate 80/sorbitan monooleate at HLB 13) diluted in water (1:10).

Under optimal conditions, an experimental polydispersity index value around 0.410 was considered appropriate for astaxanthin aqueous nanodispersions. The method that

was employed was based on the dispersion of an organic phase constituted by a dichloromethane solution of the carotenoid and its further addition to the aqueous phase under high-pressure homogenization. Considering that, the method also involved evaporation of the organic solvent prior to achievement of the final nanodispersion, it was proposed as a food ingredient (Anarjan et al., 2010). Lycopene aqueous nanodispersions were also prepared by this approach (high-pressure method and dichloromethane as organic phase constituent). Poorly dispersability was related to systems prepared solely with polysorbate 80, evidenced by pdi values greater than 0.700 (Shariffa et al., 2016). Phytosterol-based nanodispersions were also prepared. At atmospheric pressure, the utilization of hexane as component of the organic phase induced formation of internal phase with average size around 150 nm and pdi around 0.430. Polydispersity values below 0.700 were also considered acceptable for food applications by these authors. On another hand, utilization of water-miscible organic solvents as constituents of organic phase induced higher average size, highlighted by the system prepared with acetone (size around 280 nm) (Leong et al., 2011). Regarding particle size, it was observed that lutein nanodispersions presented higher diameter after utilization of high-pressure valve homogenization (236.6 ± 10.0 nm). At the experimental organic-phase-to-aqueous-phase volume ratio that was used (3:7), lutein nanodispersion could not be produced using the solvent displacement method (Tan et al., 2016c).

Microparticles prepared with annatto seeds (geranylgeraniol-rich oil) for food applications were prepared using ultrasonication in order to reduce the superficial diameter. The lowest mean size that was achieved was around 700 nm (Silva et al., 2015). Polymeric nanocapsules containing bixin were prepared using interfacial deposition of preformed polymers. The spontaneous formation of nanocapsules in this procedure required utilization of organic solvents. Mean droplet size was around 200 nm and the zeta potential values ranged, approximately, from -15 mV to -26 mV during storage (Lobato et

al., 2013). To our knowledge, the only study regarding preparation of nanostructure systems with annatto seeds extract was carried out using single surfactant and organic solvent (Prada et al., 2016). Overall, the results obtained on the present study show the suitability of the present approach to generate nanodroplets with polydispersity index, in accordance with literature data for aqueous dispersed systems based on natural products that were proposed as food additives

Conclusions

Most of studies that generated nanodispersions for application in food science makes use of organic solvents on the preparation of organic phase prior to homogenization step. Despite a further removal step is performed, a method that avoid the needs for organic solvents that may be potentially toxic in some level should be encouraged. We provided a simple method that meets this concept and make use of low energy method and low-cost equipment, which is also an advantage in terms of industrial application and consumer expectance. It is also in accordance with green and ecofriendly concepts, generating less organic solvent residues. This approach, together with the utilization of pair of non-ionic surfactants on a wide range of HLB values has been widely used for preparation of aqueous nanoemulsions. However, to our knowledge, until this moment it was not explored in terms of aqueous nanodispersions based on solid substances or extracts. The promising annatto nanodispersion that was prepared opens perspectives for its evaluation and utilization in food matrices. Moreover, this method may be useful for other carotenoids or extracts and we believe that it open perspectives its study raw materials of great interest.

Acknowledgements

The authors thank CNPQ for the student scholarship granted to the first author and Pro-Rectory of Research and Post-Graduation of Amapá Federal University by the financial support (PAPESQ-PROPESPG).

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interests.

Ethical approval

Not applicable.

Informed consent

Not applicable.

Funding source

No funding source supported the present study.

References

Anarjan, N., Mirhosseini, H., Baharin, B. S., & Tan, C. P. (2010). Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. *Food Chemistry*, 123, 477-483.

Asmaoglu, S., Gündüz, G., Mavis, B., & Çolak, U. (2016). Synthesis and characterization of multi-hollow opaque polymer pigments. *Journal of Applied Polymer Science*, DOI: 10.1002/APP.43696.

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.

Cardarelli, C. R., Benassi, M. de T., & Mercadante, A. Z. (2008). Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *Food Science and Technology*, 41, 1689-1693.

Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2015). Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauricarginate). *Food Chemistry*, 172, 298–304.

Chengaiyah, B., Mallikarjuna Rao, K., Mahesh Kumar, K., Alagusundaram, M., & Madhusudhana Chetty, C. (2010). Medicinal importance of natural dyes – a review. *International Journal of PharmTech Research*, 2, 144-154.

Cheong, J. N., Tan, C. P., Man, Y. B. C., & Misran, M. (2008) α -tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering*, 89, 204-209.

Costa, C. L. S., & Chaves, M. H. (2005). Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. *Quimica Nova*, 28, 149-152.

Costa, R. S., Negrão, C. A. B., Camelo, S. R. P., Ribeiro-Costa, R. M., Barbosa, W. L. R., Costa, C. E. F., Silva-Júnior, J. O. C. (2013). Investigation of thermal behavior of

Heliotropium indicum L. lyophilized extract by TG and DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111,1959–1964.

Davidov-Pardo, G., Joye, I. J., McClements, D. J. (2015). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 1: Preparation and characterization. *Food Hydrocolloids*, 45, 309 – 316.

Delgado, A. M. A., Khandual, S., & Villanueva, S. (2017). Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: effects of food processing and methods for preservation. *Food Chemistry*, 225, 23-30.

Guttoff, M., Saberi, A. H., & McClements, D. J. (2015). Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. *Food Chemistry*, 171, 117-122.

Kelmann, R. G., Kuminek, G., Teixeira, H. F., & Koester, L. S. (2007). Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 342, 231-239.

Leong, W. F., Lai, O. M., Long, K., Man, Y. B. C., Misran, M., & Tan, CP. (2011). Preparation and characterization of water-soluble phytosterol nanodispersions. *Food Chemistry*, 129, 77-83.

Lobato, K. B. S, Paese, K., Forgearini, J. C., Guterres, S. S., Jablonski, A., & Rios, A. O. (2013). Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chemistry*, 141, 3906–3912.

Mala, K. S., Rao, P. P., Prabhavanthy, M. B., & Satyanarayana, A. (2015). Studies on application of annatto (*Bixa orellana* L.) dye formulations in dairy products. *Food Science and Technology*, 52, 912-919.

Marcolino, V. A., Zanin, G. M., Durrant, L. R., Benassi, M. T., & Matioli, G. (2011). Interactions of curcumin and bixin with β -cyclodextrin: complexation methods, stability and applications in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3348–3357.

Mehmood, T. (2015). Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. *Food Chemistry*, 183, 1-7.

Oliveira, A. E. M. F. M. O., Duarte, J. L., Cruz, R. A. S., Conceição, E. C., Carvalho, J. C. T., & Fernandes, C. P. (2017). Utilization of dynamic light scattering to evaluate *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion formation by non-heating and solvent-free method. *Brazil Journal Pharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.11.005>.

Prada, A. L., Bitencourt, A. P. R., Amado, J. R. R., Cruz, R. A. S., Carvalho, J. C. T., & Fernandes, C.P. (2016). Development and characterization of *Cassia grandis* and *Bixa orellana* nanoformulations. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16, 2057-2065.

Rahmalia, W., Fabre, J. F., & Moulougui, Z. (2015). Effects of cyclohexane/acetone ratio on bixin extraction yield by accelerated solvent extraction method. *Procedia Chemistry*, 14, 455 – 464.

- Ramamoorthy, S., Doss, F. P., Kundu, K., Satyanarayana, V. S. V., & Kumar, V. (2010). Molecular characterization of bixin – an important product. *Industrial Crops and products*, 32, 48-53.
- Rao, M. P., Manjunath, K., Bhagawati, S. T., & Thippeswamy, B. S. (2014). Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection – Preparation, characterisation and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 473, 485–492.
- Rao, P. P., Rao, G. N., Jyothirmayi, T., Satyanarayana, A., Karuna, M. S. L., & Prasad, R. B. N. (2015). Characterisation of seed lipids from *Bixa orellana* and *Trachyspermum*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92, 1483-1490.
- Ribeiro, H. S., Chu, B.S., Ichikawa, S., & Nakajima, M. (2008). Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, 22, 12-17.
- Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013a). Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 411, 105–113.
- Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D.J. (2013b). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions by spontaneous emulsification: Effect of propylene glycol and ethanol on formation, stability, and properties. *Food Research International*, 54, 812–820.
- Shahid, M., Shahid-ul-islam, & Mohammad, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 310-331.

Shariffa, Y. N., Tan, T. B., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2016).

Producing a lycopene nanodispersion: The effects of emulsifiers. *Food and Bioprocess Technology*, 98, 2010-216.

Silva, M. C. D., Botelho, J. R., Conceição, M. M., Lira, B. F., Coutinho, M. A. Dias, A. F., Souza, A. G., & Filho, P. F. A. (2005). Thermogravimetric investigations on the thermal degradation of bixin derived from the seeds of annatto (*Bixa orellana* L.). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 79, 277–281.

Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Ribeiro, C., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., Coimbra, J. S. R., Carneiro-da-Cunha, M. G., & Vicente, A. A. (2011). *Journal of Food Engineering*, 102, 130-135.

Silva, E. K., Zobot, G. L., & Meireles, M. A. A. (2015). Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Retention and release of a bioactive compound with functional activities. *Food Research International*, 78, 159-168.

Solans, C., & Solé, I. (2012). Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid interface & Interface Science*, 17, 246-254.

Surassmo, S., Min, S.G., Bejrapha, P., & Choi, M.J. (2010). Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. *Food Research International*, 43, 8-17.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 303-318.

Tan, C. P., & Nakajima, M. (2005). Beta-carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 92, 661-671.

Tan, T. B., Yussof, N. S., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2016a). Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: the effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. *Food Chemistry*, 194, 416-423.

Tan, T. B., Yussof, N. S., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2016b). Stability evaluation of lutein nanodispersions prepared via solvent displacement method: the effect of emulsifiers with different stabilizing mechanisms. *Food Chemistry*, 205, 155-162.

Tan, T. B., Yussof, N. S., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2016c). Comparing the formation of lutein nanodispersion prepared by using solvent displacement method and high-pressure valve homogenization: effects of formulation parameters. *Journal of Food Engineering*, 177, 65-71.

Teixeira, D. F. (2003). Estudo químico e avaliação biológica de *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng. (urucuri) e *Pterodon emarginatus* Vog. (Sucupira-branca) em *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro, 154 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS (quando necessário).

O interesse pela utilização de produtos de origem natural tem crescido de forma exponencial na última década. Os corantes, por exemplo, são ingredientes primordiais no ramo alimentício e devido a esta razão busca-se escolher aqueles que não apresentam efeitos nocivos a população e ao meio ambiente. O urucum está entre as principais plantas, especificamente a parte das sementes, utilizada para gerar cor a alimentos e a outros produtos.

A viabilização de corantes naturais em meio líquido ainda é um problema. Grande parte das substâncias capazes de acrescentar cor em produtos e encontrado em vegetais são os carotenoides. Estes são caracterizados por possuírem uma baixa solubilidade em meios aquosos, o que torna restrita sua utilização.

A nanotecnologia é uma ferramenta importante neste caso, pois possibilitou neste trabalho através da produção de nanodispersões, veicular bixina e outras substâncias biologicamente importante, em uma formulação a base de água. A técnica utilizada para obtenção das formulações foi eficiente, evidenciada pela boa estabilidade física, e com baixo custo, visto que não houve utilização de solvente orgânico e empregou-se baixo aporte de energia para a obtenção dos produtos.

A utilização do urucum é feita há anos, sem qualquer evidência de danos à saúde. Dessa forma, as formulações produzidas podem ser reproduzidas de forma fácil e rápida, sem agredir o meio ambiente. Desta forma, os resultados gerados por este trabalho permitem a ampliação de estudos que utilizem o extrato de urucum, em diversos ramos da pesquisa.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; DE JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. Química Orgânica. Rio de Janeiro: Guanabara, 1978. p. 713-715.

ASMAOGLU, S.; UNDUZ, G.; MAVIS, B.; ÇOLAK, U.. Synthesis and characterization of multi-hollow opaque polymer pigments. Journal of Applied Polymer Science. n. 43696. 2016.

ARIADNA, A. L.; BITENCOURT, A. P. R.; AMADO, J. R. R.; CRUZ, R. A. S.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P.. Development and characterization of Cassia grandis and Bixa orellana nanoformulations. Current Topics in Medicinal Chemistry. n. 16. p. 2057-2065. 2016.

BARRIOS, J. G. Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Nanociências)- Área de Ciências Tecnológicas, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria –RS. 2010.

BARRIO, A. G.; GRUEIRO, M. M. M.; MONTEIRO, D.; NOGAL, J. J.; ESCARIO, J. A.; MUELAS, S.; FERNANDEZ, C.; VEGA, C.; ROLON, M.; FERNANDEZ, A. R. M.; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P. In vitro antiparasitic activity of plant extracts from Panama. Pharmaceutical Biology. v. 42. p. 332-337. 2004.

BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B.. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (Annatto). Science. v. 300. p. 2089-2091. 2015.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5ª edição. v. 1. p 101. 2010.

BRITO, J. G.; QUEIROZ, A. J. de M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; OLIVEIRA, A. da S.. Armazenamento de grãos residuais de urucum sob atmosfera controlada. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. v. 19. n. 12. p. 1185-1191. 2015.

CALIXTO, N. O.; SILVA, M. C. C.; GAYER, C. R.; COELHO, M. G.; PAES, M. C.; TODESCHINI, A. R.. Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from Pterodon pubescens fruit oil is mediated by inhibition of cyclooxygenase-1. Planta Med. 2007

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

COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de Bixa orellana L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. Química Nova. v. 28. n. 1, p. 149-152. 2005.

- CHENGAIHAH, B.; RAO, K. M.; KUMAR, K. M.; ALAGUSUNDARAM, M. CHETTY, C. M.. Medicinal importance of natural dyes – a review. *International Journal of PharmTech Research*. v. 2. n. 1. p. 144-154. 2010.
- CHEONG, J. N.; TAN, C. P.; MAN, Y. B. C.; MISRAN, M... α -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering*. v. 89. p. 204-209. 2008.
- CHISTÉ, R. C.; YAMASHITA, F.; GOZZO, F. C.; MERCADANTE, A. Z.. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *Journal of Chromatography*. v. 1218. p. 57-63. 2011.
- CUNHA, F. G.. Estudo da extração mecânica de bixina das sementes de urucum em leite de jorro. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. 2008.
- CUONG, T. V.; CHIN, K. B.. Effects of annatto (*Bixa orellana* L.) seeds powder on physicochemical properties, antioxidant and antimicrobial activities of pork patties during refrigerated storage. *Journal of Food Science*. n. 4. v. 36. p. 476-486. 2016.
- DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L. ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T.. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* n. 1. v. 32. p. 9-18. 2011.
- DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; KAISER, S.; LUCCA, L. G.; TEIXEIRA, H. F.; LIMBERGER, R. P.; VEIGA-JR, V. F.; KOESTER, L. S.. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. *Industrial Crops and Products*. v. 59, p. 154-162. 2014.
- FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*. v. 74. p. 136-138. 2003.
- GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S. A.. Comparison of volatile compounds in water- and oil-soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 50. p. 2010-2015. 2002.
- GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. de F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K.. Carotenóides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*. n. 8. v. 42. p. 1510-1517. 2012.
- GIRIDHAR, P.; AKSHATHA, V.; PARIMALAN, R.. Review on annatto dye extraction, analysis and processing – A food technology perspective. **Journal Science Research and Reports**. 2014.
- GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends in Biotechnology*, v. 21. n. 12, p. 513-515, dez. 2003.
- HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; SILVA, B. V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. *Revista Virtual de Química*. n. 3. v. 4. p. 394-420. 2013.

- IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGUEROS, M.; ESPUELAS, S..
Nanomedicine: Novel approaches in humanan veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology*.v. 180. p. 47-71. 2011.
- JOSEPH, N.; SIRILL, E. A. Evaluation and selection of elite annatto (*Bixaorellana* L.) and identification of RAPD markers associated with yield traits. *Braz. J. Bot.*. v. 37, n. 1. 2014.
- JÚNIOR, F. H. X.. Emulsões de óleo de copaíba: determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo crítico (EHLc), propriedades e estabilidade físico-químicas. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2011.
- KIOKIAS, S.; GORDON, M. H.. Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chemistry*. v. 83. p. 523-529. 2003.
- LHERAS, E. Bixaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5745>>. Acesso em: 29 Jun. 2015.
- LOBATO, K. B. S. Produção e avaliação da estabilidade de nanocápsulas de bixina em sistemas modelo de fotossensitização e aquecimento. 2013. 107 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.
- MALA, K. S.; RAO, P. P.; PRABHAVATHY, M. B.; SATYANARAYANA, A. Studies on aplication of annatto (*Bixaorellana*L.) dye formulations in dairy products. *Journal of food and science tecnology*. v. 52. p. 912-919. 2015.
- MATH, R. G.; RAMESH, G.; NAGENDER, A.; SATYANARAYANA, A.. Design and development of annatto (*Bixa orellana* L.) seed separator machine. *Journal of Food Science and Technology*. v. 53. p. 703-711. 2016.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A. RODRIGUEZ-AMAYA, D.; PFANDER, H.; BRITTON, G.. Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. *Phytochemistry*. v. 41. n. 4. p. 1201-1203. 1996.
- MONZOTE, L.; GARCIA, M.; SCULL, R.; CUELLAR, A.; SETZER, W. N. Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. *Phytotherapy Research*. v. 28. p. 753-758. 2014.
- MOREIRA, P. A.; LINS, J.; DEQUIGIOVANNI, G.; VEASEY, E. A.; CLEMENT, C. R.. The domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucuana* in Amazônia. *Economic Botany*. n. 2. v. 69. p. 127-135. 2015.
- OLEGÁRIO, L. S.; SANTOS, J. A. B.. Prospecção tecnológica sobre o corante natural de urucum (*Bixa orellana* L.). *Cad. Prospec.* v. 7. n. 4. p. 601-611. 2014.
- OLIVEIRA, J. S.. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.). Tese aprsentada ao programa de Pós-graduação em engenharia química do centro tecnológico da universidade federal de Santa Catarina. 2005.

- PARK, J. S.; MATHISON, B. D.; CHEW, B. P.. Uptake and immunomodulatory role of bixin in dogs. *American Society of Animal Science*. n. 94. p. 135-143. 2016.
- PAULA, H. Estudo de propriedades funcionais de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.): Alegações de redução do colesterol sérico e regular o equilíbrio redox. Tese (Doutorado). – Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. 2009.
- RAMAMOORTHY, S.; DOSS, F. P.; KUNDU, K.; SATYANARAYANA, V. S. V.; KUMAR, V.. Molecular characterization of bixin – an important industrial product. *Industrial Crops and products*. v. 32. p. 48-53. 2010.
- RAO, P. P.; RAO, G. N.; JYOTHIRMAYI, T.; SATYANARAYANA, A.; KARUNA, M. S. L.; PRASAD, R. B. N.. Characterization of seed lipids from *Bixa orellana* and *Trachyspermum copticum*. *J. Am. Oil Chem Soc.* n. 92. p. 1483-1490. 2015.
- RIBEIRO, H. S.; CHU, BS.; ICHIKAWA, S.; MITSUTOSHI, N.. Preparation of nanodispersions containing b-carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*. v. 22. p. 12-17. 2008.
- RIVERA-MADRID, R.; AGUILAR-ESPINOSA, M.; CÁRDENAS-CANEJO, Y.; GARZA-CALIGARIS, L. E.. Carotenoid derivatives in achiote (*Bixa orellana*) seeds: synthesis and health promoting properties. *Front. Plant. Sci.* v. 7. n. 1406. 2016.
- RODRIGUES, L. M.; ALCÁZAR-ALAY, S. C.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A.. Bixin extraction from defatted annatto seeds. *C. R. Chimie*. v. 17. p. 268-283. 2014.
- SANTANA, M. C. C.; MACHADO, B. A. S.; SILVA, T. do N.; NUNES, I. L.; DRUZIAN, J. I.. Incorporação de urucum como aditivo antioxidante em embalagens biodegradáveis a base de quitosana. *Ciência Rural*. n. 3. v. 43. p. 544-550. 2013.
- SATYANARAYANA, A.; RAO, P. P.; RAO, D. G.. Influence of source and quality on the color characteristics of annatto dyes and formulations. *Food Science and Technology*. v. 42. p. 1456-1460. 2010.
- SEN, M.; DAS, J.; ROY, S. DAS, N.. Membrane synthesized from microemulsion-derived ilmenite nano powders used for removal of red dye from textile industry. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* n. 3. v. 13. p. 487-497. 2016.
- SHAHID, M.; SHAHID-UL-ISLAN; MOHAMMAD, F.. Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production*. v. 53. p. 310-331. 2013.
- 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. p. 499-514. 2016.
- SHARON, M.; NICKOLS-RICHARDSON. Nanotechnology: implications for food and nutrition professionals. *Journal of the American Dietetic Association*. v. 107. n. 9. p. 1494-1497. 2007.
- SILVA, M. L.. Extração de corantes de urucum (*Bixa orellana* L.) utilizando sistema de recirculação de solventes. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará,

Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém. 2006.

SILVA, M. G.; CARVALHO, P. R.; TAVARES, P. E.; CARVALHO, P. R. N.; CIPOLLI, K. M. V. A.; ORMENESE, R. C. S. C.. Potential of annatto in agroindustries and animal feed: fragrance, flavor, taste and color of *Bixa orellana* L. derivatives. **Journal of Applied Research**. v. 5. n. 12. p. 2488-2488. 2009.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; RIBEIRO, C.; AVIDES, M. C.; QUINTAS, M. A. C.; COIMBRA, J. S. R.; CARMEIRO-DA-CUNHA; VICENTE, A. A.. Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. *Journal of Food Engineering*. v. 102. p. 130-135. 2011.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. n. 17. p. 246-254. 2012.

SOZER, N.; KOKINI, J. L.. Nanotechnology and its applications in the food sector. 2009.

STOHS, S. J. Safety and efficacy of *Bixa orellana* (Achiote, annatto) leaf extracts. *Phytotherapy Research*. v. 28. p. 956-960. 2014.

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. S.. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 100. p. 175-183. 2015.

TAKAMOTO, T. O.. Caracterização e aplicação de nanodispersão de bixina. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2015.

TAN, C. P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*. v. 92, p. 661-671. 2005.

VALÉRIO, M. A.; RAMOS, I. L.; BRAGA NETO, J. A.; MACEDO, L. R.. Annatto seed residue (*Bixa orellana* L.): nutritional quality. *Food Science and Technology*. n. 35. v. 2. p. 326-330. 2015.

VILAR, D. de A.; VILAR, M. S. de A.; MOURA, T. F. A. de LIMA; RAFFIN, F. N.; OLIVEIRA, M. R.; FRANCO, C. F. de O.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; DINIZ, M. de F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review. *The Scientific World Journal*. 2014

VIUDA-MARTOS, M.; CIRO-GOMEZ, G. L.; RUIZ-NAVAJAS, Y.. In vitro antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (*Bixa orellana* L.) leaves and seeds. *Journal of Food Safety*. v.32. n. 4. p. 399-406. 2012.

YONG, Y. K.; ZAKARIA, Z. A.; KADIR, A. A.; SOMCHIT, M. N.; CHENG LIAN, G.; AHMAD, Z.. Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. *Complementary and Alternative Medicine*. n. 13. v. 32. 2013.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q.. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. **Food Hydrocolloids**. n. 33. p. 1-9. 2013.

Submission checklist

1) Study contents:

The Authors should ensure that

1. The manuscript fits within **Aims & Scope** of Food Chemistry.
2. The research is **novel** and has **not been published previously** - please see "Responsible research publication: international standards for authors" from COPE for more information http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011_0.pdf
3. **Ethical consent** has been obtained in case of work on animals and/or humans.

2) Manuscript preparation:

The Authors should ensure that

1. The number of words and of figures/tables is within limits:
 - Research article: 7500 words, 6 tables and figures combined
 - Review article: 10 000 words, 6 tables and figures combined
 - Short communication: 3000 words, 6 tables and figures combinedMore tables and figures? Submit as **supplementary material**
2. The **title page** contains title, author names, affiliations and corresponding author telephone. **Email addresses are required for ALL authors. Authors must provide and use an e-mail address unique to themselves and not one that is shared with another author registered in EES, or a department.**
3. The **highlights** are provided (3-5 bullet points, max 85 characters each including spaces).
4. The manuscript contains a **conflict of interest** statement (before references)
5. The **language** follows the requirements of the Guide for Authors .
6. The **formatting** of the manuscript follows the requirements of the Guide for Authors .
7. Continuous **line numbering** is provided throughout the manuscript (including captions and references); **page numbering** is provided.
8. All relevant **references** are provided in alphabetical order
9. Figures and tables (6 combined) include clear **labels** and are prepared as **individual files**.

The manuscript contains appropriate **ethical approval** and **informed consent** (if applicable, include statement).

MATÉRIAS PRIMAS

As sementes de *Bixa orellana* L. foram coletadas no município de Macapá (Amapá) (Coordenada geográfica - S 00°01'07.5" W 051°06'18.4"). A identificação do material botânico foi realizada pela botânica Rosângela Sarquis e a exsicata foi depositada no Herbário Amapaense (HAMAB) e registrada sob o nº 10068. Os tensoativos não iônicos utilizados (polisorbato 80, monooleato de sorbitano e monooleato de polietilenoglicol 400) foram obtidos da empresa Praid® Especialidade Químicas (SP, Brasil). A acetona foi obtida da empresa Vetec® (RJ, Brasil).

EXTRATO DE *Bixa orellana* L.

A obtenção do extrato de urucum foi realizada conforme descrito por Costa & Chaves (2005). As sementes foram retiradas dos frutos (814,94 g) e imediatamente submetidas à extração por maceração utilizando-se acetona, sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi feita a filtração do material e as sementes foram novamente submetidas a extração, após nova adição de acetona. Esse procedimento foi repetido até o filtrado se apresentar como um líquido incolor. O volume total de acetona empregado para a extração foi de 7 litros. Os filtrados obtidos foram reunidos e concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório da IKA® (modelo HB 05) até completa remoção do solvente. O extrato seco obtido foi posteriormente congelado, liofilizado e armazenado ao abrigo da luz e sob refrigeração.

Determinação do teor de bixina (UV-VIS)

A concentração de bixina presente na solução estoque foi obtida através de análise espectrofotométrica (Costa e Chaves, 2005), com algumas modificações. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro UV Mini (Shimadzu, Japão). O extrato foi solubilizado em clorofórmio e o teor de bixina foi determinado utilizando-se o coeficiente de absorção específica da bixina ($2826 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A análise foi realizada em triplicata e o

resultado expresso pela média e desvio padrão. O teor de bixina foi calculado a partir da equação $A = abc$, onde:

A = absorvância da solução contendo o analito

a = absorvidade específica da bixina ($\epsilon = 2826$)

b = caminho óptico (1 cm)

c = concentração de bixina (g/L)

Análise termogravimétrica

A termogravimetria (TG) foi realizada em um analisador térmico Shimadzu® (modelo TGA 50/50H) (Quito, Japão). A análise foi feita com o extrato acetônico de urucum em atmosfera de nitrogênio e de ar sintético com fluxo de 50 mL/ min, razão de aquecimento de 10°C/ min numa faixa de temperatura de 25 a 600°C, utilizando-se um porta amostra de platina.

Infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho do extrato acetônico do urucum foi realizada em espectrofotômetro com transformador de Fourier (FTIR) (Shimadzu® Corporation IR Prestige 21 Cat. No. 206-73600-36- Kyoto-Japan) na região espectral de 4000 a 600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans, com auxílio do acessório de Refletância Total Atenuada.

Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

O extrato de urucum foi analisado em um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massas (GCMS-QP5000, SHIMADZU) equipado com detector por impacto de elétrons. A amostra foi solubilizada em diclorometano e injetada em coluna RTX-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μm). As condições de análise foram: hélio como gás de arraste; fluxo com taxa de 1mL/min; injeção de split com taxa de 1:60; temperatura do injetor, 270°C, temperatura do detector, 270 °C. A temperatura inicial do forno foi 180°C, com posterior incremento de 10°C/min até 270 °C, finalizando com 20 min de eluição

isotérmica nessa temperatura. As condições da espectrometria de massas foram: voltagem de ionização de 70eV, taxa de varredura de 1 scan/s e faixa de $m/z = 50 - 600$.

NANODISPERÇÕES AQUOSAS A BASE DE URUCUM

Soluções estoque constituídas por extrato de urucum e tensoativo (s) foram preparadas através da homogeneização em agitador magnético (400 rpm, 2 h) de 0,1 g de extrato de urucum e 2,9 g de tensoativo, ou mistura de tensoativos. Em seguida, a mistura foi centrifugada durante 15 minutos. Após a centrifugação, retirou-se, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante da mistura, que foi utilizado como fase oleosa para preparação das nanodispersões. Água destilada (98 g) foi adicionada lentamente (2,8 mL/s) a fase oleosa (2,0g) em um bequer, sob agitação magnética (500 rpm). O processo de homogeneização durou durante 1 hora, a partir da completa de adição de água. Após esse período, as nanodispersões aquosas a base de urucum foram diluídas em água deionizada (1:1) e armazenadas ao abrigo da luz sob temperatura ambiente.

Avaliação da influência de diferentes proporções de tensoativos não iônicos

Misturas de monooleato de sorbitan e polisorbato 80 foram obtidas sob diferentes proporções para preparação das fases oleosas. Valores de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) entre 9 - 15, foram obtidos através da equação abaixo:

$$EHL = \frac{EHL_a \times m_a + EHL_b \times m_b}{m_a + m_b}$$

Onde, EHL = equilíbrio hidrófilo-lipófilo da mistura de tensoativos; EHL_a = valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo do tensoativo mais hidrofóbico; EHL_b = valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo do tensoativo mais hidrofílico; m_a = massa do tensoativo mais hidrofóbico e m_b = massa do tensoativo mais hidrofílico.

Avaliação da influência da adição de uma dispersão aquosa de outro tensoativo não-iônico

As nanodispersões aquosas de urucum recém-preparadas também foram diluídas (1:1) em uma dispersão aquosa de monooleate de polietilenoglicol 400 (1%,p/p). Foi avaliada a influência desse tensoativo adicional no comportamento das nanodispersões já

formadas pela utilização de diferentes proporções de monooleate de sorbitano/polisorbato 80.

Caracterização das nanodispersões aquosas a base de urucum

As nanodispersões aquosas a base de urucum caracterizadas utilizando-se um equipamento ZetaSizer® Nano-ZS (Malvern, Reino Unido) equipado com laser vermelho ($\lambda = 632.8$ nm) e o ângulo de espalhamento do detector foi 90°. As nanodispersões foram diluídas em água deionizadas e analisadas após 0, 1, 7 e 21 dias. O tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foram medidos em triplicata e os resultados expressos em função da média e desvio padrão.

Nanodispersão aquosa otimizada a base de urucum

Após a avaliação dos parâmetros acima mencionados, a nanodispersão aquosa otimizada a base do urucum foi escolhida com base na mistura de monooleate de sorbitano/polisorbato 80 capaz de gerar a nanodispersão com melhores características. Ela foi diluída em água deionizada (1:10, 1:20 e 1:50). Cada diluição foi armazenada protegida ou exposta à luz, sob temperatura controlada (30 ± 2 °C). A análise de distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta foi realizada sob diferentes dias (0, 1, 7 e 21 and 30).

A distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta também foram avaliadas utilizando-se uma rampa de temperatura linear em condições programadas (Oliveira et al., 2017): 25-80°C, com aumento de 5°C a cada medição. O crescimento da partícula (CP) (Mehmood, 2015; Guttoff et al., 2015) foi determinado através da equação a seguir: $CP = 100 \times [\text{tamanho médio (t2)} - \text{tamanho médio (t1)}] / \text{tamanho médio (t1)}$, onde t2 = tamanho médio de partícula após increment de temperatura e t1 = tamanho médio de partícula na temperature inicia.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de Variância (Anova One-way) com 95% de interval de confiança, seguido deteste de Tukey, foi realizado utilizando-se o Software R (R Core Team, 2013).As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.