

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

Carotenoides microemulsionados: Estratégia para enriquecimento de matriz alimentar aquosa.

Tailise Beatriz Roll Zimmer

Pelotas, 2023

Tailise Beatriz Roll Zimmer

Carotenoides microemulsionados: Estratégia para enriquecimento de matriz alimentar aquosa.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi - UFPel

Prof^a. Dr^a. Carla Rosane Barboza Mendonça – UFPel

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

Z72c Zimmer, Tailise Beatriz Roll

Carotenoides microemulsionados: estratégia para enriquecimento de matriz alimentar aquosa / Tailise Beatriz Roll Zimmer; Rui Carlos Zambiasi, orientador; Carla Rosane Barboza Mendonça, coorientadora. – Pelotas, 2023.

115 f.

Tese (Doutorado) – Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Carotenoides. 2. Tensoativos. 3. Microemulsão O/A. 4. Pigmentos. 5. Suco clarificado de maçã. I. Zambiasi, Rui Carlos, orient. II. Mendonça, Carla Rosane Barboza, coorient. III. Título.

CDD: 663.63

Tailise Beatriz Roll Zimmer

Carotenoides microemulsionados: Estratégia para enriquecimento de matriz alimentar aquosa.

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/09/2023

Banca Examinadora:

Dr^a. Cristina Jansen Alves, Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

Prof.^a Dr^a. Daniela Bianchini, Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Prof. Dr. Mariano Michelin, Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Dr^a. Yara Patrícia da Silva, Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter me concedido realizar este grande desafio, por me conceder fé, sabedoria e força para superar cada obstáculo.

Ao meu marido William, por me dar incentivo e coragem diante de cada obstáculo.

Aos meus pais, por sempre me darem força e me apoiarem em todos os momentos.

Aos meus irmãos, por todo apoio.

Aos meus familiares, tias e primos por me incentivarem a estudar e a alcançar meus objetivos.

Aos meus sogros, pelo apoio, carinho e acolhimento.

A Francine, minha amiga desde a graduação por sempre me apoiar e dar bons conselhos.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Raquel Oliveira, Kátia Gomes, Bruna Antunes pelos momentos de alegrias e aprendizagem que compartilhamos.

Ao orientador, professor Rui Carlos Zambiasi e a professora co-orientadora Carla Rosane Barboza Mendonça pelo auxílio, disponibilidade, ensinamentos transmitidos e pelas orientações concedidas.

A professora Gracélie Aparecida Serpa Schulz pela cedência do monoglicérides utilizado neste trabalho e a professora Angelita da Silveira Moreira pela análise de reologia.

A professora Márcia Gularte e ao professor Eliezer Avila Gandra por todo apoio concedido na realização das análises de sensorial e de microbiologia, respectivamente.

Ao professor Luiz Antônio de Almeida Pinto e a Bruna Silva de Farias da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) pela análise de DLS (Espalhamento de luz dinâmico).

A todos os colegas, amigos, professores e funcionários do DCTA e do CCQFA que fizeram parte nesta trajetória.

À UFPel e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos (PPGCTA) pela oportunidade da realização deste estudo.

A CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Dedico este trabalho a minha família.

Resumo

ZIMMER, Tailise Beatriz Roll. **Carotenoides microemulsionados: Estratégia para enriquecimento de matriz alimentar aquosa.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Os carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis, muitos deles de cor intensa, sintetizados por plantas e microrganismos. Nutricionalmente, estão dentre os componentes minoritários mais importantes dos alimentos, pois agem como antioxidantes e alguns são precursores da vitamina A. No entanto, estes compostos são quimicamente instáveis, requerendo estratégias para ampliar sua estabilidade em produtos em que são adicionados. Com base nisso, o estudo teve como objetivo desenvolver microemulsões contendo carotenoides e avaliar as possibilidades para a aplicação deste sistema em uma matriz alimentar aquosa. No primeiro estudo, consta uma revisão bibliográfica sobre informações acerca das técnicas mais recentes de proteção e aplicação de carotenoides em matrizes alimentares, especialmente voltadas ao uso de nanotecnologias. Constata-se que os estudos sobre sistemas de liberação para uso de carotenoides em alimentos são recentes, com destaque para sua aplicação em iogurtes, havendo a necessidade de mais pesquisas para ampliar sua aplicação em diferentes matrizes alimentares. No segundo e terceiro estudo, são reportados os experimentos relativos ao desenvolvimento de microemulsões do tipo (O/A) incorporando β -caroteno (sintético) e urucum (*Bixa orellana*) em suco clarificado de maçã, com a respectiva avaliação de algumas propriedades (antioxidantes, reológicas e estruturais) e da estabilidade do produto (por tempo de armazenamento, por centrifugação e por condições térmicas), bem como, avaliar o comportamento microbiológico do suco clarificado de maçã microemulsionado com carotenoides durante 21 dias de armazenamento refrigerado, e os diferentes atributos sensoriais na aceitação do produto pelos consumidores. O produto desenvolvido apresentou clareza óptica, cor mais intensa, características isotrópicas, estabilidade sob aquecimento, comportamento newtoniano e raio hidrodinâmico na ordem de nanômetros; porém, com gotículas assimétricas e polidispersas, e, além disso, baixos valores de potencial zeta e de mobilidade. A amostra de suco de maçã clarificado com microemulsão de β -caroteno e Tween 20 apresentou pequeno desenvolvimento fúngico no tempo de 21 dias de estocagem, além disso, não foi observado desenvolvimento de bactérias ácido lácticas em até 14 dias de armazenamento refrigerado. Sensorialmente a maçã foi o descritor mais perceptível no teste de dominância temporal das sensações (TDS). Além, disso, os resultados indicaram a preferência pelas formulações com menor porcentagem de Tween 20, independente do tipo de fonte de carotenoide utilizado, e observou-se uma tendência de compra para a amostra de suco clarificado de maçã adicionada de urucum na forma de microemulsão. Por fim, o presente trabalho representa uma inovação neste campo de estudo em função das limitadas descrições da literatura sobre a aplicação do sistema de microemulsão (O/A) visando o enriquecimento de carotenoides em matrizes alimentares aquosas.

Palavras-chave: carotenoides, tensoativos, microemulsões O/A, pigmentos, vitamina A, suco clarificado de maçã.

Abstract

ZIMMER, Tailise Beatriz Roll. **Microemulsified carotenoids: Strategy for enrichment of aqueous food matrix.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Carotenoids are fat-soluble natural pigments, many of them with intense color, which are synthesized by plants and microorganisms. Nutritionally, they are among the most important minority components of foods, as they act as antioxidants and some are precursors of vitamin A. However, these compounds are chemically unstable, requiring strategies to increase their stability in products to which they are added. Therefore, the study aimed to develop microemulsions containing carotenoids and to evaluate the possibilities of this system for application in an aqueous food matrix. The first study contains a bibliographical review of information about the most recent techniques for protecting and applying carotenoids in food matrices, especially focused on the use of nanotechnology. It appears that studies on release systems for the use of carotenoids in foods are recent, with emphasis on their application in yogurts; therefore, more research is needed to expand their application in different food matrices. The second and third study, experiments were related to the development of microemulsions of the (O/W) type incorporating β -carotene (synthetic) and annatto (*Bixa orellana*) in clarified apple juice. These studies reported the evaluation of some properties (antioxidants, rheological and structural) and product stability (by storage time, centrifugation and thermal conditions), as well as evaluating the microbiological behavior of clarified apple juice microemulsified with carotenoids during 21 days of refrigerated storage, and the different sensory attributes in acceptance of the product by consumers. The developed product presented optical clarity, more intense color, isotropic characteristics, stability under heating, Newtonian behavior and hydrodynamic radius in the order of nanometers; however, with asymmetric and polydisperse droplets, and, in addition, low values of zeta potential and mobility. The sample of apple juice clarified with β -carotene and Tween 20 microemulsion showed little fungal development within 21 days of storage, in addition, no development of lactic acid bacteria was observed within 14 days of refrigerated storage. Sensory, the apple was the most noticeable descriptor in the temporal dominance of sensations (TDS) test. Furthermore, the results indicated a preference for formulations with a lower percentage of Tween 20, regardless of the type of carotenoid source used, and a purchasing trend was observed for the sample of clarified apple juice added with annatto in the form of a microemulsion. Finally, the present work represents an innovation in this field of study due to the limited descriptions in the literature on the application of the microemulsion system (O/W) aiming at the enrichment of carotenoids in aqueous food matrices.

Keywords: carotenoids, surfactants, O/W microemulsions, pigments, vitamin A, clarified apple juice.

Lista de Figuras

Estudo 1

Figura 1.	Fórmula estrutural dos principais carotenoides.....	20
Figura 2.	Ação do licopeno na presença do 1O_2	21
Figura 3.	Transformação do β -caroteno em vitamina A.....	22
Figura 4.	Formas isoméricas <i>trans</i> e <i>cis</i> do licopeno.....	23

Estudo 2

Figura 1.	Ilustração da aparência de microemulsões. MCT (Microemulsão com β -caroteno - Tween 20); MCTM (Microemulsão com β -caroteno - Tween 20 e Monoglicerídeos); MUT (Microemulsão com urucum - Tween 20); MUTM (Microemulsão com urucum - Tween 20 e Monoglicerídeos).....	61
Figura 2.	Medida da absorvância por espectrofotometria no UV das amostras de suco, no comprimento de onda de 370 nm (A) e 450 nm (B), na faixa de temperatura de 5 °C a 70 °C.....	64
Figura 3.	Atividade antioxidante por ABTS (A) e por DPPH (B), e teor de carotenoides (C) nos sucos de maçã clarificados contendo carotenoides microemulsionados, no período de quatro semanas sob refrigeração.....	74

Estudo 3

Figura 1.	Histograma da frequência de distribuição da escala hedônica para os atributos avaliados nas quatro amostras de suco clarificado de maçã microemulsionado com β -caroteno (MC).....	98
Figura 2.	Histograma da frequência de distribuição da escala hedônica para os atributos avaliados nas quatro amostras de suco clarificado de maçã microemulsionado com urucum (MU).....	100
Figura 3.	Histograma da soma dos pontos de preferência dos avaliadores para as quatro amostras de suco microemulsionado com β -caroteno (MC) e urucum (MU).....	102
Figura 4.	Histograma da intenção de compra para as amostras de suco clarificado de maçã microemulsionado com carotenoides MCT: Microemulsão com β -caroteno - Tween 20; MUT: Microemulsão com urucum - Tween 20.....	102
Figura 5.	Dominância temporal das sensações no suco clarificado de maçã microemulsionado com β -caroteno.....	104
Figura 6.	Dominância temporal das sensações no suco clarificado de maçã microemulsionado com urucum.....	105

Lista de esquemas

Estudo 1

Esquema 1.	Ação da luteína ou zeaxantina frente a um radical livre.....	24
Esquema 2.	Formação de peróxido a partir da luteína ou zeaxantina na presença de O ₂	24

Lista de equações

Estudo 2

Equação 1.	Porcentagem de inibição do radical DPPH.....	59
Equação 2.	Porcentagem de inibição do radical ABTS.....	59
Equação 3.	Carotenoides.....	60

Estudo 3

Equação 1.	Índice de aceitação (I.A).....	92
------------	--------------------------------	----

Lista de tabelas

Estudo 2

Tabela 1.	Formulação das microemulsões de carotenoides em suco de maçã clarificado.....	57
Tabela 2.	Parâmetros físico-químicos das microemulsões de carotenoides em suco de maçã clarificado.....	62
Tabela 3.	Viscosidade das amostras de suco nas temperaturas de 5°C e 25°C nas taxas de deformação de 10, 20, 30, 50, 100, 150 e 200s ⁻¹	69
Tabela 4.	Parâmetros estruturais das microemulsões de carotenoides em suco de maçã clarificado.....	70
Tabela 5.	Atividade antioxidante e conteúdo de carotenoides nas microemulsões de carotenoides em suco de maçã clarificado, durante quatro semanas de armazenamento refrigerado a 4 °C.....	85

Estudo 3

Tabela 1.	Formulação de suco de maçã clarificado com carotenoides microemulsionados submetidas à avaliação microbiológica.....	89
Tabela 2.	Formulações do suco de maçã clarificado com carotenoides microemulsionados submetidas à análise sensorial.....	90
Tabela 3.	Contagem total de fungos nos sucos de maçã clarificados com carotenoides microemulsionados, durante o armazenamento refrigerado por 21 dias.....	93
Tabela 4.	Contagem total de bactérias ácido lácticas nos sucos de maçã clarificados com carotenoides microemulsionados, durante o armazenamento refrigerado por 21 dias.....	94
Tabela 5.	Escores médios dos atributos sensoriais avaliados para as formulações do suco de maçã clarificado microemulsionado com β -caroteno.....	96
Tabela 6.	Escores médios dos atributos sensoriais avaliados para as formulações do suco de maçã clarificado microemulsionado com urucum.....	97

Lista de abreviaturas e siglas

O/A	Óleo-em-água
A/O	Água-em-óleo
EROs	Espécie reativa de oxigênio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MCT	Microemulsão com β -caroteno - Tween 20
MCTM	Microemulsão com β -caroteno - Tween 20 e Monoglicerídeos
MUT	Microemulsão com urucum - Tween 20
MUTM	Microemulsão com urucum - Tween 20 e Monoglicerídeos
P	Padrão - Suco comercial de maçã clarificado
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
CT	Carotenoides totais
MC	Microemulsão com β -caroteno
MU	Microemulsão com urucum
T	Tween 20
mPa.s	Milipascal segundo
min	Minutos
pH	Potencial hidrogeniônico
RH	Raio hidrodinâmico
IPD	Índice de polidispersão
PZ	Potencial zeta
CD	Condutividade
ME	Mobilidade eletroforética
TDS	Teste de dominância temporal das sensações
RDC	Resolução da diretoria colegiada
IN	Instrução normativa

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Estudo 1 - Métodos de proteção e aplicação de carotenoides em alimentos - Uma revisão bibliográfica.....	18
1. Introdução	18
2. Carotenoides	19
2.1. Principais carotenoides naturais	22
2.1.1. β -caroteno	22
2.1.2. Licopeno	23
2.1.3. Luteína	24
2.1.4. Zeaxantina	25
3. Encapsulamento de carotenoides	25
3.1. Encapsulamento por hidrogéis	26
3.2. Encapsulamento por <i>spray drying</i>	27
3.3. Encapsulamento por liofilização	28
3.4. Encapsulamento por co-cristalização	28
3.5. Encapsulamento por lipossomas	29
3.6. Encapsulamento por <i>electrospinning</i>	31
4. Emulsões envolvendo carotenoides	31
5. Aplicação de carotenoides em matrizes alimentares	35
6. Considerações finais	40
7. Referências	40
4. Estudo 2 - Desenvolvimento e caracterização de microemulsão (O/A) com carotenoides em suco maçã clarificado.....	54
1. Introdução	54
2. Material e métodos	56
2.1. Materiais	56
2.2. Métodos	56
2.2.1. Desenvolvimento das microemulsões	56

2.2.2. Caracterização das microemulsões	57
2.2.3. Atividade antioxidante e estabilidade dos carotenoides microemulsionados no suco clarificado de maçã estocado sob refrigeração.....	58
3. Análise estatística	60
4. Resultados e discussões	60
4.1. Desenvolvimento das microemulsões	60
4.2. Avaliação físico-química do suco de maçã microemulsionado.....	62
4.3. Atividade antioxidante e estabilidade dos carotenoides no suco de maçã estocado sob refrigeração.....	71
5. Conclusão	75
6. Referências	76
7. Material suplementar	85
5. Estudo 3 - Carotenoides microemulsionados em suco clarificado de maçã: estabilidade microbiológica e avaliação sensorial.....	86
1. Introdução	86
2. Materiais e Métodos	88
2.1. Materiais	88
2.2. Métodos	88
2.2.1. Formulações para as amostras de suco clarificado de maçã microemulsionado com carotenoides.....	88
2.2.1.1. Amostra destinada para a análise microbiológica.....	88
2.2.1.2. Amostra destinada para a análise sensorial.....	89
2.2.2. Análise microbiológica	90
2.2.3. Análise sensorial	90
3. Análise estatística	92
4. Resultados e discussão	92
4.1. Avaliação microbiológica	92
4.2. Avaliação sensorial	95
5. Conclusão	106
6. Referências	107
7. Anexos	110
6. Considerações finais	112
7. Referências finais	113

1. Introdução

Os carotenoides compreendem uma classe de pigmentos lipossolúveis amplamente difundidas na natureza, apresentando usualmente estrutura tetraterpenóide com 40 átomos de carbono. Estes compostos possuem um sistema de ligações duplas que constituem o grupo cromóforo responsável pelas cores - vermelho, laranja e amarelo, e são amplamente encontrados em plantas, e também em animais e microrganismos (OTERO et al.,2019). No entanto, fatores limitam a incorporação de carotenoides em muitos alimentos e bebidas, devido a sua baixa solubilidade em água, alta hidrofobicidade, alto ponto de fusão e alta suscetibilidade à degradação química (QIAN et al.,2012; CHAARI et al., 2018).

Em revisão bibliográfica realizada por ZIMMER e colaboradores (2021) foi possível obter informações sobre as principais nanotecnologias utilizadas para aplicação de carotenoides em alimentos, e verificar que há carência de estudos voltada para a incorporação de carotenoides em matrizes alimentares aquosas.

Os sistemas à base de emulsão são particularmente adequados para incorporar e fornecer componentes lipofílicos, como os carotenoides (QIAN et al., 2012) em matrizes alimentares aquosas. Dentre os sistemas, destacam-se as microemulsões que consistem em gotículas pequenas (≤ 100 nm) de óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O), as quais demonstram grande potencial por dissolverem tanto compostos lipossolúveis, como compostos bioativos lipofílicos, tais como β -caroteno e ácidos graxos essenciais, quanto compostos hidrossolúveis, como os polifenóis (HOLKEM et al., 2015; LEONG et al., 2009; MCCLEMENTS, 2012; SOLANS et al., 2005). As microemulsões são sistemas formados por óleo, água e tensoativo (s), opticamente transparentes e termodinamicamente estáveis (TARTARO et al., 2020).

Em 1959, Schulman propôs chamar este sistema de “microemulsão”, no entanto, o prefixo “micro” foi usado no sentido de “muito pequeno”, sem qualquer ligação com a escala de comprimento real (EVANS et al.,1999). No entanto, a transparência óptica das microemulsões implica que sua microestrutura deve ser caracterizada por escalas de comprimento abaixo de 100 nm (TARTARO et al., 2020).

O tamanho das gotículas em uma microemulsão é um fator importante e está relacionado à sua estabilidade. Este sistema tem alta capacidade de solubilização

de compostos hidrofílicos e lipofílicos, permitindo estabilizar as substâncias incorporadas e protegê-las de reações de degradação (FASOLIN et al., 2012; MCCLEMENTS, 2011). Estes sistemas podem ser úteis para o preparo de formulações alimentares, devido à sua capacidade de solubilizar compostos funcionais (SHAH, 2018).

A inclusão de carotenoides, como o β -caroteno e do urucum, em sucos pode ser viabilizada sob a forma de microemulsão, que além de ampliar a solubilidade, paralelamente, pode promover a redução ou prevenção da degradação desses compostos. A aplicação de microemulsões se torna cada vez mais promissora na indústria de alimentos, devido à vantagem da estabilidade e transparência óptica dos sistemas microemulsionados (SAIFULLAH et al., 2016).

O β -caroteno é um pigmento de cor vermelha, encontrado em plantas e animais, é um dos carotenoides mais amplamente investigados devido às suas propriedades pró-vitamina A, antioxidantes e anticancerígenas; no entanto, a bioatividade do β -caroteno é restrita devido à sua baixa estabilidade (JAIN et al., 2019). Já, o urucum é o fruto de uma pequena árvore ou arbusto tropical, *Bixa orellana* L. (Bixaceae), cujo pericarpo das sementes contém quantidades expressivas de carotenoides. O pigmento do urucum é usado para conferir cores amarelas à vermelhas em inúmeros produtos, incluindo manteiga, margarina, salsicha, queijo processado, molhos para salada, confeitos e em produtos de panificação (SHAKERI et al., 2018).

Os sucos de frutas consistem em bebidas nutritivas e podem desempenhar um papel importante em uma dieta saudável, por oferecerem sabor agradável e uma variedade de nutrientes encontrados naturalmente nas frutas (SALEHI, 2020). No entanto, as alterações de atributos sensoriais (cor e aroma) e a redução do valor nutricional (vitaminas e antioxidantes) podem ocorrer após as etapas de processamento e estocagem destes produtos (ONSEKIZOGLU, 2013).

Um dos desafios para aplicação de microemulsões em alimentos é encontrar componentes compatíveis (SCHULZ et al., 2011) para a aplicação em matrizes alimentares. Os monoglicerídeos (síntese do óleo de linhaça-HOBUSS et al., 2020), assim como o monolaurato de polioxietileno sorbitano (Tween 20), surfactantes não iônicos, são tensoativos com uso aprovado pela legislação brasileira para grande parte dos produtos alimentícios (BRASIL, 2001; BRASIL, 2010; BRASIL, 2013).

Além disso, sabe-se que a qualidade microbiológica e a aceitação sensorial do produto alimentício desenvolvido são necessárias para compreender o comportamento microbiológico durante seu armazenamento e a influência dos diferentes atributos sensoriais na aceitação pelos consumidores.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Enriquecer uma matriz alimentar aquosa com carotenoides, empregando microemulsões do tipo O/A.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver microemulsões contendo duas diferentes fontes de carotenoides em uma matriz alimentar aquosa (suco clarificado comercial de maçã).
- Monitorar a estabilidade dos carotenoides no suco clarificado de maçã microemulsionado através do conteúdo de carotenoides.
- Monitorar a estabilidade do suco microemulsionado por centrifugação e sob aquecimento.
- Avaliar as propriedades antioxidantes e reológicas no suco microemulsionado.
- Avaliar as características das microemulsões formadas mediante análises físico-químicas, de estabilidade, raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, condutividade e a mobilidade eletroforética.
- Avaliar sensorialmente o suco clarificado de maçã microemulsionado com carotenoides.
- Avaliar a estabilidade microbiológica do suco de maçã microemulsionado com carotenoides durante o período de 21 dias de armazenamento.

3. Estudo 1 - Métodos de proteção e aplicação de carotenoides em alimentos - Uma revisão bibliográfica

Publicado no periódico *Food Bioscience* - <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101829>

Resumo

A principal novidade do trabalho foi realizar uma revisão completa de dados científicos sobre técnicas recentes de proteção e aplicação de carotenoides em matrizes alimentares, especialmente voltadas para o uso de nanotecnologias. Os carotenoides são pigmentos derivados de plantas e microrganismos que desempenham um papel muito importante nos sistemas biológicos. Eles têm muitos benefícios para a saúde que atraem o interesse de pesquisadores e consumidores; no entanto, são quimicamente instáveis, restringindo sua aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos. As nanotecnologias relacionadas a encapsulamentos e emulsões podem ser utilizadas para proteger os carotenoides e manter suas características originais durante o processamento, armazenamento e digestão, além de melhorar suas propriedades físico-químicas e aumentar os efeitos positivos de seu consumo. Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para este fim; no entanto, este estudo teve como objetivo informar de forma sucinta e compacta as técnicas existentes. Constatou-se que os estudos sobre sistemas de liberação para uso de carotenoides em alimentos são bastante recentes, com ênfase para sua aplicação em iogurtes. Destaca-se a necessidade de mais pesquisas, ampliando sua aplicação em diferentes matrizes alimentares.

Palavras-chave: nanotecnologias, pigmentos, conservação, saúde, fortificação.

1. Introdução

A coloração dos alimentos é determinada pela presença de pigmentos naturais ou pela adição de corantes sintéticos. Os pigmentos naturais, além de conferirem cor, podem trazer benefícios à saúde humana, auxiliando na proteção do organismo e na prevenção de diversas doenças (ROCHA; REED, 2014).

A utilização dos pigmentos naturais em alimentos tem aumentado devido à preocupação dos consumidores com os possíveis efeitos prejudiciais ao organismo das substâncias sintéticas (DUFOSSE, 2006). Os pigmentos dos vegetais podem ser classificados em quatro principais categorias: compostos heterocíclicos de estrutura tetrapirrólica (clorofilas e hemepigmentos), carotenoides, flavonoides e betalaínas. Dentre estes, os carotenoides destacam-se, porque além de cor, podem contribuir para o enriquecimento nutricional dos alimentos (ROCHA; REED, 2014).

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis de cor intensa, sintetizados por plantas e micro-organismos e estão presentes principalmente em frutas, vegetais,

algas e peixes (URSACHE et al., 2018; CHAARI et al., 2018). Juntamente com outros compostos funcionais, os carotenoides estão sendo amplamente utilizados como ingredientes ativos em uma grande variedade de produtos alimentícios, principalmente como corantes e aditivos alimentares (SILVA et al., 2011; RIVERA et al., 2012).

Alimentos ricos em carotenoides podem ser importantes como compostos nutracêuticos, ou seja, desempenhando o papel de precursores da vitamina A ou como antioxidantes. Seu consumo está relacionado com a prevenção de várias doenças crônicas, incluindo câncer de pele e doenças cardiovasculares (KHOO et al., 2011; NDAYISHIMIYE et al., 2017; BOEUF, 2011; VOUTILAINEN et al., 2006).

A aplicação de carotenoides naturais como corante em alimentos pode ser limitada pela instabilidade frente a determinadas condições intrínsecas ou de processamento. Estes compostos são instáveis a altas temperaturas, na presença de luz e de oxigênio (MEDEIROS et al., 2016). Ainda, outros fatores limitam incorporar carotenoides em produtos alimentícios e bebidas, dentre eles, a baixa solubilidade em água, o alto ponto de fusão e a alta suscetibilidade à degradação química (QIAN et al., 2012).

Diversas estratégias, tanto para a elaboração de alimentos funcionais quanto para aplicações farmacêuticas, podem ser usadas para aumentar a solubilização, estabilidade, bioacessibilidade e bioatividade de compostos nutracêuticos pouco solúveis em água, como os carotenoides (FLANAGAN; SINGH, 2006). Estudos estão sendo realizados visando a utilização de sistemas de entrega adequados para protegê-los contra processos de oxidação e disponibilizar componentes bioativos lipofílicos como os carotenoides (QIAN et al., 2012; JAFARI et al., 2017; JAFARI; MCCLEMENTS, 2017; KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

Com base no exposto, esta revisão visou compilar dados da literatura sobre as técnicas utilizadas para a proteção de carotenoides visando sua aplicação em matrizes alimentares, além de compilar informações sobre os carotenoides naturais, destacando os principais compostos do grupo.

2. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais encontrados em frutas e vegetais, mas também em plantas, algas e bactérias fotossintéticas. Os seres humanos não podem

sintetizar carotenoides e devem ingeri-los por meio da alimentação ou por suplementação, pois os carotenoides possuem uma série de funções importantes ao organismo humano (EGGERSDORFER et al., 2018).

Existe uma grande diversidade destes compostos lipossolúveis, tendo relatos de cerca de 850 tipos distintos, todos de ocorrência natural (MAOKA, 2020). Segundo RAO e RAO (2007) cerca de 40 tipos de carotenoides estão presentes na dieta humana e aproximadamente 20 deles foram identificados no sangue e em tecidos humanos, com destaque para β -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina (Figura 1).

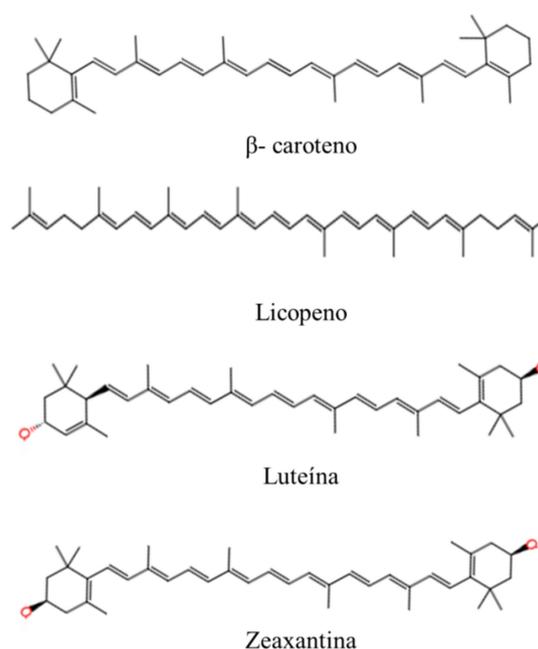


Figura 1. Fórmula estrutural dos principais carotenoides.

Os principais benefícios associados aos carotenoides podem ser explicados pelo seu poder antioxidante (FIEDOR et al. 2014), ou seja, os carotenoides apresentam mecanismos de ação física ou química que neutralizam os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs), por um mecanismo que envolve transferência de energia. Neste processo (Figura 2), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) transfere a energia de excitação para a molécula de carotenoide, e converte-se em oxigênio tripleto (não reativo), e em seguida, há a dissipação da energia de excitação por meio de interações rotacionais e vibracionais que regeneram a molécula original do carotenoide (KRINSKY, 1989; RAMEL et al., 2012).

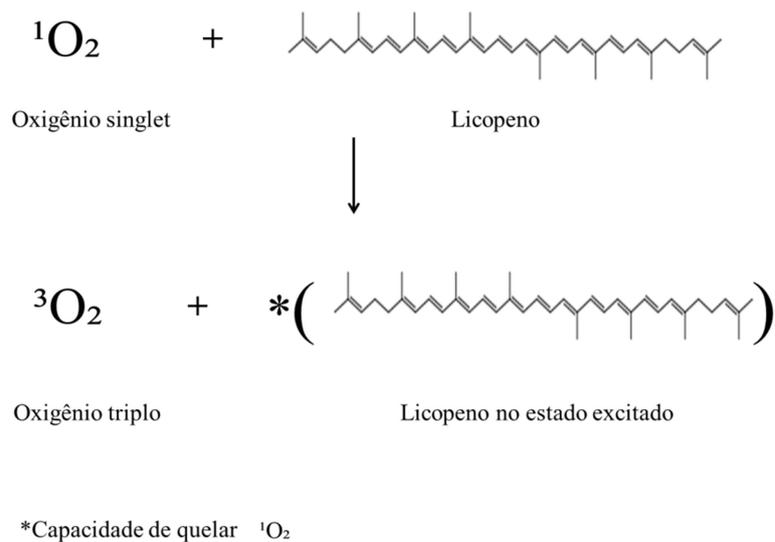


Figura 2. Ação do licopeno na presença do ${}^1\text{O}_2$ (Adaptado de UENOJO et al. 2007).

Alguns carotenoides demonstram funções fisiológicas, como atividade provitamina A (JOMOVA; VALKO, 2013; NEVILLE et al., 2013; WALK et al., 2017) como, por exemplo, o β -caroteno. Outros, como a luteína e a zeaxantina, constituem o pigmento macular do olho. Existem evidências de que os carotenoides, além dos benefícios à saúde ocular, também produzem melhorias na função cognitiva e na saúde cardiovascular, e podem ajudar a prevenir alguns tipos de câncer (EGGERSDORFER et al., 2018).

Os carotenoides são conhecidos pela diversidade estrutural e por um sistema de duplas ligações conjugadas localizado centralmente, que serve como cromóforo, sendo essencial para múltiplas funções e ações (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). São isoprenoides com uma estrutura de polieno que contém um número variável de ligações duplas conjugadas, que confere aos carotenoides a propriedade de absorver a luz visível, resultando em sua coloração característica na faixa do amarelo ao vermelho (RODRIGUEZ-CONCEPCION et al., 2018), tornando-os propensos à isomerização e oxidação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

A instabilidade é o principal problema relacionado aos carotenoides, influenciada pela própria natureza destes compostos, sendo que a degradação dos carotenoides é acentuada pela destruição da estrutura celular do alimento, que ocorre pela maior área de superfície ou porosidade, duração e severidade das condições de processamento, duração e condições inadequadas de

armazenamento, e pela permeabilidade do material de embalagem ao oxigênio e a exposição à luz (RODRIGUEZ-AMAYA, 2015).

2.1. Principais carotenoides naturais

2.1.1. β -caroteno

O β -caroteno é encontrado em diversos vegetais como cenoura, abóbora, manga e mamão, sendo o carotenoide que possui maior atividade de provitamina A (SILVA et al., 2010).

Nem todo o carotenoide apresenta atividade provitamina A, para isso, a molécula deve conter, no mínimo, 11 átomos de carbonos, pelo menos um anel β (beta) não substituído, e duplas ligações conjugadas, como as moléculas de β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina e α -criptoxatina. Entretanto, o β -caroteno é o único capaz de gerar duas moléculas de retinol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; MESQUITA et al., 2017).

Os carotenoides com atividade provitamina A (Figura 3), uma vez ingeridos, são absorvidos e convertidos a retinal no intestino. A molécula de retinal, por sua vez, é convertida a retinol e, em seguida, é transportada para o fígado, onde é armazenada (AMBRÓSIO et al., 2006; MESQUITA et al., 2017).

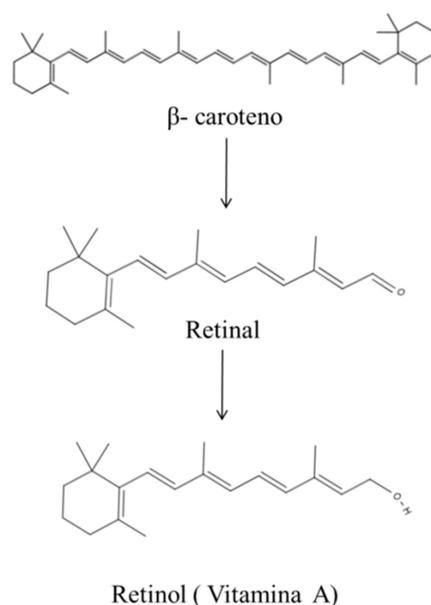


Figura 3. Transformação do β -caroteno em vitamina A

2.1.2. Licopeno

O licopeno está presente em frutas e vegetais, sendo responsável pela pigmentação vermelha (ALDA et al., 2009; ORDOÑEZ-SANTOS; LEDEZMA-REALPE, 2013). Este composto é um corante alimentar muito utilizado no setor de alimentos funcionais e também na produção de cosméticos (ZUORRO et al., 2012). Além disso, o licopeno apresenta um valor agregado crescente como um importante ingrediente bioativo, com diversas propriedades biológicas (CASEIRO et al., 2020).

Devido ao grande número de ligações dienos conjugadas, o licopeno é um dos melhores absorvedores de oxigênio singlete entre os carotenoides naturais e funciona como um potente antioxidante. Ainda, consegue reduzir a mutagênese e, em concentrações fisiológicas, pode inibir o crescimento de células humanas cancerígenas, especialmente em câncer de próstata, sem evidência de efeitos tóxicos ou apoptose celular. O tomate é a fonte vegetal mais rica em licopeno (SILVA et al., 2010; SCOLASTICI et al., 2007; BLUM et al., 2005).

No entanto, a biodisponibilidade do licopeno (Figura 4) pode estar relacionada às formas isoméricas. Apesar de o licopeno estar presente nos alimentos, em sua maioria, na forma de *trans*-isômero (80% a 97%), parece ser o *cis*-isômero a forma mais encontrada e a mais bem absorvida no corpo humano (MORITZ & TRAMONTE, 2006).

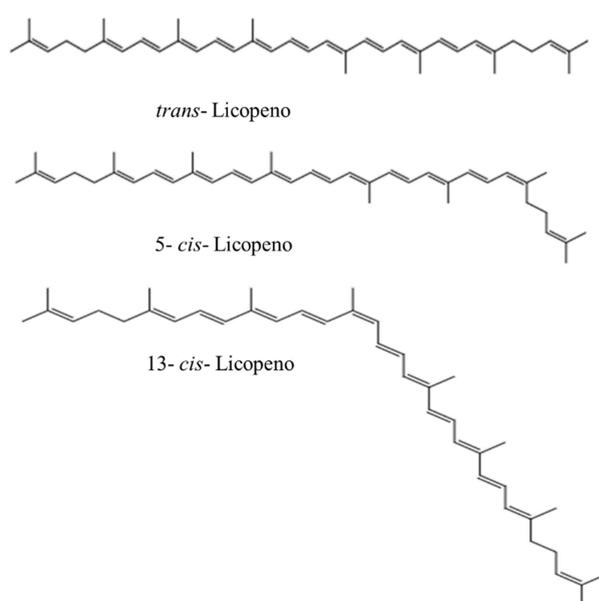
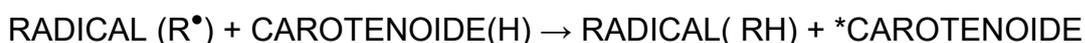


Figura 4. Formas isoméricas *trans* e *cis* do licopeno.

2.1.3. Luteína

A luteína é uma xantofila resultante do processo de hidroxilação de α -caroteno. Durante a maturação dos frutos, a conversão da luteína provoca uma diminuição nos níveis de α -caroteno (SILVA et al. 2010). Este carotenoide dihidroxilado (Esquema 1 e 2) de coloração amarela atua como antioxidante, protegendo as células dos danos oxidativos e, conseqüentemente, reduzindo o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas, uma vez que o stress oxidativo e a atuação dos radicais livres são os maiores fatores associados à iniciação e propagação do desenvolvimento destas doenças (STRINGHETA et al., 2009; MARINOVA; RIBAROVA, 2007).



Esquema 1. Ação da luteína ou zeaxantina frente a um radical livre



Esquema 2. Formação de peróxido a partir da luteína ou zexantina na presença de O_2 . Adaptado de UENOJO et al., 2007.

Além de estar presente em vários alimentos comuns como no melão, pimentão amarelo, laranja, milho, cenoura, salmão, a gema de ovo pode ser uma fonte essencial de luteína, pois o alto teor de gordura da gema melhora a absorção desse composto. O papel da luteína na saúde humana, particularmente na saúde ocular, foi bem estabelecido a partir de estudos epidemiológicos e clínicos (ABDEL-AAL et al., 2013).

A luteína e a zeaxantina são seletivamente acumuladas na mácula, estrutura localizada na retina que promove maior acuidade visual, e nela vão atuar como potentes antioxidantes biológicos. Servem como filtros de luz azul eficientes, extinguindo espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas durante a foto excitação (NWACHUKWU et al., 2016; PANOVA et al., 2017). Doenças degenerativas podem afetar a mácula, principalmente em indivíduos com mais de 65 anos, e esse fato aumenta a necessidade de inclusão de alimentos ricos em luteína na dieta alimentar (ABDEL-AAL et al., 2013; BARKER et al., 2011; NWACHUKWU et al., 2016).

2.1.4. Zeaxantina

A zeaxantina é uma xantofila resultante do processo de hidroxilação do β -caroteno, que no processo de maturação dos frutos leva à diminuição nos níveis de seu precursor (SILVA et al. 2010).

A luteína e a zeaxantina apresentam estrutura química muito similar, dificultando distingui-las analiticamente. Ambas possuem o mesmo número de ligações duplas na cadeia, porém há uma diferença na posição de uma dessas duplas ligações no anel, e essa posição faz da zeaxantina um melhor antioxidante, por apresentar uma dupla ligação conjugada a mais do que a luteína (STRINGHETA et al., 2009).

Os benefícios da luteína e da zeaxantina em humanos estão presentes na saúde dos olhos, no entanto, estudos recentes sugerem que ambas podem ser benéficas ao coração, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares, além de proteger a pele dos danos causados por radiação UV (SANTOCONO et al., 2007; MARINOVA; RIBAVORA, 2007).

3. Encapsulamento de carotenoides

O encapsulamento é um processo físico-químico que visa aprisionar uma substância ativa em microssistemas ou nanossistemas de engenharia estrutural, a fim de desenvolver uma barreira termodinâmica e física eficaz contra as condições ambientais que possam afetar determinados compostos, como vapor de água, oxigênio, luz, enzimas ou variações de pH. O método de encapsulamento de carotenoides tem demonstrado ser uma estratégia bastante eficaz para melhorar a estabilidade química destes compostos em condições comuns de processamento e de armazenamento. Além disso, a encapsulação também pode aumentar a biodisponibilidade (influenciando a bioacessibilidade e a absorção) de compostos bioativos lipofílicos, por meio da modulação de sua cinética de liberação no sistema transportador, a solubilidade e propriedades interfaciais (SOUKOULIS; BOHN, 2018).

Segundo EUN et al. (2020) as tecnologias de encapsulamento protegem o material contra a degradação e conseguem liberar substâncias bioativas individuais ou combinadas durante o processamento, bem como desenvolver vários produtos

alimentares funcionais. Além disso, os agentes encapsulantes podem ser usados para aumentar a estabilidade dos carotenoides e formar uma barreira entre o núcleo e os materiais da parede, sendo um dos fatores mais importantes no processo de encapsulamento.

O encapsulamento pode ser definido como um método de aprisionar uma substância dentro de outras, produzindo partículas com diâmetros de alguns nanômetros (nm) a alguns milímetros (mm), sendo que, o material aprisionado é geralmente um líquido, mas pode ser um sólido ou um gás. O principal motivo do uso do encapsulamento consiste na instabilidade de alguns nutrientes por não permanecerem nos alimentos por um período significativo de tempo ou por reagirem com outros componentes, causando efeitos indesejáveis (ZUIDAM; NEDOVIC, 2010).

Existem duas técnicas de encapsulamento: micro e nanoencapsulação. A microencapsulação é uma tecnologia que pode melhorar o tempo de retenção do nutriente nos alimentos e permitir a liberação controlada em momentos específicos durante o consumo alimentar ou no intestino. A nanoencapsulação tem o potencial de proteger ingredientes alimentares bioativos sensíveis de condições ambientais desfavoráveis, aumentar a solubilização, melhorar o mascaramento de sabor e odor, e aumentar a biodisponibilidade de ingredientes funcionais pouco absorvíveis (BRATOVIC; SULJAGIC, 2019). Tanto para microencapsulação quanto para a nanoencapsulação de carotenoides, podem ser utilizadas diferentes metodologias de encapsulamento.

3.1. Encapsulamento por hidrogéis

Os hidrogéis são definidos como sistemas ou materiais sólidos e translúcidos, na forma de redes poliméricas tridimensionais, capazes de reter uma grande quantidade de fluidos (ABAE et al., 2017), podendo reter até 90% da água em suas redes (TAVSANLI; OKAY, 2019).

Na técnica de produção dos hidrogéis, a fase fluida é gelificada por ajuste de temperatura, agentes de reticulação ou acidificação, ou adição de íons multivalentes (Ahmed, 2015), possibilitando a encapsulação de bioativos hidrofílicos e lipofílicos, além de proteção contra a degradação e liberação direcionada (SHISHIR et al., 2018; ZHANG et al., 2015).

Em estudo de ZHANG e colaboradores (2016) o β -caroteno foi incorporado em nanoemulsão livre e em gotas de hidrogel de alginato. Os autores avaliaram a estabilidade química e a digestão no trato gastrointestinal, em condições simuladas. O β -caroteno encapsulado em gotículas de lipídios livres (nanoemulsões) foi altamente instável frente à degradação química, quando armazenado em temperaturas elevadas, e o contrário ocorreu com as gotículas de lipídios carregadas com β -caroteno em hidrogel, que demonstraram maior estabilidade química. No entanto, o β -caroteno encapsulado apresentou maior bioacessibilidade em gotículas de lipídios livres (nanoemulsões) do que em gotas de hidrogel.

3.2. Encapsulamento por *spray drying*

Spray drying é a tecnologia de microencapsulação mais utilizada industrialmente, por ser rápida, simples e de baixo custo, comparada com outras técnicas. O processo consiste na atomização de uma emulsão ou dispersão numa câmara com circulação de ar quente, resultando em partículas micrométricas secas (BAKRY et al., 2016).

A secagem por *spray drying* oferece várias vantagens, como a conversão de líquidos e gases em pós, sendo mais fáceis de manusear; possibilita ainda mascarar sabores desagradáveis; aumento da dispersibilidade de compostos hidrofóbicos em água (uma vez que os materiais transportadores são geralmente solúveis em água); aumento da estabilidade de substâncias sensíveis durante o processamento e armazenamento de alimentos; e liberação controlada de compostos bioativos durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (ASSADPOUR; JAFARI, 2019; LAN et al., 2018; OSTROSCHI et al., 2018; SOUZA et al., 2015).

Em estudo realizado por FREITAS et al. (2021), foi obtido um pó por *spray drying*, a partir de óleo de tucumã rico em carotenoides, sendo avaliadas as propriedades físico-químicas, estabilidade de armazenamento e a digestão *in vitro*. O estudo constatou a potencialidade do produto para incorporação em alimentos processados como ingrediente funcional, uma vez que, o mesmo foi estável durante o armazenamento à temperatura ambiente e também quando submetido a altas temperaturas, como as empregadas no processamento de alimentos.

Em outro estudo, foram investigados os efeitos da secagem por *spray drying* em Gac (*Momordica cochinchinensis*), frutos ricos em carotenoides. O uso da

temperatura de 120 °C e de maltodextrina na concentração de 10% (p /v) proporcionou a obtenção de pó de Gac com boa qualidade em relação à cor, teor de carotenoides e atividade antioxidante (TUYEN et al., 2010).

3.3. Encapsulamento por liofilização

A liofilização, também denominada de *freeze drying*, tem a sublimação como o seu principal processo, em que a água é convertida diretamente em vapor, sem passar pelo estado líquido, em sistema a vácuo (BAKRY et al., 2016).

Na técnica de liofilização os componentes dos alimentos não ficam expostos ao aquecimento térmico, resultando em um produto final com melhor qualidade, sendo frequentemente usada para os componentes que são sensíveis à degradação pelo calor, como pigmentos, proteínas, fermentos, dentre outros (CIURZYNSKA; LENART, 2011). Em função de suas características, esta técnica de encapsulamento oferece boa proteção aos carotenoides (SUTTER et al., 2007; AROF et al., 2018), sendo aplicada com sucesso para fortificações e suplementações de alimentos com caroteno (GOULA; ADAMOPOULOS, 2012). A transformação do pigmento bruto em pó encapsulado, aumenta a versatilidade de aplicação e facilita a incorporação do pigmento colorido em diferentes matrizes alimentares.

Em estudo realizado por SHARMA e colaboradores (2020), a técnica de liofilização foi usada para encapsular caroteno extraído dos resíduos de *Cucurbita maxima*. As propriedades físico-químicas avaliadas demonstraram que o pó encapsulado era propício para consumo direto ou para reconstituição em água, podendo também ser usado como um corante natural ou ingrediente funcional em produtos alimentícios.

3.4. Encapsulamento por co-cristalização

A co-cristalização é um método de encapsulamento que despertou o interesse dos pesquisadores nos últimos anos devido à simplicidade do seu funcionamento (LÓPEZ-CÓRDOBA et al., 2018). Neste processo, o ingrediente ativo é introduzido na solução de sacarose supersaturada para obter a cristalização simultânea, que auxilia no aprisionamento do componente ativo na sacarose (BHANDARI; HARTEL, 2002). A estrutura cristalina sólida e perfeita da sacarose é convertida em cristais

aglomerados (tamanho inferior a 30 μm), irregulares e porosos, que fornecem um espaço vazio considerável e uma área de superfície aumentada para a incorporação do ingrediente ativo (LABELL, 1991; BHANDARI; HARTEL, 2002; SAVJANI, 2015).

O uso de co-cristalização é mais comum na indústria farmacêutica do que na indústria alimentar, no entanto, pesquisadores têm seus esforços focados na otimização do encapsulamento de componentes bioativos em alimentos por co-cristalização com sacarose (CHEZANOGLU; GOULA, 2021).

A co-cristalização em sacarose é um método de encapsulamento novo, simples e econômico, que permite a incorporação de componentes bioativos na forma de pó estabilizado, ampliando a preservação dos encapsulados (JACKSON; LEE, 1991; LÓPEZ-CÓRDOBA et al., 2014). A incorporação cuidadosa do ingrediente ativo inibe a cristalização prematura de sacarose, o que permite que o processo prossiga em taxas gerenciáveis e reprodutíveis, e também melhora a funcionalidade do produto co-cristalizado (BHANDARI et al., 1998). Além disso, a cristalização do ingrediente ativo também pode ocorrer durante o armazenamento, dependendo das condições de temperatura e umidade (SARDAR; SINGHAL, 2013). Para a cristalização espontânea do xarope de sacarose (95-97°Brix) é necessário temperatura alta (acima de 120 °C) e baixa umidade, sendo um segundo ingrediente adicionado no momento da cristalização espontânea (BHANDARI et al., 1998).

A co-cristalização com sacarose pode melhorar a dissolução, dispersibilidade, homogeneidade, higroscopicidade, hidratação, propriedades antiaglomerantes e estabilidade térmica do material encapsulado (SANJAY et al., 2014).

Em estudo realizado por KAUR e colaboradores (2021) foi possível encapsular compostos antioxidantes e carotenoides naturais do extrato de cenouras em sacarose, sendo que os co-cristais desenvolvidos apresentaram baixo teor de umidade, baixa higroscopicidade, alta eficiência de encapsulação e estrutura cristalina aprimorada. Os autores concluíram que os co-cristais encapsulados em carotenoides podem ser usados diretamente como corante, adoçante e antioxidante no desenvolvimento de diferentes produtos alimentícios.

3.5. Encapsulamento por lipossomas

Os lipossomas são sistemas de membrana em bicamada formados pela automontagem de fosfolipídios, onde o compartimento aquoso e a bicamada lipídica

podem encapsular nutracêuticos, hidrofílicos, hidrofóbicos e anfifílicos, mas, recentemente os lipossomas foram desenvolvidos para a entrega de nutracêuticos, como luteína, quercetina e kaempferol (HUANG et al., 2017; RAMEZANZADE et al., 2017; TAN et al., 2013; TAN et al., 2014; WU et al., 2019). Os principais fosfolipídios usados em lipossomas são lecitina de soja, lecitina de ovo, lecitina marinha e fosfolipídio de leite (AKBARZADEH et al., 2013; IMRAN et al., 2015; THOMPSON et al., 2007).

Estes sistemas são especialmente importantes porque têm o potencial de encapsular substâncias lipofílicas de interesse para aplicações em alimentos, como, por exemplo, vitamina E, óleos essenciais, peptídeos hidrofóbicos, polifenóis, L-carnosina e carotenoides (REZA MOZAFARI et al., 2008; TAYLOR et al., 2005; TONIAZZO et al., 2014). No geral, os lipossomas são naturais, biodegradáveis e não tóxicos, apresentam boa estabilidade e, permitem a liberação controlada de compostos bioativos sob temperatura específica (acima do ponto de fusão dos fosfolipídios: 180 °C — 200 °C) (GOUIN, 2004).

A produção de lipossomas em seu estado seco (prolipossomos) é particularmente mais relevante para a indústria de alimentos. Neste caso o processo é combinado com métodos de secagem por pulverização, congelamento ou precipitação de fluido supercrítico, representando uma alternativa econômica e sustentável para encapsulamento (ALVES; SANTANA, 2004; XIA et al., 2012; MORAES et al., 2013). O método de secagem por pulverização é o mais comum e usado na indústria alimentícia, sendo o mais recomendado para tais aplicações.

Os prolipossomos são também denominados de pó de fosfolipídios. A partir da hidratação dessas partículas, sob agitação controlada e condições de temperatura (acima da transição de fase cristalina do líquido), podem ser reconstituídos os lipossomas (ELHISSI et al., 2006; XIA et al., 2012).

MORAES e colaboradores (2013) relataram que a tecnologia de prolipossomos pode ser usada para desenvolver veículos para aprisionar β -caroteno, com propriedades tecnológicas boas (densidade, solubilidade e higroscopicidade) e alta capacidade de encapsulação (até 100%). No referido experimento, a degradação foi inferior a 8%, sob armazenamento a vácuo durante 60 dias, e de 30%, quando em contato com ar.

3.6. Encapsulamento por *electrospinning*

Entre as diferentes técnicas de encapsulamento de carotenoides, a técnica de eletrofiação ou *eletrospinning* vem ganhando destaque, devido à sua versatilidade, simplicidade, relação custo-benefício. As nanofibras produzidas por *eletrospinning* possuem muitas vantagens estruturais e funcionais, como uma grande relação superfície-volume, devido à alta porosidade, alta eficiência de encapsulamento e sem aplicação de calor, proporcionando elevada estabilidade dos compostos encapsulados (ZHANG et al., 2005; BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Electrospinning é uma técnica que depende da repulsão eletrostática entre as cargas superficiais para extrair continuamente nanofibras de um fluido viscoelástico (solução polimérica) (XUE, et al., 2017).

Para o funcionamento do *eletrospinning*, uma mistura de uma solução de polímero líquido é injetada em uma seringa com diâmetro de agulha variável, e quando a alta tensão é aplicada o polímero é bombeado continuamente através da pontada agulha, assim as gotículas passam a ter uma forma cônica. Após atingir um limite, a forma cônica da solução de polímero atua como um fluxo de fluido de jato e a solução de polímero é fundida em uma placa coletora, pela aplicação de correntes elétricas, enquanto o solvente é evaporado, permitindo o alongamento do jato (KATSOGIANNIS, et al., 2015).

Em trabalho realizado por HORUZ e BELIBAĞLI (2018), carotenoides extraídos da casca de tomate foram encapsulados com sucesso em nanofibras de gelatina. Os autores concluíram que a eletrofiação é uma forma eficaz de estabilizar os carotenoides e melhorar sua solubilidade em água, sendo promissor utilizá-los no processamento de alimentos, principalmente em matriz alimentar aquosa.

4. Emulsões envolvendo carotenoides

Emulsões são sistemas coloidais largamente utilizados pela indústria de alimentos, consistem em uma mistura, dispersão ou suspensão de dois, ou mais líquidos imiscíveis, geralmente, óleo e água. Esses sistemas apresentam uma fase dispersa, em forma de gotas esféricas e pequenas com diâmetro, de 0,1 a 100 µm, em uma fase contínua (MCCLEMENTS, 2011; LAM; NICKERSON, 2013; PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015). Emulsões simples óleo/água (O/A) são formadas por gotas

de óleo, dispersas em uma fase aquosa e emulsões simples água/óleo (A/O) são formados por gotas de água dispersas em uma fase oleosa (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015).

As emulsões são termodinamicamente instáveis e, portanto, tendem a se desestabilizar ao longo do tempo, devido a vários mecanismos físico-químicos, incluindo separação gravitacional, floculação, coalescência, coalescência de partículas, amadurecimento de Ostwald e separação de fases (MCCLEMENTS, 2015; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). Por esse motivo, estabilizantes são incluídos em formulações de emulsões para melhorar sua estabilidade a longo tempo, como emulsificantes, modificadores de textura, inibidores de amadurecimento e agentes de aumento de peso (MCCLEMENTS, 2011), dentre eles destacam-se os emulsificantes, sendo a categoria mais utilizada em qualquer formulação de emulsão. Além de sua capacidade de estabilizar emulsões, a natureza do emulsificante usado também determina a facilidade de formação da emulsão e os atributos funcionais do produto final (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

Os emulsificantes são moléculas anfifílicas que têm grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, como surfactantes de moléculas pequenas, fosfolípidios, proteínas, polissacarídeos e outros polímeros tensoativos (FITZGERALD, 2015; HASENHUETTL, 2008, MCCLEMENTS; GUMUS, 2016).

A escolha dos emulsificantes é um dos fatores mais importantes, pois estes podem influenciar no tamanho final da gotícula, na dispersão e na estabilidade das emulsões (CAVAZOS-GARDUÑO et al., 2015). Os emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos são os surfactantes sintéticos, ésteres de polioxietileno sorbitano de ácidos graxos, e os emulsificantes “naturais” como proteínas anfifílicas, fosfolípidios e polissacarídeos (KRALOVA; SJÖBLOM, 2009).

As emulsões têm várias vantagens como sistemas de entrega de carotenoides e podem ser facilmente projetadas para aumentar a estabilidade e diminuir a degradação destes compostos em produtos alimentares funcionais. São fáceis para incorporar em produtos de base aquosa a um custo relativamente baixo e podem reter estes bioativos de natureza predominantemente lipofílicos, incluindo aqueles com propriedades antioxidantes (BOON et al., 2010). Essa incorporação pode ser feita com sistemas do tipo micro ou nanoemulsionados (RIBEIRO et al., 2010).

Microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, visualmente transparentes e opticamente isotrópicos, apresentam uma fase aquosa e outra oleosa estabilizadas por um filme interfacial de um surfactante adequado, com tamanho de gota menor que 100 nm (BARBOSA et al., 2011; AMIRI-RIGI et al., 2016). As nanoemulsões consistem em dispersões com diâmetros de gota geralmente na faixa de 10 – 200 nm (AMIRI-RIGI et al., 2016). Ambos sistemas coloidais podem ser compatíveis com aplicações alimentares, portanto, constituem-se em meios de entrega adequados para proteger e entregar componentes lipofílicos, tais como os carotenoides. Possuem maior estabilidade em relação às emulsões tradicionais, por apresentarem pequenas gotículas que as tornam adequadas para a incorporação de moléculas bioativas em alimentos, aumentando sua biodisponibilidade e propriedades funcionais (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

No entanto, há equívocos na literatura relacionados ao uso do termo, principalmente, o prefixo “micro” utilizado para denotar esses sistemas e ao crescente uso do prefixo “nano” para esta mesma finalidade (MCCLEMENTS, 2012). Além disso, há algumas semelhanças entre as microemulsões e as nanoemulsões, ou seja, as dimensões que caracterizam as microemulsões não se encontram em escala micrométrica, mas sim em escala nanométrica.

Apesar de ambas apresentarem componentes (uma fase aquosa, uma fase oleosa e um agente surfactante, podendo por vezes ter também um co-surfactante) e estruturas semelhantes, as microemulsões diferem das nanoemulsões por apresentarem estabilidade termodinâmica, enquanto as nanoemulsões são cineticamente estáveis (SOLANS; ARAMAKI, 2008). Além disso, as proporções dos constituintes utilizados diferem, sendo que a proporção de surfactante nas microemulsões é maior, e, além disso, podem ou não apresentar a fase dispersa em formato esférico (MCCLEMENTS, 2012; BRUXEL et al., 2012). Ainda, as microemulsões são sistemas translúcidos e apresentam partículas com dimensões menores do que as formadas nas nanoemulsões (ANTON; VANDAMME, 2011).

As nanoemulsões não podem ser formadas espontaneamente, sendo necessária energia, geralmente a partir de dispositivos mecânicos ou a partir modificação do potencial químico dos componentes. Os métodos utilizados para formação de nanoemulsão compreendem a utilização de homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom (KENTISH et al., 2008). Os homogeneizadores de

alta pressão são muito utilizados e trabalham geralmente com pressões entre 50 e 100 MPa. O procedimento do uso de ultrassom geralmente consiste em conduzir primeiramente o fluido mediante um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória, na qual sofre impacto (BOLDYREV, 1995; ASSIS, 2012).

As microemulsões possuem vantagens sobre as emulsões convencionais ou nanoemulsões por poderem ser preparados sem envolver alta energia, além de serem translúcidas, pelo menor diâmetro das gotículas (ANTON; VANDAMME, 2011). SILVA e colaboradores (2015) relatam que as microemulsões do tipo O/A têm demonstrado ser um eficiente veículo para a incorporação de nutrientes lipofílicos em sistemas aquosos, devido ao aumento de solubilidade que proporcionam. Segundo estes autores, vários estudos relatam a adição de vitamina E, retinol, óleo de peixe (ômega 3) beta-caroteno e outros carotenoides nestes sistemas.

Segundo MOULIK et al. (2000), o licopeno pode ser solubilizado em concentração até 10 vezes superior em microemulsão, comparativamente a sua dissolução em sistema estritamente lipofílico. Os mesmos autores demonstraram que a estabilidade do composto foi aumentada quando microemulsionado, apresentando percentual de degradação entre 34,5 a 52%, após 72 dias de armazenamento, enquanto, no mesmo período, o controle (licopeno não microemulsionado) apresentou 100% de degradação.

CHIU e YANG, (1992) observaram que uma microemulsão de vitamina E, do tipo O/A, contendo água, butirato de etila (fase oleosa), polioxil 35 (surfactante) e etanol (co-surfactante), apresentou estabilidade física e resistência a variações da temperatura, sendo indicada como um potencial veículo de liberação desta vitamina em alimentos. Além disto, os autores observaram que a estabilidade oxidativa da vitamina E foi ampliada quando preparada na forma de microemulsão (O/A), obtida com o uso de surfactantes não iônicos.

ZHENG et al. (2011) relataram a solubilização de até 25% de óleo de peixe em microemulsão com liberação controlada do tipo O/A, contendo água, oleato de etila como fase oleosa e Tween 80 como surfactante. O sistema proporcionaria um possível aumento da estabilidade à oxidação e da biodisponibilidade, bem como o mascaramento do *off-flavor*, efeito sensorial típico de óleo de peixe.

5. Aplicação de carotenoides em matrizes alimentares

Na literatura científica reportam-se trabalhos que vêm explorando diferentes métodos e técnicas para a incorporação de carotenoides em matrizes alimentares, visando a conservação e o enriquecimento com esses compostos bioativos.

TONIAZZO et al. (2014) produziram lipossomas carregados com β -caroteno a partir de prolipossomos, utilizando a secagem e a atomização, e testaram sua incorporação em iogurtes. As dispersões de lipossomas multilamelares foram estabilizadas pela adição de uma mistura de gomas xantana e guar como espessantes. Os iogurtes foram produzidos visando substituir parte ou a totalidade de uma mistura comercial de morango feita com sabores e corantes artificiais. O estudo demonstrou ser possível produzir lipossomas carregados com β -caroteno que são altamente capazes de proteger os carotenoides encapsulados, durante um período de armazenamento de mais de 3 meses. A mistura de gomas xantana e guar foi eficaz para manter as dispersões estáveis. As dispersões de lipossomas mais estáveis foram testadas como corantes na produção de iogurte, onde as características físico-químicas, como cor e textura, indicaram que lipossomas carregados com β -caroteno podem ser uma opção adequada para produzir o vermelho do produto. Os resultados indicaram ser possível desenvolver um iogurte com β -caroteno encapsulado em lipossomas como ingrediente funcional.

Em estudo realizado por RUTZ et al. (2016) micropartículas contendo β -caroteno sintético e óleo de palma (rico em carotenoides) foram encapsuladas com quitosana / carboximetilcelulose como material de parede, pelo método de coacervação complexa, e com tripolifosfato de quitosana / sódio pelo método de gelificação iônica, sendo caracterizadas quanto à eficiência de encapsulamento, morfologia e comportamento térmico, além da avaliação o perfil de liberação dos compostos microencapsulados sob condições gástricas, intestinais humanas simuladas e aplicar essas micropartículas em dois sistemas alimentares (pão e iogurte). A alta eficiência de encapsulação alcançada neste estudo foi maior que 95% indicando ser possível encapsular carotenoides usando os métodos de coacervação complexa e gelificação iônica com quitosana / carboximetilcelulose e quitosana / tripolifosfato de sódio como materiais de parede. As partículas revestidas com quitosana / carboximetilcelulose exibiram comportamento de liberação ideal em meio aquoso e no fluido gástrico, mas apresentaram baixo percentual de liberação

no fluido intestinal, no entanto, houve aumento quando aplicadas em sistemas alimentares como iogurte e pão. As partículas de quitosana / tripolifosfato de sódio apresentaram alta liberação de carotenoides em meio aquoso e fluido gástrico, com comportamento satisfatório no fluido intestinal. A liberação de carotenoides aumentou ainda mais quando essas micropartículas foram adicionadas aos sistemas alimentares, havendo também ampliação da liberação durante o armazenamento.

Em outro estudo de RUTZ et al. (2017), utilizando somente óleo palma encapsulado, contendo alto teor de carotenoides, pelo método de coacervação complexa e quitosana / goma xantana e quitosana / pectina como materiais de parede, foi avaliada a eficiência de encapsulação dos carotenoides, a morfologia, o comportamento térmico e o perfil de liberação destes compostos na água e em um fluido que simula o ambiente gastrointestinal. Além disso, as micropartículas foram adicionadas na preparação de pães e iogurtes. Antes de da aplicação em alimentos, as micropartículas apresentavam maior percentual de liberação no fluido que simula as condições gastrointestinais, mas os compostos se degradavam após sua liberação. As micropartículas de quitosana / pectina apresentaram o melhor perfil de liberação em condições gastrointestinais. As micropartículas quando inseridas nos alimentos apresentaram liberação de carotenoides menor, e os compostos liberados mantiveram-se preservados.

URSACHE et al. (2018) microencapsularam os carotenoides do extrato de espinheiro-mar (*Hippophae rhamnoides* L) utilizando proteínas isoladas de soro de leite e goma acácia, por meio de coacervação e liofilização. O material microencapsulado foi testado posteriormente na formulação de muffins, como corante e ingrediente funcional. Os produtos foram caracterizados em termos físico-químicos, microbiológicos, fitoquímicos, atividade antioxidante, textura, parâmetros de cor, análise sensorial e estabilidade de armazenamento. A eficiência de encapsulamento dos carotenoides foi menor que 56%. Os muffins obtidos apresentaram um teor de carotenoides totais e atividade antioxidante satisfatórios. A análise de textura sugeriu que a adição de pó microencapsulado causou aumento da firmeza e da mastigabilidade, que foram correlacionados com a porosidade das amostras. A coesão e elasticidade dos muffins com o microencapsulado foram menores em comparação com a amostra controle. Já, análise sensorial demonstrou que ambas as amostras apresentaram sabor semelhante, no entanto, a amostra

com o microencapsulado foi a preferida por todos os painelistas, em função da melhor coloração. Durante o armazenamento foi observada degradação dos carotenoides e perda da atividade antioxidante, sem alterações significativas nos parâmetros de cor, exceto luminosidade.

INROGA et al. (2018) produziram maçãs do tipo “Gala” minimamente processadas associadas a sistemas manométricos (nanocápsulas e nanoemulsão) carregadas de β -caroteno, e avaliaram a estabilidade físico-química e fitoquímica durante o armazenamento refrigerado. Os resultados demonstraram alta eficiência na biofortificação desses produtos, além de aumento do prazo de validade. As fatias de maçã tratadas com nanocápsulas de β -caroteno apresentaram resultados superiores quanto ao teor de carotenoides, o que pode ser atribuído à capacidade de retenção de cada sistema com matriz vegetal.

A técnica de dispersão sólida foi utilizada por ALMEIDA et al. (2018) para encapsular a curcumina em polivinilpirrolidona, obtendo-se a curcumina nanoencapsulada. A bioatividade desta formulação foi comparada com uma formulação em pó, contendo 65% de curcumina, e uma amostra comercial de curcumina dispersível em água (compreende um conteúdo de curcumina 4,75–5,25%, 75% de Tween 80 e 19% de PEG) (CHR Hansen, Hoersholm, Dinamarca). Cada formulação testada foi posteriormente incorporada em iogurte, selecionado como um modelo hidrofílico. Neste produto a curcumina contribuiu positivamente na aparência (que foi mantida ao longo do tempo de armazenamento), sem provocar alterações relevantes na composição nutricional e no perfil dos ácidos graxos. O desenvolvimento de novas formulações compatíveis com água a partir de corantes hidrofóbicos, como a curcumina, pode representar um avanço no emprego industrial de compostos naturais benéficos à saúde.

No estudo realizado por SAAFAN et al. (2018) margarina de mesa foi preparada usando estearina de palma e de óleos de soja e girassol nas proporções de 15% de óleo de soja: 15% de óleo de girassol: 70% de óleo de palma; e de 15% de óleo de soja: 15% de óleo de girassol: 70% de estearina de palma, e comparada com uma amostra controle (margarina comercial). A nanotecnologia (nanoemulsão) foi usada para modificar as propriedades emulsificantes do produto. A estabilidade durante o período de armazenamento de até 11 semanas, em condições de resfriamento (4 °C), foi avaliada. As misturas de margarinas processadas usando a

técnica de nanoemulsão demonstraram melhoria nas propriedades de emulsificação e aumento da estabilidade durante o armazenamento em condições de refrigeração. Ambas formulações de margarina preparadas, usando a técnica de nanoemulsão, apresentaram consistência de creme semelhante à amostra controle. Ainda, foi verificado que o uso da técnica de nanoemulsão no preparo de margarina de mesa pode prolongar a estabilidade e estender o período de armazenamento deste produto.

CAMPO et al. (2019) incorporaram nanopartículas de zeaxantina em iogurtes e avaliaram a influência da adição de nanopartículas e nanoemulsão nas propriedades físico-químicas, estabilidade e características sensoriais, além da bioacessibilidade deste carotenoide após digestão *in vitro*. No final do tempo de armazenamento, a retenção de zeaxantina foi maior no iogurte com adição de nanopartículas do que no iogurte com adição de nanoemulsão. Apesar da menor firmeza e viscosidade observada no iogurte com adição de nanopartículas, essas alterações não foram percebidas sensorialmente. A bioacessibilidade após a digestão *in vitro* sugeriu que a nanoencapsulação forneceu uma liberação controlada do carotenoide. Os autores concluíram que as nanopartículas de zeaxantina podem ser incorporadas ao iogurte, permitindo a dispersão de um composto hidrofóbico em uma matriz hidrofílica, proporcionando estabilidade.

MEDEIROS et al. (2019) produziram e caracterizaram um extrato rico em carotenoides extraídos da polpa do melão Cantaloupe (*Cucumis melo* L.), que foi encapsulado em gelatina ou proteínas de soro de leite, visando promover sua solubilidade em água. A melhor combinação encapsulante foi adicionada a iogurte, como corante natural, e estabilidade da cor avaliada. O encapsulamento feito pela técnica de emulsificação, com gelatina suína, tornou os carotenoides mais dispersíveis em água e mais fáceis de incorporar em uma matriz alimentar. O extrato encapsulado aplicado no iogurte simulou a coloração de fruta amarela, apresentando maior homogeneidade e estabilidade em relação à adição do extrato bruto.

O estudo conduzido por ŠEREGELJ et al. (2019) investigou a possibilidade da utilização de resíduos de processamento de pimenta para aplicação em iogurte funcional, visando fortificar com compostos fenólicos e carotenoides encapsulados. A estabilidade dos compostos foi investigada, bem como aspectos microbiológicos e

sensoriais dos produtos finais. A encapsulação foi realizada em proteína de soro de leite, usando as técnicas de spray drying e liofilização. Os encapsulados liofilizados apresentaram melhores características em relação à atividade de água, teor de umidade, solubilidade, fluidez e propriedades de cor, e, portanto, foram incorporados ao iogurte. O produto reteve com sucesso 71,43% dos carotenoides e possibilitou aumento na retenção de polifenóis de até 123,73%. A formulação exibiu maiores escores de aceitabilidade sensorial em comparação com a amostra de controle.

No trabalho realizado por POLONI e dos SANTOS (2020), o licopeno extraído de tomate foi preparado por encapsulação e por emulsificação, e após aplicado em água saborizada, visando aumentar a estabilidade e ampliar suas aplicações. O encapsulado e a emulsão foram preparados por meio da injeção de uma fase orgânica (acetona, licopeno e óleo) em uma fase aquosa (água e tensoativo), sendo que para encapsulação empregou-se um polímero junto aos demais componentes. O tensoativo usado em ambos os sistemas foi o Tween 80. Após a inserção das cápsulas e emulsões na água saborizada, o produto foi armazenado à temperatura de $5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 42 dias. Pelo estudo foi constatado pequena degradação do licopeno e dos demais compostos presentes. Os resultados obtidos não indicaram diferença estatisticamente significativa entre os dois sistemas, demonstrando que ambos auxiliaram no aumento da estabilidade do licopeno.

HIMANATH et al. (2021) desenvolveram uma nanoemulsão de licopeno usando a técnica de ultrassom e examinaram sua incorporação em iogurte para aumentar as propriedades antioxidantes e manter a qualidade. Os resultados da estabilidade ao armazenamento sugeriram que uma nanoemulsão de licopeno contendo óleo de coco (fase oleosa) e lecitina de soja (fase aquosa) pode representar um bom sistema carreador para o licopeno. A aplicação no iogurte não afetou as características físico-químicas, aumentou a atividade antioxidante e manteve a qualidade do produto por 28 dias, e também melhorou a viabilidade de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, assim como a qualidade global do produto. Adicionalmente, as características sensoriais foram consideradas mais aceitáveis em comparação com as amostras controle.

6. Considerações finais

Os carotenoides são pigmentos naturais bioativos de extrema importância para a saúde humana, pois alguns são precursores da vitamina A (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina), além de exercerem atividade antioxidante e auxiliarem na prevenção de doenças crônicas degenerativas, cardiovasculares, catarata e degeneração macular, dentre outros efeitos benéficos.

A utilização da nanotecnologia pode representar uma alternativa para melhorar a segurança e o valor nutricional de produtos alimentícios. Estudos recentes abordam o uso de nanocápsulas e nanocarregadores, como sistemas de entrega de compostos ativos, como sabores, vitaminas, minerais, antimicrobianos, drogas, corantes, antioxidantes, microrganismos probióticos e micronutrientes. Neste trabalho ressaltou-se o encapsulamento e as emulsões de carotenoides, demonstrando que ambos podem ser eficientes para manter os compostos ativos em níveis adequados, por longos períodos, em matrizes alimentares.

Estudos relacionados ao emprego de carotenoides em alimentos, através dos sistemas de entrega, ainda são recentes, sendo observado que a maioria dos trabalhos são direcionados a aplicação em iogurtes. Com isso, fica evidente a necessidade de ampliação das pesquisas para outros tipos de matrizes.

7. Referências

ABAE, A.; MOHAMMADIAN, M.; JAFARI, S. M. Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, p. 69-81, 2017.

ABDEL-AAL, E. M. et al. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1169-1185, 2013.

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.

ALDA, L. M. et al. Lycopene content of tomatoes and tomato products. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 15, n. 4, p. 540-542, 2009.

ALMEIDA, H. H. S et al. Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt). **Food chemistry**, v. 261, p. 224-232, 2018.

ALVES, G. P.; SANTANA, M. H. A. Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties. **Powder Technology**, v. 145, n. 2, p. 139-148, 2004.

AMBRÓSIO, C. L. B. et al. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

AMIRI-RIGI, A; ABBASI, S.; SCANLON, M.G. Enhanced lycopene extraction from tomato industrial waste using microemulsion technique: optimization of enzymatic and ultrasound pre-treatments. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 35, p. 160-167, 2016.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 5, p. 978-985, 2011.

AROF, A. K. et al. Color analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) as potential natural colorant. **Pigment & Resin Technology**, 2018.

ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Advances in spray-drying encapsulation of food bioactive ingredients: From microcapsules to nanocapsules. **Annual review of food science and technology**, v. 10, p. 103-131, 2019.

ASSIS, L. M. de et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

BARBOSA, D. A. B. et al. Impedance spectroscopy investigation of the water-in-oil microemulsions formation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 325-328, 2011.

BARKER, F. M. et al. Nutritional manipulation of primate retinas, V: Effects of lutein, zeaxanthin, and n-3 fatty acids on retinal sensitivity to blue-light-induced damage. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 52, n. 7, p. 3934-3942, 2011.

BHANDARI, B. R. et al. Co-crystallization of honey with sucrose. **LWT-Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 138-142, 1998.

BHANDARI, B. R.; HARTEL, R. W. Co-crystallization of sucrose at high concentration in the presence of glucose and fructose. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1797-1802, 2002.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 3, p. 325-347, 2010.

BLUM, A. et al. The beneficial effects of tomatoes. **European Journal of Internal Medicine**, v. 16, n. 6, p. 402-404, 2005.

BOEUF, G. Marine biodiversity characteristics. **Comptes rendus biologiques**, v. 334, n. 5-6, p. 435-440, 2011.

BOLDYREV, V. V. Mechanochemistry and sonochemistry. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 2, n. 2, p. S143-S145, 1995.

BOON, C. S. et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 6, p. 515-532, 2010.

BRATOVCIC, A.; SULJAGIC, J. Micro-and nano-encapsulation in food industry. **Croatian journal of food science and technology**, v. 11, n. 1, p. 113-121, 2019.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

CAMPO, C. et al. Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: Influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis. **Food chemistry**, v. 301, p. 125230, 2019.

CASEIRO, M. et al. Lycopene in human health. **LWT- Food Science and Technology**, v. 127, p. 109323, 2020.

CAVAZOS-GARDUÑO, A. et al. Preparation of betulinic acid nanoemulsions stabilized by ω -3 enriched phosphatidylcholine. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 24, p. 204-213, 2015.

CHAARI, M. et al. Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro-and nano-emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 161, 219-227, 2018.

CHEZANOGLU, E.; GOULA, A. M. Co-crystallization in sucrose: A promising method for encapsulation of food bioactive components. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 262-274, 2021.

CHIU, Y. C.; YANG, W. L. Preparation of vitamin E microemulsion possessing high resistance to oxidation in air. **Colloids and surfaces**, v. 63, n. 3-4, p. 311-322, 1992.

CIURZYNSKA, A.; LENART, A. Freeze-drying-application in food processing and biotechnology-a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, n. 3, 2011.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. **Food technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 313-323, 2006

ELHISSI, A. M. A. et al. A calorimetric study of dimyristoylphosphatidylcholine phase transitions and steroid–liposome interactions for liposomes prepared by thin film and proliposome methods. **International journal of pharmaceutics**, v. 320, n. 1-2, p. 124-130, 2006.

EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 652, p. 18-26, 2018.

EUN, J. B. et al. A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze drying. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 21, p. 3547-3572, 2020.

FLANAGAN, J.; SINGH, H. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 46, n. 3, p. 221-237, 2006.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

FITZGERALD, A. (Ed.). Emulsifiers: Properties, Functions, and Applications. **Nova Publishers**, 2015.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 3, p. 276-290, 2010.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in food science & technology**, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. A method for pomegranate seed application in food industries: seed oil encapsulation. **Food and bioproducts processing**, v. 90, n. 4, p. 639-652, 2012.

HASENHUETTL, G. L. et al. (Ed.). **Food emulsifiers and their applications**. New York: Springer, 2008.

HIMANATH, G. et al. Nanoemulsion with Coconut Oil and Soy Lecithin as a Stable Delivery System for Lycopene and Its Incorporation into Yogurt to Enhance Antioxidant Properties and Maintain Quality. **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 9, p. 1538-1549, 2021.

HORUZ, T.İ; BELIBAĞLI, K. B. Nanoencapsulation by electrospinning to improve stability and water solubility of carotenoids extracted from tomato peels. **Food chemistry**, v. 268, p. 86-93, 2018.

HUANG, M. et al. Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: the case of quercetin, kaempferol and luteolin. **Food & function**, v. 8, n. 9, p. 3198-3208, 2017.

IMRAN, M. et al. Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 341-349, 2015.

INROGA, M. M. A. S. et al. Apples (*Malus Domestica* Borkh) Minimally Processed Biofortified with Nanoencapsulated β -carotene. **Journal of Culinary Science & Technology**, p. 1-15, 2021.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Lebensm. Wiss. Technol**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JAFARI, S. M. et al. Encapsulation by nanoemulsions. In: **Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries**. Academic Press, 2017. p. 36-73.

JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanotechnology approaches for increasing nutrient bioavailability. **Advances in food and nutrition research**, v. 81, p. 1-30, 2017.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European journal of medicinal chemistry**, v. 70, p. 102-110, 2013.

KATOUZIAN, I.; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 34-48, 2016.

KATSOGIANNIS, K. A. G.; VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; GEORGIADOU, S. Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation. **European Polymer Journal**, v. 69, p. 284-295, 2015.

KAUR, P. et al. Encapsulation of carotenoids with sucrose by co-crystallization: Physicochemical properties, characterization and thermal stability of pigments. **LWT**, v. 140, p. 110810, 2021.

KENTISH, S. et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170-175, 2008.

KHOO, H. E. et al. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1710-1738, 2011.

KRALOVA, I.; SJÖBLOM, J. Surfactants used in food industry: a review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, n. 9, p. 1363-1383, 2009.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 617-635, 1989.

KUKUCHI, H.; YAMAUCHI, H.; HIROTA, S. A spray-drying method for mass production of liposomes. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 39, n. 6, p. 1522-1527, 1991.

LABELL, F. Co-crystallization process aids dispersion and solubility. **Food Processing**, v. 52, n. 8, p. 60-63, 1991.

LAM, R. S. H; NICKERSON, M. T. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 975-984, 2013.

LAN, Y. et al. Solid dispersion-based spray-drying improves solubility and mitigates beany flavour of pea protein isolate. **Food chemistry**, v. 278, p. 665-673, 2019.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A. et al. Yerba mate antioxidant powders obtained by co-crystallization: Stability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 158-165, 2014.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; NAVARRO, A. Physicochemical properties and stability of sucrose/glucose agglomerates obtained by cocrystallization. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 8, p. e12901, 2018.

MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of natural medicines**, v. 74, n. 1, p. 1-16, 2020.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. **Journal of Food Composition and analysis**, v. 20, n. 5, p. 370-374, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. **Annual review of food science and technology**, v. 1, p. 241-269, 2010.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft matter**, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion stability. In: **Food emulsions**. CRC Press, 2015. p. 314-407.

MCCLEMENTS, D. J.; GUMUS, C. E. Natural emulsifiers-Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. **Advances in Colloid and interface Science**, v. 234, p. 3-26, 2016.

MCCLEMENTS, D. J. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 31-59, 2017.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in colloid and interface science**, v. 251, p. 55-79, 2018.

MEDEIROS, A. K. O. de C. et al. Nanoencapsulation improved water solubility and color stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.). **Food Chemistry**, v. 270, p. 562-572, 2019.

MEDEIROS, B. J. F.; NOGUEIRA, M. B. Microencapsulação por liofilização de carotenoides produzidos por *Phaffia rhodozyma* utilizando goma xantana como agente encapsulante (2016). **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a árvore que sustenta a vida**. 1-388.

MESQUITA, S. da S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, aplicações e mercado. **Revista virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017.

MILANI, A. et al. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1290-1324, 2017.

MORAES, M. et al. Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. **International journal of food science & technology**, v. 48, n. 2, p. 274-282, 2013.

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. Biodisponibilidade do licopeno. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 265-273, 2006.

MOULIK, S. P. et al. Studies on the interfacial composition and thermodynamic properties of W/O microemulsions. **Langmuir**, v. 16, n. 7, p. 3101-3106, 2000.

NDAYISHIMIYE, J.; CHUN, B. S. Optimization of carotenoids and antioxidant activity of oils obtained from a co-extraction of citrus (Yuzu ichandrin) by-products using supercritical carbon dioxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 106, p. 1-7, 2017.

NEVILLE, C. E. et al. Effect of increased fruit and vegetable consumption on physical function and muscle strength in older adults. **Age**, v. 35, n. 6, p. 2409-2422, 2013.

NWACHUKWU, I. D.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 74-84, 2016.

ORDOÑEZ-SANTOS, L. E. et al. Lycopene concentration and physico-chemical properties of tropical fruits. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 07, p. 758, 2013.

OSTROSCHI, L. C. et al. Production of spray-dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: Improvement of stability, sensory aspects and technological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 343-351, 2018.

PANOVA, I. G. et al. Lutein and its oxidized forms in eye structures throughout prenatal human development. **Experimental Eye Research**, v. 160, p. 31-37, 2017.

PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, v. 45, p. 155-162, 2015.

POLONI, C. A.; DOS SANTOS, P. P. **Aplicação de sistemas de encapsulamento de licopeno em água saborizada**. In: 9º JEPEX e 3º Mostra Cultural. 2020.

QIAN, C. et al. Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1440-1447, 2012.

RAMEL, F. et al. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. **Plant physiology**, v. 158, n. 3, p. 1267-1278, 2012.

RAMEZANZADE, L.; HOSSEINI, S. F.; NIKKHAH, M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v. 234, p. 220-229, 2017.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological research**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RIBEIRO, H. S. et al. Encapsulation of carotenoids. In: Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. **Springer**, New York, NY, 2010. p. 211-252.

RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1224, p. 1-10, 2012.

REZA MOZAFARI, M. et al. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of liposome research**, v. 18, n. 4, p. 309-327, 2008.

ROCHA, D. S.; REED, E. Pigmentos Naturais em Alimentos e sua Importância para a Saúde. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 41, n. 1, p. 76-85, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. et al. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI press, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Food carotenoids: chemistry, biology and technology. **John Wiley & Sons**, 2015.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, p. 200-205, 2019.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. et al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in lipid research**, v. 70, p. 62-93, 2018.

RUTZ, J. K. et al. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food chemistry**, v. 202, p. 324-333, 2016.

RUTZ, J. K. et al. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59-66, 2017.

SAAFAN, E. E.; RABIE, M. M.; EL-GAMMAL, R. E. Utilization of Nanotechnology in Improving the Properties of Prepared Table Margarine. **Journal of Food and Dairy Sciences**, v. 9, n. 6, p. 207-214, 2018.

SANJAY, A.; MANOHAR, D.; BHANUDAS, S. R. Pharmaceutical cocrystallization: a review. **India: Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, v. 4, n. 4, 2014.

SANTOCONO, M. et al. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 1, p. 1-10, 2007.

SANTOS, P. D. de F. et al. Application of spray drying for production of microparticles containing the carotenoid-rich tucumã oil (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **LWT**, v. 143, p. 111106, 2021.

SARDAR, B. R.; SINGHAL, R. S. Characterization of co-crystallized sucrose entrapped with cardamom oleoresin. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 521-529, 2013.

SAVJANI, J. K. Co-crystallization: an approach to improve the performance characteristics of active pharmaceutical ingredients. **Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm**, v. 9, n. 3, p. 147-151, 2015.

SCOLASTICI, C. et al. Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 5, p. 840-845, 2007.

ŠEREGELJ, V. et al. Application of encapsulated natural bioactive compounds from red pepper waste in yogurt. **Journal of microencapsulation**, v. 36, n. 8, p. 704-714, 2019.

SHARMA, A.; DHIMAN, A. K.; ATTRI, S. Encapsulation of extracted carotenoids of Cucurbita maxima through lyophilization. **Pigment & Resin Technology**, 2020.

SHISHIR, M. R. I. et al. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 34-60, 2018.

SILVA, J. D. F. da et al. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v. 38, p. 1196-1206, 2015.

SILVA, H. D. et al. Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 2, p. 130-135, 2011.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.

STRINGHETA, P. C. et al. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 2, p. 229-238, 2009.

SOLANS, C.; ARAMAKI, K. Editorial overview. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 4, n. 13, p.195-197, 2008.

SOUKOULIS, C.; BOHN, T. A comprehensive overview on the micro-and nano-technological encapsulation advances for enhancing the chemical stability and bioavailability of carotenoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 1-36, 2018.

SOUZA, V. B. et al. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 39-50, 2015.

SUTTER, S. C.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E. β -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, n. 1-2, p. 45-54, 2007.

TAN, C. et al. Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 34, p. 8175-8184, 2013.

TAN, C. et al. Liposome as a delivery system for carotenoids: comparative antioxidant activity of carotenoids as measured by ferric reducing antioxidant power, DPPH assay and lipid peroxidation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6726-6735, 2014.

TAVSANLI, B.; OKAY, O. Mechanically robust and stretchable silk/hyaluronic acid hydrogels. **Carbohydrate polymers**, v. 208, p. 413-420, 2019.

TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 7-8, p. 587-605, 2005.

THOMPSON, A. K.; MOZAFARI, M. R.; SINGH, H. The properties of liposomes produced from milk fat globule membrane material using different techniques. **Le Lait**, v. 87, n. 4-5, p. 349-360, 2007.

TONIAZZO, T. et al. β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. **LWT-food science and technology**, v. 59, n. 2, p. 1265-1273, 2014.

TUYEN, C. K.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of food engineering**, v. 98, n. 3, p. 385-392, 2010.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G.M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

URSACHE, F. M. et al. Valorizations of carotenoids from sea buckthorn extract by microencapsulation and formulation of value-added food products. **Journal of Food Engineering**, v. 219, p. 16-24, 2018.

VOUTILAINEN, S. et al. Carotenoids and cardiovascular health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1265-1271, 2006.

WALK, A. M. et al. From neuro-pigments to neural efficiency: The relationship between retinal carotenoids and behavioral and neuroelectric indices of cognitive control in childhood. **International Journal of Psychophysiology**, v. 118, p. 1-8, 2017.

WU, Z. et al. Multifunctional chitosan-based coating with liposomes containing laurel essential oils and nanosilver for pork preservation. **Food chemistry**, v. 295, p. 16-25, 2019.

XIA, F. et al. Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. **Food hydrocolloids**, v. 26, n. 2, p. 456-463, 2012.

XUE, J. et al. Electrospun nanofibers: new concepts, materials, and applications. **Accounts of chemical research**, v. 50, n. 8, p. 1976-1987, 2017.

ZHANG, Y. et al. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. **Journal of materials science: materials in medicine**, v. 16, n. 10, p. 933-946, 2005.

ZHANG, Z. et al. Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 698-716, 2015.

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of β -carotene in alginate-based hydrogel beads: Impact on physicochemical stability and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 1-10, 2016.

ZHENG, M. Y. et al. Formation and characterization of self-assembling fish oil microemulsions. **Colloid journal**, v. 73, n. 3, p. 319-326, 2011.

ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. (Ed.). **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. 2010.
<http://www.ifrj.upm.edu.my/afjv14%281%292007/1-14.pdf>

ZUORRO, A. et al. Enzyme-assisted production of tomato seed oil enriched with lycopene from tomato pomace. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 12, p. 3499-3509, 2013.

4. Estudo 2 – Desenvolvimento e caracterização de carotenoides microemulsionados em suco clarificado de maçã.

Resumo

Os carotenoides são antioxidantes naturais reconhecidos por serem benéficos à saúde, auxiliando na prevenção de várias doenças. A incorporação de carotenoides em alimentos tem ganhado crescente importância; no entanto, problemas como a solubilidade e estabilidade limitam sua aplicação em alguns produtos. Devido a isso, o estudo teve como objetivo desenvolver microemulsões do tipo (O/A) incorporando β -caroteno (sintético) e urucum (*Bixa orellana*) em suco clarificado de maçã, e avaliar as propriedades físico-químicas, reológicas, estruturais e a estabilidade das microemulsões e dos carotenoides neste sistema. Foram utilizados dois tipos de tensoativos, Tween 20 e monoglicerídeos obtidos de síntese do óleo de linhaça. As amostras de suco contendo carotenoides microemulsionados, independentemente do tensoativo utilizado, apresentaram clareza óptica, características isotrópicas, estabilidade sob aquecimento, e comportamento newtoniano. As microemulsões preparadas com monoglicerídeos demonstraram dimensões nanométricas e apresentaram maior retenção dos carotenoides em relação aquelas microemulsões com Tween 20. Os sistemas com β -caroteno apresentaram instabilidade sob centrifugação, ao contrário dos sistemas com urucum. Pelo estudo fica demonstrado a possibilidade de reforçar o valor nutritivo de sucos clarificados, utilizando compostos de característica lipofílica, a partir do preparo na forma de microemulsões O/A, destacando a versatilidades destes sistemas e a influência da fonte de obtenção do carotenoide.

Palavras-chave: antioxidantes, suplementação, microemulsões O/A, sistemas organizados, tensoativos não iônicos.

1. Introdução

Os carotenoides são pigmentos encontrados na maioria dos vegetais, algas, bactérias fotossintéticas e microrganismos (OTERO et al., 2019). Os seres humanos não podem sintetizar carotenoides e, portanto, estes compostos devem ser ingeridos pela alimentação ou por meio de suplementação alimentar. Além disso, seu consumo é associado a vários benefícios para a saúde, incluindo a redução de riscos de degeneração macular relacionada à idade e catarata, a alguns tipos de câncer e na prevenção de doenças coronarianas (MILANI et al., 2017; EGGERSDORFER et al., 2018).

Alguns carotenoides, cerca de 10% dos carotenoides conhecidos, são precursores da vitamina A, como o α , β e γ -caroteno, e a α e β -criptoxantina. O β -caroteno, que apresenta uma estrutura química com dois anéis β -ionona ligados a

uma cadeia de 40 carbonos, possui maior potencial de provitamina A, quando em comparação com os demais carotenoides (RUTZ et al., 2017).

O β -caroteno sintético, com uma estrutura molecular idêntica ao β -caroteno natural, foi sintetizado pela primeira vez na década de 1950, usando β -ionona, derivada de acetona ou butadieno como precursores (MONTES et al., 2021; RUTZ et al., 2016). Já, o β -caroteno natural pode ser obtido a partir de fungos filamentosos, leveduras (OTERO et al., 2019), microalgas e bactérias por processos biotecnológicos ou por extração de fontes vegetais (RUTZ et al., 2016).

O uso de fontes naturais de carotenoides, como o urucum (*Bixa orellana*), pode ser vantajoso, pois além do β -caroteno naturalmente também contém outros carotenoides, que contribuem para os benefícios à saúde que estão associados a estes compostos (NÖRNBERG et al., 2022). No entanto, além de serem insolúveis em água, os carotenoides são facilmente suscetíveis à oxidação e muitas vezes à isomerização, após a exposição ao oxigênio, luz e calor, o que pode resultar em perda de cor e das atividades antioxidantes e vitamínicas (RUTZ et al., 2016). A sua incorporação em um sistema de microemulsões pode auxiliar na minimização destas alterações.

As microemulsões são sistemas, nos quais o óleo e água estão contidos em uma fase homogênea, termodinamicamente estável, isotrópica, transparente e tipicamente de baixa viscosidade (GRADZIELSKI et al., 2021). Pela definição da IUPAC, uma microemulsão é uma “dispersão feita de água, óleo e surfactante (s), sendo um sistema isotrópico e termodinamicamente estável, com diâmetro de domínio disperso variando aproximadamente de 1 a 100 nm, geralmente 10 a 50 nm (SLOMKOWSKI et al., 2011). Gotículas de até 200 nm, ainda que permaneçam transparentes, são termodinamicamente instáveis, sendo caracterizadas como nanoemulsões (ÇINAR, 2017; ZHANG, 2011; THAKUR et al., 2013).

Microemulsões são sistemas coloidais, que dependendo dos componentes utilizados podem ser de grau alimentício, sendo adequados para proteger e entregar componentes lipofílicos, como os carotenoides (BARROSO et al., 2021; ZIMMER et al., 2022). Estes sistemas apresentam várias vantagens sobre as emulsões convencionais ou nanoemulsões, por poderem ser preparadas sem envolver alta energia (emulsificação espontânea). As microemulsões também apresentam transparência (o que é importante para bebidas claras), um pequeno tamanho de

gota, maior solubilização e biodisponibilidade de constituintes bioativos, maior proteção de componentes solubilizados e alta estabilidade. Estas são características importantes, especialmente na indústria alimentícia (AMIRI-RIGI & EMMAMBUX, 2022; JALALI-JIVAN et al., 2020).

A incorporação de carotenoides através das microemulsões possui várias vantagens, pois estes sistemas viabilizam a sua incorporação em produtos de base aquosa ou oleosa a um custo relativamente baixo, podendo ampliar a estabilidade e reter as propriedades antioxidantes destes compostos (BATRA et al., 2017; ZIMMER et al., 2022).

O desenvolvimento de microemulsões com suco clarificado não deve implicar em inferência na transparência óptica do produto, fato importante, pois esta é uma característica a ser mantida para garantir a boa qualidade deste tipo de bebida. As microemulsões podem ser utilizadas em formulações de refrescos e bebidas prontas para consumo, como repositores eletrolíticos e em bebidas carbonatadas (BENKERT et al., 2022; MERENKOVA et al., 2022).

Com base nisso, o presente trabalho teve como objetivo enriquecer uma matriz alimentar aquosa (suco clarificado de maçã) com β -caroteno (sintético) ou com urucum (*Bixa orellana*), por meio de microemulsões do tipo O/A, utilizando dois tipos de tensoativos, Tween 20 e monoglicerídeos. Além disto, objetivou-se avaliar o conteúdo de carotenoides, as propriedades físico-químicas, reológicas e estruturais, e a estabilidade das microemulsões.

2. Material e métodos

2.1. Materiais

Foram utilizados urucum, adquirido no comércio local (Pelotas/RS/Brasil), β -caroteno de padrão analítico (Sigma Aldrich/Alemanha), polioxietileno sorbitano monolaurato (Dinâmica/Brasil), álcool etílico P.A (Dinâmica/Brasil), suco clarificado de maçã comercial, monoglicerídeos obtidos a partir do óleo de linhaça (Hobuss et al., 2020), além dos demais reagentes e padrões usados para extrações e análises, todos de pureza analítica.

2.2. Métodos

2.2.1. Desenvolvimento das microemulsões

Para o preparo das microemulsões foram pesadas as amostras de carotenoides, adicionadas de álcool etílico e após do tensoativo. A mistura foi submetida a agitação magnética (Solab Científica SL- 91A/Brasil), e na sequência o suco clarificado de maçã foi adicionado, mantendo-se a agitação. A obtenção de um sistema opticamente transparente e translúcido indicou a formação da microemulsão. Após testes preliminares, as microemulsões foram preparadas com os componentes e proporções descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação das microemulsões de carotenoides em suco de maçã clarificado.

Amostras	Carotenoides (%)	Álcool etílico (%)	Emulsificantes		Suco de maçã (%)
			Monoglicerídeos (%)	Tween 20 (%)	
MCT	0,01	1	-	0,19	98,80
MCTM	0,01	1	0,27	1,62	97,10
MUT	0,07	1	-	0,19	98,74
MUTM	0,07	1	0,27	1,62	97,04

MCT (Microemulsão com β -caroteno - Tween 20); MCTM (Microemulsão com β -caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos); MUT (Microemulsão com urucum - Tween 20); MUTM (Microemulsão com urucum - Tween 20 e Monoglicerídeos).

Para a definição do teor de carotenoides considerou-se os parâmetros da legislação brasileira, na qual o enriquecimento de vitaminas deve garantir valor igual ou maior do que 5% (porção) dos respectivos valores diários de referência (VDR), segundo a RDC nº 429, de 8 de outubro de 2020 (BRASIL, 2020).

2.2.2. Caracterização das microemulsões

A caracterização das microemulsões foi avaliada pelas medidas de pH, índice de refração, cor, estabilidade por centrifugação, estabilidade térmica, raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, condutividade, mobilidade eletroforética e avaliação reológica.

Para a determinação do pH foi utilizado um pHmetro Microprocessado (Alfakit, AT-315). O sistema foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0, 7,0 e 10,0 (ZAMBIAZI, 2010).

A determinação do índice de refração foi realizada utilizando o refratômetro de Abbé (Analytik Jena), previamente calibrado com água destilada, sendo as medidas executadas a 25 ± 1 °C (ZAMBIAZI, 2010).

A cor foi determinada utilizando-se um colorímetro (Lovibond PFX880) no padrão *C.I.E L*a*b**, onde a coordenada L^* expressa o grau de luminosidade da cor medida ($L^* = 100 =$ branco; $L^* = 0 =$ preto), a coordenada a^* expressa o grau de variação entre o vermelho (+60) e o verde (-60) e a coordenada b^* expressa o grau de variação entre o azul (-60) e o amarelo (+60). Os valores a^* e b^* foram utilizados para calcular o ângulo Hue [$\arctan (b^*/a^*)$] e o Croma [$(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$].

A análise de estabilidade por centrifugação foi realizada adicionando-se aproximadamente 3mL das microemulsões em tubo Falcon, submetendo-as a centrifugação (Daiki, 80-2B-DM) na velocidade de 1784 xg por 30 min a 25 °C.

A estabilidade térmica foi realizada conforme o método descrito por BATRA et al. (2017). Em suma, as amostras foram avaliadas por medidas de absorvância, usando espectrofotômetro (Phox, SP2100-UV), nos comprimentos de onda de 370 nm e 450 nm, na faixa de temperatura de 5 °C a 70 °C. Para tanto, as microemulsões foram colocadas em banho ultratermostato (Ethik Technology), sendo a temperatura elevada em etapas de 5 °C e as leituras realizadas após a permanência de 5 min em cada temperatura.

O raio hidrodinâmico, o índice de polidispersão, o potencial zeta, a condutividade e a mobilidade eletroforética das microemulsões foram obtidos utilizando-se um equipamento Litesizer 500 Particle Analyzer (Antonpaar). As medidas foram realizadas a 25 °C.

Para análise de reologia, as amostras foram analisadas por ensaio rotacional em reômetro (Haake® Rheostress 600, RS150). A viscosidade foi determinada a partir de curvas de tensão de cisalhamento versus taxa de deformação a 5 °C e 25 °C. Utilizou-se *spindle* tipo copo (sensor DG41 Ti; 0,510 mm de *gap*), com taxa de cisalhamento de 0,01-200 s^{-1} durante 300 s.

2.2.3. Atividade antioxidante e estabilidade dos carotenoides microemulsionados no suco clarificado de maçã estocado sob refrigeração

O produto microemulsionado foi armazenado sob refrigeração a 4 °C, na ausência de luz, por quatro semanas. Foram avaliados nos sucos contendo

carotenoides microemulsionados a atividade antioxidante por DPPH e por ABTS, e o teor de carotenoides durante quatro semanas de armazenamento refrigerado.

A atividade antioxidante foi realizada através da captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), e determinada pelo método adaptado de BRAND-WILLIAMS et al. (1995). Foi misturado 0,1 mL da amostra microemulsionada com 3,9 mL do DPPH em etanol (0,06 mM). A absorbância foi medida a 515 nm após 30 min de reação, utilizando um espectrofotômetro (Jenway, 6705 UV/Vis). A eliminação do radical DPPH foi calculada usando a equação 1. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH.

$$\% \text{ de inibição} = \left[\left(\frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Em que, $ABS_{amostra}$ é a absorbância do extrato; e ABS_{branco} é a absorbância da solução de DPPH.

A atividade antioxidante pela captura do radical livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), foi determinada conforme o método descrito e adaptado de RUFINO et al. (2007). O radical foi formado a partir da reação de 88 μ L de solução de persulfato de potássio 140 mM em 5 mL de solução de ABTS (7mM), mantida no escuro em temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, foi diluído 1 mL desta mistura em álcool etílico absoluto até obter uma absorbância de $0,700 \pm 0,05$ em comprimento de onda de, 734 nm. Para a reação, foram transferidas para tubos de falcon de 15 mL alíquotas de 30 μ L do suco e 3,0 mL do radical ABTS. A mistura foi homogeneizada em vórtex (Phoenix, AP-56) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm (Jenway, 6705 UV/Vis) após 6 minutos de reação. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical ABTS (Equação 2).

$$\% \text{ de inibição} = \left[\left(\frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Em que, $ABS_{amostra}$ é a absorvância do extrato; e ABS_{branco} é a absorvância da solução de ABTS.

O conteúdo de carotenoides foi determinado através do método espectrofotométrico proposto por FLORES-ANDRADE et al. (2021) e ABREU et al. (2020), com algumas modificações. Aproximadamente 2 mL da amostra foram dissolvidos em um frasco volumétrico contendo 20 mL de acetona. Amostras dissolvidas (10 mL) foram pipetadas em tubos falcon e centrifugadas a 2325xg por 10 min (Daiki, 80-2B-DM), para separar os carotenoides (fase superior) do meio emulsificador (fase inferior). Em seguida, as medições de absorvância foram feitas usando um espectrofotômetro (Jenway, 6705 UV/Vis) a 450 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de β -caroteno, segundo a Equação 3.

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/g}) = \frac{A \times V \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times P} \quad (\text{Eq.3})$$

Em que, A = absorvância máxima; V= volume do extrato de carotenoides (mL); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorção; e P= massa da amostra (g).

3. Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, com os resultados expressos em médias \pm desvio padrão, sendo estes submetidos à análise de variância, e os tratamentos comparados pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Para avaliar o efeito do tempo de armazenamento, foram realizadas análises de regressão polinomial.

4. Resultados e discussão

4.1. Desenvolvimento das microemulsões

As microemulsões de carotenoides foram desenvolvidas a fim de viabilizar sua aplicação em matrizes alimentares aquosas, portanto, produzindo-se sistemas do tipo óleo em água (O/A), em que os carotenoides constituíram a fase dispersa (orgânica) e o suco comercial de maçã clarificado a fase contínua (aquosa).

Sabe-se que o tamanho das gotículas influencia na aparência da dispersão, sendo que sistemas com dimensões menores que o comprimento de onda da luz

visível são transparentes ou translúcidos (CHAUHAN et al., 2019), o que é importante para bebidas clarificadas.

As amostras de suco com carotenoides microemulsionados, tanto as preparadas somente com Tween 20, como aquelas que contêm também os monoglicerídeos, apresentaram clareza óptica, indicando a formação de microemulsões (Figura 1).

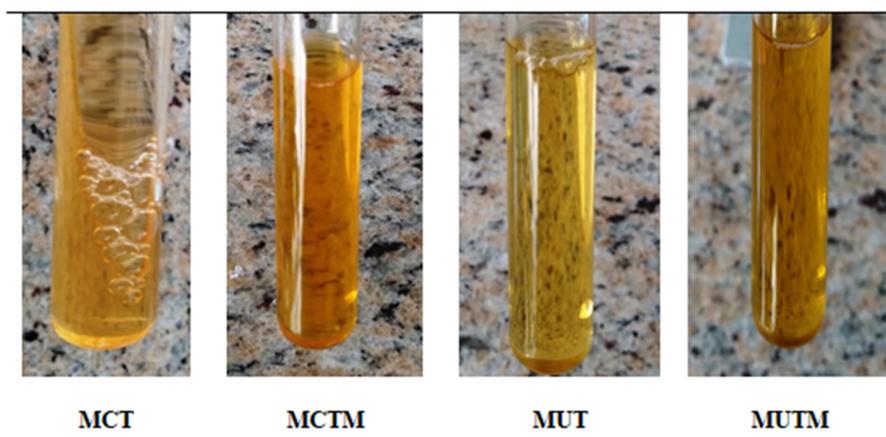


Figura 1. Ilustração da aparência de microemulsões. MCT (Microemulsão com β -caroteno- Tween 20); MCTM (Microemulsão com β -caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos); MUT (Microemulsão com urucum- Tween 20); MUTM (Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos).

Segundo DAMASCENO et al. (2011) e OLIVEIRA et al. (2018), é possível observar nitidamente diferenças entre uma microemulsão e uma emulsão, sendo que a tensão interfacial de uma microemulsão é muito baixa, quando comparada com a tensão interfacial de uma emulsão, e isso pode levar a sua formação espontânea e, conseqüentemente, a um pequeno tamanho das gotículas. As emulsões, por outro lado, são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica.

Além disso, as microemulsões são translúcidas, ou seja, opticamente límpidas, o que se justifica pelo fato de o diâmetro médio das gotículas ser menor do que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz visível, levando à transparência do sistema (DAMASCENO et al., 2011).

Em estudo realizado por pesquisador integrante deste grupo (MENDONÇA et al., 2017), o uso de monoglicerídeos obtidos a partir da glicerólise de ésteres etílicos do óleo de linhaça, em associação com Tween 20, viabilizou a produção de microemulsões compatíveis com aplicações em alimentos.

4.2. Avaliação físico-química do suco de maçã microemulsionado

Na Tabela 2 estão alguns parâmetros físico-químicos avaliados no suco clarificado de maçã microemulsionado.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos dos sucos de maçã clarificados contendo carotenoides microemulsionados.

Parâmetros	Amostras (Média ± Desvio Padrão)				
	MCT	MCTM	MUT	MUTM	P
pH	3,75 ± 0,02 ^c	3,95 ± 0,01 ^b	3,78 ± 0,01 ^c	3,99 ± 0,01 ^a	3,76 ± 0,02 ^c
Índice de Refração	1,350 ± 0,0 ^a	1,351 ± 0,0 ^a	1,350 ± 0,0 ^a	1,349 ± 0,0 ^a	1,348 ± 0,0 ^a
Cor					
L*	51,04 ± 0,2 ^d	77,42 ± 0,3 ^b	40,23 ± 0,3 ^e	75,35 ± 0,3 ^c	93,33 ± 0,2 ^a
C*	58,72 ± 0,6 ^c	107,92 ± 0,5 ^a	42,95 ± 0,4 ^d	70,22 ± 1,1 ^b	17,64 ± 0,2 ^e
H°	83,94 ± 0,4 ^c	88,09 ± 0,1 ^a	85,98 ± 0,1 ^b	72,11 ± 1,1 ^d	-57,44 ± 1,2 ^e

MCT: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20; MCTM: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20; MUTM: Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos; P: Padrão- Suco comercial de maçã clarificado. L* Grau de luminosidade; C* croma; H° ângulo Hue. As médias foram comparadas por ANOVA, usando o teste de Tukey ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente.

O pH obtido para o suco padrão (P) foi de 3,76, valor similar aos reportados na literatura para suco clarificado de maçã (KASTER, 2012; PIMENTEL et al., 2015). As amostras de suco contendo carotenoides microemulsionados apresentaram valores de pH levemente superiores, com destaque para aqueles sucos contendo a combinação de monoglicerídeos e Tween 20, com carotenoide artificial (MCTM) e com urucum (MUTM). Contudo, mesmo apresentando diferenças significativas obtidas pela estatística, os valores destes sucos microemulsionados foram muito próximos ao do suco padrão (P).

O índice de refração é definido como a razão entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz no meio, através deste parâmetro é possível determinar a quantidade de soluto em uma solução aquosa (LUTZ, 1985; MOHAN et al., 2019). O índice de refração do suco padrão foi de 1,348 e nas amostras contendo carotenoides variou de 1,349 a 1,351. Não houve diferença significativa entre as amostras, portanto, todas as microemulsões foram caracterizadas como isotrópicas (LAMOUDI et al., 2022).

Com relação à cor, ao comparar a amostra do suco comercial (P) com as demais amostras, observa-se que para o parâmetro L^* houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), indicando que o suco padrão consiste na amostra mais clara, enquanto a amostra contendo a combinação de tensoativos as mais escuras. O parâmetro croma (C^*) indicou que o β -caroteno microemulsionado com a mistura de tensoativos (MCTM) intensificou a cor do produto. O suco padrão de maçã apresentou a menor intensidade de cor.

A tonalidade da cor (Hue°) evidenciou que as amostras contendo carotenoides microemulsionados demonstravam tendência a cor alaranjada, já o suco padrão apresentou tendência para o amarelo-esverdeado.

Segundo ANTUNES (2018), a cor é um importante atributo na avaliação da qualidade sensorial do produto, embora não interfira necessariamente no valor nutricional ou no sabor. A cor pode influenciar sobre a aceitação ou rejeição do alimento, visto que a apreciação visual é o primeiro dos sentidos usados pelos consumidores. No presente estudo, foram encontradas diferenças significativas entre as amostras contendo carotenoides microemulsionados e o suco de maçã padrão, devido à influência da cor dos pigmentos adicionados; contudo, acredita-se que essa alteração não represente um fator negativo para a amostra, visto que a cor dos sucos remetem ligeiramente a cor da fruta (maçã).

Pelo teste de estabilidade na centrifugação, observou-se que houve alterações na aparência e formação de precipitado na amostra de suco microemulsionado com β -caroteno. Nas amostras contendo urucum, a estabilidade foi mantida, mesmo em alta velocidade de centrifugação (1784 xg). Possivelmente, a molécula de β -caroteno puro seja menos solúvel na microemulsão nesta condição mais drástica, gerada pela centrifugação. Considerando que os demais componentes eram iguais e que a quantidade de urucum era superior (a fim de manter a equivalência em carotenoides), verificou-se que nestas condições é mais difícil manter o β -caroteno disperso, possivelmente por redução de solubilidade, em função da formação de agregados formados pela ação dos demais componentes do urucum ou pela ocorrência de efeitos estéricos.

Segundo MARTINS et al. (2013) a solubilidade de uma substância orgânica está diretamente relacionada com a estrutura molecular, especialmente com a polaridade das ligações e da espécie química na totalidade.

Observa-se na Figura 2 (A e B) o comportamento das amostras microemulsionadas e do suco padrão submetidas ao aquecimento. O monitoramento da absorvância no UV de uma emulsão, nano ou microemulsão, pode indicar a separação de fases, sendo considerado um indicativo da condição de estabilidade (BORGOGNONI et al. 2006; AMIRI-RIGI & ABBASI, 2017).

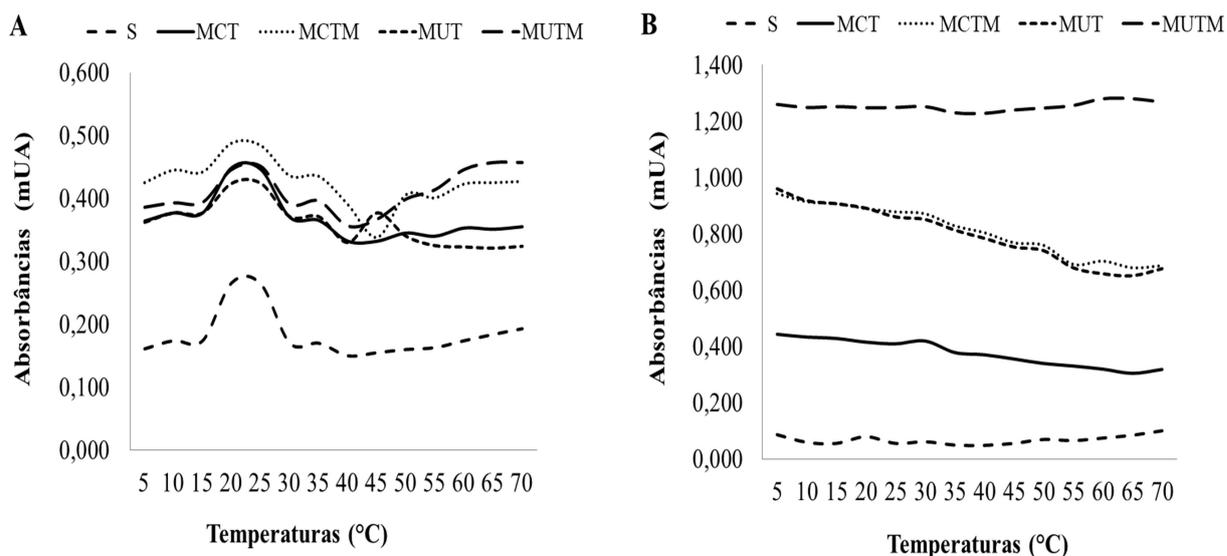


Figura 2. Medida da absorvância por espectrofotometria no UV das amostras de suco, no comprimento de onda de 370 nm (A) e 450 nm (B), na faixa de temperatura de 5 °C a 70 °C. MCT: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20; MCTM: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20; MUTM: Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos; P: Padrão- Suco comercial de maçã clarificado.

Em varredura prévia das leituras das amostras por espectrofotometria no UV (Jenway/ 6700 UV-Vis), foi possível observar bandas nas regiões de 370 nm e 450 nm, tanto no suco padrão (P) quanto nas amostras microemulsionadas. Na região de 370 nm do espectro pode ser detectada a presença de alguns compostos, como de flavonoides, possivelmente oriundos da maçã (MASSINI et al., 2016). Em 450 nm foi encontrado a absorção característica de outra classe de compostos, dos carotenoides, naturalmente presentes no suco de maçã e também adicionados nas amostras.

A avaliação do comportamento durante o aquecimento, monitorada em 370 nm (Figura 2A), no geral, ficou evidenciado semelhanças entre as amostras. A banda observada na faixa de temperatura de 15 °C a 30 °C e um ombro em 35 °C, podem ser atribuídos a algum componente do suco, que foi liberado ou se formou com o

aumento da temperatura, considerando que o suco padrão foi o que mostrou esse evento de forma mais intensa. Possivelmente o sistema de microemulsão atuou reduzindo esse efeito e/ou protegendo o componente. Independentemente da temperatura, percebeu-se que as amostras contendo os carotenoides demonstraram maior intensidade de absorção em relação ao suco padrão, devido à adição dos pigmentos, os quais atuaram como cromóforos no sistema. A amostra de suco com β -caroteno microemulsionado, que continha ambos surfactantes (MCTM), e a amostra com urucum microemulsionado e Tween 20 (MUT), demonstraram uma pequena variação a 45 °C, ocorrendo na amostra com urucum e Tween (MUT) um pequeno aumento na absorbância e na amostra com β -caroteno, Tween e monoglicerídeos (MCTM) foi observado o inverso, um pequeno decréscimo. Contudo, estes efeitos não causaram alterações visualmente identificáveis, demonstrando que o sistema de microemulsão, em qualquer das composições avaliadas, mantém-se estável, tanto em baixas como em elevadas temperaturas (5 °C a 70 °C). Na Figura 2B verificou-se que as medidas no comprimento de onda de 450 nm resultaram em maior intensidade de absorção do que as obtidas em 370 nm. Este efeito pode ser justificado devido à absorção máxima no UV dos carotenoides ocorrer na faixa de 450 nm.

As amostras de suco emulsionadas com urucum (MUT e MUTM) demonstraram maior intensidade de absorção do que as amostras contendo β -caroteno (MCT e MCTM) no comprimento de onda de 450 nm (Figura 2B). O urucum é um pigmento que além de conter carotenoides na sua composição, possuem compostos como bixina e norbixina, que apresentam faixa de absorção no UV de 458 nm e 453 nm, respectivamente, próximas a utilizada nas medidas, o que pode justificar o efeito observado.

As amostras com β -caroteno, Tween 20 e monoglicerídeos (MCTM) e com urucum e Tween 20 (MUT) (Figura 2B) apresentaram comportamento semelhante, quando avaliadas em 450 nm ao longo do aquecimento, observado em ambas as amostras o decréscimo no valor absorbância enquanto ocorreu um aumento na temperatura. Considerando que a fonte de carotenoides e tensoativos nestas amostras diferiam, e que o suco com urucum absorveu mais no UV-visível do que aquele com β -caroteno acredita-se que a presença do monoglicerídeos na amostra

com β -caroteno e Tween (MCTM) tenha proporcionado efeito hiperacrômico, o que poderia igualar a intensidade de absorção das amostras.

Contudo, pode-se observar, também, que as amostras com Tween 20 e monoglicerídeos (MCTM e MUTM), nos dois comprimentos de onda avaliados (370 nm e 450 nm), apresentaram valores superiores da absorbância em toda a faixa de temperaturas testadas, reforçando a possível interferência dos monoglicerídeos na intensificação da cor (retêm os cromóforos) e no aumento da absorção no UV das amostras (efeito hiperacrômico).

A estabilidade da absorbância ao longo do período de aquecimento sugere que o sistema é formado de gotículas pequenas, sendo mais estáveis (BORGOGNONI et al., 2006). Os resultados, no geral, evidenciam que as amostras mantiveram a estabilidade durante o aquecimento, especialmente de 35 a 40 °C, sendo considerado um comportamento satisfatório, visto que permite a aplicação da microemulsão em matrizes que exijam estabilidade em condições ambientais e de refrigeração.

Segundo FATTORI (2011), a estabilidade de uma emulsão ou microemulsão está intimamente relacionada com a escolha do tensoativo com poder emulsificante, que deve ser compatível com os componentes da formulação. Além disso, o estudo de estabilidade de formulações com microemulsões fornece informações sobre o comportamento do produto, em determinadas condições extremas, as quais este produto poderá enfrentar, para avaliar sua estabilidade desde a fabricação até o término da validade (ISAAC et al., 2008).

Segundo SALEHI (2020), a consistência de um fluido newtoniano como a água e os sucos de frutas claros pode ser caracterizada pelo termo viscosidade. A viscosidade (mPa.s) das amostras de suco foram medidas nas temperaturas de 5 e 25 °C (Tabela 3). Todas as amostras apresentaram grau de consistência classificado como “naturalmente espesso” (1 a 50 mPa.s), segundo os parâmetros da NATIONAL DYSPHAGIA DIET (2002). Na temperatura de 25 °C, as amostras apresentaram valores próximas a 1 mPa.s, o que caracteriza a consistência como “rala” (HERNANDEZ, 2020). Lembrando que a 1 mPa.s é a viscosidade da água. No entanto, as amostras a 5 °C apresentaram ligeiro aumento na viscosidade. O comportamento das amostras foi de fluidos newtonianos, os quais são caracterizados por apresentarem uma relação linear entre a tensão de cisalhamento

e a taxa de deformação aplicada, dependendo apenas da temperatura e da composição do fluido (RETICENA, 2015). As amostras apresentaram viscosidade constante, ou com pouca alteração, para as diferentes taxas de deformação (s^{-1}) utilizadas.

Observou-se que, independentemente do tipo de amostra, as amostras refrigeradas apresentaram viscosidade superior àquelas medidas em temperatura ambiente, com destaque para as amostras com a presença de monoglicerídeos. De modo geral, os líquidos espessos demonstram redução de viscosidade com o aumento da temperatura (EKBERG et al., 2010; HERNANDEZ, 2020). Salienta-se que os valores medidos foram baixos, não viabilizando comparações, uma vez que se situaram no limite de precisão do equipamento utilizado.

Segundo SALEHI (2020), o comportamento reológico de sucos de frutas é influenciado por sua composição, principalmente pelo tipo de fruta e pelos processos tecnológicos a que foram submetidos. Os sucos de frutas com baixo teor de sólidos solúveis podem apresentar um comportamento newtoniano. Além disso, o conhecimento do comportamento reológico de sucos é útil no controle de qualidade e avaliação sensorial, no controle de processo, no cálculo do consumo de energia e na seleção do equipamento adequado (DAK et al., 2007; SALEHI, 2020).

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) tem provado ser uma ferramenta precisa e adequada para investigar as propriedades internas de um sistema microemulsionado (RAHDAR et al., 2019). Esta técnica consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo. Essa análise fornece informações sobre o tamanho e movimento da partícula, movimento este que é a causa das flutuações da intensidade. Assim, partículas pequenas apresentam movimento rápido e partículas grandes apresentam movimento lento (NOMURA et al., 2013).

A avaliação do raio hidrodinâmico das amostras contendo os carotenoides microemulsionados evidenciou que as gotículas apresentavam dimensões manométricas, variando de 41 a 121 nm (Tabela 4), sendo que as menores dimensões foram observadas nas microemulsões preparadas com a mistura de surfactantes. A associação dos surfactantes contribuiu para a redução da tensão interfacial, favorecendo a redução na dimensão das gotículas.

NATANIA E SETIAWAN (2020) relatam em estudo que a transparência da emulsão é um bom indicador do tamanho das gotículas. Os autores reportam que com o aumento da concentração de surfactantes há redução na tensão entre a interface O/A, favorecendo a formação de gotículas de menores dimensões. O emprego de álcool, como co-surfactante, também auxilia na redução da tensão interfacial entre as fases, além de permitir a manipulação do balanço hidrofílico-lipofílico (WANI et al., 2018). O uso de álcoois de cadeia curta aumenta a miscibilidade entre as fases aquosa e oleosa, e este efeito é resultado da capacidade dos co-surfactantes em penetrar entre as camadas de surfactante, flexibilizando a camada interfacial (SHAH; IMRAN & ULLAH, 2017; CHATTERJEE et al. (2019). Estes compostos se encaixam entre as áreas estruturalmente mais fracas da camada interfacial, fortalecendo-a (SINGH et al., 2017).

É desejável que o raio hidrodinâmico das gotículas seja da ordem de 100 nm ou menos (dimensão que caracteriza as microemulsões), para aumentar a biodisponibilidade da substância inserida, além de aumentar a estabilidade do produto a longo prazo (BATRA et al., 2017; JINTAPATTANAKIT, 2018). Em função das dimensões, pode-se afirmar que todas as amostras caracterizam-se como microemulsões.

A homogeneidade na distribuição do tamanho das gotículas é dada pelo índice de polidispersibilidade (IPD), que indica se a dispersão é estreita ou se o sistema é polidisperso (PAMBOU et al., 2015). Neste estudo, o IPD indicou que o sistema é polidisperso, variando entre 23% a 32,8%, sugerindo uma ampla distribuição de tamanho ou mesmo a existência de várias populações (multimodal). O tamanho da gotícula influencia nas propriedades das micelas microemulsionadas. Desta forma, quando há um controle maior no tamanho das estruturas, em especial, gotículas em escala nano e de menores dimensões, estas conseguem interagir mais facilmente com moléculas orgânicas e com compostos de interesse presentes no sistema (SANTOS, 2021). No entanto, a heterogeneidade observada não deve ser um fator limitante para atuação das microemulsões na dispersão e estabilização dos carotenoides no suco de maçã.

Tabela 3. Viscosidade das amostras de suco nas temperaturas de 5 °C e 25 °C nas taxas de deformação de 10, 20, 30, 50, 100, 150 e 200 s⁻¹.

T (°C)	Amostra	Viscosidade (mPa.s) nas taxas de deformação (s ⁻¹)						
		10	20	30	50	100	150	200
5	P	2,07 ± 0,14 ^{bC}	2,35 ± 0,00 ^{aA}	2,19 ± 0,05 ^{abC}	2,22 ± 0,15 ^{abB}	2,19 ± 0,06 ^{abC}	2,24 ± 0,06 ^{abC}	2,23 ± 0,05 ^{abC}
	MCT	2,55 ± 0,24 ^{aAb}	2,53 ± 0,04 ^{aA}	2,42 ± 0,05 ^{aB}	2,53 ± 0,21 ^{aAB}	2,37 ± 0,01 ^{ab}	2,40 ± 0,01 ^{aB}	2,40 ± 0,01 ^{aB}
	MCTM	2,96 ± 0,01 ^{aA}	2,59 ± 0,01 ^{aA}	2,73 ± 0,13 ^{bA}	2,58 ± 0,11 ^{bA}	2,63 ± 0,10 ^{bA}	2,60 ± 0,05 ^{bA}	2,60 ± 0,05 ^{bA}
	MUT	2,54 ± 0,20 ^{aAB}	2,46 ± 0,18 ^{aA}	2,39 ± 0,03 ^{aB}	2,34 ± 0,07 ^{aAB}	2,34 ± 0,04 ^{abC}	2,38 ± 0,06 ^{aB}	2,38 ± 0,06 ^{aB}
	MUTM	2,37 ± 0,12 ^{bBC}	2,56 ± 0,16 ^{abA}	2,65 ± 0,10 ^{aA}	2,69 ± 0,08 ^{aA}	2,65 ± 0,07 ^{aA}	2,64 ± 0,05 ^{abA}	2,64 ± 0,04 ^{abA}
25	P	1,16 ± 0,06 ^{cB}	1,60 ± 0,03 ^{aA}	1,40 ± 0,01 ^{bA}	1,37 ± 0,02 ^{bAB}	1,36 ± 0,01 ^{bAB}	1,37 ± 0,02 ^{bA}	1,36 ^{bA} ± 0,01 ^{bA}
	MCT	1,62 ± 0,75 ^{aA}	1,58 ± 0,37 ^{aA}	1,23 ± 0,15 ^{aA}	1,25 ± 0,12 ^{aAB}	1,16 ± 0,04 ^{aC}	1,19 ± 0,01 ^{aC}	1,20 ^{aB} ± 0,03 ^{aB}
	MCTM	1,67 ± 0,80 ^{aA}	1,49 ± 0,16 ^{aA}	1,32 ± 0,12 ^{aA}	1,57 ± 0,18 ^{aA}	1,26 ± 0,04 ^{abC}	1,28 ± 0,01 ^{aB}	1,37 ^{aA} ± 0,09 ^{aA}
	MUT	1,24 ± 0,04 ^{aB}	1,24 ± 0,07 ^{aA}	1,17 ± 0,08 ^{aA}	1,17 ± 0,01 ^{aB}	1,18 ± 0,04 ^{aC}	1,20 ± 0,03 ^{aC}	1,20 ^{aB} ± 0,03 ^{aB}
	MUTM	1,40 ± 0,29 ^{aB}	1,20 ± 0,05 ^{aA}	1,38 ± 0,03 ^{aA}	1,51 ± 0,15 ^{aA}	1,42 ± 0,07 ^{aA}	1,35 ± 0,02 ^{aA}	1,36 ^{aA} ± 0,01 ^{aA}

MCT: Microemulsão com β-caroteno- Tween 20; MCTM: Microemulsão com β-caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20; MUTM: Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos; P: Padrão- Suco comercial de maçã clarificado. T: Temperatura em graus Celsius (°C). As médias foram comparadas por ANOVA, usando o teste de Tukey ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e médias de mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente.

Tabela 4. Parâmetros estruturais das microemulsões de carotenoides em suco de maçã clarificado.

Amostra	RH (nm)	IPD (%)	PZ (mv)	CD (mS.cm ⁻¹)	ME (μm cm.Vs ⁻¹)
MCT	121,57 ± 0,1 ^a	32,87 ± 0,7 ^a	-1,42 ± 0,11 ^a	1,84 ± 0,04 ^b	-0,11 ± 0,01 ^a
MCTM	71,50 ± 2,6 ^c	25,32 ± 0,4 ^c	-1,37 ± 0,3 ^a	2,05 ± 0,06 ^a	-0,11 ± 0,02 ^a
MUT	91,48 ± 2,4 ^b	30,78 ± 0,9 ^b	-0,45 ± 0,04 ^b	1,86 ± 0,04 ^b	-0,04 ± 0,004 ^b
MUTM	41,41 ± 0,6 ^d	23,23 ± 0,3 ^d	-0,23 ± 0,1 ^b	2,08 ± 0,06 ^a	-0,02 ± 0,01 ^b

MCT: Microemulsão com β-caroteno- Tween 20; MCTM: Microemulsão com β-caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20; MUTM: Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos; RH: Raio hidrodinâmico; IPD: Índice de polidispersão; PZ: Potencial zeta; CD: Condutividade; ME: Mobilidade eletroforética. As médias foram comparadas por ANOVA, usando o teste de Tukey ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente.

O potencial zeta é uma maneira efetiva de controlar o comportamento das gotículas, por indicar a relação entre o potencial de superfície e as forças de repulsão entre as gotículas (ROSANI, 2011). Os valores de potencial zeta obtidos para todas as amostras foram negativos, devido às cargas parciais negativas dos tensoativos, porém, foram próximos a zero, o que é justificado pela natureza química dos tensoativos utilizados. O tipo de carotenoide utilizado parece não ter influenciado neste parâmetro.

Para SANTOS et al. (2016), as emulsões, nano ou microemulsões do tipo O/A, estabilizadas com uma mistura de dois tensoativos não iônicos, apresentam uma região interfacial com excesso de dipolos com alguma orientação, resultando na queda de potencial. Considera-se, ainda, que, a estabilidade das microemulsões contendo em sua composição tensoativos não iônicos, como as formulações do presente estudo, não dependem unicamente do potencial zeta, visto que os tensoativos não iônicos tendem a diminuir o valor absoluto deste parâmetro (AGGARWAL et al., 2013).

Nos tensoativos não iônicos utilizados, a polaridade da molécula geralmente é oriunda da presença dos grupos etoxilados, que concentram cargas parciais negativas nos átomos de oxigênio ao longo da molécula (DALVIN, 2011). Ao analisar uma gotícula de óleo dispersa em uma fase aquosa, pode-se ver que a superfície não apresenta dupla camada elétrica, pois estes tensoativos não possuem carga verdadeira. Os surfactantes não iônicos apresentam partes polares muito longas e a estabilização das emulsões

ou microemulsões ocorre por impedimento estérico (FONTES, 2017; DALTIM, 2011).

A mobilidade eletroforética é a razão da velocidade dos íons em relação à força de um campo elétrico. Os valores de mobilidade eletroforética foram menores ($p \leq 0,05$) para os sucos adicionados de urucum (MUT e MUTM), contudo, todos os valores foram muito baixos. Estes valores podem ser justificados pela natureza dos tensoativos utilizados (Tween 20 e o monoglicerídeo), ou seja, ambos são não iônicos. Também os pigmentos (β -caroteno e o urucum), por serem compostos orgânicos de baixa polaridade, não devem ter contribuído para elevar a mobilidade eletroforética. Como o urucum contém uma mistura de carotenoides, além de outros compostos em menor quantidade, é possível que essa diversidade em sua composição tenha influenciado nos valores da mobilidade eletroforética, contudo, sem gerar valores expressivos para este parâmetro.

A condutividade elétrica é um parâmetro importante que permite a distinção entre microemulsões do tipo O/A e A/O. Nas microemulsões A/O, a fase contínua é oleosa e a relação entre a fase oleosa e a fase aquosa é alta, justificando a condutividade menor. Por outro lado, as microemulsões O/A têm maior proporção da fase aquosa, portanto, apresentam maior condutividade, geralmente na faixa de $0,25 \text{ mS.cm}^{-1}$ a $0,35 \text{ mS.cm}^{-1}$ (AMUTI et al., 2021). Os valores encontrados neste estudo para a condutividade elétrica ficaram entre $1,84$ e $2,08 \text{ mS.cm}^{-1}$, típicos de sistemas com domínio aquoso. Não houve diferença significativa entre as amostras em função do tipo de carotenoide ou tensoativo aplicados.

4.3. Atividade antioxidante e estabilidade dos carotenoides no suco de maçã estocado sob refrigeração

Foram utilizadas duas diferentes metodologias para determinar a atividade antioxidante dos sucos desenvolvidos, visando observar qual apresenta melhor afinidade com a matriz estudada (Figuras 3A e 3B; Tabela 5 do material suplementar).

Independentemente da amostra, a atividade antioxidante por ABTS destacou-se em relação à atividade medida por DPPH. Na primeira semana de armazenamento, os valores da capacidade de inibição dos radicais livres por

ABTS ficaram próximos a 90%, enquanto os valores obtidos por DPPH foram inferiores a 12% para as amostras contendo carotenoides microemulsionados e, apenas a 9% para o suco padrão.

Segundo SUCUPIRA et al. (2012) e SILVA et al. (2022), a atividade antioxidante medida através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), que pode ser gerada mediante uma reação química, eletroquímica ou enzimática, pode medir a atividade de compostos de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica, o que pode ter contribuído para os valores superiores da atividade antioxidante obtidos por esta metodologia. Contudo, ao longo das quatro semanas, houve redução drástica da atividade antioxidante no suco medida por qualquer das metodologias, indicando a degradação de espécies com potencial antioxidante presentes na matriz.

Foi observada da primeira a quarta semana de armazenamento (Tabela 5-material suplementar) uma redução da capacidade antioxidante medida por ABTS para a amostra com β -caroteno e Tween 20 (MCT) de aproximadamente 79%, para a amostra com β -caroteno, Tween 20 e monoglicerídeos (MCTM) em cerca de 78%, para a amostra com urucum e Tween 20 (MUT) em torno de 82%, para a amostra com urucum, Tween 20 e monoglicerídeos (MUTM) próximo a 74%, e para o suco controle (sem adição de carotenoides e emulsionantes) de 88%. A atividade antioxidante medida por DPPH apresentou reduções de aproximadamente 93% para a amostra com β -caroteno e Tween 20 (MCT), de 82% para amostra com β -caroteno, Tween 20 e monoglicerídeos (MCTM), de 95% para a amostra com urucum e Tween 20 (MUT), e de 85% para a amostra com urucum, Tween 20 e monoglicerídeos (MUTM). Na amostra controle não foi observada atividade antioxidante nas últimas duas semanas.

Observou-se que a degradação dos carotenoides nas microemulsões contendo apenas o Tween 20 foram ligeiramente superiores em relação às microemulsões preparadas com a combinação de Tween 20 e monoglicerídeos. Constatou-se também que mesmo ocorrendo redução na atividade antioxidante das amostras que continham carotenoides microemulsionados, este parâmetro ainda se manteve superior ao do suco clarificado padrão (sem a adição de carotenoides).

Porcentagens distintas de carotenoides (β -caroteno e urucum) foram utilizadas nas formulações das microemulsões (Tabela 1), em função do β -caroteno sintético apresentar grau de pureza superior a 95%, enquanto o urucum apresenta como pigmentos majoritários a bixina e norbixina, além de vários carotenoides em menor quantidade, como a isobixina, β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e a orellina. (TOLEDO et al., 2021), e, portanto, apresenta quantidades inferiores de carotenoides.

Assim como ocorreu em relação à atividade antioxidante, o conteúdo de carotenoides nas amostras de suco contendo β -caroteno e urucum microemulsionados, tanto somente com Tween 20 quanto com Tween 20 e monoglicerídeos, também diminuíram significativamente durante o período de armazenamento (Figura 3C, Tabela 5 – material suplementar).

Com relação ao teor de carotenoides, houve um decréscimo significativo da primeira para a quarta semana de armazenamento, sendo verificados menores percentuais de degradação nas amostras com β -caroteno microemulsionado, de 25% na amostra redução para a amostra com β -caroteno e Tween (MCT), e de 36% para a amostra com β -caroteno, Tween 20 e monoglicerídeos (MCTM). No final do período de estocagem, os percentuais de degradação nas amostras contendo urucum microemulsionado foram de 69% na amostra com urucum e Tween 20 (MUT) e de 56% na amostra com urucum, Tween e monoglicerídeos (MUTM). Ainda que tenham ocorrido perdas, ao final da primeira semana, que já representaria um tempo maior que a validade normalmente indicada para o suco após aberto, o conteúdo de carotenoides manteve-se estável na amostra contendo β -caroteno e Tween 20 (MCT), e este conteúdo reduziu em apenas 12% quando o Tween foi combinado com monoglicerídeos (MCTM). Percebeu-se a tendência de menor estabilidade destes compostos presentes no urucum.

Os carotenoides naturalmente presentes no suco padrão (P) apresentaram degradação superior (38%) a ocorrida nas amostras com β -caroteno microemulsionado (MCT e MCTM), indicando que o preparo na forma de microemulsões pode ter proporcionado algum benefício na manutenção do β -caroteno nos sucos.

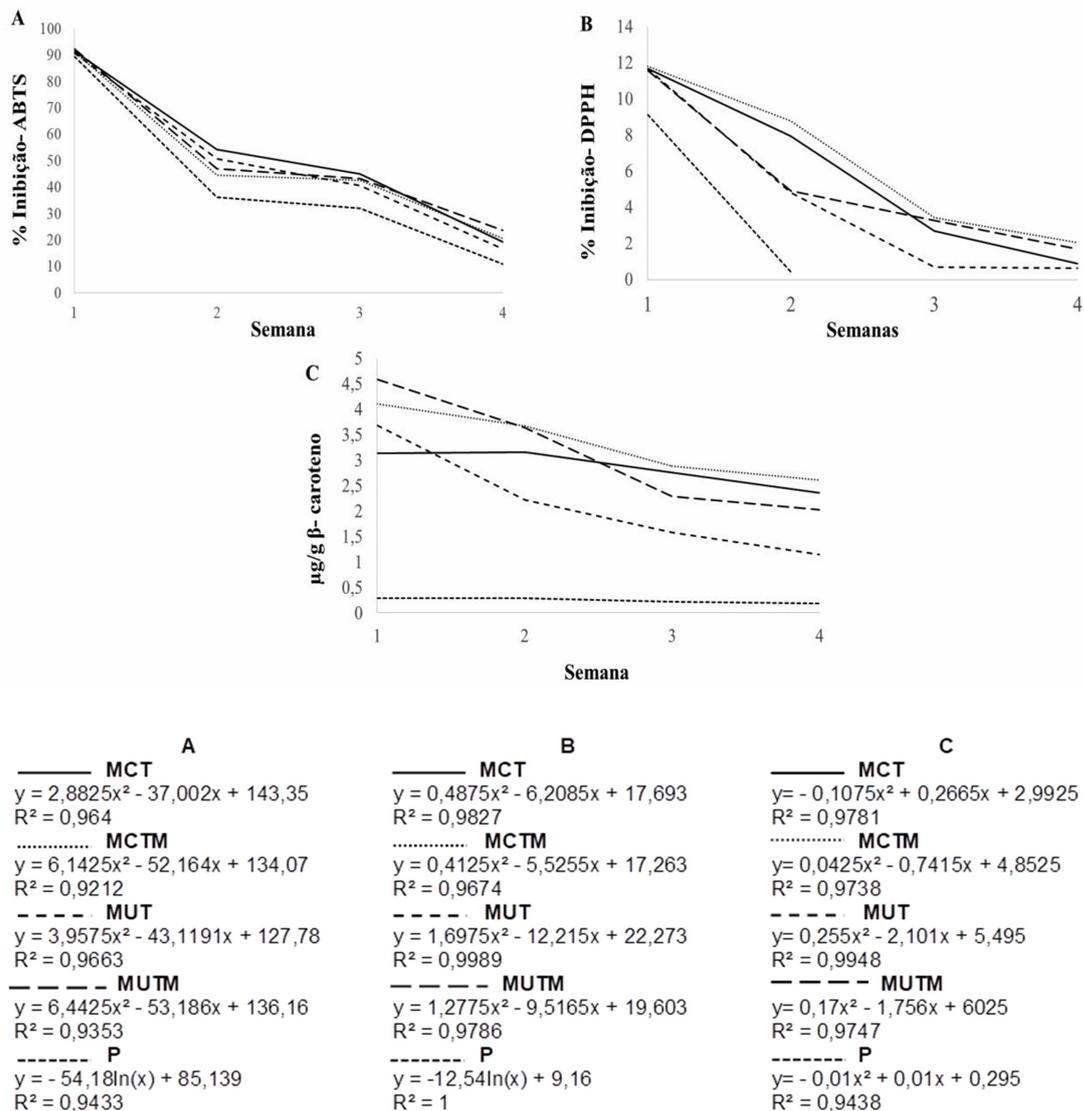


Figura 3. Atividade antioxidante por ABTS (A) e por DPPH (B), e teor de carotenoides (C) nos sucos de maçã clarificados contendo carotenoides microemulsionados, no período de quatro semanas sob refrigeração. MCT: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20); MCTM: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20; MUTM: Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos; P: Padrão- Suco comercial de maçã clarificado sem adição de carotenoides.

O suco padrão (P) apresentou baixo de teor de carotenoides, o que já era esperado, pois no processo de clarificação os compostos em suspensão são parcialmente removidos (SHARMA et al., 2017), e os teores de compostos de baixa solubilidade em água, como os pigmentos, são insignificantes neste tipo de produto. Assim, o enriquecimento torna-se interessante em termos nutricionais, contribuindo para reforçar, prevenir ou corrigir eventuais deficiências de carotenoides (MARQUES et al., 2012).

Independente do tensoativo utilizado, o β -caroteno sintético foi mais estável que os carotenoides presentes no urucum nas microemulsões durante o período de armazenamento (Tabela 5-material suplementar).

Considerando o preconizado pela RDC n.º 429 e pela IN n.º 75, de 8 de outubro de 2020 (BRASIL, 2020), pode-se verificar que as amostras mantiveram valores acima de 5% do VDR (valor diário de referência) por duas semanas de armazenamento, com exceção da amostra com urucum e Tween 20 (MUT), na qual os carotenoides reduziram de 736 μg de β -caroteno. 200 mL^{-1} para 444 μg de β -caroteno. 200 mL^{-1} na segunda semana. A quantidade de carotenoides microemulsionados em 200 mL de suco de maçã alcançou para a amostra com β -caroteno e Tween (MCT) 632 μg de β -caroteno; para a amostra com β -caroteno, Tween e monoglicerídeo (MCTM) 734 μg de β -caroteno; para a amostra com urucum e Tween (MUT) 444 μg de β -caroteno e para a amostra com urucum, Tween e monoglicerídeo (MUTM) 728 μg de β -caroteno, ao final da segunda semana de armazenamento. O conteúdo mínimo (5%) de carotenoides requeridos para crianças de 4 a 8 anos é de 240 μg de β -caroteno dia^{-1} , crianças/adolescentes de 9 a 18 anos de 450 μg de β -caroteno dia^{-1} e de adultos 480 μg de β -caroteno dia^{-1} . Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2001), a recomendação diária mínima do alimento enriquecido ou fortificado é de responsabilidade das autoridades de cada país.

5. Conclusão

A inserção de carotenoides em suco de maçã clarificado, na forma de microemulsões O/A, viabilizou o enriquecimento do suco sem alterar sua transparência óptica, ou seja, mantendo a limpidez característica do produto, ademais, proporcionou boa estabilidade. O comportamento das amostras foi de fluidos newtonianos.

O conteúdo de carotenoides das amostras enriquecidas se manteve significativamente superior ao do suco padrão, no período de quatro semanas de estocagem sob refrigeração, sendo que, a adição na forma de β -caroteno demonstrou maior manutenção dos carotenoides do que pela adição do urucum. Observou-se que a combinação de monoglicerídeos e Tween 20, como surfactantes, proporcionou menor perda de carotenoides em relação às

amostras em que se utilizou apenas Tween 20 para a formação da microemulsão.

O enriquecimento com os carotenoides, sob a forma proposta, resultou em maior atividade antioxidante para o suco, independente dos componentes utilizados.

O pH das amostras não foi influenciado pelos pigmentos ou componentes das microemulsões; no entanto, a cor tornou-se mais alaranjada, o que também pode ser considerado favorável, pela relação com o enriquecimento do produto.

A avaliação da estrutura das microemulsões por DLS indicou que as gotículas da fase dispersa apresentaram polidispersão de tamanho, com dimensões da ordem de nanômetros. As microemulsões com a mistura dos tensoativos apresentaram menores dimensões (41,4 e 71,5 nm) em relação aquelas com apenas Tween 20 (121,57 e 91,48 nm). Os valores baixos do potencial zeta e mobilidade eletroforética condizem com características dos tensoativos não iônicos empregados.

Os dados obtidos indicam a possibilidade de enriquecimento de sucos com carotenoides, a partir da utilização de microemulsões de O/A, representando uma inovação neste campo de estudo.

6. Referências

ABREU, L., CARDOSO, T., DANTAS, K., & OLIVEIRA, M. (2020). **Prospecção e quantificação de carotenoides em frutos de tucumã-do-pará.**

AGGARWAL, Nidhi; GOINDI, Shishu; KHURANA, Ranjit. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 158-166, 2013.

AMIRI-RIGI, Atefeh; ABBASI, Soleiman; EMMAMBUX, Mohammad Naushad. Background, limitations, and future perspectives in food grade microemulsions and nanoemulsions. **Food Reviews International**, p. 1-39, 2022.

AMIRI-RIGI, Atefeh; ABBASI, Soleiman. Stability assessment of lycopene microemulsion prepared using tomato industrial waste against various

processing conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 14, p. 4922-4928, 2017.

AMUTI, Aibibai et al. Formulation and characterization of curcumin-loaded microemulsions: Evaluation of antioxidant stability and in vitro release. **Journal of Molecular Liquids**, v. 336, p. 116881, 2021.

ANTUNES, Laura Luisi. **Viabilidade de Lactobacillus acidophilus livre e microencapsulado em sucos funcionais**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

ARTIGA-ARTIGAS, María; LANJARI-PÉREZ, Yamel; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Curcumin-loaded nanoemulsions stability as affected by the nature and concentration of surfactant. **Food chemistry**, v. 266, p. 466-474, 2018.

BARROSO, Livia et al. Lipid-based carriers for food ingredients delivery. **Journal of Food Engineering**, v. 295, p. 110451, 2021.

BATRA, Georgia et al. Enhanced antioxidant activity of Capsicum annum L. and Moringa oleifera L. extracts after encapsulation in microemulsions. **ChemEngineering**, v. 1, n. 2, p. 15, 2017.

BENKERT, Claudia et al. Development of a fully water-dilutable mint concentrate based on a food-approved microemulsion. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131230, 2022.

BORGOGNONI, Camila Figueiredo; POLAKIEWICZ, Bronislaw; PITOMBO, Ronaldo Nogueira de Moraes. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 502-508, 2006.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 429, de 8 de Outubro de 2020. **Dispõe sobre a rotulagem nutricional de alimentos embalados**. Diário Oficial da União, Brasília, DF,

2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-429-de-8-de-outubro-de-2020-282070599>. Acesso em: 03 de set. de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN nº 75, de 8 de Outubro de 2020. **Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2020. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/IN+75_2020_.pdf/7d74fe2d-e187-4136-9fa2-36a8dcfc0f8f. Acesso em: 05 de set. de 2023.

CHATTERJEE, Bappaditya et al. Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion: Available proof of concept and existing challenges. **International journal of pharmaceutics**, v. 565, p. 258-268, 2019.

CHAUHAN, Lalita; THAKUR, Prerna; SHARMA, Sheetal. Microemulsions: new vista in novel drug delivery system. **Innov Pharm Pharmacother**, v. 7, n. 2, p. 37-44, 2019.

CHAVDA, Vivek P.; SHAH, Dhaval. Self-emulsifying delivery systems: one step ahead in improving solubility of poorly soluble drugs. In: Nanostructures for cancer therapy. **Elsevier**, 2017. p. 653-718.

ÇINAR, Kadir. A review on nanoemulsions: preparation methods and stability. **Trakya Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**, 2017.

DAK, Manish; VERMA, R. C.; JAAFFREY, S. N. A. Effect of temperature and concentration on rheological properties of “Kesar” mango juice. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 4, p. 1011-1015, 2007.

DALTIN, Decio. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações.** Editora Blucher, 2011.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 9-18, 2011.

EGGERSDORFER, Manfred; WYSS, Adrian. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 652, p. 18-26, 2018.

EKBERG, Olle et al. Flow properties of oral contrast medium formulations depend on the temperature. **Acta Radiologica**, v. 51, n. 4, p. 363-367, 2010.

FATTORI, Bruna Poli. **Desenvolvimento de emulsão contendo C12-25 acid PEG 8 éster e avaliação da estabilidade com diferentes concentrações de óleo essencial de Achillea millefolium**. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 53f.

FLORES-ANDRADE, Enrique et al. Carotenoid nanoemulsions stabilized by natural emulsifiers: Whey protein, gum Arabic, and soy lecithin. **Journal of Food Engineering**, v. 290, p. 110208, 2021.

FAO- Food and Agriculture Organization (2001). Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, Italy. 1998; 286p. Disponível em : <https://www.fao.org/3/y2809e/y2809e.pdf>

FONTES, Luiza Moura. **Biodegradação de emulsão de óleo residual pesado em cultivo de desmodemus sp**. Tese de dissertação. Programa de Pós Graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia- Escola Politécnica, Salvador- BA, 91f, 2017.

GRADZIELSKI, Michael et al. Using microemulsions: formulation based on knowledge of their mesostructure. **Chemical reviews**, v. 121, n. 10, p. 5671-5740, 2021.

HERNANDEZ, Ana Maria. **Análise da deglutição de neonatos e lactentes: impacto da forma de oferta e viscosidade do estímulo no diagnóstico videofluoroscópico**. Tese de doutorado- Programa de Estudos Pós-Graduados em Fonoaudiologia, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 152 f, 2020.

HOBUSS, Cristiane B. et al. Synthesis and characterization of monoacylglycerols through glycerolysis of ethyl esters derived from linseed oil by green processes. **RSC advances**, v. 10, n. 4, p. 2327-2336, 2020.

ISAAC, Vera Lucia Borges et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 29, n. 1, 2008.

JALALI-JIVAN, Mehdi; GARAVAND, Farhad; JAFARI, Seid Mahdi. Microemulsions as nano-reactors for the solubilization, separation, purification and encapsulation of bioactive compounds. **Advances in colloid and interface science**, v. 283, p. 102227, 2020.

JINTAPATTANAKIT, A. Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT) method. **Pharmaceutical Sciences Asia**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 2018.

KASTER, Bruna et al. **Efeitos das condições operacionais na microfiltração do suco de maçã**. Tese de dissertação- Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico Florianópolis, 83p, 2012.

LAMOUDI, Lynda et al. Fusidic Acid Microemulsion Based on a Pseudoternary Phase Diagram: Development, Characterization, and Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, p. 1-8, 2022.

LIBERATO, Selma Coelho; PINHEIRO-SANT'ANA, Helena Maria. Fortification of industrialized foods with vitamins. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 215-231, 2006.

LUTZ, A. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. Sao Paulo, v. 2, p. 18-21, 1985.

MARQUES, Marina Fonseca; MARQUES, Millene Márcia; XAVIER, Eliane Rodrigues. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. **HU Revista**, v. 38, n. 1 e 2, 2012.

MARTINS, Cláudia Rocha; LOPES, Wilson Araújo; ANDRADE, Jailson Bittencourt de. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química nova**, v. 36, p. 1248-1255, 2013.

MASSINI, Laura et al. Apple peel flavonoids as natural antioxidants for vegetable juice applications. **European Food Research and Technology**, v. 242, p. 1459-1469, 2016.

MERENKOVA, Svetlana; ZININA, Oksana; POTOROKO, Irina. Fermented Plant Beverages Stabilized with Microemulsion: Confirmation of Probiotic Properties and Antioxidant Activity. **Fermentation**, v. 8, n. 12, p. 723, 2022.

MENDONÇA, Carla Rosane Barboza, BORGES, Caroline Dellinghausen, SCHULZ, Gracélie Aparecida Serpa, ALENCAR, Fernanda dos Santos Nunes de Melo. Capítulo 22 - Caracterização de microemulsões compatíveis com fins alimentares. In: Gisele Medeiros da Costa One; Adriana Gomes César Carvalho. (Org.). *Nutrição e Saúde: Os desafios da interdisciplinaridade nos ciclos da vida humana*. Campina Grande-PB: **Instituto Bioeducação- IBEA**, 2017, v. 3, p. 399-415. Disponível em: <https://cinasama.com.br/wp-content/uploads/2021/09/NUTRI%C3%87%C3%83O-E-SA%C3%9ADE-vol-3-ano-2017.pdf>

MILANI, Alireza et al. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1290-1324, 2017.

MOHAN, Shikhar et al. Refractive index measurement of pharmaceutical solids: a review of measurement methods and pharmaceutical applications. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 108, n. 11, p. 3478-3495, 2019.

MONTES, Letícia Telles Pereira et al. β -Caroteno e sua Ação Anticarcinogênica/ β -Carotene and its Anticarcinogenic Action. **Saúde em Foco**, v. 8, n. 3, p. 23-38, 2021.

NATANIA, Kam; SETIAWAN, Giovani Fransisca. Characterization of Antimicrobial edible films with single and double emulsions from clove (*Syzygium aromaticum*) oil. **Reaktor**, v. 20, n. 1, p. 38-46, 2020.

NATIONAL DYSPHAGIA DIET TASK FORCE; American Dietetic Association. National dysphagia diet: standardization for optimal care. **American Dietetic Associati**, 2002.

NOMURA, D. A. et al. Discussing the use of light scattering in the characterization of polydisperse colloidal systems. **Trabalho apresentado na XLII Reunião anual de la Sociedad Argentina de Biofísica**, 2013.

NÖRNBERG, Marcele L. et al. Compostos bioativos em manteigas: carotenoides e ácidos graxos Bioactive compounds in butters: carotenoids and fatty acids. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 10270-10288, 2022.

OLIVEIRA NEVES, Jamilly Kelly et al. Microemulsions containing Copaifera multijuga Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery. **Industrial crops and products**, v. 111, p. 185-192, 2018.

OTERO, Deborah M. et al. Carotenoid-producing yeasts in the Brazilian biodiversity: Isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 117-129, 2019.

PAMBOU, Elias et al. Structural features of micelles of zwitterionic dodecylphosphocholine (C12PC) surfactants studied by small-angle neutron scattering. **Langmuir**, v. 31, n. 36, p. 9781-9789, 2015.

PIMENTEL, Tatiana Colombo et al. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with Lactobacillus paracasei ssp. paracasei and oligofructose in different package type. **LWT-Food science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415-422, 2015.

RAHDAR, Abbas et al. Dynamic light scattering: A useful technique to characterize nanoparticles. **Journal of Nanoanalysis**, v. 6, n. 2, p. 80-89, 2019.

RETICENA, Ketlyn de Oliveira. **Estudo do comportamento reológico da polpa de maracujá enriquecida com polpa de banana verde**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

ROSANI, Leandro. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água com óleos vegetais**. Tese de

dissertação- Mestrado em Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 85f, 2011.

RUFINO, M. D. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2007.

RUTZ, Josiane K. et al. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food chemistry**, v. 202, p. 324-333, 2016.

RUTZ, Josiane K. et al. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59-66, 2017.

SALEHI, Fakhreddin. Physicochemical characteristics and rheological behaviour of some fruit juices and their concentrates. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 5, p. 2472-2488, 2020.

SANTANA, Jeferson Santos et al. Avaliação da viabilidade de aplicação da técnica de atenuação natural monitorada em solos contaminados por óleo diesel. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 9, n. 3, p. 150-172, 2020.

SANTOS BITTENCOURT, Simone. **Síntese e caracterização de novos surfactantes não-iônicos para catálise micelar: nanorreatores a partir do cardanol e glicerol**. 2021.

SHAH, Muhammad Raza; IMRAN, Muhammad; ULLAH, Shafi. **Lipid-based nanocarriers for drug delivery and diagnosis**. William Andrew, 117-137, 2017.

SHARMA, Harsh P.; PATEL, Hiral; SUGANDHA. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices—A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1215-1227, 2017.

SANTOS, Kátia Solange Cardoso Rodrigues et al. **Desenvolvimento de microemulsão de Minoxidil para tratamento da alopecia**. Universidade Federal do Amazonas, 2016.

SILVA, Mariana Inêz Gregorio et al. Nutritional composition and antioxidant potential of Chaya leaves (*Cnidoscolus aconitifolius*) in different cooking methods. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e0411830212-e0411830212, 2022.

SINGH, Yuvraj et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SLOMKOWSKI, Stanislaw et al. Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 2229-2259, 2011.

SOUTO, Eliana B. et al. Microemulsions and nanoemulsions in skin drug delivery. **Bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 158, 2022.

SUCUPIRA, Natália Rocha et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

THAKUR, Ajay; WALIA, Manpreet Kaur; KUMAR, S. L. Nanoemulsion in enhancement of bioavailability of poorly soluble drugs: a review. **Pharmacophore**, v. 4, n. 1, p. 15-25, 2013.

TOLEDO, Caroline Diodato et al. Revisitação dos Métodos de Extração de Pigmentos do Urucum. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 16, n. 16, p. 24-29, 2021.

WANI, Touseef A. et al. Safety of nanoemulsions and their regulatory status. In: Nanoemulsions. **Academic Press**, 2018. p. 613-628.

ZHANG, J. **Novel Emulsion-Based Delivery Systems**, Faculty of The Graduate School of the University of Minnesota. Master Thesis, 2011.

ZAMBIAZI, Rui Carlos. **Análise físico-química de alimentos**. Pelotas: Editora Universitária da Universidade Federal de Pelotas, 2010.

ZIMMER, Tailise Beatriz Roll; MENDONÇA, Carla Rosane Barboza; ZAMBIAZI, Rui Carlos. Methods of protection and application of carotenoids in foods-A bibliographic review. **Food Bioscience**, v. 48, p. 101829, 2022.

7. Material suplementar

Tabela 5. Atividade antioxidante e conteúdo de carotenoides nas microemulsões de carotenoides em suco de maçã clarificado, durante quatro semanas de armazenamento refrigerado a 4 °C.

Amostra	Parâmetros	Armazenamento (média ± desvio padrão)			
		1º semana	2º semana	3º semana	4º semana
MCT	ABTS	91,43 ± 0,3 ^{abA}	54,29 ± 0,05 ^{ab}	44,88 ± 1,92 ^{abC}	19,24 ± 0,05 ^{bc}
	DPPH	11,72 ± 1,3 ^{aA}	7,98 ± 1,8 ^{ab}	2,70 ± 0,7 ^{abC}	0,91 ± 0,3 ^{bcU}
	CT	3,13 ± 0,05 ^{dA}	3,16 ± 0,2 ^{bA}	2,76 ± 0,07 ^{ab}	2,36 ± 0,02 ^{bc}
MCTM	ABTS	91,29 ± 0,2 ^{bA}	44,60 ± 1,82 ^{cb}	42,58 ± 0,86 ^{abB}	20,46 ± 1,82 ^{bc}
	DPPH	11,83 ± 0,7 ^{aA}	8,82 ± 0,8 ^{ab}	3,44 ± 0,2 ^{aC}	2,08 ± 0,4 ^{aC}
	CT	4,11 ± 0,19 ^{bA}	3,67 ± 0,65 ^{aA}	2,88 ± 0,05 ^{ab}	2,61 ± 0,05 ^{ab}
MUT	ABTS	90,82 ± 0,07 ^{bA}	50,76 ± 2,4 ^{bb}	40,65 ± 0,37 ^{bc}	16,42 ± 2,4 ^{cd}
	DPPH	11,69 ± 0,9 ^{aA}	4,83 ± 0,5 ^{bb}	0,71 ± 0,5 ^{bc}	0,64 ± 0,3 ^{cc}
	CT	3,68 ± 0,05 ^{cA}	2,22 ± 0,13 ^{cb}	1,58 ± 0,17 ^{cc}	1,14 ± 0,1 ^{dd}
MUTM	ABTS	92,28 ± 0,4 ^{aA}	46,98 ± 0,8 ^{cb}	43,17 ± 0,85 ^{abC}	23,64 ± 0,8 ^{ad}
	DPPH	11,61 ± 0,5 ^{aA}	4,94 ± 0,9 ^{bb}	3,29 ± 0,4 ^{abC}	1,73 ± 0,3 ^{abC}
	CT	4,59 ± 0,03 ^{aA}	3,64 ± 0,3 ^{ab}	2,29 ± 0,08 ^{bc}	2,02 ± 0,01 ^{cd}
P	ABTS	89,55 ± 0,5 ^{cA}	36,13 ± 1,4 ^{db}	31,96 ± 0,9 ^{cc}	10,73 ± 1,4 ^{dd}
	DPPH	9,16 ± 0,2 ^{bA}	0,47 ± 0,16 ^{cb}	ND	ND
	CT	0,29 ± 0,05 ^{eA}	0,29 ± 0,03 ^{cA}	0,22 ± 0,03 ^{dAB}	0,18 ± 0,1 ^{eB}

MCT: Microemulsão com β-caroteno- Tween 20; MCTM: Microemulsão com β-caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20; MUTM: Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos; P: Padrão: Suco comercial de maçã clarificado. ABTS e DPPH (% de inibição); CT (Carotenoides totais-μg/g de β-caroteno). As médias foram comparadas por ANOVA, usando o teste de Tukey ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, para o mesmo tipo de determinação, e médias de mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente. ND-Não detectado.

5. Capítulo 3 - Carotenoides microemulsionados em suco clarificado de maçã: estabilidade microbiológica e avaliação sensorial.

Resumo

O suco de frutas vem se destacando em termos de consumo devido à demanda crescente de mercado por produtos naturais e ricos em nutrientes. Com base nisso, formulações de suco clarificado de maçã com carotenoides microemulsionados foram desenvolvidas e vêm sendo estudadas pelo presente grupo de pesquisa. Sabe-se que a qualidade microbiológica e a aceitação sensorial são necessárias para compreender o comportamento microbiológico do produto durante seu armazenamento e a influência dos diferentes atributos sensoriais na aceitação pelos consumidores. Assim, objetivou-se com este trabalho enriquecer suco de maçã clarificado com carotenoides na forma de microemulsões e avaliar o produto por meio de análises sensoriais, bem como a estabilidade microbiológica. Para a avaliação microbiológica foi realizada a contagem total de fungos e de bactérias ácido lácticas (BAL), e na avaliação sensorial foram realizados os testes de preferência, aceitação, ordenação, intenção de compra, além do teste de dominância temporal das sensações (TDS). Para a avaliação microbiológica foram utilizadas amostras de suco com β -caroteno e urucum microemulsionados, empregando Tween 20 e a de combinação de Tween 20 e monoglicerídeos como emulsificantes. Já na análise sensorial foram formuladas amostras de suco com β -caroteno e urucum microemulsionados, utilizando apenas Tween 20, porém em diferentes porcentagens (0,03%, 0,05%, 0,09%, 0,19%). A amostra de suco de maçã clarificado com microemulsão de β -caroteno e Tween 20 (MCT) apresentou pequeno desenvolvimento fúngico no tempo zero ($1 \log.UFC.mL^{-1}$) e no tempo 21 dias de estocagem ($1,99 \log.UFC.mL^{-1}$). Não foi observado desenvolvimento de bactérias ácido lácticas em até 14 dias de armazenamento refrigerado a $4^{\circ}C$. As formulações elaboradas com menor porcentagem de Tween 20 na composição foram as mais aceitas pelos avaliadores (0,03% e 0,05%). A maçã foi o descritor mais perceptível no teste de dominância temporal das sensações (TDS). Os resultados indicaram a preferência pelas formulações com menor porcentagem de Tween 20, independentemente do tipo de carotenoide utilizado, e a tendência de compra foi superior para a amostra de suco clarificado de maçã adicionada de urucum na forma de microemulsão (MUT).

Palavras-chave: Urucum; β -caroteno; fungos; BAL; aceitação sensorial, preferência sensorial; TDS.

1. Introdução

O suco clarificado consiste num produto obtido da extração da fruta, totalmente natural, sem conservantes e sem adição de açúcar ou adoçante. O produto se apresenta como um líquido claro, límpido, brilhante e o gosto doce da fruta (SAINZ et al., 2015; JANZANTTI et al., 2003). Por ser uma bebida

saudável, o suco de maçã armazena nutrientes, minerais e micronutrientes e pode ser rapidamente absorvido pelo corpo humano (CAI et al., 2020). O suco clarificado de maçã apresenta sabor único, além disso, os consumidores preocupados com uma alimentação saudável têm preferido sucos integrais, geralmente ricos em compostos bioativos (CAI et al., 2020; XU et al., 2022).

Os compostos bioativos são moléculas extranutricionais encontradas naturalmente nos alimentos de origem vegetal e animal e, quando ingeridos em quantidades significativas, sugerem diversos benefícios à saúde humana. Na classe dos compostos bioativos, o subgrupo dos carotenoides representa um amplo e numeroso grupo de fitoquímicos, os quais apresentam uma estrutura complexa, com característica lipofílica (CARNAÚBA, 2019).

No entanto, vários fatores limitam incorporar carotenoides em muitos alimentos e bebidas, devido a sua baixa solubilidade em água e alta hidrofobicidade, alto ponto de fusão e alta suscetibilidade à degradação química (QIAN et al., 2012; CHAARI et al., 2018).

A inclusão de carotenoides em bebidas não alcoólicas pode ser viabilizada sob a forma de microemulsão, que além de ampliar a solubilidade, paralelamente, pode favorecer a redução ou prevenção da degradação desses compostos. As microemulsões estão se tornando cada vez mais promissoras na indústria de alimentos, devido a algumas vantagens como da maior estabilidade e transparência óptica (SAIFULLAH et al., 2016).

Microemulsão é um sistema formado por óleo, água e um ou mais tensoativos, opticamente transparente e termodinamicamente estável. A transparência óptica das microemulsões é decorrente da microestrutura da fase dispersa, a qual apresenta dimensões abaixo de 100 nm (TARTARO et al., 2020). Assim, o tamanho das gotículas em uma microemulsão é um fator importante e também está relacionado à sua estabilidade. A alta capacidade de solubilização e estabilização das substâncias incorporadas, está relacionada a baixa tensão interfacial destes sistemas (FASOLIN et al., 2012; MCCLEMENTS, 2011). A capacidade de solubilizar simultaneamente compostos funcionais de diferentes polaridades tornam as microemulsões aplicáveis para o preparo de formulações alimentares enriquecidas (SHAH, 2018).

Em estudo realizado pelo grupo de pesquisa (Capítulo 2) foi possível microemulsionar carotenoides em suco clarificado de maçã utilizando diferentes tensoativos (monoglicerídeos e Tween 20). Contudo, a estabilidade microbiológica e sensorial destes sistemas não foi avaliada. Assim, identificar as possíveis alterações, é relevante para definir o prazo de validade e a aceitabilidade do produto pelos consumidores.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo enriquecer suco de maçã clarificado com carotenoides (β -caroteno e urucum) na forma de microemulsões utilizando os emulsificantes Tween 20 e monoglicerídeos; avaliar o produto microemulsionado com Tween 20 por análises sensoriais; bem como avaliar a estabilidade microbiológica das amostras microemulsionadas com Tween 20 e monoglicerídeos.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Foram utilizados urucum adquirido no comércio local (Pelotas/RS/Brasil), β -caroteno de padrão analítico (Sigma Aldrich/Alemanha), Tween 20-polioxietileno sorbitano monolaurato (Sigma Aldrich/Alemanha), Tween 80-monooleato de sorbitan etoxilado 20 EO (Sigma Aldrich/Alemanha), Monoglicerídeo da síntese do óleo de linhaça (Hobuss et al., 2020), álcool etílico P.A. (Dinâmica/Brasil), suco clarificado de maçã comercial, BDA- ágar batata dextrose (Kasvi/Espanha), MRS- ágar Mrs. lactobacillus (Kasvi/Espanha), placa de Petri estéril 60 × 15 mm (J. Prolab/ Brasil); além dos demais reagentes e padrões usados para análises, todos de pureza analítica.

2.2. Métodos

2.2.1. Formulações das amostras de suco clarificado de maçã microemulsionado com carotenoides.

2.2.1.1. Amostra destinada para a análise microbiológica

Foram obtidos quatro amostras de sucos microemulsionados (Tabela 1). Primeiramente, pesou-se em balança analítica as amostras de carotenoides e adicionou-se o álcool etílico para solubilização do pigmento. Após, foi pesado e adicionado o Tween 20/ monoglicerídeos, e sob agitação magnética procedeu-

se a homogeneização simples (apenas para a mistura dos componentes). Logo após a mistura dos componentes, a bebida (suco) foi adicionada na mistura, mantendo-se a agitação magnética até a obtenção de um sistema opticamente transparente e translúcido, indicando a formação da microemulsão.

Tabela 1. Formulação de suco de maçã clarificado com carotenoides microemulsionados submetidas à avaliação microbiológica.

Amostras	Carotenoides (%)	Álcool etílico (%)	Emulsificantes		Suco de maçã (% m/v)
			Monoglicerídeos (%)	Tween 20 (%)	
MCT	0,01	1	-	0,19	98,80
MCTM	0,01	1	0,27	1,62	97,10
MUT	0,07	1	-	0,19	98,74
MUTM	0,07	1	0,27	1,62	97,04

MCT (Microemulsão com β -caroteno-Tween 20); MCTM (Microemulsão com β -caroteno-Tween 20 e Monoglicerídeos); MUT (Microemulsão com urucum- Tween 20); MUTM (Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos).

2.2.1.2. Amostra destinada para a análise sensorial

Foram obtidos oito amostras de sucos microemulsionados (Tabela 2). Primeiramente, pesou-se em balança analítica as amostras de carotenoides e adicionou-se o álcool etílico para solubilização do pigmento. Após, foi pesado e adicionado o Tween 20 em diferentes porcentagens (0,03%; 0,05%; 0,09% e 0,19%), e sob agitação magnética procedeu-se a homogeneização simples (apenas para a mistura dos componentes). Logo após a mistura dos componentes, a bebida (suco) foi adicionada na mistura, mantendo-se a agitação magnética até a obtenção de um sistema opticamente transparente e translúcido, indicando a formação da microemulsão.

Tabela 2. Formulações do suco de maçã clarificado com carotenoides microemulsionados submetidas à análise sensorial.

Amostra	Carotenoides (%)	Álcool etílico (%)	Tween 20 (%)	Suco de maçã (% m/v)
MC + 0,19T	0,01	1	0,19	98,80
MC + 0,09T	0,01	1	0,09	98,90
MC + 0,05T	0,01	1	0,05	98,94
MC + 0,03T	0,01	1	0,03	98,96
MU + 0,19T	0,07	1	0,19	98,74
MU + 0,09T	0,07	1	0,09	98,84
MU + 0,05T	0,07	1	0,05	98,88
MU + 0,03T	0,07	1	0,03	98,90

MC (Microemulsão com β -caroteno); MU (Microemulsão com urucum); T (Tween 20).

2.2.2. Análise microbiológica

A fim de avaliar o desenvolvimento fúngico no suco com carotenoides microemulsionados (Tabela 1) ao longo do armazenamento, foi realizada a contagem total de fungos segundo metodologia descrita por STAREK et al.(2021), com algumas modificações. Placas de Petri com BDA foram preparadas conforme a indicação do fabricante, adicionadas de 100 μ l do suco desenvolvido no centro da placa para posterior espalhamento total da amostra e incubação a 25 °C por 5 dias no período de 0, 7, 14 e 21 dias de estocagem. Para o controle, foram utilizadas placas de BDA sem a adição do suco.

Para a contagem total de bactérias ácido lácticas (BAL), utilizaram-se placas de Petri com MRS, preparadas conforme a indicação do fabricante, adicionadas de 100 μ l do suco no centro da placa, para posterior espalhamento total da amostra e incubação a 35 °C por 3 dias. As avaliações ocorreram no período de 0, 7, 14 e 21 dias de estocagem. Para o controle, foram utilizadas placas de MRS sem a adição do suco.

2.2.3. Análise sensorial

Para a análise sensorial foram desenvolvidas oito formulações de sucos contendo carotenoides microemulsionados, sendo: quatro formulações com microemulsão de β -caroteno e quatro formulações com microemulsão de

urucum (Tabela 2). Nas formulações foram alteradas a quantidade de Tween 20, e os testes sensoriais foram realizados em dias distintos e separados por amostra (MCT- Suco clarificado de maçã microemulsionado com β -caroteno e Tween 20; MUT- Suco clarificado de maçã microemulsionado com urucum e Tween 20) devido à quantidade de formulações. Cabe ressaltar, que as porcentagens dos constituintes na formulação de cada suco não interferiram na estabilidade da microemulsão, e as amostras elaboradas com monoglicerídeos obtidos de síntese do óleo de linhaça (HOBUSS et al., 2020) não foram utilizadas para a avaliação sensorial, pois, não foi avaliado a garantia de inocuidade do produto para o consumo humano.

A avaliação sensorial da bebida desenvolvida foi conduzida no Laboratório de Análise Sensorial do CCQFA/UFPel, para identificar a impressão dos consumidores. Foram realizados os testes de preferência e aceitação, juntamente com um estudo de consumo, através da aplicação de um questionário (Anexos) contendo o teste afetivo, quantitativo e de aceitação, com escala hedônica e teste de ordenação, além do teste da intenção de compra (GULARTE, 2009).

As amostras de sucos microemulsionados foram codificadas com três dígitos aleatórios foram fornecidas em copos descartáveis de 50 mL em temperatura ambiente. Todos os testes foram realizados em cabines individuais, com luz branca, isentas de ruídos e odores, em horário distante das principais refeições. Foi solicitado aos julgadores que expressassem sua preferência pelas amostras, ordenando-as da mais preferida (1) a menos preferida (3). A aceitação foi avaliada para os atributos (aparência, cor, sabor, acidez, impressão global e índice de aceitação) por meio de escala hedônica de 9 pontos, na qual os extremos correspondiam aos termos (1) “desgostei extremamente” e (9) “gostei extremamente”. Na pesquisa da intenção de compra utilizou-se uma escala de 3 pontos, com as descrições “provavelmente compraria”, “talvez compraria” e “não compraria” (GULARTE et al., 2019). O índice de aceitação (I.A) foi calculado conforme a equação 1, com base nos dados obtidos para a impressão global.

$$I. A = \frac{A}{B} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Em que:

A = nota média obtida para o produto (impressão global);

B = nota máxima da escala utilizada.

O teste de dominância temporal das sensações (TDS) foi realizado conforme a metodologia de PINEAU (2009). O teste foi realizado em cabines individualizadas e contou com a participação de avaliadores selecionados com base em suas aptidões sensoriais. As amostras foram apresentadas em recipientes descartáveis, codificados com três dígitos aleatórios, contendo 15 mL de suco. Na análise, os avaliadores foram solicitados a escolher a sensação dominante durante o tempo de ingestão, considerando como dominante a sensação percebida com maior clareza e intensidade, a partir de uma lista predefinida (doce, ácido, maçã, adstringente, amargo, remédio, artificial e cor não característica). O tempo de duração de 30 segundos foi estabelecido para analisar cada amostra utilizando o software SensoMaker. Foram construídas curvas com nível de significância de 5%.

As análises foram realizadas com a aprovação do Comitê de Ética da FAMED/UFPel, Parecer Consubstanciado do CEP — n.º 5.978.662.

3. Análise estatística

As determinações foram realizadas em triplicata, com os resultados expressos em médias \pm desvio padrão, sendo estes submetidos à análise de variância (ANOVA), e os tratamentos comparados pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

4. Resultados e discussão

4.1. Avaliação microbiológica

Foram realizadas análises de fungos e de bactérias ácido lácticas (BAL) no suco microemulsionado com β -caroteno e urucum e no suco comercial padrão (Tabela 1). A deterioração de sucos de frutas está associada aos microrganismos tolerantes ao meio ácido (pH 3,0 a 4,0), com predomínio de bactérias lácticas e fungos (CONTI, 2013; KREUTZ, 2021).

Segundo SOURRI et al. (2022), as leveduras são os microrganismos de deterioração predominantes em sucos de fruta devido sua alta tolerância a meios ácidos e preferência por condições anaeróbicas, combinado com o alto teor de açúcar e a temperatura de refrigeração, a qual são submetidos.

Tabela 3. Contagem total de fungos nos sucos de maçã clarificados com carotenoides microemulsionados, durante o armazenamento refrigerado por 21 dias.

Amostras	Tempo de armazenamento (Dias)			
	T0	T7	T14	T21
P	1,60 ± 0,3 ^{bA}	2,15 ± 0,5 ^{bC}	6,00 ± 0,0 ^{aA}	6,00 ± 0,0 ^{aA}
MCT	1,00 ± 0,9 ^{abA}	0,00 ± 0,0 ^{bD}	0,00 ± 0,0 ^{bB}	1,99 ± 0,1 ^{aB}
MCTM	0,87 ± 0,8 ^{cA}	2,84 ± 0,0 ^{bAB}	6,00 ± 0,0 ^{aA}	6,00 ± 0,0 ^{aA}
MUT	1,43 ± 0,4 ^{cA}	2,19 ± 0,1 ^{bBC}	6,00 ± 0,0 ^{aA}	6,00 ± 0,0 ^{aA}
MUTM	1,74 ± 0,2 ^{cA}	2,96 ± 0,2 ^{bA}	6,00 ± 0,0 ^{aA}	6,00 ± 0,0 ^{aA}

MCT: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20; MCTM: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20; MUTM: Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos; P: Padrão- Suco comercial de maçã clarificado. As médias foram comparadas por ANOVA, usando o teste de Tukey ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente. Os resultados foram expressos em média ($\log.UFC.mL^{-1}$) \pm desvio padrão.

Pode-se observar pelos dados que todas as amostras apresentaram maior desenvolvimento fúngico em 21 dias de armazenamento refrigerado, com exceção da amostra MCT (suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado e Tween 20) que apresentou a menor média com 1,99 $\log.UFC.mL^{-1}$. A amostra MCT (suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado e Tween 20) apresentou desenvolvimento fúngico nos tempos 0 e 21 dias de armazenamento; no entanto, nos tempos 7 e 14 dias de armazenamento não houve desenvolvimento fúngico. Uma possível contaminação ambiental no tempo zero pode ter ocasionado o crescimento fúngico, uma vez que, esse comportamento não se repete no tempo 7 e 14 dias de estocagem. As demais amostras apresentaram colônias já na primeira semana de estocagem.

Não houve diferença significativa do crescimento fúngico entre as amostras no tempo zero. No tempo 7, as amostras MCTM (suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado- Tween 20 e monoglicerídeos) e MUTM (suco

clarificado de maçã com urucum microemulsionado- Tween 20 e monoglicerídeos) apresentaram maior desenvolvimento fúngico; e na amostra MCT (suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado- Tween 20) não foi observado crescimento fúngico. Nos tempos 14 e 21 dias, com exceção da amostra MCT (suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado- Tween 20), as demais amostras apresentaram expressivo desenvolvimento fúngico.

O comportamento da amostra MCT (suco clarificado de maçã microemulsionado com β -caroteno- Tween 20) pode ser justificado pela ação detergente dos tensoativos, podendo ter agido sobre a parede celular do microrganismo causando a destruição do mesmo (SILVA et al., 2015). No entanto, não foi observado o mesmo comportamento para as demais amostras de suco microemulsionadas, pois, a presença do urucum e a do monoglicerídeo pode ter influenciado no crescimento fúngico devido a possível contaminação.

Tabela 4. Contagem total de bactérias ácido lácticas nos sucos de maçã clarificados com carotenoides microemulsionados, durante o armazenamento refrigerado por 21 dias.

Amostras	Tempo de armazenamento (Dias)			
	T0	T7	T14	T21
P	ND	ND	ND	6,00 \pm 0,0 ^A
MCT	ND	ND	ND	ND
MCTM	ND	ND	ND	6,00 \pm 0,0 ^A
MUT	ND	ND	ND	6,00 \pm 0,0 ^A
MUTM	ND	ND	ND	6,00 \pm 0,0 ^A

MCT: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20; MCTM: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20 e Monoglicerídeos; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20; MUTM: Microemulsão com urucum- Tween 20 e Monoglicerídeos; P: Padrão- Suco comercial de maçã clarificado. As médias foram comparadas por ANOVA, usando o teste de Tukey ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente. ND-Não detectado. Os resultados foram expressos em média ($\log.UFC.mL^{-1}$) \pm desvio padrão.

Não foi observado desenvolvimento de BAL até os 14 dias de estocagem sob refrigeração (Tabela 4), possivelmente, devido ao processo térmico aplicado no suco comercial (P) utilizado neste estudo. Cabe salientar, que o suco comercial utilizado, após aberto, tem sua validade limitada a poucos dias sob refrigeração.

Foi verificado o desenvolvimento de BAL nas amostras P (suco clarificado de maçã comercial), MUT (suco clarificado de maçã com urucum microemulsionado-Tween 20), MCTM (suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado-Tween 20 e monoglicerídeos) e MUTM (suco clarificado de maçã com urucum microemulsionado-Tween 20 e monoglicerídeos) somente aos 21 dias de armazenamento refrigerado. O crescimento fúngico expressivo aos 21 dias de armazenamento refrigerado (dados na Tabela 3) pode ter aumentado o pH das amostras de sucos, permitindo o desenvolvimento das bactérias lácticas.

A amostra MCT (suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado-Tween 20) destacou-se em relação as demais amostras de suco por impedir o crescimento de bactérias ácido lácticas (Bal) ao longo dos 21 dias de armazenamento refrigerado. Este comportamento pode ser justificado pela possível ação do tensoativo (Tween 20) e do carotenoide (β -caroteno) utilizado, visto que, há relatos na literatura da ação antimicrobiana de ambos componentes.

As bactérias ácido lácticas (BAL) também são associadas à deterioração em sucos de frutas, com produção de alguns ácidos, etanol e dióxido de carbono, conferindo sabor semelhante ao leite no suco; no entanto, a deterioração de sucos por bactérias lácticas pode ser evitada pelo tratamento térmico, procedimento de conservação realizado durante o envase na maioria de sucos comerciais (CONTI, 2013; SOURRI et al., 2022).

4.2. Avaliação sensorial

A avaliação contou com a participação de 54 julgadores não treinados, de ambos os sexos, pertencentes à comunidade acadêmica da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Sendo, 77% do sexo feminino. Destes, 69% tinham idade entre 20 – 29 anos e 53% possuíam graduação incompleta. Em relação ao consumo de suco clarificado, 48% dos avaliadores reportaram que consomem o suco pelo menos uma vez por semana e 52% relataram não consumir ou nunca consumiram pelo fato de desconhecerem o produto e/ou ser difícil de encontrar nos supermercados, ou ainda, preferem consumir suco natural (*in natura*). Foi também questionado aos avaliadores sobre “gostar ou

não gostar” de maçã, sendo que 95% afirmam gostar da fruta, destes, 41% costumam consumir uma vez por semana e 36% relatam consumir de duas a três vezes por semana.

Os resultados obtidos para os atributos avaliados nas oito amostras de suco microemulsionadas (Tabela 2) podem ser observada na Tabela 5 (MC-suco clarificado de maçã com β -caroteno e Tween 20) e Tabela 6 (UM-suco clarificado de maçã com urucum e Tween 20).

Entre as amostras de suco clarificado de maçã microemulsionado com β -caroteno (Tabela 5), não houve diferença significativa quanto a “aparência” e “cor”, sendo os escores médios enquadrados na descrição “gostei ligeiramente” da escala hedônica. As amostras com 0,05% (MC + 0,05T) e com 0,03% de Tween 20 (MC + 0,03T) destacaram-se em relação as demais em todos os atributos, sendo classificadas na designação “gostei ligeiramente” da escala; com ressalva da amostra com 0,05% de Tween 20 (MC + 0,05T), que obteve média 7, quanto a “cor” e “impressão global”, e, portanto, classificada na descrição “gostei moderadamente”.

Tabela 5. Escores médios dos atributos sensoriais avaliados para as amostras do suco de maçã clarificado com β -caroteno microemulsionado.

Atributos	Amostras			
	MC + 0,19T*	MC + 0,09T*	MC + 0,05T*	MC + 0,03T*
Aparência	6,72 \pm 1,9 ^a	6,76 \pm 1,8 ^a	6,98 \pm 1,5 ^a	6,88 \pm 1,7 ^a
Cor	6,68 \pm 1,6 ^a	6,76 \pm 1,8 ^a	6,92 \pm 1,6 ^a	6,70 \pm 1,8 ^a
Sabor	4,44 \pm 2,2 ^c	5,70 \pm 2,0 ^b	7,18 \pm 1,6 ^a	6,72 \pm 1,8 ^a
Acidez	4,66 \pm 2,2 ^c	5,74 \pm 1,9 ^b	6,98 \pm 1,5 ^a	6,65 \pm 1,7 ^{ab}
Impressão Global	4,91 \pm 2,0 ^b	5,79 \pm 2,0 ^b	7,22 \pm 1,5 ^a	6,74 \pm 1,7 ^a
Índice de Aceitação (%)	54,5	64,4	80,2	74,9

MC (Microemulsão com β -caroteno); T (Tween 20). As médias foram comparadas por ANOVA, usando o teste de Tukey ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente. *Valor corresponde ao % de Tween 20 na amostra. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

Nas amostras de suco clarificado de maçã com urucum microemulsionado (Tabela 6), não houve diferença significativa da “cor” em função dos diferentes conteúdos de tensoativos, sendo o escore médio enquadrado na descrição “gostei ligeiramente” da escala hedônica, para todas as amostras. As duas amostras com menores teores de Tween 20 (MU + 0,05T e MU + 0,03T) se destacaram em relação as demais, enquadradas na designação “gostei

ligeiramente” para a maioria dos atributos, com ressalva para o atributo “aparência” (“gostei moderadamente”) na formulação com 0,05% de Tween (MU + 0,05T).

Tabela 6. Escores médios dos atributos sensoriais avaliados para as amostras do suco de maçã clarificado microemulsionado com urucum.

Atributos	Amostras			
	MU + 0,19T*	MU + 0,09T*	MU + 0,05T*	MU + 0,03T*
Aparência	6,13 ± 2,6 ^b	6,79 ± 1,6 ^{ab}	7,05 ± 1,4 ^a	6,64 ± 1,5 ^{ab}
Cor	5,87 ± 2,5 ^a	6,77 ± 1,6 ^a	6,81 ± 1,5 ^a	6,30 ± 1,7 ^a
Sabor	6,62 ± 2,1 ^b	5,43 ± 2,2 ^c	6,75 ± 1,8 ^a	6,87 ± 1,3 ^a
Acidez	3,67 ± 2,2 ^c	5,39 ± 2,0 ^b	6,64 ± 1,7 ^a	6,77 ± 1,8 ^a
Impressão Global	3,68 ± 2,0 ^c	5,90 ± 1,9 ^b	6,98 ± 1,6 ^a	6,96 ± 1,3 ^a
Índice de Aceitação (%)	40,8	65,6	77,6	77,4

MU (Microemulsão com urucum); T (Tween 20). As médias foram comparadas por ANOVA, usando o teste de Tukey ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente. *Valor corresponde ao % de Tween 20 na amostra. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

O índice de aceitação (I.A) deve atingir o mínimo de 70%, para os produtos serem considerados aceitos. As amostras microemulsionadas com β -caroteno e com 0,05% e 0,03% de Tween 20 (MC + 0,05T e MC + 0,03T) (Tabela 5); e as amostras microemulsionadas com urucum e com 0,05% e 0,03% de Tween 20 (MU + 0,05T e MU + 0,03T) (Tabela 6), apresentaram 80,2% e 75,0%; 77,6% e 77,4%, respectivamente, da aceitabilidade, indicando um bom potencial mercadológico. Estas formulações apresentaram a menor porcentagem de tensoativo (Tween 20) em sua composição (Tabela 2). Verificou-se que a quantidade de tensoativo utilizada nas amostras não influenciou na cor e na aparência sensorial dos sucos desenvolvidos, contudo, nos demais atributos houve influência. Segundos MATOS et al., (2022) o Tween é conhecido por seu sabor adstringente, os autores avaliaram sensorialmente amostras de iogurte de coco contendo as nanoemulsões de vitamina D3 produzidas com óleo de castanha-do-pará, óleo de soja e Tween 80.

Na área de alimentos a análise sensorial é altamente importante por avaliar a aceitabilidade mercadológica e a qualidade do produto, de modo a atender desejos e a satisfação do consumidor (RICARTE et al., 2019). Além disso, a escala hedônica é um dos métodos mais empregados para avaliar a

aceitação de produtos, sendo parte crucial no processo de desenvolvimento ou melhoramento de produtos (OLIVEIRA et al., 2019).

Na Figura 1 (A, B, C, D e E) estão demonstradas a frequência de distribuição da escala hedônica para os atributos avaliados nas quatro amostras de suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionados (MC).

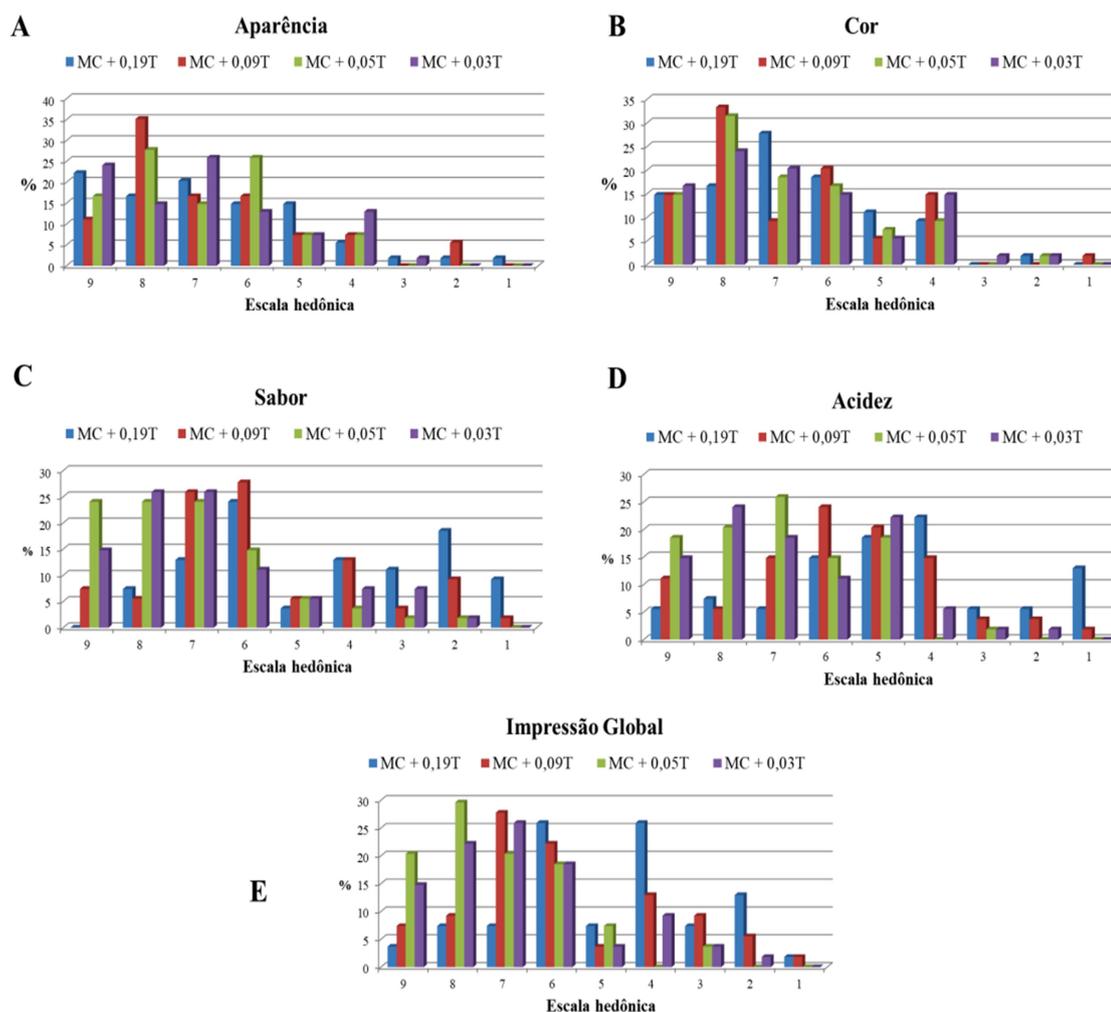


Figura 1. Histograma da frequência de distribuição da escala hedônica para os atributos avaliados nas quatro amostras de suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado (MC). Escala hedônica: 9 - Gostei extremamente; 8 - Gostei muito; 7 - Gostei moderadamente; 6 - Gostei ligeiramente; 5 - Indiferente; 4 - Desgostei ligeiramente; 3 - Desgostei moderadamente; 2 - Desgostei muito; 1 - Desgostei extremamente.

A amostra com 0,09% de Tween 20 (MC + 0,09T) se destacou quanto a “aparência” (Figura 1A), com 35% da frequência para a nota 8 “gostei muito”; já a amostra com 0,05% de Tween 20 (MC + 0,05T) apresentou em média 26%

das respostas com nota 8 “gostei muito” e 25% com nota 6 “gostei ligeiramente”, a mesma porcentagem obtida pela amostra com 0,03% de Tween 20 (MC + 0,03T).

Na Figura 1B, as amostras com 0,09% e 0,03% de Tween 20 (MC + 0,09T e MC + 0,05T) se destacaram quanto a “cor” com 33% e 31%, respectivamente, em média das respostas com nota 8 “gostei muito” e 27% das respostas com nota 7 “gostei moderadamente”, para a amostra com 0,19% de Tween 20 (MC + 0,19T). O “sabor” (Figura 1C) apresentou em média 27% de respostas na nota 6 “gostei ligeiramente” e 25%, na nota 7 “gostei moderadamente” para a amostra com 0,09% de Tween 20 (MC + 0,09T). No entanto, a amostra com 0,05% de Tween 20 (MC + 0,05T) apresentou em média 72% das avaliações com notas entre 7 a 9 entre as descrições “gostei moderadamente” a “gostei extremamente”; já a amostra com o menor teor de Tween 20, 0,03% (MC + 0,03T) também agradou os avaliadores, com 50% das avaliações para a nota 7 “gostei moderadamente” e 8 “gostei muito”.

Cabe destacar, que a amostra com o maior teor de Tween 20, 0,19% (MC + 0,19T) obteve em média 18% das avaliações com nota 2 “desgostei muito” e 9% nota 1 “desgostei extremamente” quanto ao “sabor”, indicando que a maior concentração de Tween 20 na amostra pode ter influenciado negativamente nesse atributo.

As amostras com 0,05% e 0,03% de Tween 20 (MC + 0,05T e MC + 0,03T) apresentaram boa aceitação quanto à “acidez” (Figura 1D), com 69% entre as descrições “gostei moderadamente” e “gostei muito”; por outro lado, a amostra com maior teor de Tween 20, 0,19% (MC + 0,19T) obteve em média 13% das avaliações na descrição “desgostei extremamente”. A impressão global (Figura 1E) indicou a amostra que no geral mais agradou os avaliadores. Com base na escala hedônica a amostra com 0,05% de Tween 20 (MC + 0,05T) apresentou em média 49% entre as descrições “gostei muito” e “gostei extremamente”, ao passo que, a amostra com o maior teor (0,19%) de Tween 20 (MC + 0,19T) foi a menos apreciada pelos avaliadores, com aproximadamente 13% de respostas na nota 2 “desgostei muito” e 25% na nota 4 “desgostei ligeiramente”.

Cabe salientar, que as microemulsões consistem na utilização de baixa energia para a formação espontânea de gotículas de óleo nos sistemas mistos

de óleo/água/tensoativo. Contudo, há uma desvantagem desse método que é a necessidade de utilização de maiores quantidades de tensoativos do que nos métodos de alta energia (emulsões e nanoemulsões). Dessa forma, pode-se alterar as características do produto onde as microemulsões são incorporadas. É possível que ocorram alterações sensoriais, como de textura, sabor ou mesmo torná-lo impróprio para consumo (KOMAIKO; Mc CLEMENTS, 2016).

Na Figura 2 (A, B, C, D e E), tem-se a frequência de distribuição da escala hedônica para os atributos avaliados nas quatro amostras de suco clarificado de maçã com urucum microemulsionado (MU).

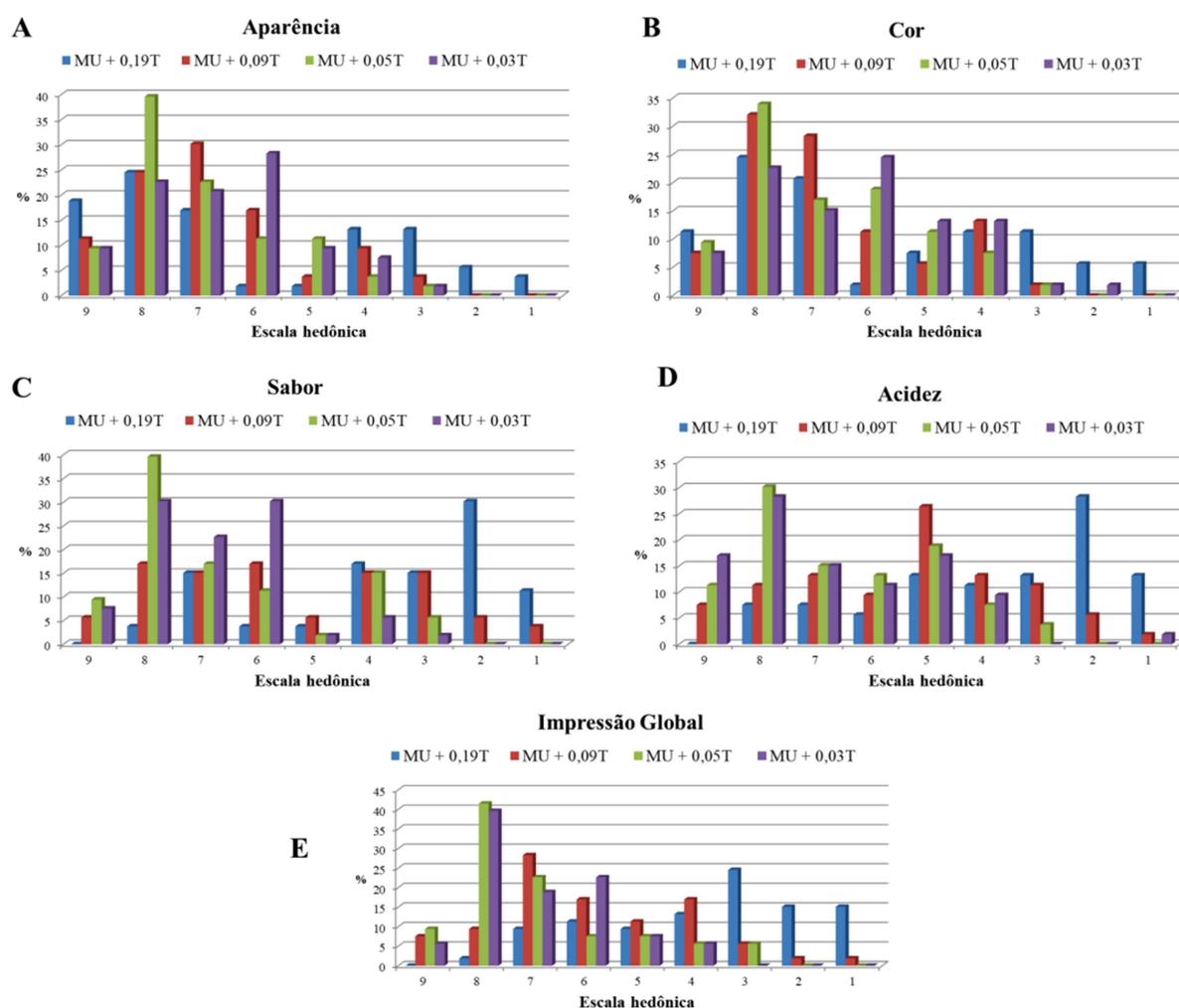


Figura 2. Histograma da frequência de distribuição da escala hedônica para os atributos avaliados nas quatro amostras de suco clarificado de maçã microemulsionado com urucum (MU). Escala hedônica: 9 - Gostei extremamente; 8 - Gostei muito; 7 - Gostei moderadamente; 6 - Gostei ligeiramente; 5 - Indiferente; 4 - Desgostei ligeiramente; 3 - Desgostei moderadamente; 2 - Desgostei muito; 1 - Desgostei extremamente.

A amostra com 0,05% de Tween 20 (MU + 0,05T) destacou-se em relação ao atributo “aparência” (Figura 2A) com 40% das avaliações para a nota 8 “gostei muito”, e as amostras com 0,09% e 0,03% de Tween 20 (MU + 0,09T e MU + 0,03T) também apresentaram boa frequência em notas altas, com média de 57% para a nota 7 “gostei moderadamente” e 6 “gostei ligeiramente”.

As amostras com 0,05%, 0,09% e 0,19% de Tween 20 (MU + 0,05T, MU + 0,09T e MU + 0,019T) apresentaram em média 89% da nota 8 “gostei muito” e 7 “gostei moderadamente”, e para as amostras com urucum de 0,03% e 0,05% de Tween 20 com nota 6 “gostei ligeiramente”, apresentaram média de 42% das avaliações quanto a cor (Figura 2B).

Na figura 2C, a amostra com 0,05% de Tween (MU + 0,05T) destacou-se com nota 8 “gostei muito” manifestada em 39% das avaliações; a amostra com o menor percentual de Tween 20, 0,03% (MU + 0,03T) obteve 60% das avaliações com nota 6 “gostei ligeiramente” e 8 “gostei muito”; e a amostra com o maior percentual de Tween 20, 0,19% (MU + 0,19T) foi a menos apreciada pelos avaliadores com nota 2 “desgostei muito”, com 30% das avaliações para o atributo “sabor”.

Em relação à acidez, a amostra com o maior percentual de Tween 20 (MU + 0,19T) obteve a menor nota, 2 “desgostei muito” (27% das respostas) e 1 “desgostei extremamente” (13% das respostas) (Figura 2D). Contudo, as amostras com 0,05% e 0,03% de Tween 20 (MU + 0,05T e MU + 0,03T) destacaram-se apresentando nota 8 “gostei muito” com 58% das avaliações.

Na impressão global (Figura 2E), assim como nas amostras de suco com β -caroteno (MC), as amostras de suco com urucum com 0,05% de Tween 20 (MU + 0,05T) e com 0,03% de Tween 20 (MU + 0,03T) destacaram-se, com 78% das avaliações com nota 8 “gostei muito”, e a amostra com o maior percentual de Tween 20 (MU + 0,19T) apresentou a menor impressão global, com 24% das avaliações com nota 3 “desgostei moderadamente”.

Analisando os dados da Figura 3, pode-se afirmar que houve diferença significativa em relação à preferência dos avaliadores pelas amostras. A mínima diferença significativa para a análise com 54 avaliadores não treinados, para 4 amostras, é de 35. Assim, todas as amostras que diferirem entre si por um valor maior ou igual a 35, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Conforme a tabela de *Newell e Mac Farlene* (GULARTE, 2009) o valor 1

corresponde a amostra mais preferida e o valor 4 a amostra menos preferida. Esses resultados são baseados na soma da preferência dos julgadores por cada amostra, logo, a soma de maior valor é considerada a menos preferida pelos avaliadores e a soma de menor valor a mais preferida pelos avaliadores.

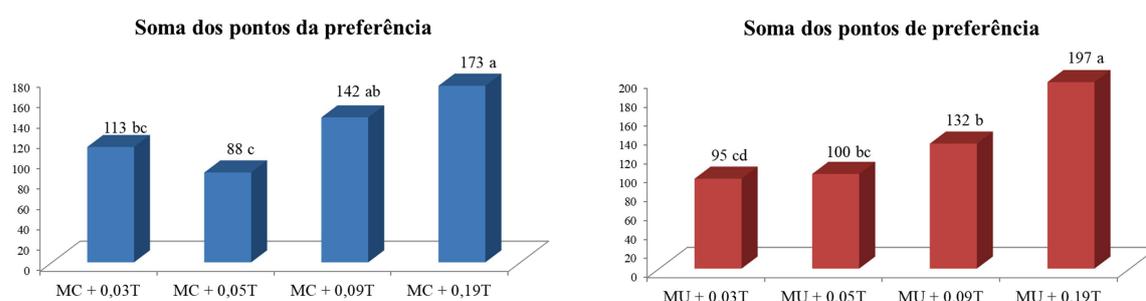


Figura 3. Histograma da soma dos pontos de preferência dos avaliadores para as quatro amostras de suco microemulsionado com β -caroteno (MC) e urucum (MU). Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$), conforme a tabela de Newell e Mac Farlane (1987). Valor 1 = mais preferida e valor 4 = menos preferida.

As amostras com o maior percentual de Tween 20 (MC + 0,19T e MU + 0,19T) foram consideradas pelos avaliadores como as menos preferidas, e, em contrapartida, as amostras com os menores percentuais de Tween 20 (MC + 0,05T e MU + 0,03T) foram as mais preferidas. De modo geral, percebeu-se que quanto menor o teor de Tween 20 para o desenvolvimento da microemulsão, melhores foram as características sensoriais avaliadas do suco.

A intenção de compra para as duas amostras de suco clarificado de maçã com carotenoides microemulsionados (MCT e MUT) pode ser verificado na Figura 4.

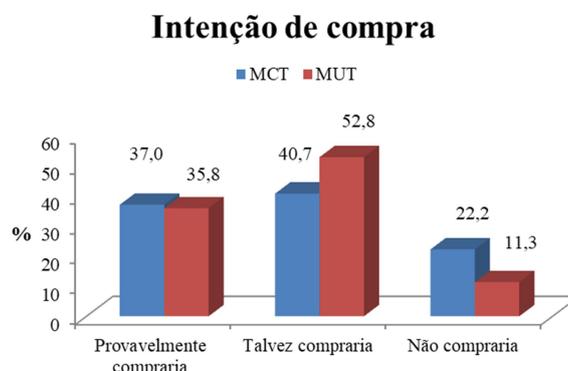


Figura 4. Histograma da intenção de compra para as amostras de suco clarificado de maçã com carotenoides microemulsionados. MCT: Microemulsão com β -caroteno- Tween 20; MUT: Microemulsão com urucum- Tween 20.

As avaliações indicaram que 52,8% dos consumidores responderam “talvez compraria”, para o suco com urucum microemulsionado (MUT), e 40,7% “talvez compraria” o suco clarificado de maçã com β -caroteno (MCT).

Os resultados indicam uma preferência para as amostras com menor porcentagem de Tween 20, e a tendência de compra para a amostra de suco clarificado de maçã microemulsionado com urucum (MUT), evidenciando que a quantidade de Tween 20 na amostra dos sucos influenciou no sabor. Quanto menor a quantidade do tensoativo (mínimo necessário para formar a microemulsão), melhor foi considerado o sabor do suco, além disso, pode-se afirmar que a inclusão do urucum microemulsionado no suco favoreceu a qualidade sensorial.

Este fato pode ser justificado porque o urucum é um corante natural amplamente utilizado pela indústria em formulações de alimentos, sendo um aromatizante amplamente utilizado na culinária para realçar a cor dos alimentos com uma leve tonalidade vermelha e um sabor almiscarado, além de ser fonte rica em carotenoides (HIRKO & GETU, 2022).

Os resultados do teste sensorial de dominância temporal das sensações (TDS) são demonstrados nas Figuras 5 e 6, em que cada curva representa a dominância de um determinado atributo com o decorrer do tempo. Um atributo é considerado significativamente dominante quando a curva correspondente está acima do limite de significância visível (tracejado *Sig. Level*) em cada gráfico. A linha de *chance* é a taxa de dominância que um atributo pode ter ao acaso.

O método TDS é considerado descritivo multi-atributo, rápido e eficaz, quando comparado com outros métodos descritivos convencionais utilizados para avaliar um conjunto de sensações induzidas por um determinado alimento (PEREIRA et al., 2021).

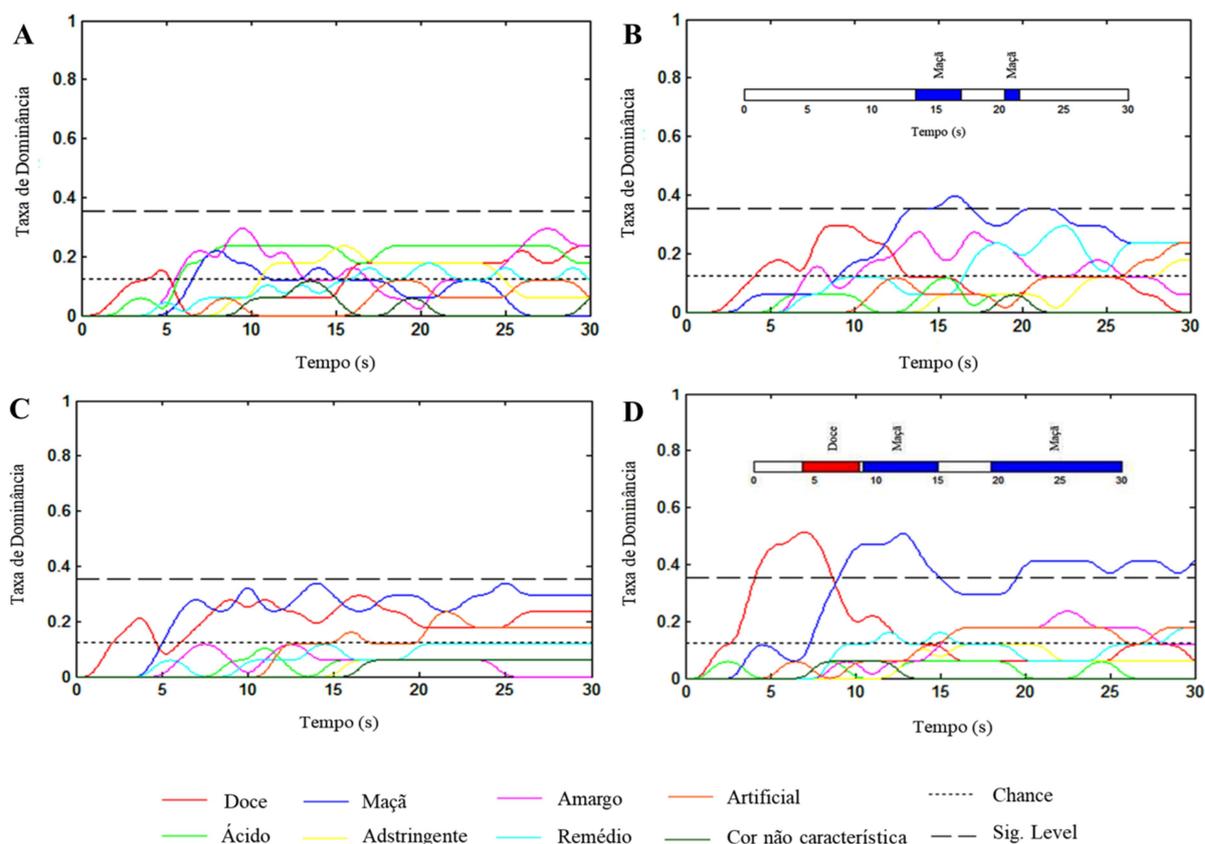


Figura 5. Dominância temporal das sensações no suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado. A: MC + 0,19T; B: MC + 0,09T; C: MC + 0,05T e D: MC + 0,03T. O valor numérico na codificação das amostras corresponde ao percentual de Tween 20.

Como observado nas Figuras 5A e 5C, as amostras com 0,19% e 0,05% (MC + 0,19T e MC + 0,05T) não apresentaram dominância nos descritores utilizados; entretanto, para a amostra com 0,09% de Tween 20 (MC + 0,09T) (Figura 5B) a sensação dominante foi a “maçã”, com taxa de dominância de 0.4, tempo de percepção 13 a 14 segundos (s) e depois 21 a 23 segundos (tempo de duração de 2s) com taxa de dominância sobre a linha (*Sig. Level*).

A amostra com o menor percentual de Tween 20 (MC + 0,03T) (Figura 5D) evidenciou dominância dos descritores “doce” com taxa de dominância 0.5 de 4 a 8 segundos com tempo de duração de 4s e “maçã” com taxa de dominância 0.5 de 8 a 15 segundos (tempo de duração de 7s) e depois com 19 a 30 segundos (tempo de duração 11s) com taxa de dominância de 0.4.

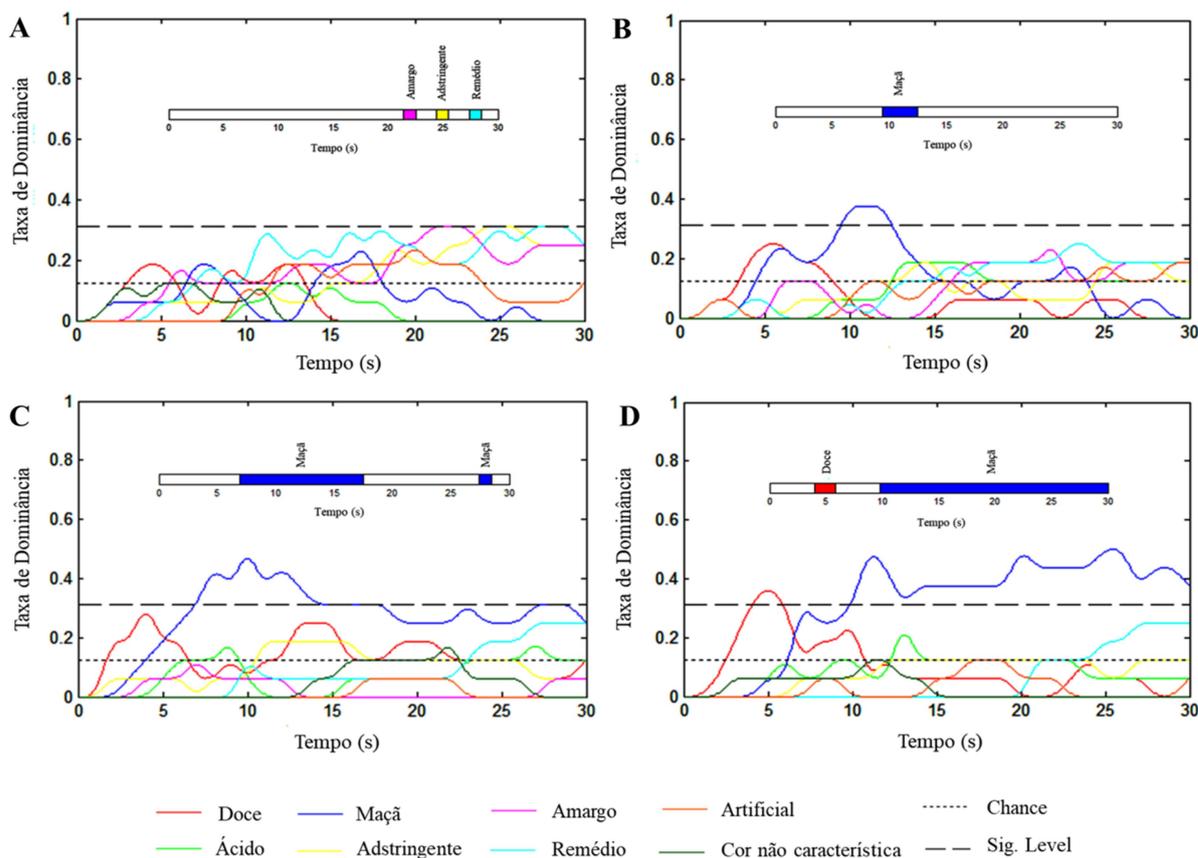


Figura 6. Dominância temporal das sensações no suco clarificado de maçã com urucum microemulsionado. A: MU + 0,19T; B: MU + 0,09T; C: MU + 0,05T e D: MU + 0,03T; o valor numérico na codificação das amostras corresponde ao percentual de Tween 20.

Comportamento oposto foi observado para as amostras contendo urucum (Figura 6A), onde a amostra com o maior percentual de Tween 20 (MU + 0,19T), evidenciou dominância de três descritores “amargo”, “adstringente” e “remédio” relacionados ao sabor, com taxa de dominância sobre a linha (Sig. Level) com tempo de duração de mais ou menos 2s para cada sensação. Esse comportamento pode ser justificado pela porcentagem de Tween 20 mais elevada nesta amostra. Para a amostra com 0,09% de Tween (MU + 0,09T) (Figura 6B) a sensação dominante foi a “maçã”, com taxa de dominância de 0.4, com tempo de percepção 9 a 13 segundos (s) com duração de 4s.

A amostra com 0,05% de Tween 20 (MU + 0,05T) (Figura 6C) também evidenciou o descritor “maçã” como dominante, apresentando taxa de dominância 0.5 de 7 a 17 segundos, e depois uma pequena percepção da mesma sensação de 27 a 29s do tempo, portanto, com tempo total de duração de 12s. O comportamento da amostra com urucum e com o menor percentual de Tween 20 (MU + 0,03T) (Figura 6D) foi semelhante ao da amostra com

carotenoide e com o menor percentual de Tween (MC + 0,03T) (Figura 5D), em que as sensações dominantes foram “doce” e “maçã”. O descritor “doce” foi perceptível no decorrer de 4 a 6 segundos, com taxa de dominância de 0.4, e a “maçã” no decorrer de 10 a 30 segundos, com taxa de dominância de 0.4 a 0.5. Esse comportamento para as duas amostras pode ser explicado pela redução do Tween 20 na amostra, que pode ter proporcionado maior destaque para a doçura e o sabor do suco.

5. Conclusão

O sistema de microemulsão influenciou na estabilidade microbiológica do suco clarificado de maçã com β -caroteno microemulsionado e Tween 20, demonstrando ser viável para o consumo durante o período de 21 dias de armazenamento refrigerado.

De maneira geral, as amostras de suco clarificado de maçã microemulsionados com β -caroteno e urucum, nas porcentagens 0,03% e 0,05% de Tween 20, se enquadraram na descrição “gostei muito” da escala hedônica, indicando a aceitação do produto pelos avaliadores.

No teste de dominância temporal das sensações, os descritores perceptíveis pelos avaliadores foram maçã e doce, sendo também detectados amargo, adstringente e remédio apenas no suco contendo urucum microemulsionado com 0,19% de tensoativo. Além disso, a preferência dos avaliadores foi pelas amostras de urucum com 0,03% de Tween e de β -caroteno com 0,05% de Tween, reforçada pela maior intenção de compra do suco clarificado de maçã contendo urucum microemulsionado (MUT).

No presente estudo foi possível investigar a viabilidade do sistema de microemulsão (O/A) em suco clarificado de maçã contendo carotenoides microemulsionados, apresentando estabilidade microbiológica e aceitação sensorial pelos avaliadores ao produto enriquecido, representando uma inovação neste campo de estudo, ao contribuir com a produção de informações e dados, especialmente, em função das limitadas descrições da literatura sobre a aplicação destes sistemas na área de alimentos, principalmente em matrizes alimentares aquosas.

6. Referências

CAI, Ming et al. Changes in physicochemical profiles and quality of apple juice treated by ultrafiltration and during its storage. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 2913-2919, 2020.

CARNAÚBA, R. A. Ação dos compostos bioativos dos alimentos no envelhecimento e longevidade. **Rev. Bras. Nutr. Func**, v. 45, n. 80, p. 8-13, 2019.

CHAARI, Marwa et al. Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro-and nano-emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, p. 219-227, 2018.

CONTI, Maria Josiane. **Crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em seis tipos de sucos de frutas tropicais, em diferentes temperaturas**. Tese de Doutorado, 2013.

FASOLIN, L. H.; SANTANA, R. C.; CUNHA, R. L. Microemulsions and liquid crystalline formulated with triacylglycerols: Effect of ethanol and oil unsaturation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 415, p. 31-40, 2012.

GULARTE, M. A., AVILA, B. P., PEREIRA, A. M., DIERINGS, E. J. (2019). **Rice and Beans: Practical guide for sensory analysis in grains**. Pelotas: Santa Cruz.

GULARTE, Márcia Arocha (2009). **Manual de análise sensorial**. Ed. Universidade Federal de pelotas, 106p. ISBN 978.85.7192.519.9

HIRKO, Biruk; GETU, Abukiya. Bixa orellana (Annatto Bixa) A review on use, structure, extraction methods and analysis. **Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management**, v. 5, n. 1, p. 687-696, 2022.

HOBUSS, Cristiane B. et al. Synthesis and characterization of monoacylglycerols through glycerolysis of ethyl esters derived from linseed oil by green processes. **RSC advances**, v. 10, n. 4, p. 2327-2336, 2020.

JANZANTTI, Natália S.; FRANCO, Maria Regina B.; WOSIACKI, Gilvan. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 523-528, 2003.

KREUTZ, Daniel Henrique. **Utilização de subprodutos da industrialização de maçã para o desenvolvimento de um adoçante natural**. 2021.

MATOS, Ricardo et al. Nanoencapsulation of Vitamin D3 by the Emulsion Inversion Point Method for Enrichment of Coconut Yogurts. **ACS Food Science & Technology**, v. 2, n. 12, p. 1899-1910, 2022.

MCCLEMENTS, David Julian; RAO, Jiajia. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

OLIVEIRA FARIA, Layanara; GABRIELE VAZ SOUZA, Ane; DA SILVA BERTI, Mariana Pina. Análise sensorial e aceitação comercial de diferentes formulações de geleia. **Revista Agrotecnologia**, v. 10, n. 2, 2019.

PEREIRA A.M., ÁVILA B.P., SOUZA E.J.D. de, GULARTE M.A. Descomplicando a Análise Sensorial: Grãos e Derivados. CAPÍTULO 3. Sensorial Aplicada: Métodos Inovadores, **Mérida Publishers**, 97-115, 2021.

PINEAU, Nicolas et al. Dominância Temporal das Sensações: Construção das curvas TDS e comparação com tempo-intensidade. **Qualidade e Preferência Alimentar**, v. 20, n. 6, pág. 450-455, 2009.

QIAN, Cheng et al. Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1440-1447, 2012.

RICARTE, Dara et al. Análise sensorial de preparações com batata yacon: revisão sistemática. **HU Revista**, v. 45, n. 4, p. 431-440, 2019.

SAIFULLAH, Md; AHSAN, Amimul; SHISHIR, Mohammad Rezaul Islam. Production, stability and application of micro-and nanoemulsion in food production and the food processing industry. In: emulsions. **Academic Press**, 2016. p. 405-442.

SAINZ, Ricardo Lemos; FERRI, Valdecir Carlos. Vida-de-prateleira de sucos clarificados de pêssegos das variedades jubileu e eldorado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, p. 239-249, 2015.

SILVA, José Dilson F. da et al. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v. 38, p. 1196-1206, 2015.

SOURRI, Patra et al. Fruit juice spoilage by Alicyclobacillus: Detection and control methods—A comprehensive review. **Foods**, v. 11, n. 5, p. 747, 2022.

STAREK, Agnieszka et al. Influence of ultrasound on selected microorganisms, chemical and structural changes in fresh tomato juice. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 3488, 2021.

TARTARO, Giuseppe et al. Microemulsion microstructure (s): A tutorial review. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1657, 2020.

XU, Lei et al. Impact of Clarified Apple Juices with Different Processing Methods on Gut Microbiota and Metabolomics of Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 17, p. 3488, 2022.

7. Anexos

7.1. Ficha - Avaliação sensorial

Avaliação sensorial de suco de maçã clarificado enriquecido com carotenoides

A preferência do consumidor por um suco de maçã totalmente claro e brilhante tornou o suco de maçã clarificado muito mais popular do que o suco de maçã natural não clarificado. A produção de suco de maçã claro requer a remoção do material em suspensão, o que pode acarretar em alterações, como a redução do valor nutricional (vitaminas e antioxidantes).

O enriquecimento de suco torna-se uma estratégia importante na incorporação de vitaminas e compostos bioativos (carotenoides) após a etapa do processamento.

Nome: _____ Sexo: _____ Idade: _____

Grau de instrução:

Por favor, prove e avalie as amostras de suco indicando o número da escala correspondente a sua opinião em relação aos atributos solicitados.

	Código da amostra			
	026	105	317	620
Aparência				
Cor				
Sabor				
Acidez				
Impressão Global				

9 Gostei extremamente

8 Gostei muito

7 Gostei moderadamente

6 Gostei ligeiramente

5 Indiferente

4 Desgostei ligeiramente

3 Desgostei moderadamente

2 Desgostei muito

1 Desgostei extremamente

Comentários adicionais:

Por favor, ordena as amostras da mais preferida (1) à menos preferida (4):

1 - _____

2 - _____

3 - _____

4 - _____

Se este produto estive disponível no mercado, qual seria sua atitude em relação à compra? Indique sua opção:

() Provavelmente compraria

() Talvez compraria

() Não compraria

6. Considerações finais

No presente estudo foram desenvolvidas microemulsões do tipo O/A com carotenoides, utilizando como emulsificantes o Tween 20 e monoglicerídeos (síntese do óleo de linhaça) em suco clarificado de maçã.

No primeiro estudo (Estudo 1), devido a carência de estudos sobre os principais métodos de proteção e aplicação de carotenoides em alimentos, uma revisão bibliográfica foi realizada, sendo disponibilizadas várias informações sobre a utilização, principalmente, das nanotecnologias.

No segundo estudo (Estudo 2), os carotenoides (urucum e β -caroteno) foram microemulsionados em suco clarificado de maçã utilizando tensoativos não iônicos, com formação de gotículas nanométricas, assimétricas e polidispersas; produto opticamente transparente de cor mais intensa e isotrópica; com comportamento newtoniano e estabilidade sob aquecimento, além de baixos valores de potencial zeta e mobilidade.

No terceiro estudo (Estudo 3), as amostras de suco clarificado de maçã microemulsionado com carotenoides foram avaliados sensorialmente e quanto a estabilidade microbiológica por 21 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C. Destacou-se a amostra de suco clarificado de maçã microemulsionado com β -caroteno e Tween 20, a qual apresentou baixo desenvolvimento microbiológico durante o período de estocagem. As amostras de suco formuladas com menor percentual de tensoativo obtiveram melhor aceitação sensorial, com tendência de compra para a amostra adicionada de urucum, “maçã” foi o descritor mais perceptível pelo teste de TDS nas amostras de suco clarificado de maçã com carotenoides microemulsionados.

Os resultados foram promissores, viabilizando a microemulsão como uma possível técnica para enriquecimento de compostos bioativos como os carotenoides em matrizes alimentares aquosas.

Portanto, foi possível através deste estudo investigar a viabilidade do sistema de microemulsão (O/A) em suco clarificado de maçã contendo carotenoides microemulsionados representando uma inovação neste campo de estudo em função das limitadas descrições da literatura sobre a aplicação destes sistemas na área de alimentos, principalmente em matrizes alimentares aquosas.

7. Referências finais

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33, de 09 de março de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a Categoria de Alimentos 12: Sopas e Caldos.** Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 12 de março de 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 46, de 03 de novembro de 2010. **Dispõe sobre limites máximos para aditivos excluídos da lista de aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF).** Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 21 de agosto de 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 8, de 6 de março de 2013. **Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó.** Diário Oficial da União; Poder Executivo, nº 46, de 8 de março de 2013.

CHAARI, M. et al. Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro-and nano-emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 161, 219-227, 2018.

EVANS, D. F.; WENNERSTRÖM, H. **The colloidal domain: where physics, chemistry, biology, and technology meet.** 1999.

FASOLIN, L. H.; SANTANA, R. C.; CUNHA, R. L. Microemulsions and liquid crystalline formulated with triacylglycerols: Effect of ethanol and oil unsaturation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 415, p. 31-40, 2012.

HOLKEM, A. T. et al. Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 87-96, 2015.

JAIN, A. et al. Beta-carotene-encapsulated solid lipid nanoparticles (BC-SLNs) as promising vehicle for cancer: An investigative assessment. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 3, p. 1-7, 2019.

LEONG, T. S. H. et al. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 721-727, 2009.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

ONSEKIZOGLU, P. Production of high quality clarified pomegranate juice concentrate by membrane processes. **Journal of membrane science**, 442, 264-271, 2013.

QIAN, C., DECKER, E. A., XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. (2012). Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, 135(3), 1440-1447.

SAIFULLAH, M. D; AHSAN, A.; SHISHIR, M. R. I. Production, stability and application of micro-and nanoemulsion in food production and the food processing industry. In: **emulsions**. Academic Press, 2016. p. 405-442.

SALEHI, F. Physicochemical characteristics and rheological behaviour of some fruit juices and their concentrates. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 14(5), 2472-2488, 2020.

SCHULZ, G. A. S. et al. Synthesis and characterization of mono-acylglycerols through the glycerolysis of methyl esters obtained from linseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 12, p. 1533-1540, 2011.

SHAH, D. O. Micelles, microemulsions, and monolayers: quarter century progress at the University of Florida. In: **Micelles, Microemulsions, and Monolayers**. Routledge, 2018. p. 1-52.

SHAKERI, A. et al. Biological activities of three natural plant pigments and their health benefits. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 1, p. 356-361, 2018.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.

TARTARO, G. et al. Microemulsion microstructure (s): A tutorial review. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1657, 2020.