

**TÁCIO THIERS SILVA SANTOS**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE  
ANATO E NANOESTRUTURAS DE QUITOSANA PARA  
BIOAPLICAÇÕES**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA FACULDADE DE  
ENGENHARIA QUÍMICA**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**TÁCIO THIERS SILVA SANTOS**

# PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE ANATO E NANOESTRUTURAS DE QUITOSANA PARA BIOAPLICAÇÕES

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. Orientadores: Profa. Dra. Viviane Pilla (Infis -UFU) e Prof. Dr. Rubens Gedraite (FEQUI -UFU).

**Uberlândia – MG**

**2020**

# PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE ANATO E NANOESTRUTURAS DE QUITOSANA PARA BIOAPLICAÇÕES

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (MG) pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 22 de dezembro de 2020.

---

Prof. Dr. Viviane Pilla (Infis – UFU)

---

Prof. Dr. Rubens Gedraite (FEQUI – UFU)

---

Prof. Dr. Djalmir Nestor Messias (Infis – UFU)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram a passar por esta etapa da vida, minha família, principalmente minha mãe que me apoiou, acreditou no poder transformador da educação em minha vida e confiou em mim por todos esses anos, colegas de graduação que estiveram ao meu lado, à professora orientadora Dra. Viviane Pilla, pela paciência e por todo tempo investido em mim, que por anos fui seu orientando de iniciação científica e agora, de trabalho de conclusão de curso, aos colegas de pesquisa que tive no laboratório do grupo de Propriedades Ópticas e Térmicas de Materiais (GPOTM) do Infis-UFU que me apoiaram em diversos momentos da minha graduação, ao professor também orientador Dr. Rubens Gedraite e colegas de curso e de trabalho que me ajudaram, me deram força em forma de sorrisos.

À Universidade Federal de Uberlândia, à Faculdade de Engenharia Química e ao Instituto de Física.

# PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE ANATO E NANOESTRUTURAS DE QUITOSANA PARA BIOAPLICAÇÕES

## RESUMO

Os corantes naturais apresentam importância fundamental para a sociedade, pois são utilizados em diversas aplicações alimentícias, cosméticas e biomédicas. Um dos mais utilizados é o urucum corante em que o Brasil é consolidado como maior produtor, possui coloração vermelha, extraído do pericarpo das suas sementes, que apresentam substâncias capazes de promover uma redução das concentrações séricas do colesterol, triglicerídeos, ações antioxidantes, antimicrobianas e hiperglicemiante. Desta forma, o estudo e aplicação dos corantes naturais são de fundamental importância para a sociedade. Para o desenvolvimento deste trabalho, foi feita extração do corante natural das sementes do urucum em meio alcalino utilizando diversas variáveis como concentração e quantidade de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (4M). Foi preparado também soluções de quitosana e soluções de nanopartículas de quitosana sintetizadas sob tratamento térmico controlado, seguida de uma etapa de centrifugação, visando intensificar o seu potencial fluorescente, removendo partículas de tamanho maior. O método de preparação dos biomateriais e extração do corante de anato foram otimizados, e seus espectros de absorção e fluorescência, e coeficientes termo-ópticos ( $dn/dT$ ) foram caracterizados utilizando técnicas espectroscópicas e interferômetro do tipo Mach-Zehnder. Outras técnicas complementares foram utilizadas para as caracterizações das nanoestruturas como difração de raio-X (XDR), microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), visando futuras bioaplicações desses biomateriais na presença do corante natural.

**Palavras-chave:** corante natural, biomateriais, nanopartículas, espectroscopia, caracterização óptica.

# PREPARATION AND OPTICAL CHARACTERIZATION OF ANNATTO AND CHITOSAN NANOSTRUCTURES FOR BIOAPPLICATIONS

## ABSTRACT

Natural dyes are of fundamental importance to society because these dyes are used in various food, cosmetic and biomedical applications. One of the most used natural dye, annatto is consolidated as the largest producer in Brazil, it has red coloring, extracted from the pericarp of its seeds, which contain substances capable of promoting a reduction in the serum concentrations of cholesterol, triglycerides, antioxidant, antimicrobial and hyperglycemic. Thus, the study and application of natural dyes are of fundamental importance to society. For the development of this work, extraction of the natural coloring of the annatto seeds was done in an alkaline medium using several variables such as concentration and amount of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (4M). Chitosan solutions and solutions of chitosan nanoparticles synthesized under controlled heat treatment were also prepared, followed by a centrifugation step, to intensify their fluorescent potential, removing larger particles. The method of preparing biomaterials and extracting the dye from annatto was optimized, and their absorption and fluorescence spectra and thermo-optical coefficients ( $dn/dT$ ) were characterized using spectroscopic techniques and Mach-Zehnder interferometers type. Other complementary techniques were used for the characterization of nanostructures such as XDR (X-ray powder diffraction), AFM (atomic force microscope), and FTIR (Fourier transformed infrared spectroscopy), aiming at future bioapplications of these biomaterials in the presence of natural dye.

**Keywords:** natural dye, biomaterials, nanoparticles, spectroscopy, optical characterization.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução.....	8
CAPÍTULO 2 – Materiais e Métodos.....	11
2.1 - Urucum .....	11
2.2 - Principais carotenoides.....	13
2.3 - Quitosana.....	14
2.4 - Nanopartículas de quitosana.....	15
2.5 - Procedimento Experimental.....	16
2.5.1 - Extração do corante de urucum.....	16
2.5.2 - Solução de quitosana.....	17
2.5.3 - Síntese de nanopartículas de quitosana.....	18
2.6 - Principais técnicas espectroscópicas e ópticas utilizadas .....	19
2.6.1 - Interferometria .....	19
2.6.2 - Absorbância .....	22
2.6.3 - Fluorescência.....	22
2.6.4 - Difração de raios X (XDR) .....	23
2.6.5 - Microscopia de força atômica (AFM) .....	23
2.6.6 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)...	24
CAPÍTULO 3 – Resultados e Discussões.....	25
CAPÍTULO 4 – Conclusões.....	37
Apêndice A .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Quase 90% das percepções dos sentidos do ser humano acontecem através da visão. A luz sob diferentes comprimentos de onda, quando penetra nos olhos provoca estímulos no cérebro e produz as distinções de cor [1], isso faz com que ela seja um dos principais atrativos aos produtos. A indústria de corantes começou usando fontes naturais de plantas e insetos, e depois voltaram-se para processos de fabricação de sintéticos devido à diversas vantagens que eles possuíam. Porém, eles não são as melhores opções, com o tempo foi descoberto que vários corantes sintéticos, embora possuam baixo custo de produção, maior estabilidade e poder tintorial, sua proibição é crescente, especialmente os corantes azoicos são tóxicos e mutagênicos e estão sendo cada vez mais proibidos em todo o mundo [2].

O uso dos corantes naturais torna-se a principal alternativa para a substituição saudável dos corantes artificiais e entre eles, destaca-se o urucum, nome de origem na linguagem Tupi-Guarani transliterado “uru-ku” e significa “vermelho”. Seu nome científico, “*Bixa orellana* L”, foi dado em homenagem a Francisco de Orellana (1490-1546), um membro da expedição de Francisco Pizarro e o primeiro explorador espanhol que navegou o rio Amazonas, consiste em uma das principais fontes de corantes naturais empregadas pelas indústrias de alimentos, correspondendo em torno de 90% do total de consumo de corantes naturais no Brasil, e em torno de 70% dos corantes naturais mundialmente empregados em alimentos [3]. A bixina é indexada no Colour Index, um órgão internacional de nomenclatura de corantes, como CI n°75120, mas a denominação mais conhecida é da Comunidade Europeia, como ECC n°E160b [4].

As extrações do urucum são usadas para colorir diversos alimentos [5]. Além desta aplicabilidade na indústria alimentícia, vários outros segmentos utilizam este corante, como a indústria têxtil, agropecuária, na medicina e cosméticos. O pigmento do urucum é extraído do pericarpo das sementes e é constituído por vários carotenóides, no qual a bixina pode representar mais de 80%, dependendo do processo de extração usado [6]. Na área de benefícios dos corantes naturais é possível citar o



carotenoide extraído da semente do urucum que é uma substância de grande interesse, devido ao seu potencial como alimento funcional, tanto para a indústria farmacêutica, quanto para a alimentícia [7,8].

No urucum estão presentes substâncias de cor vermelha capazes de promover uma redução das concentrações séricas do colesterol, triglicerídeos, ações antioxidantes, antivirais, antimicrobianas e hiperglicemiante [9], devido a essas propriedades possui grande importância em ser pesquisado, bem como, estar presente na alimentação humana.

Por outro lado, a utilização de polímeros naturais biodegradáveis é uma alternativa adequada para a preparação de plásticos amigáveis e sistemas nano particulados biocompatíveis [10]. Um candidato desse tipo de material é a quitosana, um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível, bactericida e produzido por fontes renováveis, obtido a partir de carapaças de crustáceos que são abundantes e rejeitadas pela indústria pesqueira [11]. Além disso, a partir dela é possível produzir nanopartículas de carbono fluorescente, que apresentam características importantes como foto estabilidade, baixa citotoxicidade, elevada fluorescência, biocompatibilidade e estabilidade química, seus filmes transparentes apresentam baixa resposta mecânica e alta sensibilidade à umidade [10]. Sua maior aplicação é na área biomédica, assim como em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, liberação controlada de drogas em animais e humanos, lentes de contato e encapsulamento de materiais [11].

Além disso, a aplicação conjunta com nanopartículas de carbono fluorescente (CNPs), possui extrema importância e estão sendo cada vez mais pesquisadas em aplicações biológicas, como biossensoriamento e liberação de drogas [12]. Obtidas a partir da quitosana, com baixa citotoxicidade e excelente biocompatibilidade, suas propriedades ópticas também são um fator atrativo, possuindo elevada fluorescência no azul quando excitado em 365 nm [12]. Assim, as CNPs são uma alternativa para nanomateriais fluorescentes, ecológicos e ainda, biocompatíveis, com possíveis atividades antimicrobianas.

O objetivo do trabalho foi otimizar o processo de extração do anato em solução aquosa e alcalina, e desenvolver uma metodologia de baixo custo para a síntese de nanopartículas de quitosana. Foram realizadas as caracterizações espectroscópicas de absorvância e fluorescência dos biomateriais investigados, e a determinação do coeficiente termo-óptico ( $dn/dT$ ). Esses resultados são importantes, para os trabalhos de caracterizações de eficiência quântica da fluorescência dessas soluções em andamento no grupo de pesquisa, usando as técnicas de Lente Térmica e/ou Difração Cônica (DC) baseado no efeito de auto modulação de fase espacial (AMFE) [13-15] proposta pelo grupo de pesquisa em 2009 [16], bem como bioaplicações futuras desses materiais.

# CAPÍTULO 2

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será abordado uma breve revisão bibliográfica sobre o corante natural de urucum, o polímero de quitosana e sobre métodos de baixo custo para obtenção de nanopartículas de quitosana. O documento foi estruturado em uma sequência abordando inicialmente o urucum, seus principais corantes, bixina e norbixina. Em seguida, a quitosana e por último, nanopartículas de quitosana. Posteriormente, o procedimento experimental de extração de anato, preparação da quitosana e síntese de nanopartículas de quitosana, bem como as técnicas ópticas e espectroscópicas usadas em suas caracterizações.

### 2.1 - Urucum

Um dos primeiros relatos sobre o uso do urucum é registrado numa carta de Pero Vaz de Caminha ao rei de Portugal Dom Manuel informando a descoberta do Brasil. Diz em um trecho da carta:

“E, segundo diziam esses que lá foram, folgavam com eles. Neste dia os vimos mais de perto e mais à nossa vontade, por andarmos quase todos misturados. Ali, alguns andavam quartejados daquelas tinturas quartejados; outros de metades; outros de tanta feição, como em pano de armar, e todos com os beiços furados, e muitos com os ossos neles, e outros sem ossos.

Alguns traziam uns ouriços verdes, de árvores, que, na cor, queriam parecer de castanheiras, embora mais pequenos. E eram cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagando entre os dedos, faziam tintura muito vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam.” (CAMINHA, Pero Vaz de. [Correspondência]. Destinatário: Rei Dom Manuel, Porto Seguro. Bahia, 1 de maio de 1500. 1 carta. Disponível em <http://portal.iphan.gov.br/uploads/ckfinder/arquivos/Carta%20de%20Pero%20Vaz%20de%20Caminha%201500.pdf>. Acesso em: 09 dez 2020)

Esse relato descreve a cachopa (“...traziam uns ouriços verdes, que na cor queriam parecer de castanheiras, embora mais pequenos.”) e as sementes do urucum também são descritas (“... cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagando-os entre os dedos, faziam tintura muito vermelha...”). Desde então, é um produto que

desperta interesse tanto por aspectos provenientes da sua cor, quanto por sua capacidade nutricional.

Na Figura 1 é apresentada a foto das cachopas de urucum no formato ouriçado, que em sua maturidade, no interior das cápsulas contêm pequenas sementes dispostas em série, envolvidas por arilo vermelho [17].

Figura 1 – Cachopas de urucum, algumas abertas expondo as sementes e outras fechadas.



Fonte: Própria

A semente de urucum apresenta em sua superfície um arilo (pericarpo) que possui várias substâncias além do pigmento vermelho característico. Este arilo representa cerca de 5 a 10 % do peso da semente, dos quais 30 %, aproximadamente, são carotenoides [17]. Com o passar dos anos, as sementes do urucum foram tornando-se cada vez mais importantes e com maior interesse comercial, favorecendo o melhoramento genético e aumento na qualidade do produto, objetivando uma quantidade maior de carotenoides.

A Tabela 1, representa as classes de urucum relacionado à qualidade, nesse aspecto quanto maior quantidade de carotenoides, em destaque a bixina, menor umidade, menor quantidade de impurezas e ausência de materiais estranhos, de melhor qualidade as sementes se apresentam, possibilita maior da extração do corante.

Tabela 1 – Classificação comercial das sementes de urucum.

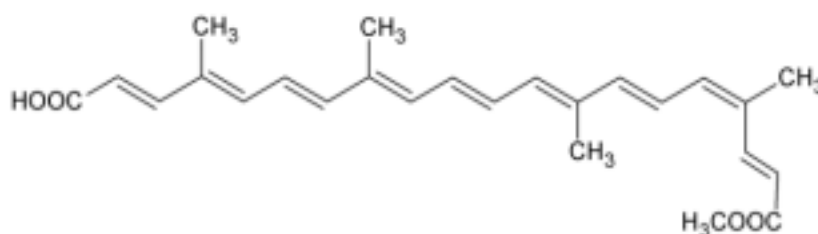
Fatores de qualidade	Classe		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Umidade	≤10%	10% a 14%	>14%
Bixina	>2,5%	2% a 2,5%	5%
Impurezas	<5%	<5%	>5%
Materiais estranhos	Ausência	Ausência	Presença

Fonte: FRANCO et al. (2002). [18]

## 2.2 – Principais carotenoides

A bixina (fórmula química  $C_{25}H_{30}O_4$ ) é o corante presente em maior quantidade no urucum, quando utiliza-se extração química por uso de solventes, é o responsável pelas tonalidades que vão do amarelo ao vermelho [19]. Foi isolada pela primeira vez por Boussingault em 1825 e apresenta-se convencionalmente de duas formas, a bixina, lipossolúvel, e a norbixina, cuja forma de sal hidrolisado é hidrossolúvel [20]. A bixina apresenta algumas particularidades entre os carotenoides, encontrada naturalmente na forma *cis* e possui em dois grupos carboxílicos, sendo um deles éster metílico, como pode ser observado na Figura 2, grupo do éster metílico lhe confere lipossolubilidade, motivo pelo qual o corante era muito utilizado com gorduras animais e utilizada como pigmentos em alimentos como margarinas, cremes vegetais, queijos e sorvetes. [21]

Figura 2 – Estrutura química da bixina



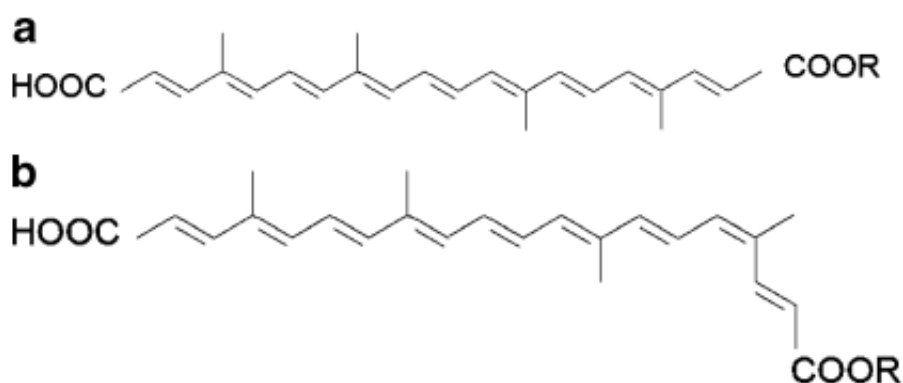
Fonte: STRINGHETA; SILVA (2008). [22]

Existem três processos principais para extração do pigmento do urucum, são eles a extração por imersão em solução alcalina, e em seguida a extração por imersão em

óleo vegetal e em solventes orgânicos [23]. Já o corante de urucum comumente comercializado com a finalidade de ser utilizado na culinária, o colorífico, é obtido a partir da mistura do pigmento ou da semente triturada do urucum com farinha de milho e óleo vegetal, principalmente.

A norbixina é um sal corante, que é extraído do urucum em meio alcalino, com maior instabilidade, possui muita importância para uso em aplicações alimentares aquosas, onde outros corantes possuem dificuldade em solubilizar devido serem hidrofóbicos, numerosos fatores afetam a perda de cor durante o armazenamento devido à sua instabilidade, entre eles os principais são luz, temperatura pH e a níveis de oxigênio. [24].

Figura 3 – Estrutura da Bixina e Norbixina, se R=H; Norbixina, se R=CH<sub>3</sub>, Bixina. Estrutura (a) corresponde à forma cis e (b) à forma trans.



Fonte: DIAS. V.M. et al. (2011). [8]

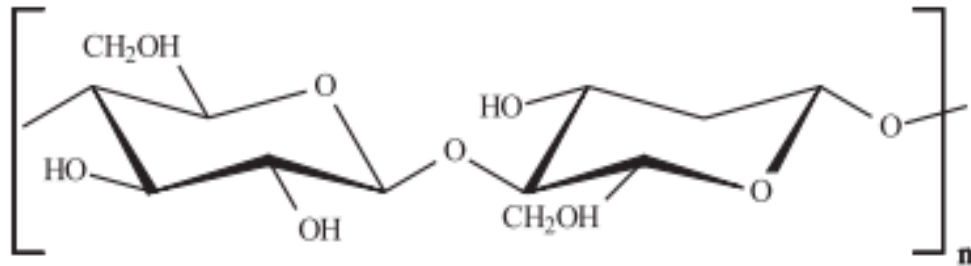
A norbixina possui estrutura química próxima da bixina, apenas um radical os diferencia, sendo hidrogênio na norbixina e radical metil, na bixina, conforme Figura 3.

### 2.3 – Quitosana

A quitosana consiste em um polissacarídeo amino, que resultante de um processo de desacetilação da quitina, sendo muito abundante na natureza, constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, e é o segundo composto orgânico mais abundante da natureza [25], ficando atrás apenas da celulose. Enquanto a quitina é inerte e insolúvel, a quitosana é reativa e solúvel em ácidos fracos, podendo ser caracterizada como um polieletrólito catiônico, sendo geralmente purificada na forma neutra. Em diversos trabalhos ela é utilizada diluída em ácido acético. Devido à

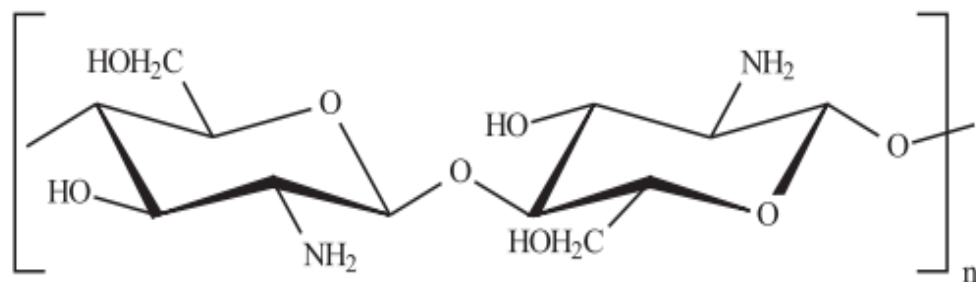
suas propriedades físicas e químicas, pode ser utilizada com a finalidade de produção de filmes com baixa toxicidade e boas propriedades mecânicas, podendo inclusive serem ou não porosas.

Figura 4: Fórmula química da celulose



Fonte: ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. (2003). [26]

Figura 5: Fórmula química da quitosana



Fonte: ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. (2003). [26]

A celulose (Figura 4) trata-se do composto em maior abundância na natureza, enquanto a quitosana (Figura 5) é o segundo composto de maior presença na natureza. A quitosana diferentemente da celulose apresenta grupos amino caracterizados por ligações covalentes (N-H) conferindo ao polímero, alto grau de afinidade e retenção de água.[27]

#### 2.4 – Nanopartículas de quitosana

Existem diferentes modos de obter as nanopartículas de carbono fluorescente, dentre as mais comuns estão, criação baseada em defeito de ponto em partícula de diamante com posterior recozimento, ablação à laser de grafite seguida por oxidação e funcionalização, decomposição térmica de compostos orgânicos, eletro oxidação de

grafite e oxidação de fuligem de vela com ácido nítrico [28]. Neste trabalho, a síntese de nanopartículas de quitosana fluorescentes foi realizada via decomposição térmica da quitosana, um procedimento com menor custo de produção e com a utilização de um composto natural.

## **2.5– Procedimento Experimental**

### **2.5.1– Extração do corante de urucum**

Inicialmente foi realizado um estudo preliminar com sementes de urucum provenientes de diversos estados brasileiros e a que apresentava maior potencial de absorção numa solução de mesma concentração foi definida como padrão para o restante do trabalho, sendo ela proveniente do estado de São Paulo.

O uso de atrito mecânico das sementes em moinhos de bolas para extração da bixina e emprego de leite de jorro na obtenção do corante é uma importante alternativa para a extração do corante [29]. Porém neste trabalho, foi realizada a extração primeiramente usando um atrito mecânico na forma de maceração das sementes, conforme a Figura 6, seguidas em imersão de solução alcalina e a eficiência avaliada utilizando métodos espectroscópicos.

Figura 6: Processo de maceração das sementes

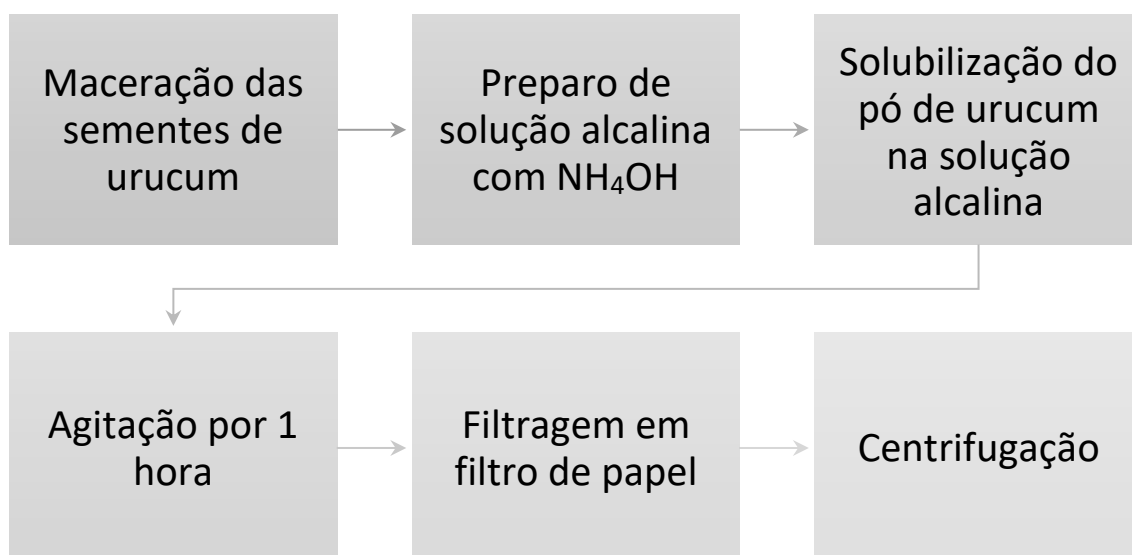


Fonte: Própria

O procedimento básico para preparo das soluções de urucum é descrito no fluxograma da Figura 7.



Figura 7: Fluxograma básico de extração do corante de urucum.



Algumas variantes do processo de extração do corante natural foram realizadas modificando a quantidade de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , quantidade de pó de urucum e temperatura de extração.

### 2.5.2– Solução de quitosana

A solução de quitosana para as análises ópticas foi obtida diluindo o pó de quitosana (marca Polymar, sem peso molecular definido) em soluções de ácido acético (2%), na concentração de 0,01 g/mL, mantida sob agitação por 6 horas. A caracterização foi realizada tanto na solução pura e quanto na solução com corante de urucum, neste caso, ocorreu agitação à temperatura ambiente e amostra possuindo pH entre 4,6 e 5.

As soluções de corante produzidas com a finalidade de aplicação na matriz de quitosana, possuíam uma concentração mais elevada (10,5 mg/mL do pó macerado), a solução possuía 0,5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 4 molar(M) e 9,5 mL de água destilada aquecida à 98 °C, seguida de agitação com duração de 1 hora para cada amostra. Após este processo, foram realizadas as filtrações das amostras utilizando filtro de papel e centrifuga com duração de 20 minutos. Finalizada a preparação das amostras, foram

realizadas as análises espectroscópicas das soluções de anato na matriz de quitosana em cubeta óptica de 2 mm, formando soluções de 10 mL com quantidades variadas de quitosana e anato, conforme a Tabela 2. Em seguida foram realizadas análises de fluorescência e absorbância destas soluções.

Tabela 2 – Composições das amostras de urucum inseridas na matriz de quitosana

Quantidade de quitosana (mL)	9,9	9,8	9,7	9,5	9,0	8,5	8,0
Quantidade de solução concentrada de urucum (mL)	0,1	0,2	0,3	0,5	1	1,5	2,0

Para verificar a influência do urucum no coeficiente térmico do índice de refração  $dn/dT$ , foi realizada uma análise em comparação com a água, utilizando um interferômetro duplo.

### 2.5.3– Síntese de nanopartículas de quitosana.

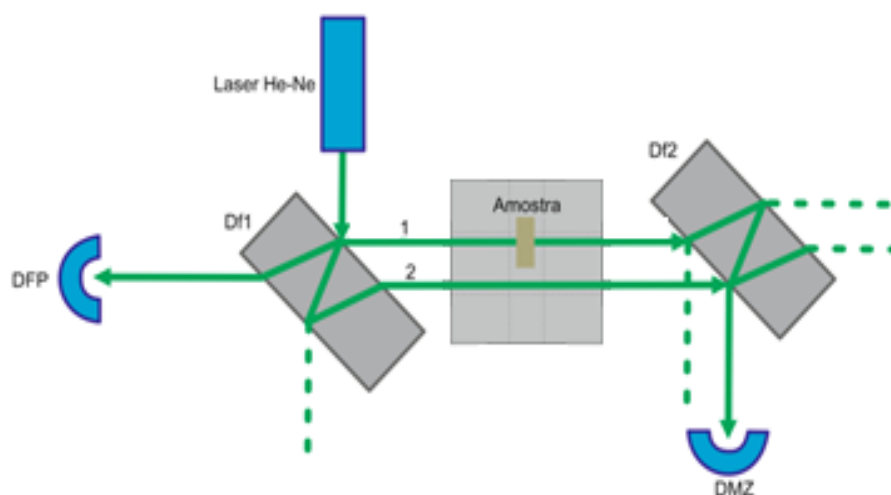
Para a síntese das nanopartículas de carbono fluorescente, a solução de quitosana foi realizada de forma mais concentrada, utilizou-se 2 g de quitosana em soluções de 18 mL à 2% de ácido acético, seguido de tratamento térmico em 180 °C por 12 horas na primeira amostra, depois submetendo a solução à ação de centrifuga à alta velocidade (7200 RPM) por aproximadamente 15 minutos afim de remover o depósito que possui menor fluorescência [12], restando assim, nanopartículas com maior fluorescência na solução. Após a obtenção do material, em diversas situações distintas, tempo de tratamento térmico foi testado a variação da temperatura, neste caso, mantendo o tempo de tratamento térmico de 10 horas e ocorreram caracterizações, utilizando técnicas ópticas, como absorbância, fluorescência, interferometria, dentre outras técnicas. Para as medidas de absorção e fluorescência foram utilizadas soluções diluídas, com 0,2 g/mL tanto de CNPs como de quitosana, numa solução de 1% ácido acético, nas medidas de AFM, uma solução ainda mais diluída foi utilizada 0,04 g/mL e 1% em ácido acético.

## 2.6 – Principais técnicas espectroscópicas e ópticas utilizadas

### 2.6.1 – Interferometria

Para a medição do coeficiente termo-óptico ( $dn/dT$ ) foi utilizado o interferômetro do tipo Mach-Zehnder [30], em que permite determinar simultânea os coeficientes de expansão térmica linear ( $\alpha$ ) e  $dn/dT$  com superfícies planas e paralelas. O esquema do interferômetro utilizado neste trabalho é apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema do interferômetro duplo de braço único: Df1 e Df2 são divisores de feixes, DFP é o detector Fabry-Pérot, DMZ é o detector Mark-Zehnder.



Fonte: Adaptado de DOMENEGUETI. J.F.M. et al. (2017). [30]

A luz proveniente do laser de diodo (532 nm) é refletida pela primeira e segunda face do divisor de feixe (Df1), que é um vidro de janela plano paralelo, gerando dois novos feixes. O feixe 1 passa pela amostra situada em cima da placa termoelétrica Peltier, e o feixe 2 segue o percurso sem interagir com a amostra. Os feixes 1 e 2 se encontram na primeira face do segundo divisor de feixe (Df2) e após o feixe 1 ser refletido pela segunda face do Df2, eles se encontram e seguem até o detector DMZ, que faz a leitura da interferência gerada pela junção dos feixes 1 e 2. Devido a presença da amostra no caminho óptico do feixe 1, isso faz com que exista uma diferença de fase entre o feixe 1 e 2, dada por [30]

$$\phi^{MZ} = \frac{2\pi}{\lambda}(n - 1)l, \quad (1)$$

Em que  $n$  e  $l$  são o índice de refração e espessura da amostra, respectivamente, com  $\lambda$  sendo o comprimento de onda do laser utilizado. Essa parte do experimento é conhecida como interferômetro de Mark-Zehnder (IMZ). O interferômetro de Fabry-Pérot (IFP) é a interferência que ocorre entre a reflexão da primeira e segunda face da amostra, quando o feixe 1 passa pela amostra. Essas duas reflexões se interferem gerando uma interferência com diferença de fase de [30]

$$\phi^{FP} = \frac{4\pi}{\lambda}nl, \quad (2)$$

a qual é lida pelo detector DFP. Como o objetivo é avaliar as interferências entre os feixes em função da temperatura, a amostra é colocada no interior da cubeta situada em cima da placa termoelétrica Peltier.

As variações na temperatura afetam no índice de refração ( $n$ ) e espessura ( $l$ ) da amostra, de modo que as equações [30]

$$n = n_0 + \frac{dn}{dT}\Delta T \quad (3)$$

e

$$l = l_0(1 + \alpha\Delta T) \quad (4)$$

são válidas. Nessas equações  $n_0$  e  $l_0$  são constantes definidas a temperatura ambiente, e o  $dn/dT$  e o  $\alpha$ , são o coeficiente térmico do índice de refração e coeficiente de expansão térmica, respectivamente. Substituindo as equações (3) e (4) nas equações (1) e (2), se obtém o espaçamento entre um máximo e mínimo consecutivo gerado por cada detector de acordo com as equações [30]:

$$\frac{dn}{dT} + n\alpha = \frac{\lambda}{4l_0\Delta T^{FP}}\Delta m \quad (5)$$

para o interferômetro Fabry-Perot e

$$\frac{dn}{dT} + (n - 1)\alpha = \frac{\lambda}{2l_0\Delta T^{MZ}}\Delta M \quad (6)$$

para o interferômetro de Mach-Zehnder, onde  $\Delta T^{FP}$  e  $\Delta T^{MZ}$  são o espaço entre um máximo e um mínimo consecutivo de cada interferômetro. O  $\Delta m$  e o  $\Delta M$  são a diferença entre os máximos e mínimos consecutivos. Sabendo esses valores é possível, a partir das equações (5) e (6), encontrar o  $dn/dT$  e o  $\alpha$  do material, que são dados por [30],

$$\frac{dn}{dT} = \frac{\lambda}{2l_0} \left( \frac{n}{\Delta T^{MZ}} - \frac{n-1}{2\Delta T^{FP}} \right), \quad (7)$$

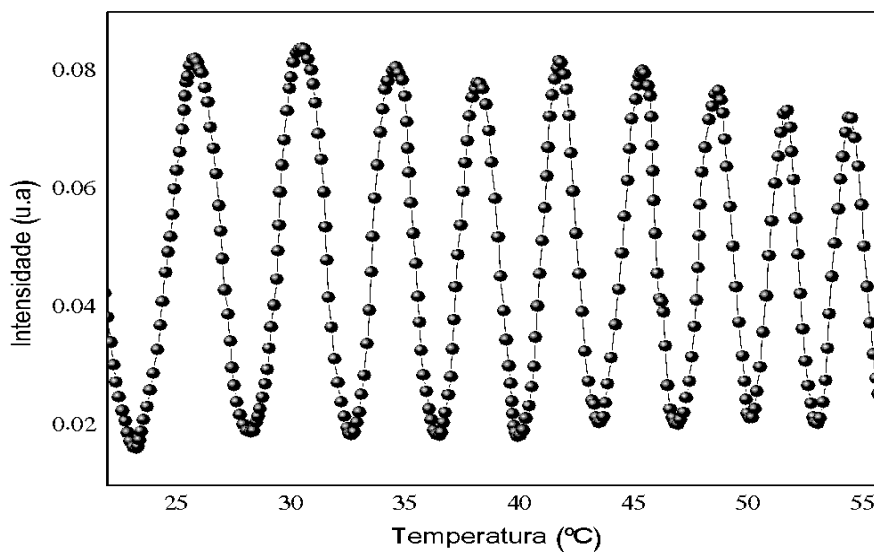
$$\alpha = \frac{\lambda}{2l_0} \left( \frac{1}{2\Delta T^{FP}} - \frac{1}{\Delta T^{MZ}} \right). \quad (8)$$

Ao fazer medidas à base de água, somente o detector DMZ irá ler variação da intensidade do feixe com a mudança da temperatura da amostra. Isso porque como a amostra líquida se encontra dentro de uma cubeta, a variação com a temperatura do  $dn/dT$  do líquido é cerca de 100 vezes maior que o  $\alpha$  da cubeta. Assim a equação (6) é simplificada e fica sem o segundo termo do lado esquerdo, resultando em [31]

$$\frac{dn}{dT} = \frac{\lambda}{2l_0 \Delta T^{MZ}} \Delta M. \quad (9)$$

A medida obtida do detector DMZ da intensidade do sinal em função da temperatura da amostra está representada na Figura 9.

Figura 9 – Medida da leitura do detector DMZ da intensidade do feixe em função da temperatura para água destilada. As linhas são apenas para guiar os olhos.



Fonte: Própria

A partir da Figura 9, obtêm-se os máximos e mínimos da intensidade de cada padrão de interferência, nesse caso somente do IMZ, e a partir disso encontra-se a temperatura dos máximos e mínimos para cada índice correspondente a temperatura dada. Utilizando a equação (9) e os resultados obtidos para  $\Delta T_{Mz}$ , que indica a temperatura entre um máximo e mínimo consecutivos, ou seja,  $\Delta M = 1$ , e é possível encontrar o  $dn/dT$  da água e do corante de urucum extraído em água e hidróxido de amônio.

### **2.6.2 - Absorbância**

A absorbância (Abs) de um material é uma grandeza que informa qual a capacidade do composto em absorver luz ao longo de uma faixa de comprimentos de onda eletromagnética. A absorbância de um material é definida matematicamente como:

$$\text{Abs} = \log_{10} (I_0/I) \quad (10)$$

sendo  $I_0$  e  $I$  as intensidades de luz incidente e transmitida, respectivamente. As medidas de espectro de absorbância realizadas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro comercial (Shimadzu UV-3600 UV-Vis-NIR) com caminho óptico de 1 cm (ou 2 mm).

### **2.6.3 – Fluorescência**

Em temperatura ambiente, as moléculas estão, em sua maioria, no nível vibracional e rotacional fundamental, quando irradiadas com fótons de frequências apropriadas, podem absorver energia e passar do estado fundamental para um estado excitado e devido as colisões com outras moléculas, elas retornam ao estado eletrônico fundamental, emitindo fótons [32], analisando a intensidade e o espectro dessa emissão, é possível obter a fluorescência, que é uma propriedade intrínseca da substância.

Para medir o espectro de fluorescência utilizou-se um espectrofotômetro (Varian Cary Eclipse) em temperatura ambiente, com caminho óptico de 1 cm em uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas.

#### **2.6.4 – Difração de raios X (XDR)**

A técnica de difração de raios-X possui fundamento em fenômenos de difração e interferência de ondas eletromagnéticas. A difração ocorre com ondas quando elas encontram um obstáculo ou abertura de dimensões na ordem de grandeza do seu comprimento de onda. A interferência entre duas ondas difratadas pode ser construtiva ou destrutiva a depender da diferença de comprimentos de onda entre elas. [33]

XDR é uma técnica indicada na determinação de fases cristalinas em materiais cerâmicos. Ao incidir um feixe de raios X em um cristal, ele interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração. A análise do material é realizada quando um feixe de radiação difrata na estrutura desconhecida do material investigado, e a medida dos ângulos da difração dos raios possibilita a determinação da distância dos átomos no cristal, fornecendo a estrutura cristalina.

A difração de raios X ocorre segundo a Lei de Bragg (Equação 11), a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram.

$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad (11)$$

Sendo  $n$  o número inteiro,  $\lambda$  o comprimento de onda dos raios X incidentes,  $d$  a distância interplanar, e  $\theta$  o ângulo de difração. Esta técnica pode ser utilizada para estudar a estrutura de muitos materiais. Neste trabalho, foi utilizado o equipamento Shimadzu modelo XDR6000, para a medida de difração de raios X.

#### **2.6.5 – Microscopia de força atômica (AFM)**

A microscopia de força atômica permite gerar imagens da superfície com resolução atômica, permitindo o estudo do topo da amostra em escala nanométrica, não necessitando de estudo prévio da amostra, sendo uma importante ferramenta para a engenharia dos materiais. Neste trabalho foi utilizado o microscópio SPM-9600 Shimadzu Scanning Probe Microscope.

### **2.6.6 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

É uma análise que fornece evidências da presença de grupos funcionais em uma substância, é uma ferramenta importante na investigação da composição de um determinado material, esta técnica espectroscópica baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão, e esta é medida. FTIR é uma técnica importante para caracterização de filmes, solução ou pó e neste trabalho foi utilizado o equipamento PerkinElmer Frontier para a realização das medidas.

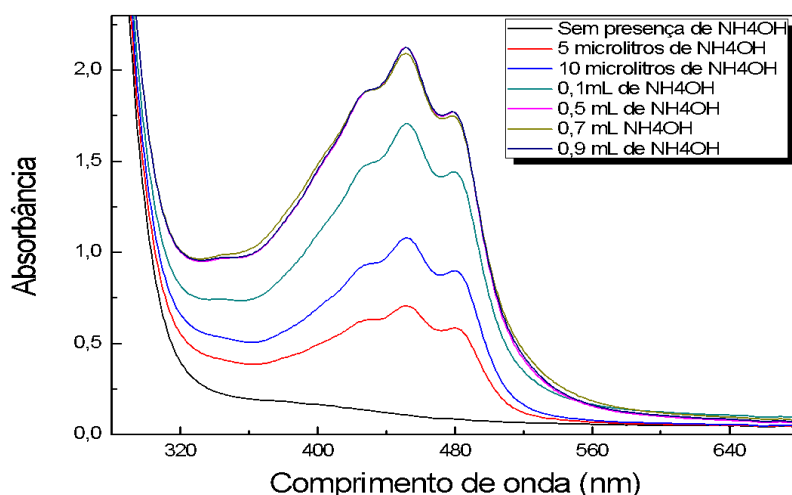


# CAPÍTULO 3

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

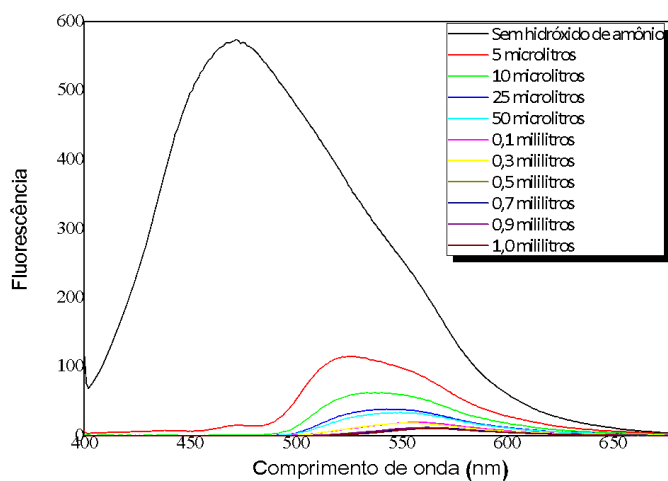
Nas Figuras 10 e 11 são apresentados os espectros de absorvância e fluorescência, respectivamente das soluções de anato extraídas em diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (4M). É possível observar que para baixas concentrações de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , a partir de 0,5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  em 10 mL de solução, as bandas características do corante natural (norbixina) são observadas nas posições 425, 449 e 477 nm, em acordo com a referência [5]. As intensidades dos espectros de fluorescências são dependentes das concentrações de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A maior coloração do corante natural, na extração na presença de hidróxido de amônio, influenciou os resultados das intensidades de fluorescência (Figura 11). Desta forma, a maior quantidade de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , fez com que resultasse na redução da intensidade de fluorescência da amostra, quando excitada em 381 nm, devido à uma maior absorção do corante.

Figura 10 – Absorvância do corante extraído do urucum variando quantidade de hidróxido de amônio.



Fonte: Própria

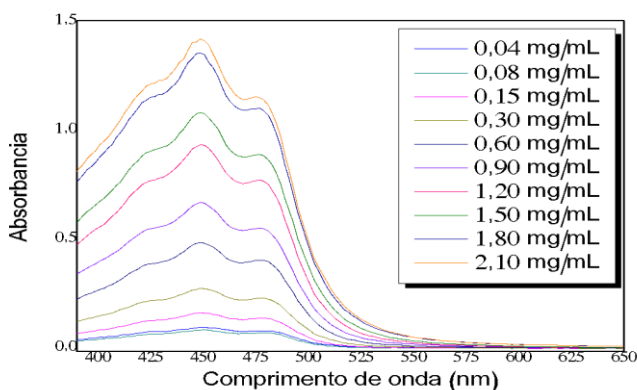
Figura 11 – Fluorescência (em u.a.) do corante extraído do urucum variando quantidade de hidróxido de amônio



Fonte: Própria

Na Figura 12 são apresentados os espectros de absorbâncias para diferentes concentrações de extrações de anato (0.04- 2.1 mg/mL). As medidas de absorbância das amostras em função da concentração apresentaram linearidade, e quanto menor a concentração, menos evidente o primeiro pico de absorção em relação aos demais. Com essa medida foi possível obter o comprimento de absorção dos três picos do corante extraído (Pico 1, 2 e 3). A Figura 12 apresenta o espectro de absorção no UV-vis para o urucum extraído em uma solução de água e hidróxido de amônio (4M). Os máximos de absorção estão localizados em  $(425 \pm 1)$  nm,  $(449 \pm 1)$  nm e  $(477 \pm 1)$  nm nas diversas concentrações.

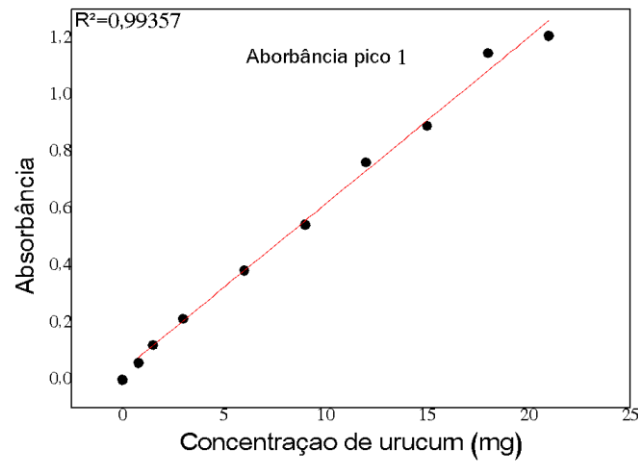
Figura 12 – Absorbância para amostras variando a concentração de urucum



Fonte: Própria

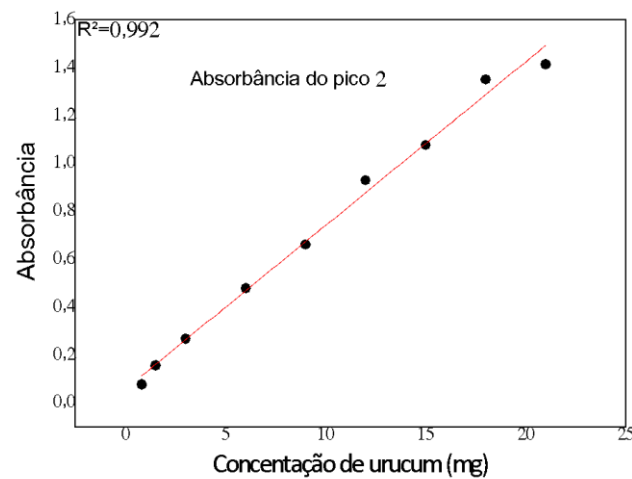
Os espectros de absorvância em função da concentração de urucum apresentaram em cada pico máximo de absorção boa linearidade ( $R^2 = 0.99357-0.99116$ ), não havendo saturação, conforme mostrado nas Figuras 13 (a-c).

Figura 13(a) – Linearidade da absorvância no primeiro pico de absorção (425 nm)



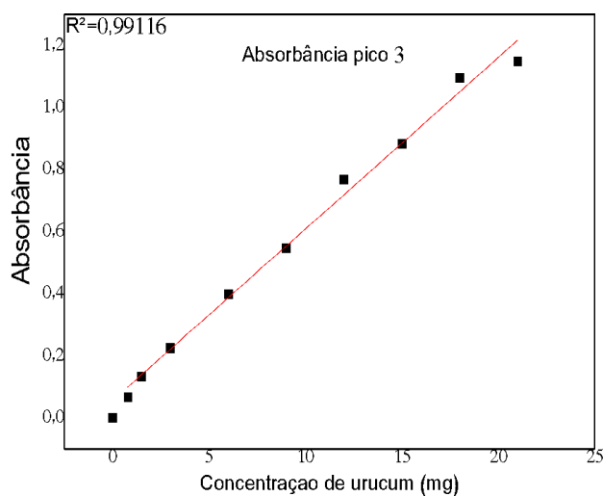
Fonte: Própria

Figura 13(b) – Linearidade da absorvância no segundo pico de absorção (449 nm)



Fonte: Própria

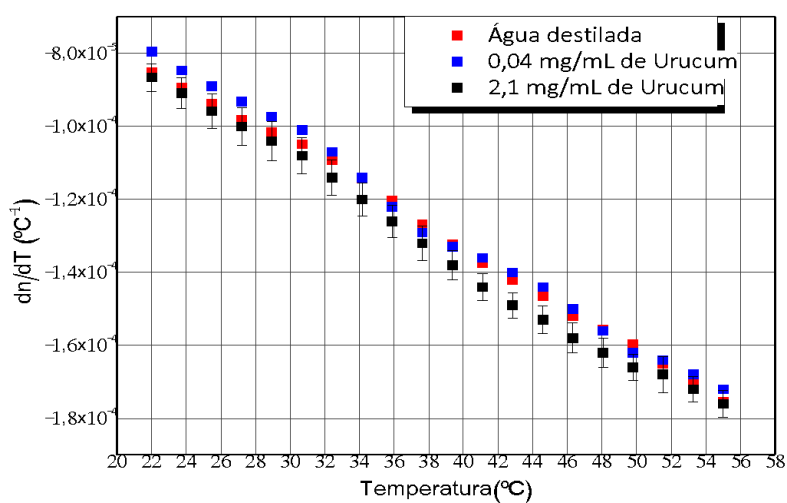
Figura 13(c) – Linearidade da absorbância no terceiro primeiro pico de absorção (479 nm)



Fonte: Própria

Na Figura 14 são apresentadas as medidas de interferometria para a determinação do coeficiente térmico do índice de refração ( $dn/dT$ ) em função da temperatura. É possível observar que a presença do urucum não apresenta modificações significativas nos valores de  $dn/dT$  em função da temperatura, e os valores são próximos dos valores obtidos para a água pura, em acordo com o obtido na literatura [30].

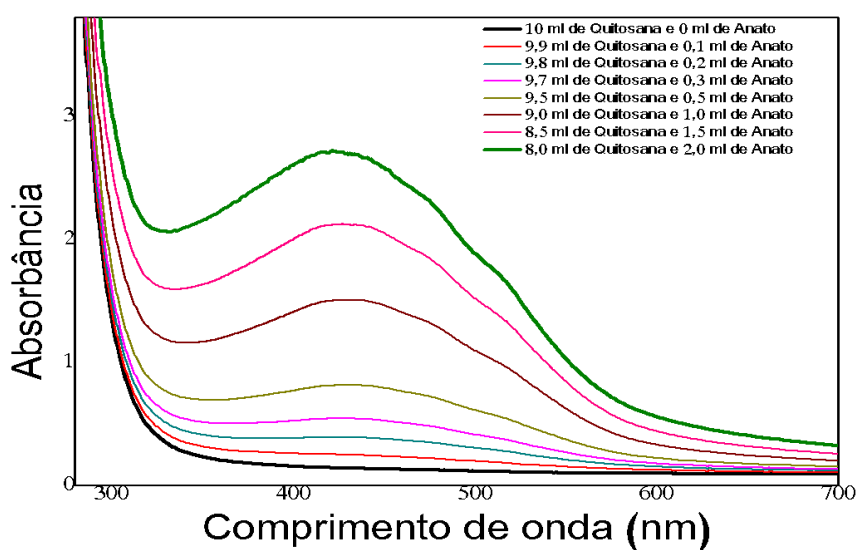
Figura 14 – Medidas de  $dn/dT$  variando a concentração de urucum.



Fonte: Própria

O corante de urucum apresenta uma banda larga de absorção muito intensa, com três picos bem definidos, nos comprimentos de onda de 425 nm, 449 nm e 477 nm. Ao observar a Figura 15, nota-se que a quitosana apresenta uma baixa absorção na mesma região que o urucum. Como o interesse foi analisar o efeito da adição do urucum na matriz de quitosana, é possível verificar na Figura 15, que a banda de absorção da quitosana molda a banda do urucum. Mesmo isso ocorrendo, ainda é possível observar a presença dos picos característicos de absorção do urucum em 425 nm, 449 nm e 479 nm, porém, com menor nitidez. Os espectros de fluorescências são apresentados na Figura 16, e o aumento da concentração de urucum, diminui a intensidade de fluorescência da quitosana.

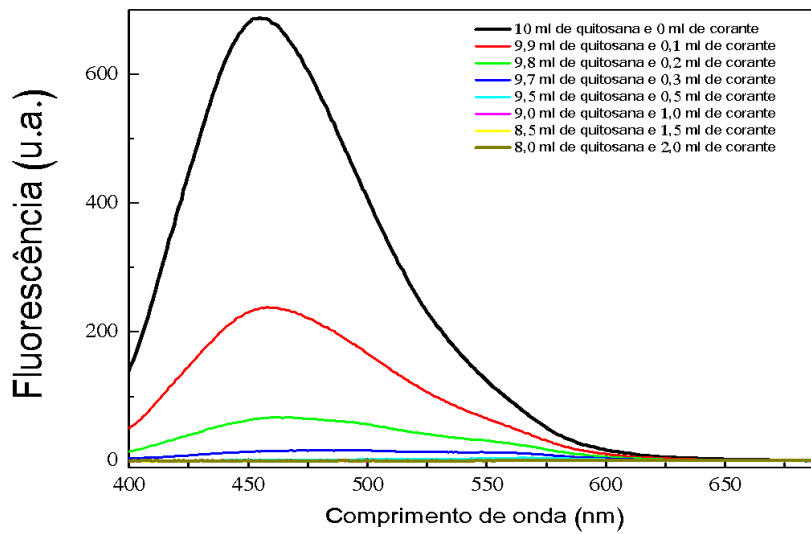
Figura 15- Absorbância das soluções de quitosana e com corante de urucum (L=1 cm).



Fonte: Própria

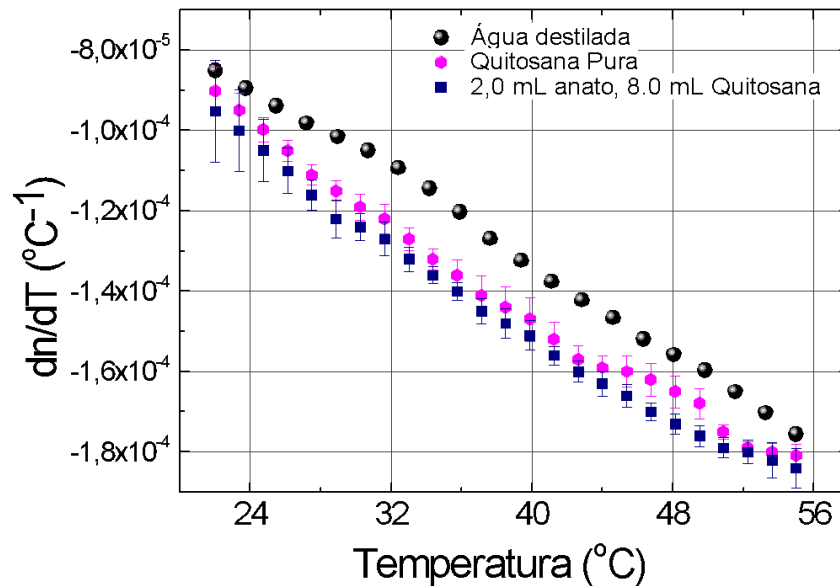
Na Figura 17 são apresentados os resultados de  $dn/dT$  para as soluções de quitosana com e sem anato, vemos que o anato influencia pouco nos resultados de  $dn/dT$  da quitosana em função da temperatura, não oferecendo modificações significativas, embora apresente modificações nos resultados comparado com a água pura.

Figura 16- Fluorescência das amostras de quitosana e com corante de urucum.  
(L= 1 cm).



Fonte: Própria

Figura 17- Medidas de  $dn/dT$  da quitosana e corante inserido na matriz de quitosana.  
(L= 1 mm).



Fonte: Própria

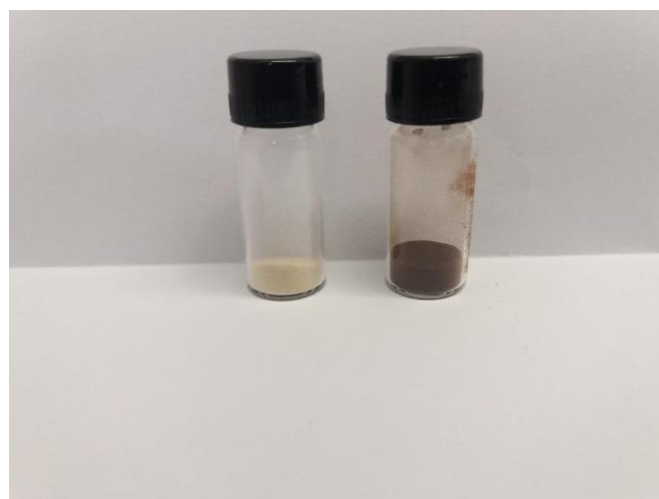
Como segunda etapa deste trabalho, na Figura 18 é apresentado o suporte para cadinho projetado e usinado, com o objetivo de realizar o aquecimento controlado de síntese das amostras de nanopartículas de quitosanas fluorescentes. O pó obtido (Figura 19) foi caracterizado para evidenciar eventual aumento da fluorescência das partículas de quitosana obtidas, e outras caracterizações ópticas necessárias.

Figura 18-Suporte para cadinho projetado e usinado para a preparação de nanopartículas de quitosana



Fonte: Própria

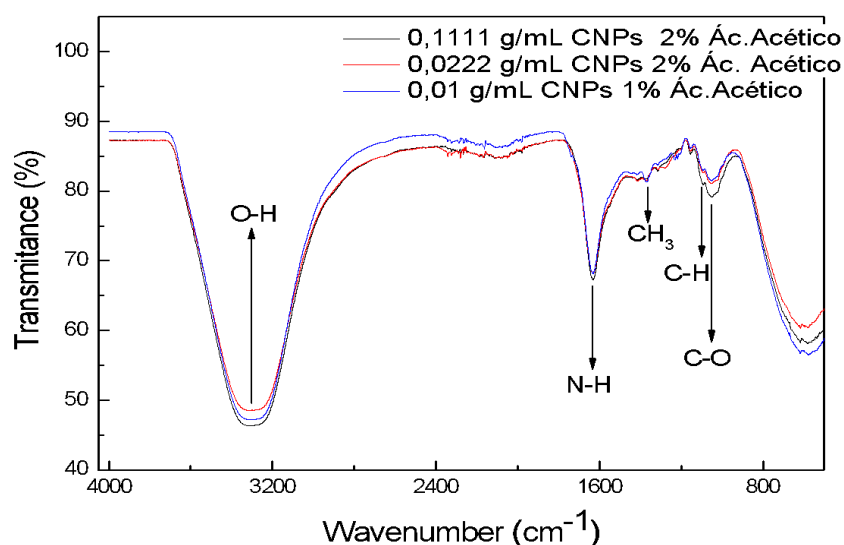
Figura 19- Pó de quitosana antes do tratamento térmico à esquerda e pó de quitosana obtido como resultado preliminar à direita



Fonte: Própria

O pó obtido após o tratamento foi diluído em diferentes concentrações e foi realizada uma medida de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (Figura 20), a mesma medida foi realizada posteriormente também no pó das amostras (Figura 21).

Figura 20 - Medida de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier para amostras de nanopartículas de carbono com diferentes concentrações em meio líquido



Fonte: Própria

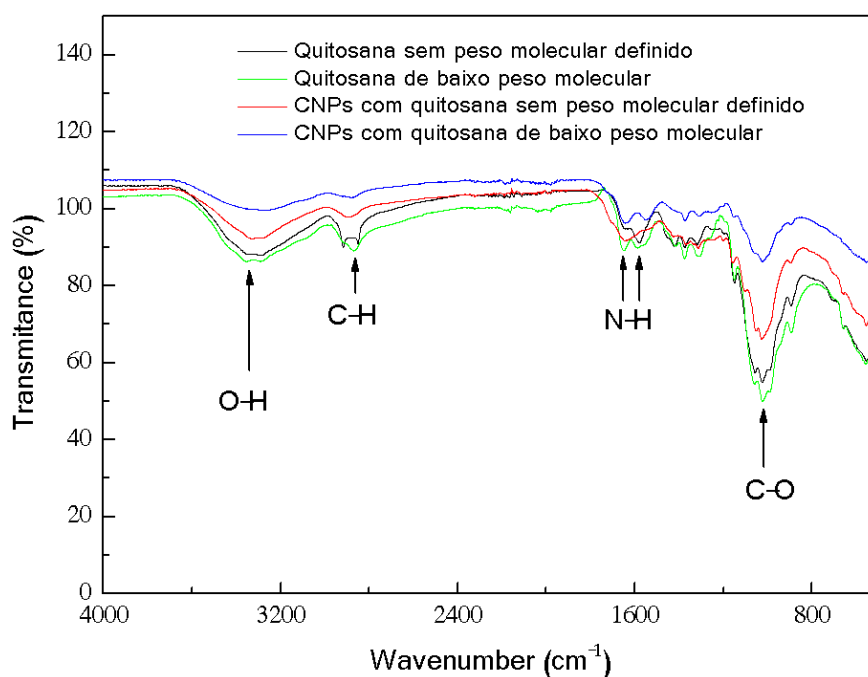
De acordo com a Figura 20, as nanopartículas de quitosana exibem bandas de absorção características de alongamentos O-H de grupos amina em 3448 cm<sup>-1</sup>, vibrações de curvatura N-H em 1662 cm<sup>-1</sup> e vibrações de curvatura C-H do anel de piranose em 1130-1064 cm<sup>-1</sup>. E entre 1091 cm<sup>-1</sup> e 1035 cm<sup>-1</sup> trata-se de um estiramento ligado do grupo funcional hidroxila (C-OH) [10]. Ainda na medida de espectroscopia de infravermelho, a concentração da solução e quantidade de NH<sub>4</sub>OH através da variação da proporção de ácido acético não influenciaram de forma relevante os resultados, apresentando as mesmas bandas nas diferentes amostras.

Na Figura 21 são apresentados os espectros de FTIR das amostras em pó de quitosana. A banda de absorção característica de alongamentos O-H do grupo amina é observado em 3325 cm<sup>-1</sup>, a absorção característica do alongamento C-H vibrações no



intervalo de 2926 a 2850  $\text{cm}^{-1}$ , as vibrações de curvatura N-H em 1652 e 1588  $\text{cm}^{-1}$ , e por último o estiramento ligado do grupo funcional hidroxila (C-OH). Por outro lado, nas partículas após o tratamento térmico, ocorre uma diminuição na adsorção das vibrações de alongamento O-H, C-H e N-H. [10]

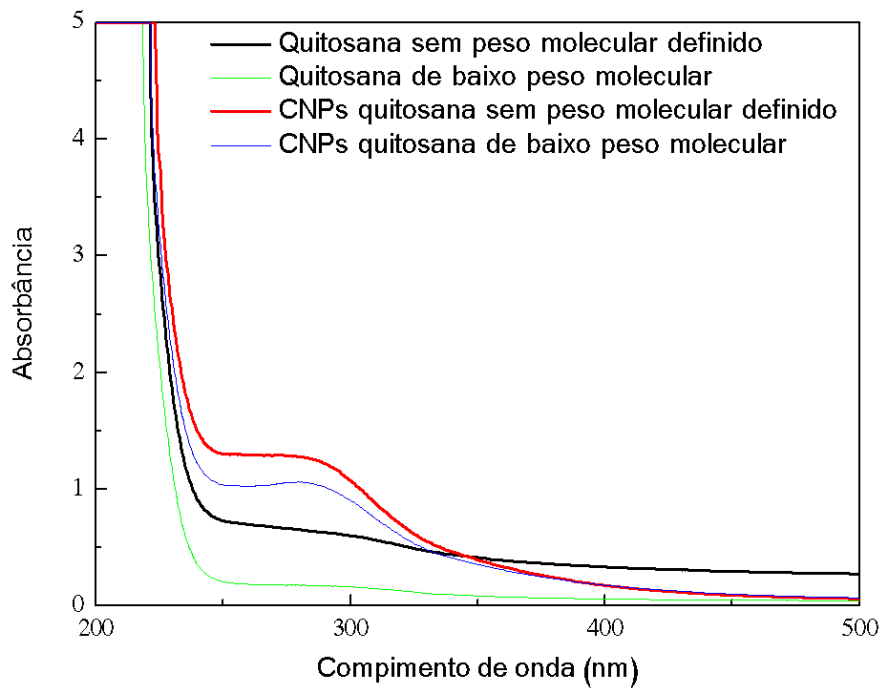
Figura 21 - Medida de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier para amostras de quitosana e nanopartículas de carbono em pó.



Fonte: Própria

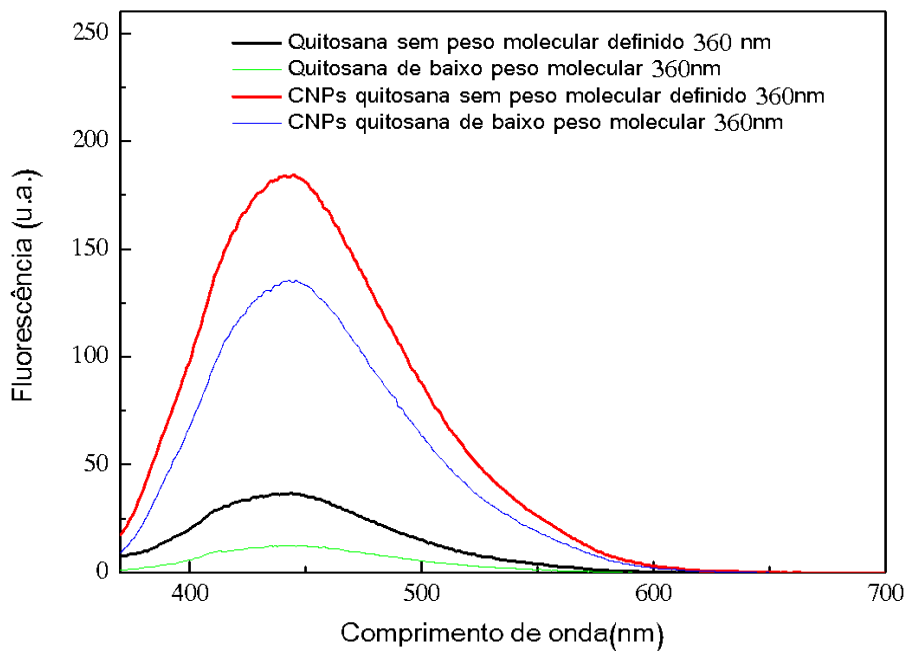
Nas medidas de absorvância (Figura 22) e fluorescência (Figuras 23), foram utilizadas amostras com 0,2 g/mL de concentração à 1% de ácido acético, nessas medidas foi possível notar que o tratamento térmico eleva os valores tanto da fluorescência quanto absorvância, onde temos o pico de absorção nas amostras de nanopartículas, próximo aos 280 nm. O espectro de fluorescência apresentou aumento da intensidade de fluorescência para as amostras submetidas ao tratamento térmico. Desta forma, acredita-se que o procedimento térmico foi bastante eficiente para elevação da fluorescência na região do azul.

Figura 22- Medida de espectroscopia de absorvância das amostras de quitosana com e sem tratamento térmico, com peso molecular definido e com peso molecular não uniforme



Fonte: Própria

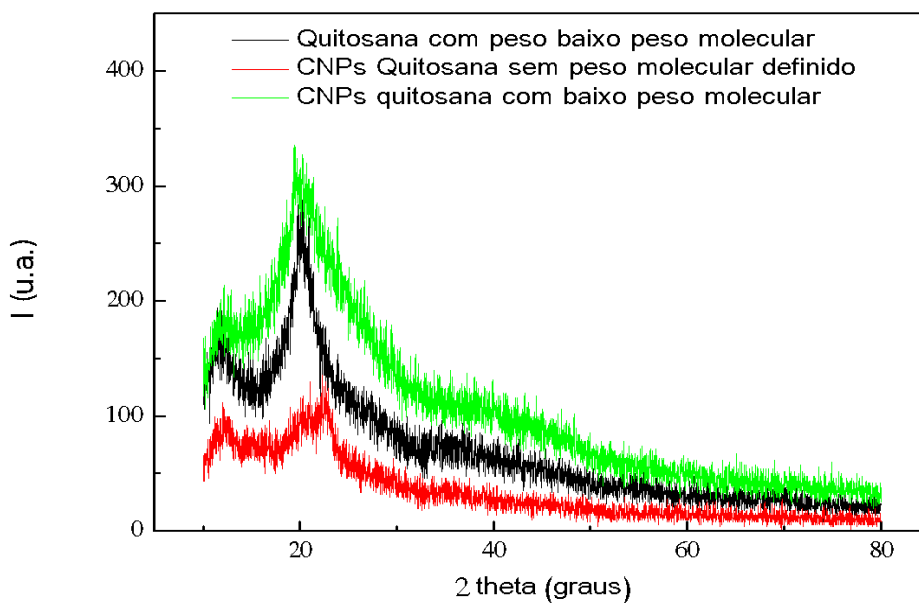
Figura 23- Medida de espectroscopia de fluorescência na quitosana com e sem tratamento térmico (360 nm).



Fonte: Própria

Outra técnica utilizada foi o XDR (Figura 24), essa medida foi realizada na amostra sólida (pó). Concluiu-se que tanto a quitosana antes do tratamento térmico, quanto após, apresentam características amorfas e não cristalinas. Na realização das medidas de XDR, foram utilizados alvo de cobre, tensão de 40 kV e corrente de 30 mA.

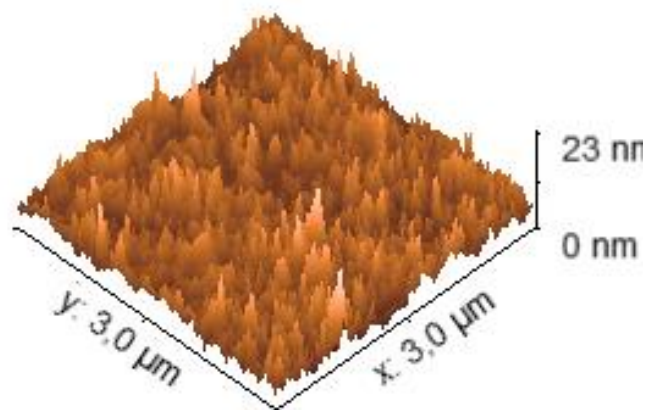
Figura 24- Medida de difração de raios X nas amostras de quitosana com e sem tratamento térmico, com peso molecular definido e com peso molecular não uniforme.



Fonte: Própria

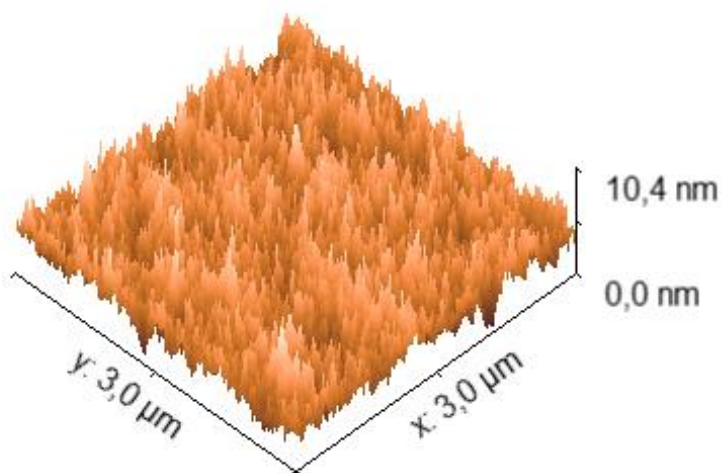
Medidas de AFM também foram importantes para a verificação da topografia da amostra. Na Figura 25 é apresentada a topografia da quitosana sem peso molecular definido em 3D, e na Figura 26 para a amostra de quitosana com peso molecular definido. A amostra de quitosana com peso molecular não uniforme, quando comparada com a medida de quitosana de baixo peso molecular como esperado, apresenta aglomerados e/ou partículas maiores, devido à não uniformidade das partículas. A solução com nanopartículas de quitosana de peso molecular não definido apresentou um filme aparentemente mais fino, com aglomerados mais espaçados que na solução de nanopartículas de quitosana com peso molecular baixo.

Figura 25 - Medida de AFM com quitosana sem peso molecular definido em 3D.



Fonte: Própria

Figura 26 - Medida de AFM em quitosana de baixo peso molecular em 3D.



Fonte: Própria

# CAPÍTULO 4

## CONCLUSÕES

A matriz de quitosana apresenta elevada fluorescência e baixa absorbância, ao contrário do corante de urucum, que apresenta elevada absorbância e baixa fluorescência, com a inserção do corante na matriz de quitosana, ocorre aumento da absorbância, porém os picos característicos do corante do urucum se tornam menos evidentes, devido ao empacotamento.

A presença do corante de urucum não causou mudanças significativas em relação à da água no coeficiente térmico do índice de refração  $dn/dT$ , estando dentro da margem de erro.

O pó de quitosana após tratamento apresentou coloração marrom escura, na absorbância foi possível notar um aumento na absorção, na região dos 280 nm, nas medidas de fluorescência, a amostra após o tratamento térmico também apresentou aumento da intensidade do sinal.

As nanopartículas de quitosana exibiram bandas de absorção características de alongamentos O-H, vibrações de grupos amina, vibrações de curvatura N-H e vibrações de curvatura C-H do anel de piranose e estiramento ligado ao grupo funcional hidroxila C-OH.

Na medida de XRD tanto a quitosana antes do tratamento térmico, quanto após, apresenta característica amorfa e não cristalina. Por outro lado, a topografia das quitosanas antes do tratamento térmico apresentou uma maior quantidade de aglomerados e/ou partículas maiores, já nas amostras após o tratamento térmico, apresentou um filme mais fino com partículas e aglomerados menores e mais espaçados.

Desta forma, o meu trabalho de conclusão contribuiu para minha formação acadêmica, aumentando meu conhecimento; além de auxiliar no domínio de técnicas para a preparação de soluções e caracterizações ópticas de nanomateriais

bioestruturados e biomateriais de maneira geral. Por outro lado, o estudo desses biomateriais representa grande importância para o futuro da sociedade, desde redução da utilização do petróleo em plástico de embalagens, quanto da utilização na biomedicina, no processo de encapsulamento de drogas, com este trabalho pude contribuir muito em relação à otimização da extração de corantes naturais e produção de nanopartículas de quitosana e suas caracterizações utilizando técnicas de baixo custo de síntese.

# Apêndice A

## Abstract de algumas conferências de resultados parciais do trabalho

Spectroscopic and thermo-optical characterization of natural dye extracted from seeds of the tropical shrub *Bixa Orellana* L.: Colorimetric probe application in adulterated food

V. Pilla <sup>1\*</sup>, T. T. S. Santos<sup>1</sup>, L. R. Lourenço<sup>2</sup>, S. R. De Lima<sup>2</sup>, D. N. Messias<sup>1</sup>, A. A. Andrade<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physics, Universidade Federal de Uberlândia –UFU, Av. João Naves de Ávila 2121, CEP 38.400-902, Uberlândia, MG, Brazil

\* email: vivianepilla@ufu.br

### Abstract

Annatto dye is a natural colorant widely used in several applications such as pharmaceuticals, cosmetics, and food purposes <sup>[1-4]</sup>. The fruit of the tropical tree *Bixa Orellana* L. provides the red resin situated in the pericarp of annatto seeds <sup>[5]</sup>. Colorful solutions in the yellow-orange-red range are obtained of the annatto dehydrated seed, and several carotenoids as bixin and norbixin are detected in the dye that is dependent on the extraction method used <sup>[6,7]</sup>. The seeds of the annatto tree are widely used as a source of carotenoids in the extraction of the natural dye <sup>[1-4]</sup>. In this work, spectroscopic and thermo-optical characterizations of annatto aqueous solutions extracted from the seeds of the tropical shrub *Bixa Orellana* L. are presented in the function of the potential of hydrogen (pH) values. The extraction process was performed using alkaline aqueous solution heating (at 98 °C) and without heating. The absorbance and fluorescence spectra were performed using different annatto concentration and pH. Fluorescence spectra are pH-dependent, and fluorescence peak shifts for longer wavelengths when pH changes from basic for alkaline. Thermal Lens (TL) transient measurements <sup>[8,9]</sup> were performed in the mode-mismatched dual-beam (excitation and probe) configuration for thermo-optical characterizations. Thermal diffusivity ( $D$ ) and the absolute nonradiative quantum efficiency ( $\varphi$ ) were measurements by TL, and fluorescence quantum yield ( $\eta$ ) parameters were determined for annatto dye extracted in aqueous solutions in the function of the pH. A single-arm double interferometer <sup>[10]</sup> was used for refractive index temperature coefficient ( $dn/dT$ ) determination.  $\eta$  values obtained for dye extracted in aqueous solutions (without and with heated) were determined and compared with values of others natural dyes <sup>[6]</sup>. Also, the fluorescence spectra of the natural dye were used for application in adulterated milk with different pH values as colorimetric and fluorometric biosensor probe possibility.

### Keywords

Natural Dye; Spectroscopy; Thermal Lens; Fluorescence Quantum Yield; Milk

### References

- [1] Shahid-ul-Islam, L. J. Rather, F. Mohammad, J. Adv. Res. 7 (2016) 499-514.
- [2] K. S. Mala, P. P. Rao, M. B. Prabhavathy, A. Satyanarayana, J. Food Sci. Technol. 52 (2015) 912- 919.
- [3] V. M. Dias, V. Pilla, L. P. Alves, H. P. M. Oliveira, E. Munin, J. Fluoresc. 21 (2011) 415-421.
- [4] L. F. Santos, V. M. Dias, V. Pilla, A. A. Andrade, L. P. Alves, E. Munin, V. S. Monteiro, S. C. Zilio, Dyes Pigm. 110 (2014) 72-79.
- [5] Y. Zhang, Q. Zhong, Food Chem. 139 (2013) 611-616.
- [6] R. D. Snook, R. D. Lowe, Analyst 120 (1995) 2051-2068.
- [7] J. F. M. Domenegueti, A.A. Andrade, V. Pilla, S. C. Zilio, Opt. Express 25 (2017) 313-319.
- [8] S. R. De Lima et al., J. Photochem. Photobiol. B 200 (2019) 111631.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the Brazilian funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais FAPEMIG (APQ-01647-17), CAPES (financial code 001) and Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Fotônica INCT/CNPq for their financial support.

## Optical Characterization of Biomaterials Based on Chitosan and Natural Dyes for Bioapplications

Viviane Pilla<sup>1\*</sup>, Tácio T. S. Santos<sup>1</sup>, Larissa R. Lourenço<sup>1</sup>, Marina Thomaz<sup>1</sup>, Sthanley R. De Lima<sup>1</sup>,  
Andrea Antunes<sup>1</sup>, Djalmir N. Messias<sup>1</sup>, Acácio A. Andrade<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physics, Universidade Federal de Uberlândia –UFU, Av. João Naves de Ávila 2121, 38.400-902,

Uberlândia, MG, Brazil.

\*email: vivianepilla@ufu.br

Chitosan and its derivatives are substances that have been widely studied and used in some areas, for example, agriculture, biomedicine, pharmacy, and environmental protection. This is due to its antifungal, antibacterial, biodegradable, non-toxic and antioxidant properties which meet the needs of various applications [1]. In addition, studies show that several natural dyes as anthocyanin and annatto have strong biochemical and pharmacological activities with various biological effects, including antioxidant actions, antimicrobial and anticarcinogenic [2,3]. This work presents the spectroscopic and thermo-optical characterizations of a natural dye extracted from leaves of *Tradescantia pallida purpurea* and seeds from of the tropical shrub *Bixa orellana* L. [2-4]. The studies were performed on pigments of anthocyanin and annatto extracted in aqueous solutions and other solvents. The thermo-optical parameters, such as fractional thermal load ( $\phi$ ) and quantum yield ( $\eta$ ), were determined using Thermal Lens (TL) or Conical Diffraction (CD) techniques [5]. The refractive index temperature coefficient ( $dn/dT$ ) was measured using a single arm double interferometer [6]. The  $\eta$  results obtained for annatto and anthocyanin solutions were compared to those obtained for other dyes. In addition, this work discusses the preparation of chitosan solutions and films in the presence of natural dyes and their optical characterizations. As preliminary applications, the results of the biomaterials obtained will be discussed in different bioapplications as functional foods, environmental and fungicidal applications.

### References:

- [1] M.N.V.R. Kumar, *React. Funct. Polym.* 46 (2000) 1-27.
- [2] V. Mendes et al. *Dyes Pigm.* 135 (2016) 57-63.
- [3] V.M. Dias et al. *J. Fluoresc.* 21 (2011) 415-421.
- [4] L.F. Santos et al. *Dyes Pigm.* 110 (2014) 72-79.
- [5] S.R. De Lima et al. *J. Lumin.* 197 (2018) 175-179.
- [6] J. F. M. Domenegueti et al. *Opt. Express* 25 (2017) 313-319.

### Acknowledgements:

The authors acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais FAPEMIG (APQ-01647-17), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES (financial code 001) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica INCT/CNPq.



## Spectroscopic Characterization of the Annatto Dye Extracted from Seeds of the Tropical Shrub *Bixa Orellana* L. Embedded in Chitosan Solution

Viviane Pilla<sup>1\*</sup>, Tácio T. S. Santos<sup>1</sup>, Djalmir N. Messias<sup>1</sup>, Acácio A. Andrade<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Group of Optical and Thermal Properties of Materials, Institute of Physics, Universidade Federal de Uberlândia-UFU, Av. João Naves de Ávila 2121, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil

\* vivianepilla@ufu.br

### Abstract

Annatto is an important source of natural dye used in several bioapplications, due to the dye potential for the human health, and possible protection of cells and tissues [1,2]. The red resin of the pericarp of annatto seeds derived from the fruit of the tropical tree *Bixa Orellana* L. is the main substance which is responsible for the dye characteristics from the yellow-orange-red range [1,2]. Several carotenoids are detected in annatto seeds, the intense red coloration indicates the presence of bixin, and when the color is close to yellow, the norbixin structure is predominant [1,2]. In this work, the process of the annatto dyes extractions in aqueous solutions was optimized in aqueous solutions. Spectroscopic and thermo-optical characterizations were performed in annatto dye extract at different concentrations (0.08-2.1) g/L. The refractive index temperature coefficient ( $dn/dT$ ) was measured using a single arm double interferometer [3]. Natural dye extracted was homogenized in a matrix of chitosan, which is a non-toxic, biodegradable, biocompatible, bactericidal and renewable polymer [4,5]. The spectroscopic characterization of annatto was performed in different concentrations in solution of the chitosan for possible bioapplication.

### References

- [1] V.M. Dias, V. Pilla, L.P. Alves, H.P.M. Oliveira, E. Munin, J. Fluoresc. 21 (2011) 415-421.
- [2] L.F. Santos, V.M. Dias, V. Pilla, A.A. Andrade, L.P. Alves, E. Munin, V.S. Monteiro, S.C. Zilio, Dyes Pigm. 110 (2014) 72-79.
- [3] J. F. M. Domenegueti, A. A. Andrade, V. Pilla, S. C. Zilio, Opt. Express 25 (2017) 313-319.
- [4] M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H. J. Park, Int. J. Food Microbiol. 144 (2010) 51-63.
- [5] A. Domard, Carbohydr. Polym. 84 (2011) 696-703.

### Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais FAPEMIG (APQ-01647-17), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica INCT/CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANGELUCCI, E; Corantes para alimentos: legislação brasileira. **Corantes para alimentos**. Campinas. p.1, 1988.
- [2] BAFANA, A; DEVI, S.S; CHAKRABARTI, T; Azo dyes: past, present and the future. **Environmental Reviews**, v. 19, p. 350, 2011.
- [3] CONTO, W. L. do, et al, **Estudos econômicos de alimentos processados**. Campinas: IATL – Instituto de tecnologia de alimentos, p. 65, 1991.
- [4] MARMION, D. M. Handbook of US Colorants, food, drugs, cosmetics and medical devices. 3. ed., **John Wiley & Sons**, 1991.
- [5] SANTOS, L. F. et al, Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Applications in functional foods. **Dyes and Pigments**, v. 110, p. 72, 2014. Disponível em: <http://www.ifsc.usp.br/~fotonica/pdfs/2014/Dyes%20and%20pigments.pdf>. Acesso em 22/10/2018.
- [6] COLLINS, P; PLUMBY, J; Natural colors: stable future? **Food tech Europe**, v. 49, p. 64, 1995.
- [7] PILLA, V. et al, Self-Induced Phase Modulation for Thermo-Optical Characterization of Annatto Extracted Using Different Solvents, **Applied Spectroscopy**, v. 65, p. 1393, 2011.
- [8] DIAS V. M. et al, Optical Characterization in Annatto and Commercial Colorific. **Journal of Fluorescence**, v. 21, p. 415, 2011.
- [9] SILVA, C.A.N; BRAGA, S.F.P; SILVA, A.G; Urucum, *Bixa orellana L.* (Bixaceae) - um agente importante na regulação de dislipidemias. **Natureza on line**, v. 4, p. 72, 2006.
- [10] SOUZA, H. et al, Ultrasound-assisted preparation of size-controlled chitosan nanoparticles: Characterization and fabrication of transparent biofilms. **Food Hydrocolloids**. v. 31, p. 227, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/food-hydrocolloids/vol/31>. Acesso em 18/11/2018.
- [11] AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 27, 2007. Disponível em: <http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/viewFile/46/81>. Acesso em 19/11/2018.
- [12] LIU, Y. et al, One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan. **ChemComm**, v. 48, p. 380, 2012. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cc/c1cc15678k#!divAbstract>. Acesso em 19/04/2020
- [13] DABBY, F. W. et al, Thermally Self – induced Phase Modulation of Laser Beams. **Applied Physics Letters**, v. 16, p. 362, 1970.
- [14] DURBIN, S. D; ARAKELIAN, S. M; SHEN, Y. R; Laser-induced diffraction rings from a nematic-liquid-crystal film. **Optics Letters**. v. 6, p. 411, 1981.

- [15] ONO, H; KAWATSUKI, N; Self-Phase Modulation Induced by a He-Ne Laser in Host-Guest Liquid Crystals with Different Nematic – Isotropic Transition Temperatures. **The Japan Society of Applied Physics**, v. 36, p. 353, 1997.
- [16] PILLA, V; MUNIN, E; GESUALDI, M. R. R; Measurement of the thermo – optic coefficient in liquids by laser – induced conical diffraction and thermal lens techniques. **Journal of Optics A: Pure and Applied Optics**, v. 11, p. 105201, 2009. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/aea7/794c639484e920edb6485a2dd4ead7bcc939.pdf>. Acesso em 13/11/2018.
- [17] CARVALHO, P. R. N.; CARVALHO, C. R. L.; MANTOVANI, D. M. B. Estudo da composição de sementes, cachopas, folhas e galhos do urucueiro. In. **Seminário Internacional de Corantes Naturais para Alimentos**, Campinas – SP, p. 317, 1991.
- [18] FRANCO, C. F. O. et al, Urucum: agronegócio de corantes naturais. **EMEPA**. João Pessoa. 2002.
- [19] RIBANI, R. H.; DEMCZUK, B.; Atualidades sobre a química e a utilização do urucum (Bixa orellana L.). **Revista brasileira de pesquisa em alimentos**, Campo Mourão – PR.
- [20] LIMA, L. R. P. et al, Bixina, Norbixina e Quercitina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 196. 2001.
- [21] SILVA, P.I.; NACHTIGALL, A.M.; STRINGHETA, P.C.; Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenoides presentes no urucum (Bixa orellana L.). **[Edição especial]. Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, p. 1892. 2009. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542009000700033](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542009000700033). Acesso em 08/12/2020.
- [22] STRINGHETA P. C., SILVA P. I.; **Pigmentos de urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações**, Viçosa, 2008.
- [23] PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D.; Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, n. 5, p. 47, 1980.
- [24] BOON, C.S., MCCLEMENTS, D.J., WEISS, J. & DECKER, E.A.; Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 515, 2010.
- [25] RATHKE, T. D.; HUDSON, S. M.; Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. **Journal Macromolecules Science**, v. 34, p. 375, 1994.
- [26] ASSIS, O. B. G.; VALMIR, L. S.; Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros [online]**. São Carlos, v. 13, p. 223, 2003. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010414282003000400006&lng=pt&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010414282003000400006&lng=pt&tlng=pt). Acesso em 05/12/2020.
- [27] SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; Características e Propriedades de Quitosanas Purificadas nas Formas Neutra, Acetato e Cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. São Carlos, v. 11, p. 58, 2001. Disponível em <https://www.scielo.br/pdf/po/v11n2/6154.pdf>. Acesso em 10/12/2020

- [28] SARKAR, R. et al. Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application. **The Journal of Physical Chemistry**. v. 113, p. 18546, 2009.
- [29] MASSARANI, G.; PASSOS, M. L.; BARRETO, D. W. Production of annatto concentrates in spouted beds. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, n. 70, p. 954, 1992.
- [30] DOMENEGUETI, J.F.M.; et al. Simultaneous measurement of thermo-optic and thermal expansion coefficients with a single arm double interferometer. **Optics Express**, v. 25, p. 313, 2017.
- [31] LIMA, S. R. DE et al. Fluorescence quantum yield determination of molecules in liquids by thermally driven conical diffraction. **Journal of Luminescence**, v. 197, p. 175, 2018.
- [32] PAVONI, J.F. et al. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 36, p. 4501, 2014.
- [33] HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J.; **Fundamentos de Física 4**. 6. ed. Rio de Janeiro, 2003.