

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ANDERSON CLAYTON DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA E APLICAÇÃO DE
MICROCRISTAIS DE CURCUMINA EM CENOURA
MINIMAMENTE PROCESSADA**

DISSERTAÇÃO

**CAMPO MOURÃO
2016**

ANDERSON CLAYTON DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA E APLICAÇÃO DE
MICROCRISTAIS DE CURCUMINA EM CENOURA
MINIMAMENTE PROCESSADA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lívia Bracht

CAMPO MOURÃO
2016



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA E APLICAÇÃO DE MICROCRISTAIS DE CURCUMINA EM CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADA

Por

ANDERSON CLAYTON DA SILVA

Essa dissertação foi apresentada às catorze horas, do dia vinte e cinco de abril de dois mil e dezesseis, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____

Pro. Dr. Odinei Hess Gonçalves (Orientador – PPGTA)

Pro. Dra. Luciana Furlaneto Maia (Membro Interno – PPGTA)

Pro. Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencourt (Membro Externo – UTFPR – Câmpus Medianeira)

RESUMO

A curcumina é um composto fenólico natural isolado a partir do rizoma do açafrão da Índia (*Curcuma longa*) que apresenta uma série de propriedades biológicas, incluindo a ação antimicrobiana. Sua baixa afinidade pela água pode ser contornada pelo aumento da área superficial através de nanoencapsulação ou na sua transformação em microcristais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de curcumina-poli(vinil pirrolidona) e de microcristais de curcumina. Para a curcumina *in natura* e para as nanopartículas, foi utilizada a técnica de diluição em ágar frente a bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*). Os microcristais de curcumina foram utilizados na produção de cenoura minimamente processada como método de conservação em relação a microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes totais. As nanopartículas foram caracterizadas em relação à distribuição de tamanhos, eficiência de encapsulação, propriedades térmicas e interações entre a curcumina e a poli(vinil pirrolidona) através de Espectroscopia de Infravermelho. Foram encontrados altos valores de eficiência de encapsulação, sendo corroborados pelo desaparecimento do pico de fusão da curcumina nos ensaios térmicos bem como do pico de absorção de infravermelho em cerca de 3508 cm^{-1} , característico da curcumina. A curcumina *in natura* apresentou atividade antimicrobiana em concentrações de 250 a $500\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, dependendo do microrganismo avaliado. As nanopartículas de curcumina não apresentaram atividade antimicrobiana na faixa de concentrações avaliada, possivelmente devido à formação de ligações de hidrogênio com a poli(vinil pirrolidona). Microcristais de curcumina apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) da inibição de bactérias mesófilas, psicrotróficas e coliformes totais em cenoura minimamente processada.

Palavras-chave: *Curcuma longa*; Encapsulação; PVP; Precipitação em não solvente; Concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

Curcumin is a phenolic, natural compound isolated from *Curcuma longa* which presents many biological properties including antimicrobial activity. Its low water affinity can be improved by increasing total surface area by either encapsulation or micronization. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of curcumin-polyvinylpyrrolidone nanoparticles and curcumin microcrystals. In the case of *in natura* curcumin and curcumin nanoparticles, the agar dilution technique was used against Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-positive (*Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) bacteria. Curcumin microcrystals were used as a preserving agent in the production of minimally processed carrots and the evaluated parameters were mesophilic and psychrotrophic bacteria and total coliforms. Nanoparticles were characterized for sizes distribution, encapsulation efficiency, thermal properties and chemical interactions between curcumin and polyvinylpyrrolidone by infrared spectroscopy. High encapsulation efficiency was found in accordance with the disappearance of the fusion peak of curcumin and the infrared absorption band at 3508 cm^{-1} related to the phenolic group. *In natura* curcumin presented antimicrobial activity in concentrations from 250 to $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ depending on the microorganism. Curcumin nanoparticles did not present activity in the evaluated concentration range, possibly due to the hydrogen bonds formed between curcumin and polyvinylpyrrolidone. Curcumin microcrystals were able to significantly inhibit mesophilic and psychrotrophic bacteria and total coliforms in the minimally processed carrots.

Keywords: *Curcuma longa*; encapsulation; PVP; precipitation in non-solvent; minimum inhibitory concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Estrutura química dos curcuminóides	13
Figura 2 – Estrutura química da curcumina e do PVP.....	17
Figura 3 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas PVP-Curcumina.....	23
Figura 4 – Termogramas da mistura física entre PVP e curcumina, do PVP puro, da curcumina in natura e das nanopartículas de PVP-curcumina.....	24
Figura 5 –Espectros de infravermelho para a curcumina in natura, PVP, nanopartículas de PVP-Curcumina e para a mistura física entre curcumina e PVP.	25
Figura 6 –Nanopartículas de curcumina (esquerda) e curcumina <i>in natura</i> dispersas em água destilada.	27
Figura 7 – Nanopartículas de curcumina diluídas em ágar em diferentes concentrações da esquerda para direita (1000 a 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).	27
Figura 8 - Inibição percentual da curcumina in natura em relação aos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.....	28
Figura 9 – Microcristais de curcumina e curcumina in natura dispersas em água, registrados em microscópio óptico (Ampliação: 400x).	35
Figura 10 –Curvas de temperatura obtidas para curcumina livre e microcristais de curcumina em DSC.....	36
Figura 11 – Espectros de infravermelho para a curcumina in natura e para os microcristais de curcumina.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupamentos e bandas características da curcumina.	26
Tabela 2 – Grupamentos e bandas características do PVP.	26
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima CIM de curcumina in natura e das nanopartículas.....	28
Tabela 4 – Contagem de microrganismos mesófilos para as cenouras minimamente processadas tratadas com os microcristais de curcumina e para o controle.	38
Tabela 5 – Contagem de microrganismos psicrotróficos para as cenouras minimamente processadas tratadas com os microcristais de curcumina e para o controle.....	39
Tabela 6 – Contagem de Coliformes Totais (35°C) para as cenouras minimamente processadas tratadas com os microcristais de curcumina e para o controle.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH – Ágar Muller Hinton

B. cereus – *Bacillus cereus*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CMH – Caldo Muller Hinton

Cur. – Curcumina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Differential Scanning Calorimetry

Dz – Diâmetro médio

E. coli – *Escherichia coli*

EMB - Eosin Methylene Blue

FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

IPD – Índice de Polidispersão (adimensional)

MYP – Mannitol Egg Yolk Polymyxin

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

PCA – Plate Count Agar

PVP – Poli(vinil pirrolidona)

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

UATR –Universal Attenuated Total Reflectance

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UV-Vis – Ultra-Violeta Visível

5.1.5	Concentração real de microcristais de curcumina na cenoura minimamente processada	34
5.1.6	Análises microbiológicas da cenoura minimamente processada.....	34
5.1.7	Análise Estatística	35
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.2.1	Caracterização dos microcristais de curcumina	35
5.2.2	Análise microbiológica da cenoura minimamente processada	37
5.3	CONCLUSÕES.....	41
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	42
7.	REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos relatos na literatura sobre a diversidade de atividades biológicas apresentadas pela curcumina, sua aplicação como aditivo alimentar é limitado pela sua baixa solubilidade em água. Por meio de técnicas como a encapsulação e a micronização é possível melhorar sua solubilidade e sua capacidade de ser dispersada, permitindo a formulação de alimentos contendo curcumina.

A atividade antimicrobiana da curcumina é de interesse da indústria de alimentos, pois a contaminação e deterioração por microrganismos ainda não é um problema que está totalmente sob controle, apesar dos vários métodos de conservação disponíveis. A procura por conservantes naturais não tóxicos também tem crescido, devido aos relatos de efeitos prejudiciais de conservantes químicos sintéticos.

A presente Dissertação foi elaborada a fim de apresentar uma breve introdução Capítulo 1, seguida dos objetivos geral e específicos no Capítulo 2. A revisão bibliográfica é apresentada no Capítulo 3 abordando os temas relevantes para todo o trabalho. A seguir, a metodologia e os resultados são divididos em duas partes: na primeira (Capítulo 4) são apresentados os resultados relativos à produção e caracterização da curcumina nanoencapsulada em poli(vinil pirrolidona) e a atividade antimicrobiana dessas nanopartículas comparada à da curcumina *in natura*. Na segunda parte (Capítulo 5), são apresentados os resultados referentes à produção de microcristais de curcumina e aplicação destes microcristais em cenoura minimamente processada a fim de avaliar sua capacidade de conservação frente aos microrganismos mesófilos aeróbios, microrganismos psicrotróficos e coliformes totais. Por fim, as conclusões gerais do trabalho e as referências bibliográficas são apresentadas no Capítulos 6 e 7, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana da curcumina tanto na forma de microcristais quanto na forma nanoencapsulada em poli(vinil pirrolidona).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Produzir nanopartículas de curcumina e poli(vinil pirrolidona) (PVP) pela técnica de complexação;
- ✓ Produzir microcristais de curcumina pela técnica de precipitação em não solvente sem estabilizantes;
- ✓ Caracterizar as nanopartículas em relação ao tamanho, eficiência de encapsulação, propriedades térmicas (Calorimetria Diferencial de Varredura) e interações químicas (Espectroscopia de Infravermelho);
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana da curcumina *in naturae* das nanopartículas contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) por meio da técnica de diluição em ágar;
- ✓ Aplicar os microcristais de curcumina em cenoura minimamente processada
- ✓ Avaliar a capacidade antimicrobiana dos microcristais de curcumina frente às bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis, psicrotróficas e coliformes totais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Curcumina

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil -1,6-heptadieno-3,5-diona) é um composto fenólico hidrofóbico natural extraído do rizoma do açafrão da Índia (*Curcuma longa* L.) pertencente à família Zingiberaceae e utilizado há muito tempo como corante alimentar natural de cor amarela-alaranjado (ANAND et al., 2007; FENG; SONG; ZHAI, 2012; HAN; YANG, 2005; KAEWNOPPARAT et al., 2009; KUMAVAT et al., 2013).

O açafrão da Índia tem em sua constituição química a mistura de curcuminóides derivados da cúrcuma em proporções variadas. A composição média dos diferentes curcuminóides presente na *Curcuma longa* apresentam em torno de 5,69% do rizoma em pó em peso seco, a curcumina se apresenta em torno de 2,86%, a demetoxicurcumina em 1,47% e a bisdemetoxicurcumina 1,36% (LI et al., 2011). As estruturas dos curcuminóides podem ser observadas na Figura 1.

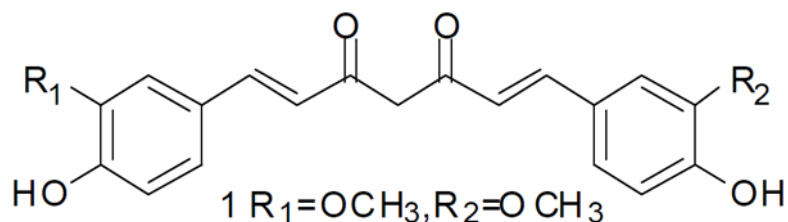


Figura 1 –Estrutura química dos curcuminóides

Curcumina: R₁ = OCH₃; R₂ = OCH₃

Demetoxicurcumina: R₁ = OCH₃; R₂ = H

Bisdemetoxicurcumina: R₁ = H; R₂ = H

Fonte: adaptada de (LI et al., 2011)

A curcumina tem uma longa história na tradição asiática, mais notadamente a chinesa e indiana, devido às suas inúmeras atividades biológicas (KUMAVAT et al., 2013; SHLAR et al., 2015). Diversos estudos têm comprovado uma grande variedade de propriedades, como efeitos antiproliferativo (DUBEY et al., 2008; PARVATHY; NEGI; SRINIVAS, 2009), antiprotozoário (GOVINDARAJ; KANDASUBRAMANIAN; KODAM, 2014; LAL et al., 2013), anti-séptico (DUVOIX; BLASIUS; DELHALLE, 2005), quimiopreventivo (DUVOIX; BLASIUS; DELHALLE, 2005; GOVINDARAJ; KANDASUBRAMANIAN; KODAM, 2014), anti-inflamatório (ANAND et al., 2007; DUVOIX; BLASIUS; DELHALLE, 2005; FENG; SONG; ZHAI, 2012;

GOVINDARAJ; KANDASUBRAMANIAN; KODAM, 2014; HAN; YANG, 2005; KHAN; RATHOD, 2014; LAL et al., 2013), antioxidante (ANAND et al., 2007; CARVALHO et al., 2015; DUVOIX; BLASIUS; DELHALLE, 2005; FENG; SONG; ZHAI, 2012; GOVINDARAJ; KANDASUBRAMANIAN; KODAM, 2014; KHAN; RATHOD, 2014; LAL et al., 2013; PARVATHY; NEGI; SRINIVAS, 2009), anti-Alzheimer, anti-HIV, antimutagênio, anti-malária, anti-diabetes (LAL et al., 2013), anticancerígeno (ANAND et al., 2007; DUBEY et al., 2008; FENG; SONG; ZHAI, 2012; HAN; YANG, 2005; KHAN; RATHOD, 2014; LAL et al., 2013; PARVATHY; NEGI; SRINIVAS, 2009), antiamilóide (FENG; SONG; ZHAI, 2012), anti-úlceras, imunomodulador, neuroprotetor, (KHAN; RATHOD, 2014), cicatrizante (DUBEY et al., 2008; KHAN; RATHOD, 2014; LAL et al., 2013), antienvelhecimento (DUBEY et al., 2008; KHAN; RATHOD, 2014) e por fim, a atividade antimicrobiana (ANAND et al., 2007; DUBEY et al., 2008; FENG; SONG; ZHAI, 2012; GOVINDARAJ; KANDASUBRAMANIAN; KODAM, 2014; HAN; YANG, 2005; HU; HUANG; CHEN, 2013; LAL et al., 2013; MUN et al., 2013; PARVATHY; NEGI; SRINIVAS, 2009).

3.2 Atividade antimicrobiana da curcumina

O mecanismo de ação da curcumina não se encontra completamente elucidado, contudo supõem-se que sua atividade antimicrobiana esteja relacionada com a interação da curcumina com a proteína FtsZ do citoesqueleto bacteriano. O citoesqueleto bacteriano é necessário para o crescimento e divisão celular de algumas bactérias. A proteína FtsZ é uma proteína envolvida na divisão celular de algumas bactérias e a primeira proteína a aparecer no local da divisão. Ela está presente em quase todas as espécies procariontes estudadas e também é essencial para a divisão dos cloroplastos e mitocôndrias, em alguns eucariontes. Experimentos de imunolocalização demonstraram que em algumas bactérias, a FtsZ sofre polimerização para formar uma estrutura de anel dinâmico conhecido como o anel Z (KAUR et al., 2010; RAI et al., 2008).

Existem indícios de que os grupamentos metoxila e hidroxila da curcumina sejam os responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (FUJIKAWA et al., 1969; GOTOH; SAITOH; MIYAKE, 1998; HAN; YANG, 2005; TESAKI et al., 1998). De fato, um experimento de *docking* molecular demonstrou que os oxigênios das funções fenol e metoxila (ligados aos anéis fenólicos) e dos dois grupos carbonila da curcumina formam

pontes de hidrogênio com os sítios catalíticos da proteína FtsZ impedindo a polimerização desta proteína, dificultando a divisão celular bacteriana para cepas testas de *Bacillus subtilis* e *E. coli* (KAUR et al., 2010).

A propriedade antimicrobiana da curcumina tem sido demonstrada em uma ampla gama de microrganismos. A literatura relata que a curcumina em sua forma *in natura* apresenta atividade antimicrobiana para *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae* (BHAWANA et al., 2011; DUBEY et al., 2008; HAN; YANG, 2005; HU; HUANG; CHEN, 2013; LIU; HUANG, 2012; MUN et al., 2013; PARVATHY; NEGI; SRINIVAS, 2009; RAI et al., 2008).

Quando microencapsulada por atomização, utilizando-se como matriz encapsulante amido e gelatina dissolvidas em acetona, apresentou atividade para *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* e *Saccharomyces cerevisiae* (WANG et al., 2009).

Alguns autores descrevem sua atividade na forma de nanocristais dispersos em água, conseguindo inibir os seguintes microrganismos: *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *A. niger* e *P. notatum* (BHAWANA et al., 2011). Complexos de curcumina e cobalto foram capazes de inibir *E. coli* (HATAMIE et al., 2012). Quando aplicada em filmes, inibiu *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *Klebsiella pneumonia* (GOVINDARAJ; KANDASUBRAMANIAN; KODAM, 2014).

O derivado glicosídeo da curcumina é antimicrobiano para os microrganismos *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *Y. enterocolitica* (PARVATHY; NEGI; SRINIVAS, 2009), enquanto os derivados bioativos da curcumina inibiram *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus*, *Klebsiella aeruginosa*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *P. notatum*, *Aspergillus fumigatus* (DUBEY et al., 2008), e combinadas com sulfanamidas impediram o desenvolvimento de *S. aureus*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride*, *Curvularia luneta* (LAL et al., 2013).

Santos (2015) obteve microcristais de curcumina por precipitação em não solvente sem o uso de estabilizantes, gerando cristais micrométricos com formato de espículas. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de diluição em ágar Muller Hinton e comparada com a curcumina em pó *in natura*, encontrando concentrações inibitórias mínimas para o microcristais de curcumina de 125 µg.ml⁻¹ para *B. cereus*, e de 250 µg.ml⁻¹ para *S. aureus* (ambas Gram-positivas) e 125 µg.ml⁻¹ para *E.coli* e *P. aeruginosa* (ambas

Gram-negativas). A autora relatou a melhora na dispersão dos cristais em água comparado com a curcumina *in natura*, o que sugere que o seu uso em formulações aquosas de alimentos seja possível sem o auxílio de dispersantes adicionais.

3.3 Técnicas para a modificação da curcumina: nanoencapsulação e obtenção de microcristais

Apesar do crescente interesse sobre a curcumina, as suas aplicações práticas são limitadas devido à sua baixa solubilidade em água e sensibilidade diante de condições alcalinas, tratamentos térmicos, luz, íons metálicos, enzimas, oxigênio, ácido ascórbico, entre outros (PARADKAR et al., 2004; PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011a). A curcumina é, portanto, um candidato promissor para o desenvolvimento de novos materiais naturais encapsulados (SHLAR et al., 2015). Foi demonstrado que o uso da curcumina na forma de nanopartículas é uma alternativa para minimizar as dificuldades advindas da sua hidrofobicidade (ANAND et al., 2007; FENG; SONG; ZHAI, 2012; PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011a). A encapsulação tem sido descrita na literatura como uma forma de aumentar sua eficácia terapêutica, biodisponibilidade e estabilidade química e física da curcumina e de inúmeros outros fármacos e compostos em geral (BHAWANA et al., 2011; YEN et al., 2010).

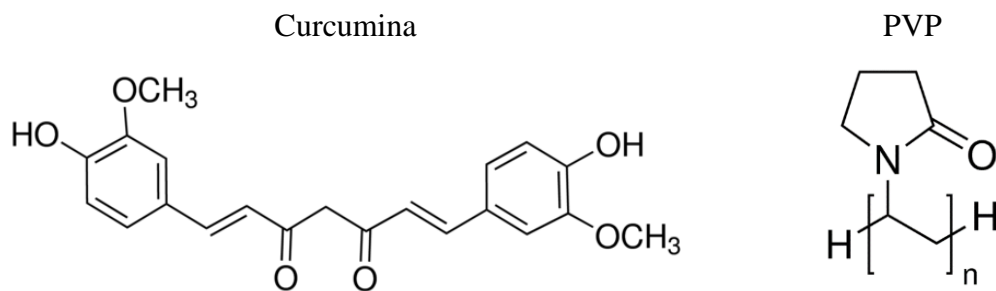
As técnicas de encapsulação têm sido amplamente estudadas para proteção ou liberação controlada de compostos e ingredientes alimentícios (MADENE et al., 2006) e sua obtenção consiste na incorporação, absorção ou dispersão de compostos bioativos, os quais se desejam proteger, em pequenas estruturas com diâmetros em escala nanométrica (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; GARCÍA; FORBE; GONZALEZ, 2010). As nanopartículas podem ser classificadas como esferas ou cápsulas, de acordo com sua estrutura. Quando o material encapsulado se encontra disperso no interior da partícula, essa estrutura é chamada de nanoesfera ou microesfera. No caso das nanocápsulas ou microcápsulas, o material encontra-se em um núcleo confinado por uma parede protetora. Esta controla a liberação do material e o protege de efeitos de agentes externos (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

Diversos trabalhos disponíveis sobre a curcumina nanoencapsulada concluem que tanto a técnica de encapsulação quanto o material encapsulante tem grande influência na eficiência de encapsulação e, conseqüentemente, no potencial de aplicação das nanopartículas obtidas. Em geral, a curcumina nanoencapsulada apresenta vantagens

sobre a curcumina *in natura*, principalmente em relação à solubilidade em água e à sua biodisponibilidade.

Um método versátil para a obtenção de curcumina nanoencapsulada é a precipitação por complexação utilizando poli(vinil pirrolidona) (PVP) como encapsulante (KAEWNOPPARAT et al., 2009; KHAN; RATHOD, 2014; KUMAVAT et al., 2013; YEN et al., 2010). Essa técnica apresenta a vantagem de baixo custo se comparado com os processos supercríticos, por exemplo, e utiliza compostos de baixa toxicidade como o etanol, fazendo-a de grande interesse para a indústria de alimentos (THORAT; DALVI, 2014). Por essa técnica, curcumina e PVP são colocados em um solvente em comum, como a acetona ou o etanol, sendo então adicionada água sob agitação, que leva à precipitação e formação das partículas. O solvente então é evaporado e a dispersão é seca, fornecendo as partículas na forma sólida. O procedimento é descrito em detalhes por Yen et al. (2010), que obteve nanopartículas de PVP-curcumina para avaliação da sua atividade antioxidante. A formação das partículas ocorre pela formação de ligações de hidrogênio entre o grupamento carbonila do PVP e as hidroxilas da curcumina. Pelo fato de a curcumina ser um polifenol, uma rede de ligações cruzadas são formadas, resultado em um hidrogel em água.

Na Figura 2 observa-se as estruturas químicas da curcumina e do PVP, respectivamente.



Fonte: (YEN et al., 2010)

Fonte: (HAAF; SANNER;
STRAUB, 1985)

Figura 2 – Estrutura química da curcumina e do PVP.

Dependendo das condições experimentais, a técnica de precipitação por adição de não solvente pode levar à formação de cristais de tamanhos micrométricos, que apresentam grande área superficial total e podem ter aplicação prática (BENAOUDA et al., 2013; THORAT; DALVI, 2014). Thorat e Dalvi (2014) estudaram a formação de estruturas polimórficas durante a precipitação da curcumina assistida por uma fonte de

cisalhamento intenso (ultrassom). Cristais micrométricos foram formados quando estabilizantes como albumina de soro bovino, lauril sulfato de sódio e hidroxipropil metil celulose e Tween 80 e também na ausência total destes. Quando PVP foi utilizado, partículas esféricas nanométricas foram obtidas, contudo estas aglomeraram formando superestruturas de dimensões macrométricas.

No caso da indústria de alimentos, o uso de microcristais de curcumina como agentes antimicrobianos merece ser investigada, principalmente devido ao baixo custo envolvido e no fato de que estes podem ser obtidos na ausência de surfactantes ou estabilizantes, o que diminui a quantidade de aditivos que devem ser adicionados ao alimento.

3.4 Qualidade microbiológica de alimentos minimamente processados

No Brasil são registradas perdas significativas de alimentos devido ao uso inadequado de tecnologias durante a manipulação, armazenagem e conservação. O processamento mínimo de frutas e produtos hortícolas e uma tecnologia alternativa para minimizar as perdas deste tipo de produtos. A procura de hortaliças minimamente processadas tem promovido um aumento na qualidade e variedade dos produtos bem como impulsionado o desenvolvimento de tecnologias de conservação (PILON et al., 2006).

O processamento mínimo de cenouras apresenta boa aceitação por parte dos consumidores, contudo problemas como a descoloração e o esbranquiçamento causados pela desidratação dos tecidos e deterioração microbiana limitam a sua vida de prateleira (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007). Além das características sensoriais, existe a preocupação com questões envolvendo a segurança alimentar. É sabido que a contaminação microbiana ocorre com mais intensidade na superfície dos alimentos, decorrendo desse fato que o uso de agentes superficiais ou recobrimentos antimicrobianos são preferíveis em relação à adição de tais substâncias diretamente ao alimento (DURANGO; SOARES; ANDRADE, 2006). Recobrimentos superficiais geralmente requerem uma quantidade menor do agente antimicrobiano (OUATTARA et al., 2000).

A adição de microcristais de curcumina pode vir a se tornar um tratamento que pode inativar a microflora natural, sendo adequado para prolongar o período de vida útil dos produtos, quando utilizada utilizado sob condições que permitam atingir descontaminação sem prejudicar os atributos sensoriais.

4. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA-POLI(VINIL PIRROLIDONA) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Material

Curcumina (Sigma-Aldrich, 99,5% pureza), álcool etílico absoluto (Vetec, 99,5% de pureza), poli(vinilpirrolidona) (PVP, Sigma-Aldrich, 99%) e água destilada foram utilizados para obtenção das nanopartículas de curcumina. Metanol (Dinâmica, 99,8%) foi utilizado nas análises de eficiência de encapsulação.

Para análise de atividade antimicrobiana, foram utilizadas solução salina (Alphatec, 8,5%), caldo Muller Hinton (CMH, Himedia) ágar Muller Hinton (AMH, Himedia), ágar Baird Parker (Himedia), ágar Eosina Azul de Metileno (EMB, Himedia), ágar Manitol-Gema de Ovo-Polimixina Segundo Mossel (MYP, Biomark), ágar Cetrimide (Himedia) solução McFarland (Sulfato de Bário 0,5%). As bactérias avaliadas foram *Bacillus cereus* (ATCC14579) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (ambas Gram-positivas) e *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (ambas Gram-negativas), adquiridas no Instituto Adolfo Lutz. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.1.2 Preparação das nanopartículas de poli(vinil pirrolidona)-curcumina (PVP-Cur)

As nanopartículas foram produzidas por meio da técnica de complexação conforme Yen et al. (2010) com adaptações. Poli(vinil pirrolidona) (PVP, 300 mg) foi dissolvido em água destilada (75 mL). Separadamente, curcumina (50 mg) foi dissolvida em etanol absoluto (25 mL), e essa solução foi então adicionada na solução aquosa de PVP, sob agitação de 22.000 rpm (dispersor Ultra Turrax Ika, modelo T25). Após 25 minutos de agitação, o recipiente contendo a dispersão de nanopartículas foi levado a um banho termostático para evaporação do etanol ($40\pm 1^\circ\text{C}$ por 4 dias) e então, as nanopartículas foram liofilizadas (-50°C por 4 dias). Depois de estarem secas foram mantidas armazenadas em geladeira (10°C) até o momento das análises.

4.1.3 Distribuição de tamanhos das nanopartículas

O diâmetro médio (D) e índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas foram determinados por medidas do diâmetro em software adequado (Sizemeter®) das nanopartículas nas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (JEOL JSM-6390LV). O IPD é adimensional e é frequentemente utilizado como uma medida indireta do alargamento da curva de distribuição dos tamanhos. Assumindo uma distribuição de tamanho unimodal Gaussiana das nanopartículas, o IPD refere-se ao desvio padrão (σ) e o diâmetro médio de acordo com a Equação 1. Assim, valores maiores de PDI indicam distribuição de tamanhos mais largas.

$$PDI = \frac{\sigma^2}{D^2} \quad (\text{Eq.1.})$$

4.1.4 Determinação da eficiência de encapsulação da curcumina

A quantidade total de curcumina presente na dispersão de nanopartículas foi determinada pelo seguinte procedimento: aproximadamente 5 mg de nanopartículas liofilizadas foram dissolvidas em 10 mL de metanol em balão volumétrico, sendo então pipetado 1 mL dessa solução que foi novamente avolumada com metanol para 10 mL. As amostras foram filtradas (Millipore, 0,45 mm), a absorbância a 427 nm foi determinada por espectroscopia UV-Vis (OceanOptics, USB650) e comparada com uma curva de calibração (construída em triplicata). Para determinar a quantidade de curcumina efetivamente incorporada nas nanopartículas, aproximadamente 9,3 mg de nanopartículas liofilizadas foram redispersas em 2 mL de água destilada. Uma alíquota de 500 μ L foi transferida para um tubo de microcentrífugacom filtros Amicon® (100 KDa) e centrifugadas a 14.500 rpm por 30 minutos (centrífuga MiniSpin Plus Eppendorf). As alíquotas foram diluídas em 500 μ L de metanol e a absorbância foi determinada por espectroscopia UV-Vis a 427 nm. A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a Equação 2 e o procedimento foi realizado em triplicata.

$$EE (\%) = \left(\frac{[cur]_{real} - [cur]_{n\tilde{a}o\ encapsulada}}{[cur]_{real}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Na equação 2, $[\text{cur}]_{\text{real}}$ é a concentração de curcumina total presente na dispersão e $[\text{cur}]_{\text{não encapsulada}}$ é a concentração de curcumina livre (não encapsulada).

4.1.5 Avaliação das propriedades térmicas

Calorimetria Diferencial de Varredura foi realizada no equipamento Perkin-Elmer, DSC4000 (DSC do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) para avaliar a encapsulação da curcumina. Aproximadamente 5 mg das amostras de curcumina *in natura*, nanopartículas, PVP e mistura física (300 mg de PVP + 50 mg de curcumina) foram colocadas em porta amostras de alumínio fechadas, e aquecidas de 0 a 200°C na taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.

4.1.6 Identificação de interações químicas entre a curcumina e o PVP

Foi realizada identificação de dos picos de absorção da curcumina e do PVP através de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de refletância atenuada (FTIR-ATR). As leituras (Perkin Elmer, modelo Frontier) foram conduzidas no intervalo de comprimentos de onda de 4000 a 600 cm⁻¹ com resolução de 1 cm⁻¹ para as amostras de curcumina encapsulada, da curcumina *in natura*, do PVP e da mistura física (50 mg de curcumina e 300 mg PVP misturados em cadinho de porcelana).

4.1.7 Atividade antimicrobiana de curcumina *in natura* e das nanopartículas

A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da técnica de diluição em ágar, conforme descrito por Bhawana et al. (2011) com algumas adaptações. As cepas bacterianas encontravam-se em ágar BHI em tubo inclinado. Com o auxílio de uma alça bacteriológica foi retirada uma pequena quantidade da biomassa bacteriana da superfície dos tubos com ágar BHI e repicado para placas de meio seletivo (ágar Baird Parker, ágar EMB, ágar MYP, ágar Cetrimide) para cada microrganismo testado. Essas placas foram incubadas a 36±1°C por 48 horas. Após este período, as colônias características de cada microrganismo foram transferidas para tubos contendo caldo Mueller Hinton (MH). Estes

tubos foram incubados durante 24 horas a $36\pm 1^\circ\text{C}$, sendo a turvação do caldo indicativo do crescimento bacteriano.

Os inóculos bacterianos com 24 horas de crescimento em caldo MH foram padronizados de modo a se obter uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland. Adicionalmente, a densidade óptica do inóculo microbiano padronizado foi também verificada por espectrofotometria. A absorvância em 625 nm foi de aproximadamente de 0,08 a 0,10, o que corresponde a uma suspensão bacteriana com aproximadamente 10^8 UFC/mL. A partir desta solução foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 10^4 UFC/mL.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram realizados ensaios nas concentrações de curcumina de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em triplicata. A curcumina foi diluída em Ágar Mueller-Hinton (MH) e colocada em tubos de ensaio com tampa. Tubos controle também foram utilizados sem a adição de curcumina. Os tubos foram esterilizados em autoclave vertical durante 15 minutos a 121°C . Após resfriamento, os tubos foram mantidos em banho-maria a 45°C . Em seguida inoculou-se $100 \mu\text{l}$ (10^3 UFC) do inóculo bacteriano previamente padronizado (10^4 UFC/ml) nos tubos contendo 5 mL de ágar. Após homogeneização, o conteúdo dos tubos foi vertido em placas de Petri estéreis. Estas placas foram incubadas na posição invertida durante 24 horas a 36°C . Após este período foi realizada a contagem do número de colônias em cada placa. O mesmo procedimento foi adotado para atividade antimicrobiana das nanopartículas de curcumina encapsuladas em PVP. O percentual de inibição (PI, %) foi calculado utilizando-se a Equação 3. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração de curcumina capaz de causar inibição completa do crescimento microbiano.

$$PI (\%) = 100 * \left(1 - \frac{T}{C}\right) \quad (\text{Eq.3})$$

Onde:

T= média de contagem de colônias do tratamento em UFC/mL.

C = média de contagem de colônias do controle da bactéria em UFC/mL.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Caracterização da curcumina nanoencapsulada

Foram determinados o diâmetro médio (D), o índice de polidispersão (IPD) e a eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas de curcumina. O diâmetro médio das nanopartículas apresentou-se em $324 \pm 12 \text{ nm}$, o índice de polidispersão de $0,20 \pm 0,01$ e a eficiência de encapsulação em torno de $96,3 \pm 1,8\%$. Na Figura 3 podem ser observadas as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas em diferentes aumentos.

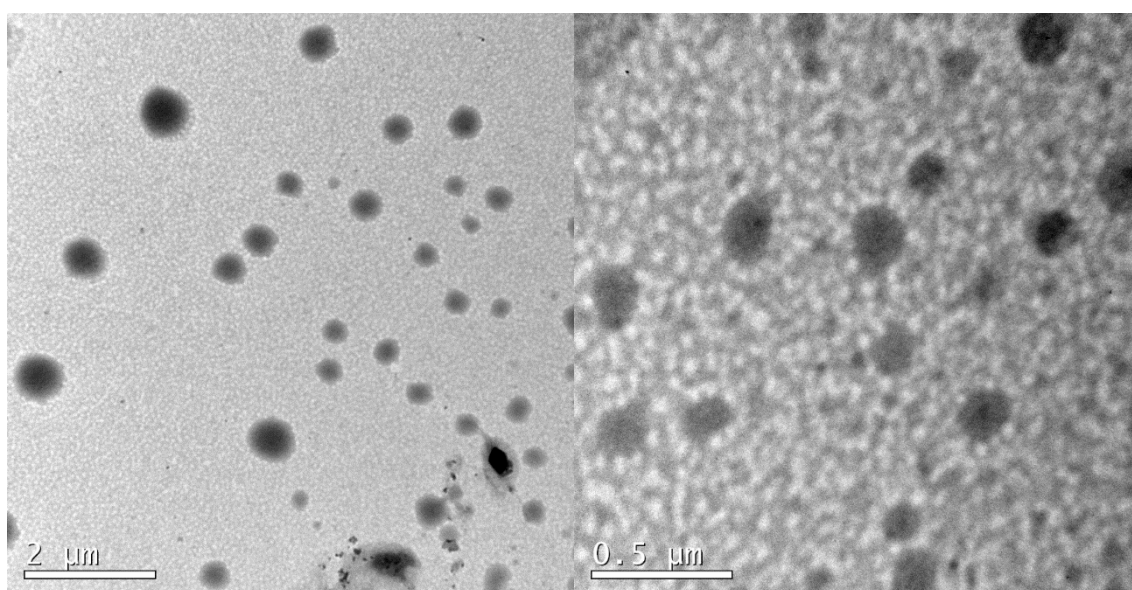


Figura 3 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas PVP-Curcumina.

Os altos valores de eficiência de encapsulação obtidos já eram esperados devido à alta hidrofobicidade da curcumina. Yen et al. (2010) produziram nanopartículas de curcumina encapsuladas em PVP também pela técnica de complexação. Os autores encontraram valores de diâmetro de partícula por volta de 142,9 nm e de polidispersão 0,19 e sua eficiência em $99,93 \pm 0,01\%$ indicando uma alta afinidade entre a curcumina e o PVP. Feng et al. (2012) encapsularam curcumina em poli(ϵ -caprolactona)-copoli(etilenoglicol) pela técnica de evaporação do solvente, obtendo resultados de diâmetro de partícula de 56 a 62 nm e de polidispersão de 2,5 a 2,6, além de eficiência de encapsulação de 94,3% a 95,5%. Khan e Rathod (2014) produziram nanopartículas de curcumina pela técnica de nanoprecipitação e como polímero o PVP obtendo tamanhos

de partícula em torno de 180 nm a 220 nm. Silva-Buzanello et al. (2015) encapsularam curcumina em nanopartículas de poli(L-ácido lático) e encontraram eficiências de encapsulação entre 98 e 67%, dependendo da quantidade inicial de curcumina adicionada. Thorat e Dalvi (THORAT; DALVI, 2014) avaliaram a morfologia de partículas de curcumina utilizando como estabilizantes PVP, albumina de soro bovino, lauril sulfato de sódio e Tween 80 e concluíram que o PVP foi o mais eficiente em produzir partículas esféricas e de tamanhos nanométricos (50-80 nm).

Na Figura 4 podem ser observados os termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) da mistura física entre PVP e curcumina, do PVP puro, da curcumina *in natura* e das nanopartículas de PVP-curcumina.

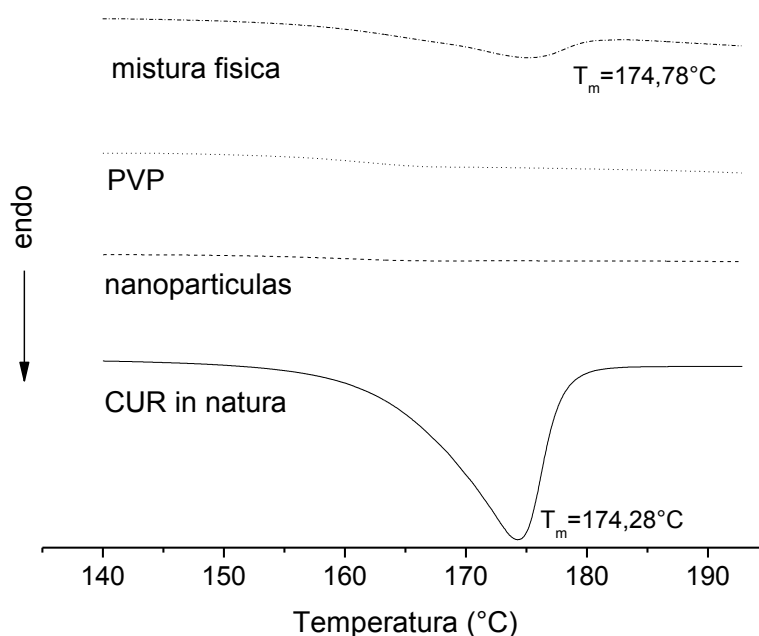


Figura 4 – Termogramas da mistura física entre PVP e curcumina, do PVP puro, da curcumina *in natura* e das nanopartículas de PVP-curcumina.

É possível identificar o ponto de fusão da curcumina *in natura* em 174,3°C, resultado este de acordo com a literatura (FENG; SONG; ZHAI, 2012; KHAN; RATHOD, 2014; PARADKAR et al., 2004; PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011a; YEN et al., 2010). Na mistura física é possível observar o pico de fusão cristalina da curcumina em 174,8°C, sendo que nas nanopartículas de PVP-curcumina não foi possível detectar a presença de tal pico de fusão, sugerindo que ela esteja em sua forma amorfa distribuída junto ao PVP, ou seja, formando uma mistura

sólida homogênea com o polímero. A ausência do pico de fusão cristalina da curcumina durante a sua encapsulação é utilizada em diversos trabalhos como um indicativo de que o composto se encontra encapsulado. Paramera et al. (2011a) avaliaram a encapsulação da curcumina em amido modificado e identificaram que a curcumina nanoencapsulada não apresentou o pico de fusão característico da curcumina pura, sugerindo a distribuição homogênea da curcumina dentro da matriz encapsulante. Yen et al. (2010) e Khan; Rathod (2014) obtiveram curcumina nanoparticulada com PVP e verificaram que o pico de fusão da curcumina desapareceu após a sua encapsulação. O mesmo foi verificado por Feng et al. (2012) encapsulando curcumina em poli(ϵ -caprolactona)–poli(etilenoglicol)–poli(ϵ -caprolactona).

Na Figura 5 os espectros de infravermelho para a curcumina *in natura*, PVP, nanopartículas de PVP-Curcumina e para a mistura física entre curcumina e PVP podem ser observados. Os grupamentos característicos mais importantes da curcumina e do PVP são listados nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

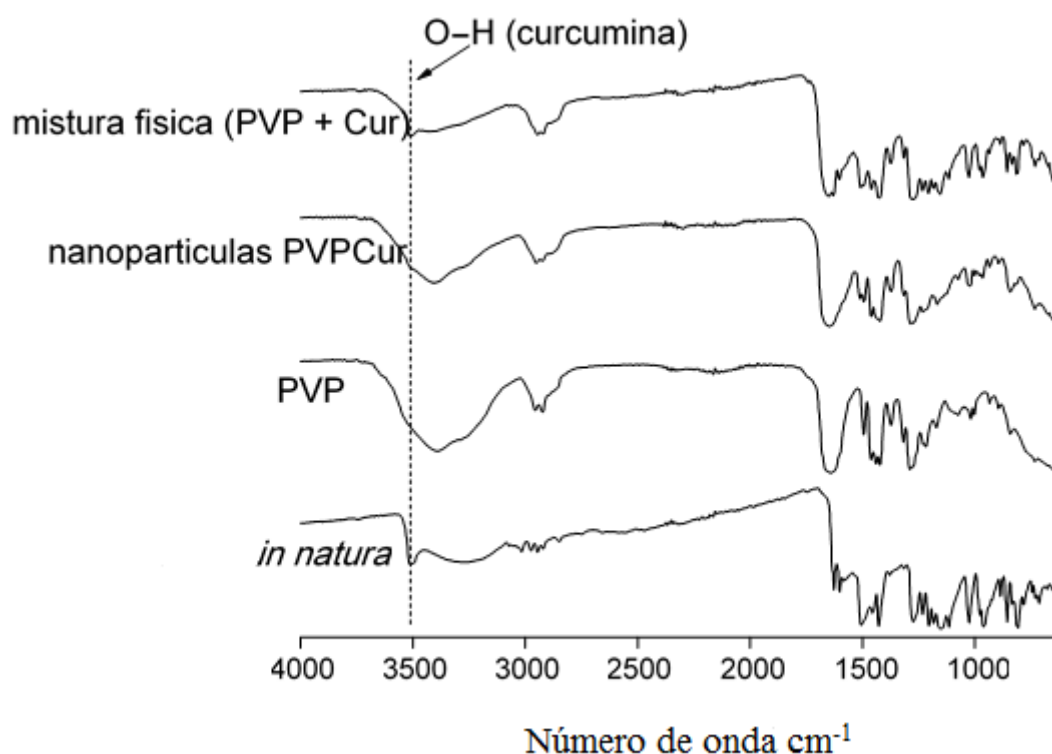


Figura 5 –Espectros de infravermelho para a curcumina *in natura*, PVP, nanopartículas de PVP-Curcumina e para a mistura física entre curcumina e PVP.

Tabela 1 – Grupamentos e bandas características da curcumina.

Grupamento	Bandas (cm⁻¹)	Fonte
O-H (axial)	3508	(PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011b)
C=O	1629	(PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011b)
C-C aromático	1602	(PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011b; SILVERSTEIN et al., 2014)
C=Oe C=C	1506	(PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011b)
C-H olefínico	1426	(PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011b)
C-O fenólico (axial)	1276	(SILVERSTEIN et al., 2014)
C-O-C (axial simétrica)	1025	(SILVERSTEIN et al., 2014)

Tabela 2 – Grupamentos e bandas características do PVP.

Grupamento	Bandas (cm⁻¹)	Fonte
C=O	1662	(YEN et al., 2010)
C-H	1019	(ABDELGHANY et al., 2015)
Estiramento C-N ou C-O	1284	(ABDELGHANY et al., 2015)
C=O	1644	(ABDELGHANY et al., 2015)

O pico referente às hidroxilas da curcumina (em torno de 3500 cm⁻¹) é comumente utilizado para a sua identificação (PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011b). Outras bandas características da curcumina podem ser vistas a 1602 cm⁻¹ (C-C aromático), 1426 cm⁻¹ (C-H olefínico) e 1025 cm⁻¹ (C-O-C assimétrico). A banda do grupamento fenólico aparece intensa na curcumina *in natura* e na mistura física, contudo nas nanopartículas a sua intensidade foi atenuada, sugerindo que a curcumina se encontra no interior das partículas e não na sua forma livre (não encapsulada). A atenuação ou desaparecimento do pico referente à hidroxila presente na curcumina é interpretada em alguns trabalhos sobre nanopartículas de curcumina como resultado da formação de ligações de hidrogênio entre a curcumina e o PVP (KAEWNOPPARAT et al., 2009; KHAN; RATHOD, 2014; KUMAVAT et al., 2013; PARADKAR et al., 2004; YEN et al., 2010).

4.2.2 Atividade antimicrobiana de curcumina *in natura* das nanopartículas

Na Figura 6 são observadas as nanopartículas de curcumina dissolvida em água antes da adição do ágar para análise antimicrobiana e na Figura 7 se observam as nanopartículas diluídas em ágar nas placas em diferentes concentrações (1000 a 62,5 µg/mL). A inibição percentual da curcumina *in natura* frente às bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus* está ilustrada a na Figura 8. A concentração inibitória mínima (CIM) da curcumina foi avaliada para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus* e os resultados são observados na Tabela 3 junto aos resultados da atividade antimicrobiana das nanopartículas PVP-curcumina.



Figura 6 –Nanopartículas de curcumina (esquerda) e curcumina *in natura* dispersas em água destilada.

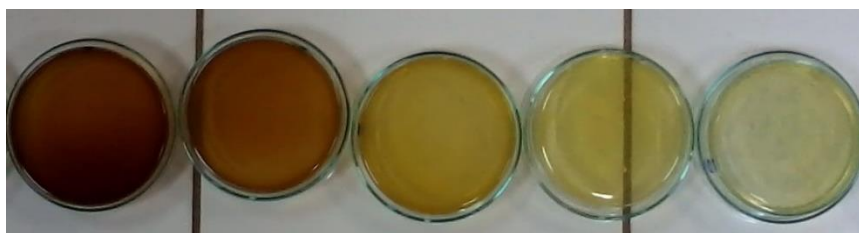


Figura 7 – Nanopartículas de curcumina diluídas em ágar em diferentes concentrações da esquerda para direita (1000 a 62,5 µg.ml⁻¹).

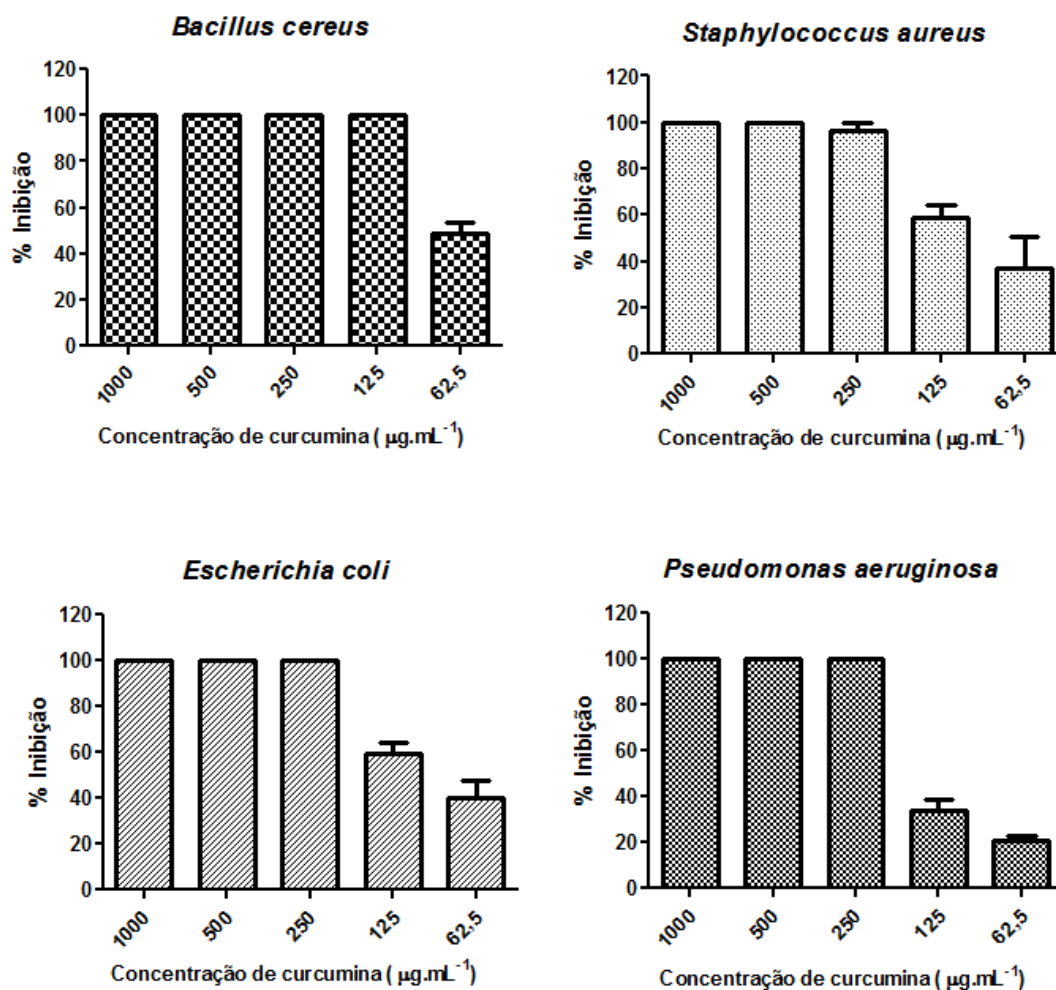


Figura 8 - Inibição percentual da curcumina in natura em relação aos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima CIM de curcumina in natura e das nanopartículas.

Bactéria	Concentração inibitória mínima (CIM, µg.mL ⁻¹)	
	Curcumina in natura	Nanopartículas de curcumina
<i>Escherichia coli</i>	250	*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	*
<i>Bacillus cereus</i>	125	*
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	*

*Não apresentou atividade.

Pode-se observar na Figura 8 que a curcumina *in natura* foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos testados. A CIM da curcumina *in natura* para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus* foi de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Os gráficos demonstram que a ação da curcumina ocorreu de maneira dose-dependente. Para *S. aureus*, as porcentagens de inibição foram de 96%, 60% e 37%, para as concentrações 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Em relação ao microrganismo *E. coli*, a curcumina inibiu seu crescimento em 73% na concentração de 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 51% na concentração de 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. O crescimento do microrganismo *P. aeruginosa* foi inibido em 33% e 20% também nas concentrações de 125 e 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. O *B. cereus* foi inibido em 49% na concentração de 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana da curcumina *in natura* estão de acordo com os apresentados por outros autores. Nos estudos conduzidos por Dubey et al. (2008) foi possível inibir a bactéria *E. coli* com CIM de 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (3,7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) diluindo a curcumina em acetona e se utilizando-se da técnica de diluição em tubos. Mun et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana da curcumina para 10 diferentes cepas de *S. aureus* extraíndo a curcumina com butanol e com uma solução de clorofórmio com hexano, por meio da técnica de microdiluição em placas de 96 poços, dispersando a curcumina em caldo Muller Hinton, atingindo CIM de 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sendo possível inibir todas elas. Hu et al. (2013), em um estudo da atividade antimicrobiana da curcumina em solvente dimetilsulfóxido (DMSO), utilizando-se do caldo BHI como meio, conseguiram inibir a bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans* conseguindo a CIM de 125 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (46,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) por meio da técnica de microdiluição em placas de 96 poços. Bhawana et al. (2011) utilizaram-se do solvente DMSO para dissolver a curcumina e conseguiram inibir as bactérias *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosae* e *E. coli*, obtendo CIM que variava de 100 a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ através da técnica de diluição em ágar. Parvanthy et al. (2009) foram capazes de inibir *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* alcançando CIM de 0,081 μM (0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) até 0,679 μM (0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) também por meio da técnica de diluição em ágar e utilizando-se da acetona como solvente. Han e Yang (2005) conseguiram diminuir a contaminação por *S. aureus* e *E. coli* em tecido de lã aplicando curcumina dissolvida em álcool etílico dispersando a mesma em ágar nutriente por meio de uma técnica expressa em porcentagem de redução de bactérias. A concentração de 0,2% de curcumina foi necessária para inibir 95% das

bactérias *E. coli* e *S. aureus*, com apenas 0,01% de curcumina foi possível inibir 70% de *S. aureus*, contudo para inibir 70% de *E. coli* foi necessária uma concentração de 0,05%.

Percebe-se, portanto, que a CIM da curcumina pode sofrer grande variação dependendo do tipo de método utilizado para a avaliação da atividade antimicrobiana, do tipo de microrganismo e, também, dependendo do solvente utilizado para solubilização/dispersão da curcumina. Em alguns casos em que as CIMs encontradas por outros autores foram menores do que as observadas neste trabalho, foram utilizados solventes orgânicos (como acetona, álcool etílico ou DMSO) para a pré-solubilização da curcumina, explicando a sua maior eficácia. Nos ensaios realizados a curcumina foi dispersa diretamente no ágar (em água), sem sofrer uma pré-diluição em solventes orgânicos que auxiliariam na sua atuação como antimicrobiano. Como o objetivo é desenvolver um método de conservação para uso direto em alimentos, é importante que a atividade antimicrobiana seja avaliada sem o uso de tais solventes, pois a maioria dos alimentos são preparados em formulações de constituição aquosas.

Os experimentos demonstraram que as nanopartículas PVP-Cur não apresentaram atividade antimicrobiana na faixa de concentrações avaliada. Uma hipótese para explicar este fenômeno pode ser o fato de que, nas nanopartículas, as hidroxilas da curcumina e o grupamento carbonila do PVP formam ligações de hidrogênio, como demonstrado nos espectros de infravermelho e DSC (Figuras 5 e 6) e também já relatado por outros autores (KAEWNOPPARAT et al., 2009; KHAN; RATHOD, 2014; KUMAVAT et al., 2013; PARADKAR et al., 2004; YEN et al., 2010). Desta maneira, a curcumina não estaria disponível para interagir com o seu sítio de ação, a proteína FtsZ, impedindo sua atividade antimicrobiana. Contudo, mais experimentos são necessários para avaliar o real efeito da complexação da curcumina sobre sua ação sobre os microrganismos.

4.3 CONCLUSÕES

As nanopartículas de PVP-curcumina foram obtidas pela técnica de complexação, produzindo partículas nanométricas esféricas (em torno de 324 nm), com alta eficiência de encapsulação (em torno de 96%) conforme demonstrado por espectroscopia UV-Vis. Análises espectroscópicas (FTIR-ATR) e térmicas (DSC) comprovaram que a curcumina apresenta-se efetivamente encapsulada na matriz polimérica.

Os ensaios possibilitaram concluir que a técnica de diluição em ágar é apropriada para avaliar a atividade antimicrobiana da curcumina *in natura* e que esta apresenta concentração inibitória mínima alta provavelmente devido à sua baixa solubilidade em água. As nanopartículas de curcumina não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, provavelmente devido às ligações de hidrogênio entre curcumina e o PVP.

5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROCRISTAIS DE CURCUMINA APLICADAS EM CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADA

Apesar da curcumina apresentar atividade antimicrobiana, sua baixa afinidade pela água limita seu uso como conservante para alimentos com composição aquosa. Além disso, os resultados apresentados no capítulo anterior demonstraram a dificuldade das nanopartículas de PVP-curcumina em agir como antimicrobiano. Experimentos realizados pelo grupo de pesquisa de “Desenvolvimento e Aplicações de Biomateriais” da UTFPR – Campo Mourão demonstraram que microcristais de curcumina apresentam atividade antimicrobiana mais alta do que a curcumina *in natura* (SANTOS, 2015) como já descrito na seção 3.2. Contudo, é preciso avaliar se tais microcristais podem efetivamente atuar como agente antimicrobiano durante a obtenção de um produto alimentício comercial. Nessa etapa do trabalho, microcristais de curcumina foram obtidos e utilizados no preparo de cenoura minimamente processada. Foi avaliada sua eficácia frente a microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Material

Curcumina (Sigma-Aldrich, 99,5% pureza), álcool etílico absoluto (Vetec, 99,5% de pureza) e água destilada foram utilizados para obtenção das micropartículas de curcumina. Hipoclorito de sódio (PuryVitta, 0,98% p/p de cloro ativo) foi utilizado para sanitização das cenouras minimamente processadas.

Para análise microbiológica foram utilizadas solução salina peptonada 0,1% (Himedia), ágar para Contagem Padrão em Placas (PCA, Himedia), ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRBA, Biomark), Caldo Verde brilhante bile lactose 2% (VBB, Himedia). Cenouras foram adquiridas do comércio local. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.1.2 Preparação dos microcristais de curcumina

Os microcristais foram produzidos por meio da técnica de precipitação pela adição de não solvente, conforme Yen et al. (2010) com algumas adaptações. Curcumina (50 mg) foi dissolvida em etanol absoluto (15 mL) e então adicionada rapidamente em água destilada (75 mL) sob agitação a 22.000 rpm (Ultraturrax Ika, modelo T25). Após 15 minutos, a agitação foi desligada e a dispersão de micropartículas foi levada ao banho termostático para a evaporação do etanol (40°C por 4 dias). Os microcristais foram liofilizados (-50°C por 4 dias) e armazenados protegidos da luz em geladeira (10°C) até o momento das análises.

5.1.3 Caracterização dos microcristais de curcumina

Microscopia óptica (BIOVAL, L2000A, câmera acoplada DCM130E) foi utilizada para obter imagens dos microcristais de curcumina em diferentes aumentos. A caracterização térmica (Calorimetria Diferencial de Varredura) e as análises de Espectroscopia de Infravermelho foram realizadas conforme descrito nos itens 4.1.5 e 4.1.6, respectivamente.

5.1.4 Preparo das cenouras minimamente processadas

Foram utilizadas cenouras adquiridas no mercado varejista local da cidade de Campo Mourão - PR. Aproximadamente 600 g de cenouras foram selecionadas (excluindo as cenouras defeituosas e deterioradas), realizada uma pré-lavagem em água fria com objetivo de remoção de sujidades maiores e sanitizadas em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO, 0,98% p/p de cloro ativo) por 5 minutos. Após este período as cenouras foram enxaguadas novamente para remoção do NaClO e então descascadas e cortadas em cubos de $0,5 \pm 0,1$ cm. Aproximadamente 300 gramas de cenoura foram submersas em uma dispersão aquosa contendo os microcristais de curcumina na concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante 5 minutos. O restante das cenouras selecionadas (300 gramas) ficou submerso pelo mesmo tempo em água destilada estéril (amostras controle). Após este período, amostras de 25 g de cenouras foram colocadas em bandejas de poliestireno. Depois de pesadas, elas foram levadas a estufa de circulação de ar forçado

durante 2 horas a 25°C e finalmente embaladas em filme de PVC e armazenadas em geladeira a 10°C.

5.1.5 Concentração real de microcristais de curcumina na cenoura minimamente processada

Cenouras (5 gramas) tratadas com os microcristais de curcumina foram imersas por 20 segundos em 50 mL de etanol absoluto para extração da curcumina superficial. Essa solução foi filtrada (Millipore, 0,45 mm) e sua absorbância em 427 nm foi determinada por espectroscopia UV-Vis (OceanOptics, USB650) e comparada com uma curva de calibração previamente construída em triplicata. O mesmo procedimento foi aplicado para as cenouras que não receberam o tratamento superficial de curcumina e lidas em 427 nm para serem usadas como branco.

5.1.6 Análises microbiológicas da cenoura minimamente processada

O acompanhamento microbiológico durante a vida de prateleira da cenoura minimamente processada foi realizado através de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos, microrganismos psicrotróficos e coliformes totais, nos seguintes intervalos de 0, 5, 10 e 15 dias. As análises foram realizadas segundo as metodologias preconizadas pela Instrução Normativa Número 62, de 2003 (BRASIL, 2003).

Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis: foram preparados homogenatos a partir de 25 g da amostra de cenoura minimamente processada em 225 mL de solução salina peptonada 0,1% esterilizada, *em stomacher*, obtendo-se a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram preparadas diluições decimais, quando necessárias. Para plaqueamento das amostras, 1 mL deste homogenato (ou das diluições) foi adicionado às placas de Petri, utilizando-se a semeadura em profundidade em ágar PCA. Após a homogeneização adequada e solidificação do ágar em superfície plana, as placas foram invertidas e armazenadas em estufa a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 48h.

Contagem de Microrganismos Psicotróficos: o mesmo procedimento descrito para mesófilos foi adotado para os microrganismos psicotróficos com exceção de que as placas foram encubadas em geladeira a 10°C por um período de 7 dias.

Coliformes Totais (35°C): o mesmo procedimento descrito acima para mesófilos foi adotado para os coliformes totais com exceção de que foi utilizado o ágar VRBA e as placas foram encubadas em estufa a 36°C por um período de 24h e as colônias típicas e atípicas foram posteriormente confirmadas em caldo VBB.

5.1.7 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e para comparação das médias foi utilizado o teste t de *Student* para amostras independentes, realizado no Software GraphPadPrism, versão 6.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Caracterização dos microcristais de curcumina

Na Figura 9 são observadas imagens de microscopia óptica dos microcristais de curcumina e da curcumina *in natura* respectivamente.

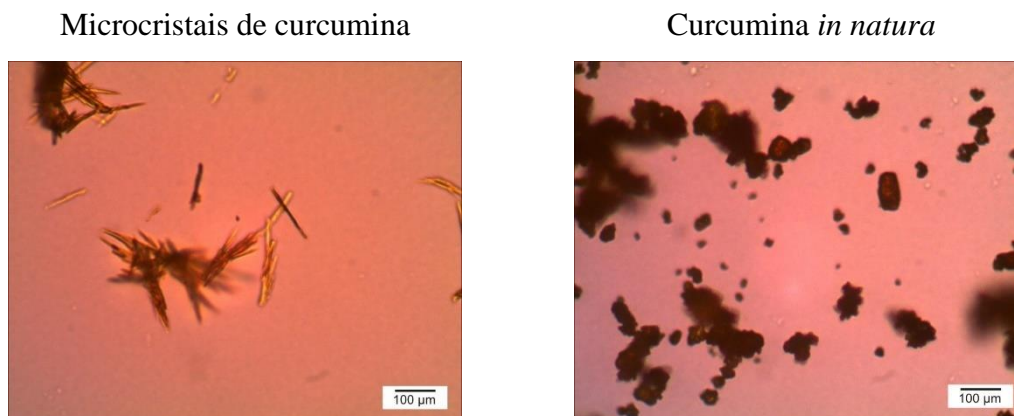


Figura 9 – Microcristais de curcumina e curcumina *in natura* dispersas em água, registrados em microscópio óptico (Ampliação: 400x).

Os microcristais de curcumina se apresentam como espículas devido à sua natureza cristalina com tamanhos na faixa de alguns micrômetros. Tal morfologia confere um aumento na área superficial total da curcumina em relação à curcumina *in natura*.

Na Figura 10 se observamos termogramas obtidos a partir das análises feitas em DSC para a curcumina livre e para os microcristais de curcumina. Na Figura 11 são observados os espectros de FTIR da curcumina *in natura* e dos microcristais de curcumina.

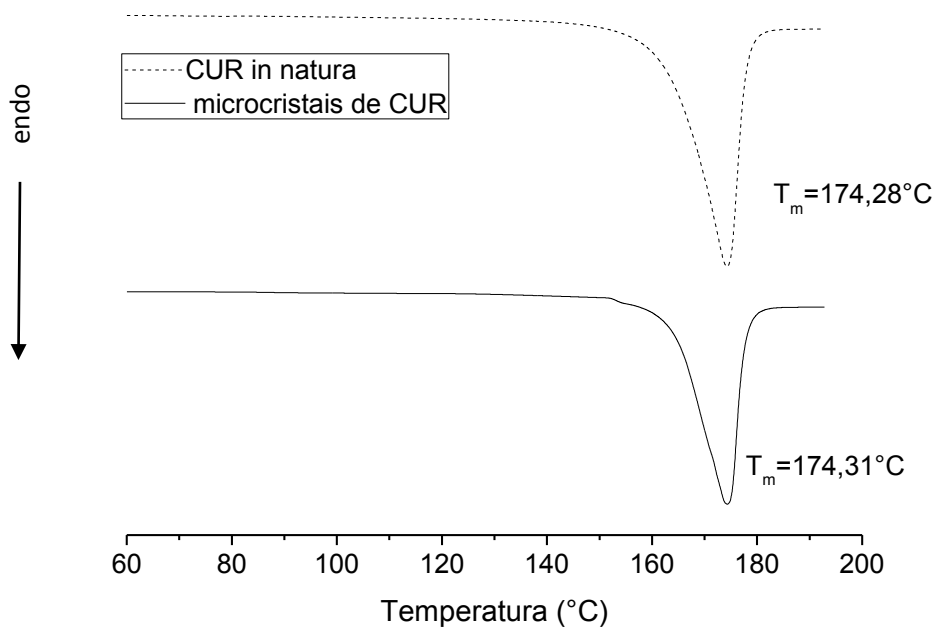


Figura 10 –Curvas de temperatura obtidas para curcumina livre e microcristais de curcumina em DSC.

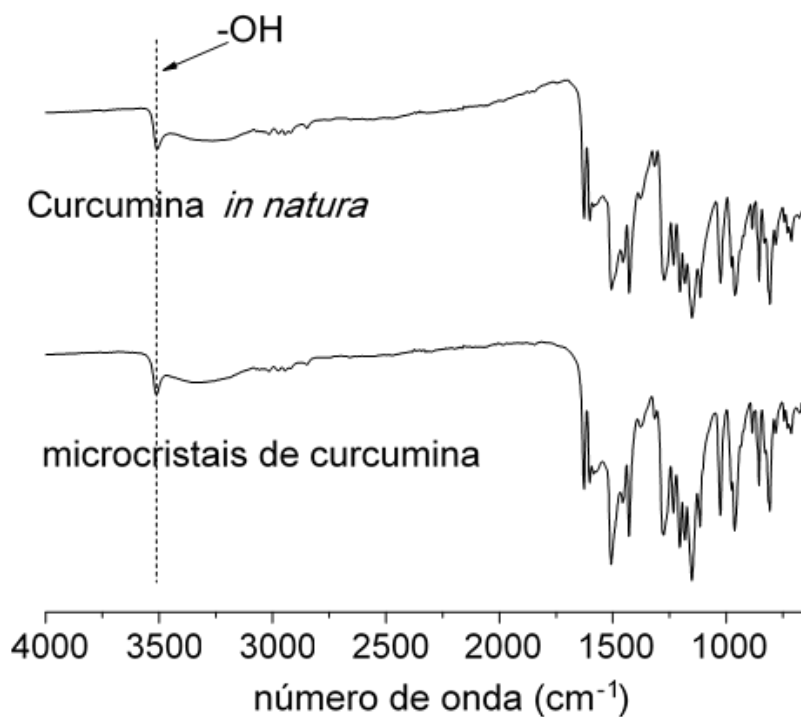


Figura 11 – Espectros de infravermelho para a curcumina *in natura* e para os microcristais de curcumina.

As temperaturas de fusão da curcumina *in natura* e na forma de microcristais não apresentam diferenças, indicando que o procedimento não deve ter alterado a estrutura física da curcumina, ocorrendo apenas a redução do tamanho de suas partículas. O mesmo pode ser observado nos espectros de FTIR, onde as bandas de absorção da curcumina na forma de microcristais não foram deslocadas quando comparadas com a *in natura*.

5.2.2 Análise microbiológica da cenoura minimamente processada

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos presentes na microbiota de cenoura minimamente processada submetida ao tratamento com microcristais de curcumina estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Contagem de microrganismos mesófilos para as cenouras minimamente processadas tratadas com os microcristais de curcumina e para o controle.

Tempo de armazenamento (dias)	Log UFC/mL	
	Controle (H ₂ O)	Microcristais de curcumina
0	3,21±0,09	2,52±0,07*
5	4,86±0,02	4,41±0,07*
10	6,10±0,12	5,84±0,09*
15	6,24±0,03	5,81±0,03*

*Amostras apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$, Teste t).

Vale ressaltar que, apesar de a dispersão dos microcristais conter 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de curcumina, a análise de espectroscopia UV-Vis demonstrou que apenas 6% desta curcumina aderiu efetivamente na superfície das cenouras, resultando em uma concentração real $1,33 \pm 0,6$ mg cur/g cenoura.

A contagem de microrganismos mesófilos na cenoura minimamente processada tratada com os microcristais de curcumina foi significativamente menor do que o controle ($p < 0,05$), para todos os tempos em que a análise foi realizada. O tratamento com curcumina foi capaz de inibir a quantidade total de microrganismos mesófilos em aproximadamente 79%, 63%, 39% e 62% nos dias 0, 5, 10 e 15, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle. Estes valores correspondem a uma redução de 0,7 log UFC.mL⁻¹, 0,5 log UFC.mL⁻¹, 0,3 log UFC.mL⁻¹ e 0,6 log UFC.mL⁻¹, para cada tempo de tratamento.

Levando-se em consideração que os vegetais minimamente processados são em geral mantidos sob refrigeração até o seu consumo, torna-se interessante investigar a presença da microbiota denominada psicrotrófica, que independentemente de sua temperatura ótima de crescimento, multiplica-se consideravelmente sob refrigeração. O resultado da contagem destas classes de microrganismos na cenoura minimamente processada submetida aos diferentes tratamentos pode ser visualizadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Contagem de microrganismos psicrotróficos para as cenouras minimamente processadas tratadas com os microcristais de curcumina e para o controle.

Tempo de armazenamento (Dias)	Log UFC/mL	
	Controle (H ₂ O)	Microcristais de curcumina
0	2,87±0,30	1,28±0,73*
5	4,78±0,02	4,24±0,00*
10	4,97±0,01	4,76±0,00*
15	5,39±0,07	5,19±0,13*

*Amostras apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$, Teste t).

O crescimento dos microrganismos psicrotróficos na cenoura minimamente processada também foi expressivo ao longo dos 15 dias de armazenamento. Nas amostras controle, o número de microrganismos psicrotróficos no 15º dia de armazenamento aumentou cerca de 300 vezes em relação ao dia 0. O tratamento com os microcristais de curcumina foi efetivo em reduzir o número de microrganismos psicrotróficos desde o dia 0. Neste dia, inclusive, nota-se a maior diferença na contagem de psicrotróficos entre os tratamentos controle e microcristais de curcumina. No dia 0, o tratamento com os microcristais de curcumina causaram uma redução de 94% (1,6 ciclo logarítmico) na contagem de microrganismos psicrotróficos, em relação ao controle. No 15º dia de armazenamento, a redução do número de microrganismos psicrotróficos nas amostras tratadas com microcristais de curcumina foi menor, em torno de 36% (0,2 ciclo logarítmico).

A contagem de microrganismos coliformes totais (35º C) nas amostras de cenoura minimamente processada encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Contagem de Coliformes Totais (35º C) para as cenouras minimamente processadas tratadas com os microcristais de curcumina e para o controle.

Tempo de armazenamento (Dias)	Log UFC/mL	
	Controle (H ₂ O)	Microcristais de curcumina
0	2,98±0,01	1,82±0,06*
5	4,15±0,01	3,19±0,05*
10	5,32±0,41	4,54±0,04
15	5,80±0,03	5,21±0,04*

*Amostras apresentam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$, Teste t).

O grupo dos coliformes totais inclui todas as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. O índice de coliformes totais avalia as condições higiênicas sendo, por este motivo, uma das classes de microrganismos de grande interesse para o controle da qualidade microbiológica dos alimentos (CARDOSO et al., 2001)

O aumento no número de microrganismos pertencentes a esta classe nas amostras de cenoura minimamente processada controle ao longo do período de armazenamento foi de aproximadamente 600 vezes ($2,8 \log \text{UFC.mL}^{-1}$). Em relação à cenoura minimamente processada tratada com os microcristais de curcumina, foi também observado uma redução significativa do número de microrganismos coliformes totais para todos os tempos de armazenamento, em relação ao controle. Houve redução de 91% (1,2 ciclo logarítmico) no dia 0 e de 76% (0,6 ciclo logarítmico) no dia 15, em relação ao controle.

Em estudo realizado por Wang et al. (2012), onde se utilizou curcumina em revestimento comestível, também foi observado diminuição microbiana. Os autores aplicaram micropartículas de amido e gelatina contendo curcumina na formulação de pão, tofu e carne de porco cozida, sendo verificado uma redução no teor de esporos de fungos de até 53%.

A redução da população microbiana dos alimentos tem como objetivo principal a destruição de microrganismos patogênicos associados ao alimento em questão. Um objetivo secundário é aumentar a vida de prateleira do alimento, reduzindo as taxas de alterações microbiológicas e enzimáticas. É provável, portanto, que a diminuição da população de microrganismos da microbiota natural da cenoura minimamente processada observada na presente pesquisa resulte em um aumento significativo da vida de prateleira deste produto.

5.3 CONCLUSÕES

Microcristais de curcumina foram obtidos sem a necessidade de estabilizantes adicionais, resultando em estruturas na forma de espículas micrométricas. Sua atividade antimicrobiana em relação aos microrganismos mesófilos aeróbios estritos facultativos viáveis, psicrotróficos e coliformes totais foi avaliada em cenouras minimamente processadas. Foi detectada menor contagem de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes totais no tratamento com microcristais em relação ao controle ao longo do tempo de armazenamento. Este efeito pode resultar no aumento da vida de prateleira do produto minimamente processado, demonstrando o potencial da curcumina como agente antimicrobiano para a conservação de alimentos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Na presente Dissertação de Mestrado, a atividade antimicrobiana da curcumina foi avaliada considerando-a nas formas *in natura*, de microcristais e como nanopartículas de poli(vinil pirrolidona)-curcumina.

Para as nanopartículas, apesar dos altos valores de eficiência de encapsulação e tamanhos nanométricos alcançados, não foi detectada inibição do crescimento de microrganismos Gram-positivos (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativos (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) na faixa de concentrações avaliada, enquanto a curcumina *in natura* foi capaz de inibir o crescimento nessa mesma faixa. Análises de Calorimetria Diferencial de Varredura e Espectroscopia de Infravermelho e de Ultravioleta-Visível indicaram que a curcumina encontrava-se no interior das nanopartículas de poli(vinil pirrolidona). Como a atividade antimicrobiana está diretamente ligada à ação dos grupamentos hidroxila e metoxila da curcumina, a ligação destes grupamentos com as carbonilas da poli(vinil pirrolidona) através de ligações de hidrogênio pode ter sido responsável pela perda da atividade após a encapsulação, nas faixas de concentração avaliadas.

Para os microcristais de curcumina, estes foram utilizados no preparo de cenouras minimamente processadas, sendo avaliada sua eficácia frente a microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, psicrotróficos e coliformes totais. Foi comprovado que a adição dos microcristais em cenouras minimamente processada aumentou a vida de prateleira, podendo atuar como um método de conservação natural.

Para trabalhos futuros, sugere-se avaliar de forma mais detalhada a atividade antimicrobiana das nanopartículas PVP-curcumina. Já para os microcristais de curcumina poderia ser realizada a contaminação proposital do alimento com uma cepa padronizada para verificar sua atividade antimicrobiana no alimento para diferentes microrganismos, ou aplicação dos microcristais em outros vegetais minimamente processados.

7. REFERÊNCIAS

- ABDELGHANY, A. M. et al. Combined DFT/FTIR structural studies of monodispersed PVP/Gold and silver nano particles. **Journal Of Alloys And Compounds**, v. 646, p. 326–332, 2015.
- ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.
- ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. **Journal Of Controlled Release: Official Journal Of The Controlled Release Society**, v. 128, n. 3, p. 185–99, 24 jun. 2008.
- BENAOUDA, F. et al. In situ self assembly of soft diclofenac loaded microparticles in superstructured fluids. **Soft Matter**, v. 9, n. 42, p. 10165–10173, 2013.
- BHAWANA et al. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 59, p. 2056–61, 9 mar. 2011.
- BISHT, S. et al. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”): a novel strategy for human cancer therapy. **Journal Of Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 1–18, jan. 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa Nº 62, De 26 De Agosto De 2003. **Diário Oficial da União de 18/09/2003 , Seção 1**, p. 14, 2003.
- CARDOSO, A. L. S. P. et al. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descavado. **Arq. Inst. Biol.**, v. 68, n. 1, p. 19–22, 2001.
- CARVALHO, D. D. M. et al. Production , solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. **Food Science Technology**, v. 35, n. 1, p. 115–119, 2015.
- DANDEKAR, P. P. et al. Curcumin-loaded hydrogel nanoparticles : Application in anti-malarial therapy and toxicological evaluation. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 12, p. 4992–5010, 2010.
- DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, And Medicine**, v. 6, n. 1, p. 153–60, fev. 2010.
- DUBEY, S. K. et al. Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1837–1846, set. 2008.
- DURANGO, A. M.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. **Food Control**, v. 17, p. 336–341, 2006.
- DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**, v. 223, p. 181–190, 8 jun. 2005.
- ETHIRAJAN, A. et al. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Templates for

Biomimetic Mineralization of Calcium Phosphate. **Macromolecular Chemistry And Physics**, v. 212, n. 9, p. 915–925, maio 2011.

FENG, R.; SONG, Z.; ZHAI, G. Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 7, p. 4089–4098, 2012.

FUJIKAWA, F. et al. NII-Electronic Library Service. **Bioscienci Biotechnology Biochemistry**, v. 89, n. 8, p. 1119–1123, 1969.

GARCÍA, M.; FORBE, T.; GONZALEZ, E. Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 573–581, 2010.

GOMEZ-ESTACA, J. et al. Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 82–91, jul. 2012.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. et al. Shelf-life extension of minimally processed carrots by gaseous chlorine dioxide. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 116, p. 221–227, 2007.

GOTOH, Y.; SAITOH, H.; MIYAKE, T. Chemical transformation of tylosin derivatives into neutral macrolides having a 3'-methoxyl group. **Carbohydrate Research**, v. 309, n. 1, p. 45–55, 1998.

GOVINDARAJ, P.; KANDASUBRAMANIAN, B.; KODAM, K. M. Molecular interactions and antimicrobial activity of curcumin (*Curcuma longa*) loaded polyacrylonitrile films. **Materials Chemistry And Physics**, p. 1–8, out. 2014.

HAAF, F.; SANNER, A.; STRAUB, F. Polymers of N-vinylpyrrolidone: Synthesis, characterization and uses. **Polymer Journal**, v. 17, n. 1, p. 143–152, 1985.

HAN, S.; YANG, Y. Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin. **Dyes And Pigments**, v. 64, p. 157–161, fev. 2005.

HATAMIE, S. et al. Complexes of cobalt nanoparticles and polyfunctional curcumin as antimicrobial agents. **Materials Science & Engineering C**, v. 32, p. 92–97, 2012.

HU, P.; HUANG, P.; CHEN, M. W. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. **Archives Of Oral Biology**, v. 58, p. 1343–1348, 2013.

KAEWNOPPARAT, N. et al. Increased solubility, dissolution and physicochemical studies of curcumin-polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions. **World Academy Of Science, Engineering And Technology**, v. 3, n. 7, p. 07–29, 2009.

KAUR, S. et al. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ - A structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4209–4214, 2010.

KHAN, W. H.; RATHOD, V. K. Process intensification approach for preparation of curcumin nanoparticles via solvent–nonsolvent nanoprecipitation using spinning disc reactor. **Chemical Engineering And Processing: Process Intensification**, v. 80, p. 1–10, 2014.

KUMAVAT, S. D. et al. Characterization and Evaluation of Curcumin - PVP Solid Dispersion by Solvent Evaporation Technique. **International Journal Of**

Pharmaceutical & Research Sciences, v. 2, n. 5, p. 693–706, 2013.

LAL, J. et al. Biological activity, design, synthesis and structure activity relationship of some novel derivatives of curcumin containing sulfonamides. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 579–88, jun. 2013.

LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. **Materials Science And Engineering: C**, v. 29, n. 3, p. 856–860, abr. 2009.

LI, S. et al. Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.). **Pharmaceutical Crops**, v. 2, p. 28–54, 2011.

LIU, C.; HUANG, H.-Y. Antimicrobial Activity of Curcumin-Loaded Myristic Acid Microemulsions against *Staphylococcus epidermidis*. **Chem. Pharm Bull**, v. 60, n. 9, p. 1118–1124, 2012.

MADENE, A. et al. Review Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal Of Food Science And Technology**, v. 41, p. 1–21, 2006.

MUN, S. et al. Phytomedicine Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 20, p. 714–718, 2013.

OUATTARA, B. et al. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 62, p. 139–148, 2000.

PARADKAR, A. et al. Characterization of curcumin-PVP solid dispersion obtained by spray drying. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 271, p. 281–286, 2004.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry**, v. 125, p. 913–922, abr. 2011a.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 892–902, abr. 2011b.

PARVATHY, K. S.; NEGI, P. S.; SRINIVAS, P. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin-b-diglucoside. **Food Chemistry**, v. 115, p. 265–271, jul. 2009.

PILON, L. et al. Shelf life of minimally processed carrot and green pepper. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 1, p. 150–158, 2006.

RAI, D. et al. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. **The Biochemical Journal**, v. 410, p. 147–155, 2008.

SANTOS, P. D. F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de microcristais de curcumina**. 2015. F 36. Trabalho de Conclusão de Curso – UTFPR. Campo Mourão - PR, 2015.

SHAIKH, J. et al. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences: Official Journal Of The European Federation For Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3-4, p. 223–30, jun. 2009.

SHLAR, I. et al. High-Throughput Screening of Nanoparticle-Stabilizing Ligands:

Application to Preparing Antimicrobial Curcumin Nanoparticles by Antisolvent Precipitation. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 1, p. 68–79, 2015.

SILVA-BUZANELLO, R. A. DA et al. Validation of an Ultraviolet–visible (UV–Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(L-lactic acid) nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 172, p. 99–104, abr. 2015.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **The Spectrometric Identification Of Organic Compounds**. 8. ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 2014.

SONG, L. et al. Polymeric micelles for parenteral delivery of curcumin: Preparation, characterization and in vitro evaluation. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects**, v. 390, n. 1-3, p. 25–32, out. 2011.

TESAKI, S. et al. 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetic and Sinapic Acids as Antibacterial Compounds from Mustard Seeds. **Biosci, Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n. 5, p. 998–1000, 1998.

THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Particle formation pathways and polymorphism of curcumin induced by ultrasound and additives during liquid antisolvent precipitation. **Royal Society oO Chemistry**, v. 16, p. 11102–11114, 2014.

WANG, Y. et al. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 136, p. 71–74, 30 nov. 2009.

WANG, Y. F. et al. Food preservation effects of curcumin microcapsules. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 113–117, set. 2012.

YEN, F.-L. et al. Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 58, p. 7376–7382, 23 jun. 2010.