

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PATRÍCIA GRIEP**

**ENCAPSULAMENTO POR *SPRAY DRYER* DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS**  
**POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**MARÇO DE 2021**

**ENCAPSULAMENTO POR *SPRAY DRYER* DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS  
POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**

Patrícia Griep

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Valduga  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jamile Zeni  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Monks  
IFFarroupilha Campus São Borja

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Alexander Junges  
URI Erechim

---

Dr<sup>a</sup>. Rosicler Colet  
URI Erechim

Erechim, 25 de Março de 2021.

G848e Griep, Patrícia

Encapsulamento por spray dryer de carotenoides produzidos por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 / Patrícia Griep. – 2021.

97 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2021.

“Orientação: Profª Dra Eunice Valduga, Profª Dra Jamile Zeni”

1.Extratos carotenogênicos 2. Goma arábica 3. maltodextrina 4. Encapsulamento  
I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

*“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.”*

*- Romanos 8:28 –*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos mesmo naqueles em que eu ousei pensar em desistir. Grata por ouvir todas as minhas orações e me consolar quando estava triste e desanimada. Te sou grata pela vida, força, perseverança e coragem. Obrigada por me iluminar, me guiar sempre pelos melhores caminhos e por fazer tudo cooperar para o bem, colocando em meu caminho sempre as pessoas certas nas horas certas.

À minha família, em especial aos meus pais, Lisiane e Elton, pelo apoio e inspiração, pelo incentivo a não desistir e por tudo que sacrificaram por mim.

Ao meu companheiro de vida, Jean, pelo incentivo, apoio, compreensão, paciência e amor e também por nunca desistir de mim.

À minha irmã Daiana e cunhado Rangel por estarem sempre ao meu lado e pelo Bento que sempre me deu abraços quando precisei.

A todos os professores que passaram pela minha formação acadêmica e pessoal.

As minhas professoras e orientadoras Eunice Valduga e Jamile Zeni, pela orientação (até mesmo nos domingos), apoio, ajuda, conhecimento transmitido, segurança, paciência, compreensão, amizade e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Rosicler que pegou na minha mão e me ensinou tudo, explicou tudo, me ajudou em várias análises, ouviu as minhas dúvidas e me confortou quando nada estava dando certo. Obrigada pela amizade, risadas, ensinamentos e boa vontade em ajudar.

Ao professor Alexander por auxiliar na análise de tamanho de partículas e ajuste de modelos.

À Sandy e ao bolsista Leonardo, por ajudar nos experimentos e análises deste trabalho.

À secretária da Pós-graduação, Liane sempre disposta a ajudar.

Aos meus colegas de Pós-graduação, em especial Bruno, Giovana, Eloir, Rafaela e Carina pelo apoio, amizade, companheirismo, auxílio nos estudos, momentos de descontração e boas risadas.

À equipe da Central de Materiais, Rose e Vera, sempre dispostas a ajudar.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim e ao Departamento de Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de Pós-graduação e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, pela amizade e boa convivência, minha eterna gratidão.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**ENCAPSULAMENTO POR *SPRAY DRYER* DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS  
POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**

Patrícia Griep

Março/2021

Orientadores: Eunice Valduga

Jamile Zeni

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores de amarelo ao vermelho em muitos alimentos como frutas e hortaliças e, por serem componentes funcionais promissores da dieta humana, estão ganhando imensa importância atualmente. Podem ser obtidos a partir de fontes naturais como vegetais ou produzidos por micro-organismos como por exemplo as leveduras utilizando-se resíduos agroindustriais como substrato. São compostos bioativos que apresentam um conjunto de duplas ligações conjugadas as quais lhes conferem coloração característica e atividade antioxidante e pró-vitáminica A. No entanto, apresentam elevada sensibilidade as condições ambientais como luz, temperatura, oxigênio, além de baixa solubilidade em água. Dessa forma, a microencapsulação por atomização apresenta-se como uma alternativa interessante e promissora para a proteção destes compostos, tornando-os mais estáveis. O objetivo do estudo foi encapsular extratos carotenogênicos produzidos pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor* pela técnica de atomização em *spray dryer*. O extrato carotenogênico foi caracterizado em carotenoides totais e atividade antioxidante. Para avaliar os efeitos da composição da matriz goma arábica (GA) e maltodextrina (MD) e da temperatura na eficiência de encapsulamento de carotenoides empregou-se metodologia de planejamento de experimentos. As micropartículas foram caracterizadas em termos de rendimento de produto, eficiência de encapsulamento, atividade de água, umidade, parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$ ), microestrutura das partículas e estabilidade de estocagem armazenadas a  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  em embalagem de vidro âmbar e transparente. O teor de carotenoides do extrato foi de  $3852,75 \mu\text{g/L}$  e a atividade antioxidante  $1,11 \text{ mM}$  de Trolox/g. A máxima eficiência de encapsulamento de carotenoides foi de 60% com 5% (v/v) de extrato, 2% (p/v) de Tween 80 e 90% (v/v) de tampão fosfato pH 7,0, temperatura do ar de secagem de  $130^\circ\text{C}$  e proporções iguais de MD:GA (25 g/L). As microcápsulas apresentaram 0,206 de atividade de água, 1,1% de umidade, e índices de cor de 72,57 para  $L^*$  e 22,60 para a chroma  $C^*$  e tamanho de partículas de  $3,48 \mu\text{m}$  ( $\pm 1,35$ ). O encapsulado apresentou estabilidade dos carotenoides de 63,50 e 50,57%

armazenados por 40 dias a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em vidro cor âmbar e vidro transparente, respectivamente. Assim, o encapsulamento por *spray dryer* empregando a matriz composta de GA e MD é promissora visando a preservação de pigmentos carotenogênicos e sua aplicação na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos.

**Palavras-chave:** atomização, extratos carotenogênicos, goma arábica, maltodextrina, eficiência de encapsulamento.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

**SPRAY DRYER ENCAPSULATION OF CAROTENOIDS PRODUCED BY  
*Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**

Patrícia Griep

Março/2021

Advisors: Eunice Valduga

Jamile Zeni

Carotenoids are natural pigments responsible for the colors of yellow to red in many foods such as fruits and vegetables and, because they are promising functional components of the human diet, they are gaining immense importance today. They can be obtained from natural sources such as vegetables or produced by microorganisms such as yeasts using agro-industrial residues as a substrate. They are bioactive compounds that have a set of double conjugated bonds which give them a characteristic color and antioxidant and provitamin A activity. However, they are highly sensitive to environmental conditions such as light, temperature, oxygen, in addition to low water solubility. Thus, microencapsulation by atomization presents itself as an interesting and promising alternative for the protection of these compounds, making them more stable. The aim of the study was to encapsulate carotenogenic extracts produced by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* using the *spray dryer* atomization technique. The carotenogenic extract was characterized in total carotenoids and antioxidant activity. In order to evaluate the effects of the matrix composition (gum arabic and maltodextrin) and temperature on carotenoid encapsulation efficiency, an experimental design methodology was used. The microparticles were characterized in terms of product yield, encapsulation efficiency, water activity, moisture content, color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and  $C^*$ ), particle microstructure and storage stability stored at  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  in amber and transparent glass packaging. The carotenoid content of the extract was  $3852,75 \mu\text{g/L}$  and the antioxidant activity  $1,11 \text{ mM}$  of Trolox/g. The maximum carotenoid encapsulation efficiency was 60% with 5% (v/v) extract, 2% (w/v) Tween 80 and 90% (v/v) phosphate buffer pH 7,0, drying air temperature of  $130^\circ\text{C}$  and equal proportions of maltodextrin and gum arabic (25 g/L). The microcapsules showed 0,206 water activity, 1,1% of moisture content, and color indexes of 72,57 for  $L^*$  and 22,60 for chroma  $C^*$  and particle size of  $3,48 \mu\text{m}$  ( $\pm 1,35$ ). The encapsulated presented stability of carotenoids of 63,50 and 50,57% stored for 40 days at  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  in amber and transparent glass, respectively. Thus, the encapsulation using spray dryer employing the matrix composed of GA and MD is promising for the preservation of carotenogenic pigments and their application in the food, pharmaceutical and cosmetic industry.



**Keywords:** atomization, carotenogenic extracts, gum arabic, maltodextrin, encapsulation efficiency.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 CAROTENOIDES: DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO.....	19
2.2 PROPRIEDADES E FUNÇÕES DOS CAROTENOIDES .....	21
2.2.1 Propriedades cromofóricas .....	21
2.2.2 Atividade pró-vitáminica A .....	22
2.2.3 Atividade antioxidante e pró-oxidante.....	23
2.3 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR MICRORGANISMOS .....	25
2.3.1 Recuperação dos carotenoides .....	27
2.4 SOLUBILIDADE E ESTABILIDADE DE CAROTENOIDES.....	28
2.5 ENCAPSULAMENTO.....	30
2.5.1 Agentes encapsulantes .....	32
2.5.1.1 Maltodextrinas .....	33
2.5.1.2 Goma arábica .....	34
2.5.2 Métodos de encapsulamento .....	35
2.5.2.1 Secagem por atomização ( <i>spray drying</i> ) .....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 MATERIAL.....	41
3.1.1 Reagentes.....	41
3.1.2 Soluções.....	41
3.1.3 Equipamentos.....	41
3.2 MÉTODOS .....	42
3.2.1 Microrganismo e preparo do inóculo.....	42
3.2.2 Produção de carotenoides em biorreator em sistema semi-contínuo.....	43
3.2.3 Recuperação dos Carotenoides Totais .....	43
3.2.4 Encapsulamento de carotenoides .....	44
3.2.4.1 Preparo das amostras .....	44
3.2.4.2 Formação das microcápsulas .....	45
3.2.4.3 Secagem em <i>spray dryer</i> .....	46
3.2.4.4 Rendimento do encapsulado .....	47
3.2.4.5 Eficiência de Encapsulamento .....	47
3.2.5 Estabilidade de estocagem das microcápsulas.....	48
3.2.5.1 Modelagem matemática da estabilidade das microcápsulas .....	48

3.2.6 Caracterização morfológica dos encapsulados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
3.2.7 Determinação analíticas.....	49
3.2.7.1 Carotenoides totais do extrato (C <sub>t</sub> ).....	49
3.2.7.2 Carotenoides específicos (CE) do encapsulado.....	50
3.2.7.3 Atividade antioxidante do extrato.....	50
3.2.7.4 Atividade de água.....	53
3.2.7.5 Umidade.....	53
3.2.7.6 Índices de cor (L*, a*, b* e chroma C*).....	53
3.2.8 Análise Estatística.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO.....	55
4.2 ENCAPSULAMENTO DOS CAROTENÓIDES.....	56
4.2.1 Definição da composição da matriz e condição de secagem.....	56
4.2.2 Maximização do processo de encapsulamento dos carotenoides.....	57
4.2.3 Rendimento de secagem.....	59
4.2.4 Eficiência de Encapsulamento de carotenoides.....	60
4.2.5 Características físico-químicas e morfológicas dos encapsulados.....	64
4.2.5.1 Atividade de água e Umidade.....	65
4.2.5.2 Cor.....	69
4.2.5.3 Caracterização morfológica dos encapsulados.....	75
4.3 ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	76
5 CONCLUSÕES.....	81
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
7 REFERÊNCIAS.....	84
8 APÊNDICES.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Representação geral da molécula de carotenoide acíclica (C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> ) com estrutura central poliênica.....	20
<b>Figura 2 -</b> Estrutura química de alguns de carotenoides dos grupos carotenos (licopeno e β-caroteno) e xantofilas (luteína, cantaxantina e astaxantina).....	21
<b>Figura 3 -</b> Reação de neutralização do oxigênio singlete por ação de carotenoide: (a) reação de conversão do oxigênio singlete em oxigênio triplete; (b) reação subsequente, em que o carotenoide triplete retorna ao estado fundamental, liberando o excesso de energia sob forma de calor.....	24
<b>Figura 4 -</b> Reações de supressão do radical peroxil e a molécula de carotenoide: (a) reação de transferência de elétron; (b) reação de abstração de hidrogênio; (c) reação de adição. ....	24
<b>Figura 5 –</b> Esquema de degradação esperada dos carotenoides. ....	29
<b>Figura 6 -</b> Diferentes morfologias de microcápsulas obtidas por microencapsulação: (a) microcápsula; (b) microesfera; (c) microcápsula multicamadas; (d) microesfera multicamada e multinuclear.....	30
<b>Figura 7 –</b> Representação esquemática dos diferentes processos envolvidos na microencapsulação.....	31
<b>Figura 8 -</b> Esquema de funcionamento de um <i>Spray dryer</i> . ....	36
<b>Figura 9 -</b> Formação da partícula sólida através da secagem por aspersão ( <i>spray drying</i> ). ....	37
<b>Figura 10 –</b> Fluxograma esquemático das etapas realizadas no estudo.....	40
<b>Figura 11 –</b> Extrato de carotenoides concentrado. ....	44
<b>Figura 12-</b> Aspecto geral do <i>spray dryer</i> utilizado no encapsulamento do extrato concentrado carotenoides. ....	46
<b>Figura 13–</b> Curva padrão de Trolox. ....	51
<b>Figura 14-</b> Representação tridimensional do sistema colorimétrico. ....	54

<b>Figura 15</b> - Superfície de resposta e curva de contorno para a eficiência de encapsulamento em função da temperatura e goma arábica (a) e (b) e goma arábica e maltodextrina (c) e (d), respectivamente. ....	61
<b>Figura 16</b> - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis independentes testadas no planejamento fatorial $2^3$ para o encapsulamento e secagem de extrato de carotenoides em relação a atividade de água (a) e ao teor de umidade (%) (b). ....	66
<b>Figura 17.</b> Aspecto visual das microcápsulas secagem por <i>spray dryer</i> (Ensaio ponto central). ....	69
<b>Figura 18</b> - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o parâmetro de cor $L^*$ em função da temperatura e maltodextrina. ....	70
<b>Figura 19</b> - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis independentes testadas no planejamento fatorial $2^3$ para o índice de cor $a^*$ . ....	71
<b>Figura 20</b> - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o parâmetro de cor $b^*$ em função da goma arábica e maltodextrina. ....	72
<b>Figura 21</b> - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o parâmetro de cor $C^*$ em função da goma arábica e maltodextrina. ....	74
<b>Figura 22-</b> Micrografias eletrônicas das microcápsulas do material de parede (a) e do extrato carotenogênico encapsulado (b) $10\mu\text{m}$ e detalhe em $2\mu\text{m}$ . ....	75
<b>Figura 23-</b> Estabilidade das microcápsulas armazenadas a $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ em frasco de vidro âmbar (a) e transparente (b). ....	76
<b>Figura 24</b> - Modelos cinéticos de ordem um e Weibull de degradação dos carotenoides encapsulados em função do tempo, armazenados a $22^\circ\text{C}$ em frascos de vidro âmbar e vidro transparente. ....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Máxima produção de carotenoides ( $\mu\text{g/L}$ ) obtida em estudos utilizando <i>S. salmonicolor</i> em biorretator.	27
<b>Tabela 2</b> – Alguns estudos da literatura de encapsulamento de carotenoides empregando <i>spray dryer</i> .	39
<b>Tabela 3</b> - Ensaios preliminares do encapsulamento de carotenoides variando a temperatura, extrato de carotenoides, a proporção de maltodextrina e goma e Tween 80.	45
<b>Tabela 4</b> - Variáveis independentes e níveis utilizados no DCCR $2^3$ para o encapsulamento de carotenoides.	45
<b>Tabela 5</b> – Preparo das solução para curva padrão.	51
<b>Tabela 6</b> - Diluições utilizadas para o cálculo da atividade antioxidante total.	52
<b>Tabela 7</b> – Resultados dos testes preliminares do encapsulamento de carotenoides.	56
<b>Tabela 8</b> - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) $2^3$ (valores codificados e reais) e respostas encontradas.	58
<b>Tabela 9</b> - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo $2^3$ em relação a eficiência de encapsulamento.	94
<b>Tabela 10</b> - Análise de variância para a eficiência de encapsulamento do planejamento fatorial completo $2^3$ .	94
<b>Tabela 11</b> - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo $2^3$ para o índice $L^*$ .	95
<b>Tabela 12</b> – Análise de variância para o parâmetro de cor $L^*$ do planejamento fatorial completo $2^3$ .	95
<b>Tabela 13</b> - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo $2^3$ para a varivável $b^*$ .	96
<b>Tabela 14</b> - Análise de variância para o parâmetro de cor $b^*$ do planejamento fatorial completo $2^3$ .	96

**Tabela 15** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo  $2^3$  para o índice C\*. 97

**Tabela 16** - Análise de variância para o parâmetro de cor C\* do planejamento fatorial completo  $2^3$ . 97

**Tabela 17** – Estabilidade dos carotenoides armazenados em vidro âmbar. 98

**Tabela 18** - Estabilidade dos carotenoides armazenados em vidro transparente. 98

# 1 INTRODUÇÃO

A indústria tem voltado seus esforços à aplicação de corantes que mantenham suas características durante o processamento e armazenamento do produto. Tais compostos podem ser definidos como substâncias incorporadas nos alimentos com o intuito de conferir e intensificar a cor (tornando-os visualmente mais atraentes) e restaurar e/ou uniformizar a cor original do alimento (a qual foi perdida durante o processamento), ajudando o consumidor a identificar o aroma e o gosto normalmente associado ao produto, sendo que em uma classificação geral, eles podem ser naturais ou sintéticos (OLIVEIRA et al., 2010; CONSTANT et al., 2020). Dentro deste grupo de aditivos naturais um dos mais importantes são o dos carotenoides, pigmentos lipossolúveis que podem ser produzidos como metabólito secundário de vegetais, algas, fungos e algumas bactérias. No ano de 2017, foram isolados e identificados aproximadamente 1117 carotenoides naturais de 683 fontes (arquea 8; bactérias 170 e eucariotos 505) (ÁLVAREZ et al., 2014; ZAGHDOUDI et al., 2015; YABUZAKI, 2017). O mercado global de carotenoides vem crescendo, sendo que no ano de 2017, alcançou US\$ 1,5 bilhão e está previsto chegar a US\$ 2,0 bilhões até 2022, a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 5,7% no período de 2017-2022 (BCC, 2018).

A obtenção de pigmentos de fontes naturais por processos biotecnológicos tem se tornado atrativa devido a busca por produtos naturais e substituição aos pigmentos sintéticos. A produção biotecnológica de carotenoides apresenta como vantagens a sustentabilidade, o custo-benefício, serem considerados naturais e seguros, o processamento independe de mudanças climáticas, composição do solo, sazonalidade e tampouco do tempo gasto com cultivo de safras para colheita e extração. Acrescenta-se o fato de que, o processo pode ser totalmente controlado e otimizado, de forma a aumentar os rendimentos reduzindo os custos gerais de processamento ao utilizar-se, por exemplo, substratos baratos como resíduos agroindustriais.

Os carotenoides são usados em preparações alimentares, nutracêuticas e farmacêuticas devido às suas aplicações potenciais como corantes e à sua atividade pró-vitamina A e antioxidante atuando na eliminação dos radicais de oxigênio e reduzindo o estresse oxidativo. No entanto, as mesmas características que tornam os carotenoides interessantes para incorporação em alimentos, criam desafios no que se refere a sua conservação e estabilidade, devido, principalmente, a suscetibilidade à isomerização e oxidação frente a ação de oxigênio, luz, altas temperaturas, podendo causar alterações na cor e a perda de sua atividade biológica,



além de apresentarem baixa solubilidade em água, o que dificulta o seu uso em algumas matrizes alimentares (CHEN et al., 2017; PINTO et al., 2018, SHRISTI et al., 2020).

Uma abordagem para contornar estes processos é o uso da técnica de microencapsulação por *spray dryer*, utilizada para reduzir a instabilidade destes compostos e promover sua liberação gradual de forma controlada, sob condições específicas, através da qual é possível proporcionar proteção de substâncias sensíveis em função do isolamento físico devido a formação de membranas ou paredes que envolvem as partículas do material encapsulado, que podem ser constituídos por proteínas, lipídeos ou carboidratos, bem como por polímeros naturais ou sintéticos (JANISZEWSKA-TURAK et al., 2017; JAFARI et al., 2021).

O uso de carboidratos poliméricos com alta energia de ativação previne o estresse térmico e o oxidativo durante o armazenamento. Dentre eles, a maltodextrina é amplamente utilizada como material de revestimento devido ao seu baixo custo, boa solubilidade, não toxicidade, baixas viscosidades mesmo com alto teor de sólidos e fácil disponibilidade (SILVA; VIEIRA; HUBINGER, 2014). Porém apresenta baixa capacidade de emulsificação, por isso é preferível o seu uso em combinação com outros agentes carreadores, como a goma arábica, um material exsudato seco obtido da *Acacia Senegal (L.)*, constituída principalmente por polissacarídeos de alto peso molecular e seus sais, que na hidrólise produzem arabinose, galactose, ramnose e ácido glucurônico. Em baixos níveis de 1 e 10%, a goma arábica atua como formadora de filme, e estabilizador de umidade (PREMI; SHARMA, 2017; AREPALLY; GOSWAMI, 2018).

Assim, tendo em vista que os carotenoides são suscetíveis a perda de propriedades nutritivas, biológicas e tecnológicas quando expostos a fatores como ar, luz, calor e ácidos, o objetivo deste trabalho foi encapsular, pela técnica de atomização em *spray dryer*, os carotenoides produzidos por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636, utilizando goma arábica e maltodextrina como materiais de parede. Para tal alguns objetivos específicos e/ou metas foram delineados:

- Produzir carotenoides obtidos por *S. salmonicolor* em biorreator em processo semicontínuo com resíduos agroindustriais;
- Avaliar a concentração de carotenoides e a atividade antioxidante do extrato;
- Encapsular o extrato de carotenoides pela técnica de atomização por *spray dryer* avaliando os efeitos do material de parede (goma arábica e maltodextrina), da temperatura e Tween 80 na eficiência do encapsulamento;

- Caracterizar as micropartículas quanto ao rendimento de produto, eficiência de encapsulamento, atividade de água, umidade, índices de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$ ), estrutura e tamanho de partícula;
- Avaliar a estabilidade das microcápsulas armazenadas a 22°C em embalagem de vidro âmbar e transparente.

Esta dissertação está dividida em itens, conforme descrição resumida apresentada a seguir. No Item 2, serão abordados alguns aspectos teóricos da classificação, definição caracterização, propriedades, produção de carotenoides e as técnicas e materiais empregados para o seu encapsulamento. O Item 3 apresenta o desenvolvimento da metodologia para a produção de carotenoides utilizando uma levedura e resíduos agroindustriais por processo semicontínuo bem como a descrição das condições dos ensaios para o encapsulamento de carotenoides e a forma como caracterizou-se o extrato e as micropartículas. No Item 4, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para os experimentos e análises realizados tanto do extrato produzido quanto das microcápsulas. O Item 5 apresenta as conclusões do trabalho realizado, seguido do Item 6 com as sugestões para trabalhos futuros, Item 7 contendo todas as referências consultadas e, por fim, o Item 8 apresenta os apêndices deste trabalho.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A revisão bibliográfica está dividida em 3 partes principais: i) a primeira apresenta e define os carotenoides, sua caracterização, propriedades e funções; ii) a segunda parte por sua vez, refere-se a produção de carotenoides através de microrganismos e a estabilidade desses compostos; iii) e, por fim, a terceira parte aborda as técnicas e materiais empregados para o encapsulamento dos carotenoides.

### 2.1 CAROTENOIDES: DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO

Devido a sua ampla distribuição e diversidade de estruturas e funções, os carotenoides compõem um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais (PFANDER, 1992). Tais compostos são moléculas lipofílicas e estão presentes em todos os organismos fotossintéticos, sendo produzidos como metabólito secundário de vegetais, algas, fungos e algumas bactérias. Os animais, incluindo os seres humanos, são incapazes de sintetizar carotenoides sendo, portanto, dependentes do suprimento via cadeia alimentar (WESTPHAL; VOLKER BÖHM, 2015).

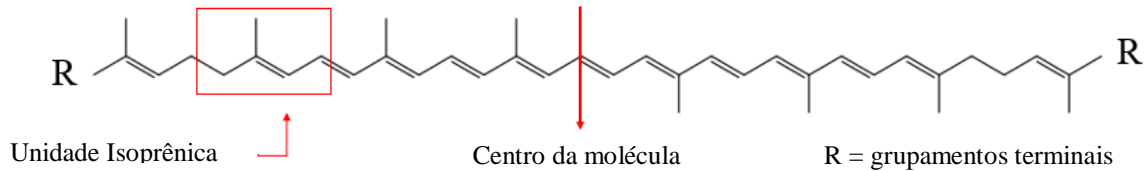
Quimicamente os carotenoides são classificados como tetraterpenóides, ou seja, com 40 átomos de carbono (exceto a crocetina e a bixina), formados pela união cabeça-cauda de oito unidades isoprenoides C<sub>5</sub>, exceto na posição central, onde a junção ocorre no sentido cauda-cauda, invertendo a ordem, resultando em uma molécula simétrica (OLIVIER; PALOU, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

A grande multiplicidade de carotenoides deve-se às diferentes modificações da estrutura básica que ocorrem através de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de ligações duplas, introdução de grupos contendo oxigênio, rearranjos, encurtamento ou extensão de cadeia, isomerização, ou combinações desses processos os quais resultam em uma infinidade de estruturas (PFANDER, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). Ademais, as alterações na cadeia poliênica dão origem a carotenoides acíclicos (como o licopeno), monocíclicos (como o  $\gamma$ -caroteno) ou bicíclicos (como o  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017).

Uma característica distintiva é a presença de uma cadeia poliênica conjugada centralmente localizada, que constitui o cromóforo absorvente de luz responsável pelas atraentes cores amarela, laranja ou vermelha e que fornece o espectro de absorção visível que serve de base para sua identificação e quantificação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999;

MALDONADE, 2002; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004; GRUSZECKI; STRZAŁKA, 2005). Na Figura 1 é apresentada a estrutura geral da molécula de carotenoide acíclica ( $C_{40}H_{56}$ ).

**Figura 1-** Representação geral da molécula de carotenoide acíclica ( $C_{40}H_{56}$ ) com estrutura central poliênica.



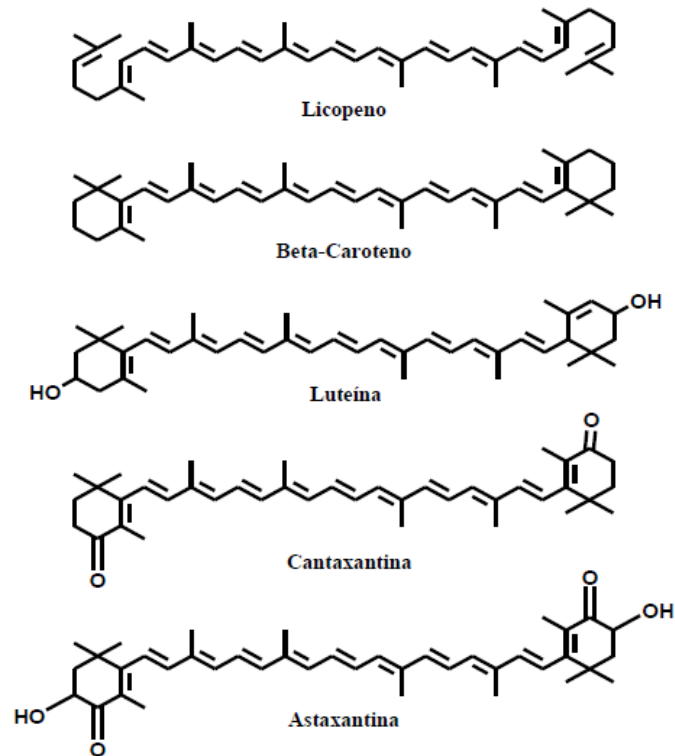
Fonte: Adaptado de Pfander (1992).

Devido ao sistema de duplas ligações conjugadas, que faz com que esses compostos sejam capazes de receber elétrons de espécies reativas e assim neutralizar radicais livres, os carotenoides apresentam potencial antioxidante. Em contrapartida, a presença destas mesmas duplas ligações conjugadas os tornam suscetíveis à perda da cor, do potencial antioxidante e atividade pró-vitáminica devido a possibilidade de isomerização e oxidação causados por fatores como oxigênio, luz, calor e extremos de pH (MALDONADE, 2002; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; SANTOS; MEIRELES, 2010).

De acordo com sua estrutura, os carotenoides são diferenciados em: i) carotenos (hidrocarotenoides) que são formados apenas de carbono e hidrogênio sendo livres de oxigênio e, portanto, muito solúveis em gordura e ii) xantofilas (oxicarotenoides) que contém átomos de oxigênio em sua molécula, além de carbono e hidrogênio e são mais polares que os carotenos (Figura 2) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; OLIVIER; PALOU, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004; KRINSKY; JOHNSON, 2005; WESTPHAL; VOLKER BÖHM, 2015). Em geral, “caroteno” é usado como sufixo no grupo dos carotenos e “ína” como sufixo das xantofilas (MATA-GÓMEZ et al., 2014).

Dentro do grupo dos (i) carotenos ainda existe a divisão entre compostos provitamina A (por exemplo,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina) e componentes não provitamina A, como a luteína ou licopeno (STAHL; SIES, 2005; ROSTAMABADI; FALSAFI; JAFARI, 2019).

**Figura 2** - Estrutura química de alguns de carotenoides dos grupos carotenos (licopeno e  $\beta$ -caroteno) e xantofilas (luteína, cantaxantina e astaxantina).



Fonte: Adaptado de Rodrigues-Amaya (2008); Vieira (2017).

Além do poder corante, os carotenoides apresentam propriedades funcionais que formam a base de diversas funções e ações em organismos vivos, como por exemplo atividade antioxidante e pró-vitamina A, as quais serão explanadas a seguir.

## 2.2 PROPRIEDADES E FUNÇÕES DOS CAROTENOIDES

Em consequência de apresentarem estrutura conjugada de polienos, os carotenoides apresentam diversas propriedades, funções e ações. Dentre elas, destacam-se as cromofóricas, atividade pró-vitamina A, capacidade antioxidante e/ou pró-oxidante, baixa solubilidade em água e facilidade de isomerização (baixa estabilidade), os quais serão detalhados a seguir.

### 2.2.1 Propriedades cromofóricas

A cor é um aspecto muito interessante nos carotenoides, variando do amarelo claro até o vermelho escuro como resultado de um sistema de duplas ligações conjugadas que ocorre ao longo da cadeia de hidrocarbonetos, constituindo o grupo cromóforo responsável pela capacidade de absorver luz na região do visível e que é utilizado para identificar e quantificar os carotenoides (ZAGHDOUDI et al., 2015).

A intensidade e a variação da cor dependem do número de ligações duplas, pois são elas que fazem com que o cromóforo absorva luz em regiões diferentes. Assim, carotenoides com menos de sete duplas ligações conjugadas são considerados incolores, como o fitoeno e o fitoflueno. Ainda, é descrito na literatura que para que a cor amarela apareça são necessárias, no mínimo, sete ligações conjugadas sendo que a coloração é acentuada à medida em que há o aumento no número de ligações conjugadas, pois estas resultam em maiores bandas de absorção em maiores comprimentos de onda, e neste caso, os carotenoides tornam-se mais vermelhos, a citar o licopeno que, com 11 ligações conjugadas, apresenta a cor vermelha (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; OLIVIER; PALOU, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

A propriedade corante por si só justificou a intensa investigação sobre carotenoides por muito tempo. Naturalmente a cor sempre influenciou na escolha dos alimentos pelos consumidores, sendo este atributo considerado um dos mais importantes e de maior impacto decisivo no julgamento da qualidade global do alimento. Mas muito mais que a cor, os carotenoides apresentam também atividade pró-vitáminica A.

### **2.2.2 Atividade pró-vitáminica A**

Além do seu papel como corante, a importância de carotenoides em alimentos se dá em virtude de suas funções biológicas das quais a mais conhecida há muitos anos, é a atividade pró-vitáminica A, que é um termo usado para se referir a moléculas que apresentam atividade biológica de retinol (IUPAC, 1983). A vitamina A é essencial para o bom funcionamento do sistema imune, visual, para a manutenção e crescimento, diferenciação e integridade epitelial, além de preservar o organismo do estresse oxidativo (IOM, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). A literatura aponta que para que um carotenoide apresente esta propriedade o composto deve conter ao menos um anel  $\beta$ -ionona (trimetil ciclohexano) conjugado não substituído e uma cadeia lateral poliênica ligada. A outra extremidade da molécula pode variar quanto à estrutura cíclica ou acíclica e ser alongada, mas não encurtada a um fragmento poliênico contendo menos do que 11 carbonos (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006; RAMALHO, 2010).

A estrutura da vitamina A (retinol) é, basicamente, a metade da molécula do  $\beta$ -caroteno com a adição de uma molécula de água no final da cadeia poliênica. Assim, o  $\beta$ -caroteno se destaca por ser o único capaz de gerar duas moléculas de retinol e a ele é atribuído 100% de atividade vitamínica A, além de ser o mais abundante na natureza. Mas outros compostos também podem cumprir este papel, como é o caso das moléculas de  $\beta$ -criptoxantina com 57%

de atividade,  $\alpha$ -caroteno com 53%,  $\gamma$ -caroteno entre 42-50% e o  $\beta$ -zeacaroteno entre 20-40%. (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006; RODRIGUES-AMAYA, 2008; WATKINS; POGSON, 2020).

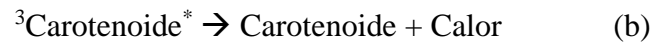
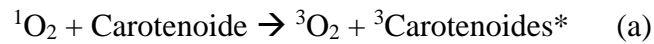
Além desta propriedade, outras funções biológicas têm sido associadas aos carotenoides, como a atividade antioxidante.

### 2.2.3 Atividade antioxidante e pró-oxidante

Em consequência da respiração, atividades celulares e do metabolismo do oxigênio, espécies reativas de oxigênio (ERO's) são geradas. Este termo designa qualquer átomo ou molécula que contenha um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, o que os tornam altamente reativos, causando a oxidação e danos aos componentes celulares, como proteínas, DNA, RNA e lipídios. Tais processos ocorrem quando há um desequilíbrio, através do qual a concentração de ERO aumenta em detrimento da defesa resultante da ação de antioxidantes levando ao estresse oxidativo, que pode desencadear doenças crônicas como cardiovasculares, oculares, processos carcinogênicos, mutagênicos e de envelhecimento (HIGUERA-CIAPARA; FÉLIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006; HALLIWELL, 2007; HORST; MORENO, 2009; MORGANTI, 2009; HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2015; MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017). Os carotenoides, devido às ligações duplas conjugadas da estrutura, tem ação de antioxidante, podem agir na desativação de radicais livres e, principalmente, no sequestro do oxigênio singlete por via física ou química ou ainda pelo sequestro de radicais peroxila por interação química, desta forma protegendo o organismo (HALLIWELL, 2007; SUCUPIRA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2018).

Em se tratando da via física, a neutralização ocorre pela transferência de energia física de excitação do oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) para a molécula de carotenoide, produzindo estados tripletos de ambas as moléculas (Figura 3a). O estado tripleto do oxigênio é seu fundamental menos ativo, enquanto que o carotenoide, através de uma reação subsequente, pelas interações rotacionais e vibracionais entre o tripleto carotenoide e o solvente, regeneram a molécula original de carotenoide e dissipam a energia de excitação sem causar danos (Figura 3b) (ÖTLES; ÇAGINDI, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; RAMEL, 2012; MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017).

**Figura 3** - Reação de neutralização do oxigênio singlete por ação de carotenoide: (a) reação de conversão do oxigênio singlete em oxigênio triplete; (b) reação subsequente, em que o carotenoide triplete retorna ao estado fundamental, liberando o excesso de energia sob forma de calor.



Fonte: Adaptado de Krinsky (1989); Mesquita; Teixeira; Servulo (2017).

A extinção química (eliminação), por sua vez, constitui em torno de 0,5% do total da inativação do oxigênio singlete e relaciona-se à reação química entre a espécie reativa do oxigênio e o carotenoide, por três tipos conhecidos: transferência de elétron, abstração de hidrogênio e adição (POLYAKOV, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

No mecanismo de transferência de elétron, os radicais com alto potencial redox removem um elétron do carotenoide, oxidando-o e formando o radical cátion, conforme Figura 4a. No processo de abstração de hidrogênio, por outro lado, ocorre a formação de uma radical neutro pela remoção de um átomo de hidrogênio da molécula de carotenoide (Figura 4b). Por fim, no mecanismo conhecido por adição, como o próprio nome diz, ocorre a adição de um radical à molécula de carotenoide, formando o radical aduto que também se encontra ilustrado na Figura 4c (POLYAKOV, 2001; EL-AGAMEY et al., 2004).

**Figura 4** - Reações de supressão do radical peroxil e a molécula de carotenoide: (a) reação de transferência de elétron; (b) reação de abstração de hidrogênio; (c) reação de adição.



Fonte: Adaptado de El-Agamey et al. (2004); Polyakov (2001).

Como moléculas hidrofóbicas, os carotenoides possuem ação antioxidante em ambiente lipofílico, como por exemplo nas membranas celulares ou lipoproteínas. Especificamente em membranas, dependendo de sua localização, as reações antioxidantes podem ocorrer tanto na presença de carotenoides polares (xantofilas), na porção hidrofílica, como também apolares (carotenos), na região hidrofóbica. A sua eficácia, porém, como já mencionado, está associada ao número de ligações duplas conjugadas presentes na molécula, as quais determinam o nível de energia tripleto mais baixo (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004).

Neste sentido, o licopeno (com onze duplas ligações conjugadas e cadeia acíclica) é mais eficiente em extinguir o oxigênio singlete do que o  $\beta$ -caroteno que possui nove duplas



ligações conjugadas e cadeia cíclica nas extremidades. Além destes, outros carotenoides apresentam atividade antioxidante, por ordem decrescente:  $\gamma$ -caroteno, astaxantina, cantaxantina,  $\alpha$ -caroteno, zeaxantina e luteína (HEBER; LU, 2002; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004; SIEMS et al., 2005).

Importante citar a possibilidade de os carotenoides manifestarem um efeito pró-oxidante ao reagir com espécies reativas de oxigênio (EROs) e formar compostos mais deletérios para as biomoléculas do que as EROs sozinhas. De acordo com Young e Lowe (2001), os fatores que podem influenciar para que o carotenoide apresente atividade antioxidante ou pró-oxidante são:

- (i) A estrutura da molécula (tamanho, forma e a natureza, número de grupos substituintes); forma física (agregada ou monomérica); configuração (*cis* ou *trans*);
- (ii) A localização ou local de ação do carotenoide dentro da célula;
- (iii) Possível interação com outros carotenoides ou antioxidantes, como por exemplo, vitaminas C e E;
- (iv) O aumento da concentração de carotenoides e da pressão parcial do oxigênio, que pode levar a formação de um radical carotenoide peroxil, dando início a lipoperoxidação; e
- (v) Reações com EROs ou espécies reativas de nitrogênio em que a molécula de carotenoide é oxidada e/ou clivada, gerando produtos pró-oxidantes.

Entretanto, tal comportamento pró-oxidante é relatado em condições experimentais extremas como utilizando-se oxigênio puro ou altas concentrações de carotenoides.

### 2.3 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR MICRORGANISMOS

A tentativa de adequação ao mercado consumidor tem impulsionado pesquisadores na busca por fontes de aditivos naturais e técnicas de recuperação emergentes. Porquanto os processos de obtenção de carotenoides através das plantas são caros, pesquisas científicas se voltam para a produção de tais pigmentos através da via microbiana.

As quantidades e os tipos de carotenoides obtidos via biotecnológica podem variar por uma série de fatores, tais como a fonte de carbono, microrganismos, condições de operação que afetam o crescimento celular e a produção de metabólitos (temperatura, pH e luminosidade),

aeração (essencial para a assimilação do substrato e taxa de crescimento) e o meio de cultivo (MATA-GÓMEZ et al., 2011).

Muitos microrganismos possuem a capacidade de biossíntese de carotenoides, todavia, nem todos são economicamente viáveis. Apesar disso, as leveduras notabilizam-se pelas suas necessidades simples de substrato, quando comparados a outros microrganismos, precisando apenas de uma fonte de carbono e de nitrogênio, os quais podem ser obtidos de coprodutos agroindustriais, trazendo benefícios para o meio ambiente e reduzindo custos de produção (VALDUGA et al., 2009a).

Dentre as leveduras, destaca-se a *Sporidiobolus salmonicolor* pertencente ao reino dos fungos da divisão dos *Basidiomycota*, tendo 3 variedades descritas, a *S. albus*, *S. fischeri* e *S. salmoneus*. Os pigmentos formados são de coloração rosa a laranjada e as culturas são opacas, lisas ou onduladas (SAMPAIO, 2011). São unicelulares, apresentam taxa de crescimento relativamente alta e capacidade de acumular lipídios e carotenoides, em especial  $\beta$ -caroteno. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25-35°C. Essas leveduras são capazes de biossintetizar carotenoides de substratos contendo mono e dissacarídeos e matérias-primas renováveis de baixo custo (melaço, soro de leite, água de parboilização, água de maceração de milho, glicerol bruto, etc). A parede celular é composta de manose, fucose, glicose e galactose (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; COLET et al. 2019).

Alguns trabalhos relatam a utilização de *S. salmonicolor* para a produção de carotenoides, conforme a Tabela 1.

A utilização de resíduos e/ou subprodutos agroindustriais é uma alternativa de baratear o custo de produção potencializando a viabilidade econômica do processo. Na literatura há estudos com a utilização do glicerol bruto, oriundo da produção de biodiesel (VALDUGA et al., 2014; COLET; DI LUCCIO; VALDUGA, 2015) da água de maceração de milho (AMM) (VALDUGA et al., 2007; VALDUGA et al., 2008; BARBATO, 2014) e de água de parboilização de arroz (APA) (COLET, 2016; COLET et al., 2017; COLET et al., 2019). O glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono, facilmente assimilável para a obtenção de energia metabólica e como regulador do potencial redox e para reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula, a AMM é fonte de nitrogênio orgânico, carboidratos, aminoácidos, minerais, vitaminas, peptídeos e fosfato e a APA contém altas cargas de substâncias orgânicas e nutrientes como nitrogênio e fósforo (DASARI et al., 2005; VALDUGA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2016; COLET et al., 2017).

**Tabela 1** – Máxima produção de carotenoides ( $\mu\text{g/L}$ ) obtida em estudos utilizando *S. salmonicolor* em biorretator.

<b>Autor</b>	<b>Máxima produção de carotenoides (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Carotenoides Majoritários</b>
Buzzini et al. (2007)	613,3	Toruleno e $\beta$ -caroteno
Valduga et al. (2008)	541,5	-
Tatsch (2008)	3425,9	-
Valduga et al. (2009b)	590,4	-
Valduga et al. (2009c)	913,0	-
Colet; Di Luccio; Valduga (2015)	4400	-
Colet (2017)	7388	all-trans- $\beta$ -caroteno
Colet et al. (2019)	4753	all-trans- $\gamma$ -caroteno

Fonte: O autor, 2020.

Além de levar em conta todos fatores que estão relacionados com a produção de carotenoides, uma etapa essencial para obtenção deste produto se encontra na recuperação.

### 2.3.1 Recuperação dos carotenoides

Subsequente a produção, a etapa de recuperação dos carotenoides é considerada crítica em virtude do desafio de ser feita sem degradar os carotenoides, já que são sensíveis as condições ambientais (PENNACCHI et al., 2014).

A escolha do método mais eficiente para a extração não depende apenas das características dos carotenoides (como a polaridade), mas também do microrganismo pelo qual ele foi produzido. Uma vez que os carotenoides apresentam características lipofílicas, são sintetizados intracelularmente e que, em alguns casos, a parede celular é rígida, este processo envolve o uso de solventes orgânicos ou ainda métodos abrasivos, químicos ou enzimáticos (CARDOSO; KANNO; KARP, 2017; SAINI; KEUM, 2018; MUSSAGY et al., 2019).

O uso de solventes apresenta vantagens de não produzir detritos celulares finos, além de ser uma técnica simples, que não exige longos períodos de tempo nem altos custos. Neste sentido, a extração dos pigmentos depende da permeabilidade do solvente através da parede celular e da solubilidade dos carotenoides no solvente, sendo que os mais utilizados (misturados ou individualmente) são: acetona, clorofórmio, éter de petróleo, diclorometano, hexano,

metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol entre outros (PENNACCHI et al., 2014; CARDOSO; KANNO; KARP, 2017).

Como dito, existe uma forte associação dos carotenoides com as células, e os autores Valduga et al. (2009c), visando maximizar a extração de carotenoides produzidos pela levedura *S. salmonicolor*, testaram 11 métodos diferentes de rompimento celular e de extração com solventes, no qual observaram que a melhor combinação para ruptura celular foi obtida com a maceração com nitrogênio líquido, seguido pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO) e, posterior extração com a mistura de acetona e metanol na proporção 7:3 (v:v), sendo estes solventes mais efetivos na extração por serem miscíveis em água e os materiais biológicos apresentarem grande quantidade de água em sua composição.

#### 2.4 SOLUBILIDADE E ESTABILIDADE DE CAROTENOIDES

Os carotenoides, em sua grande maioria, são moléculas lipossolúveis, como por exemplo, o  $\beta$ -caroteno e o licopeno. Isso ocorre pela presença de longas cadeias alifáticas insaturadas que os tornam solúveis em solventes orgânicos clássicos como metanol, sulfeto de carbono, éter de petróleo e acetona. São hidrofóbicos com exceção de quando formam complexos com proteínas (carotenoproteínas). Além disso, em alguns casos aparecem dissolvidos nos lipídios, formando soluções coloidais (SUBAGIO; MORITA, 2001; DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010; LU; MAIDANNYK; LIM; 2020).

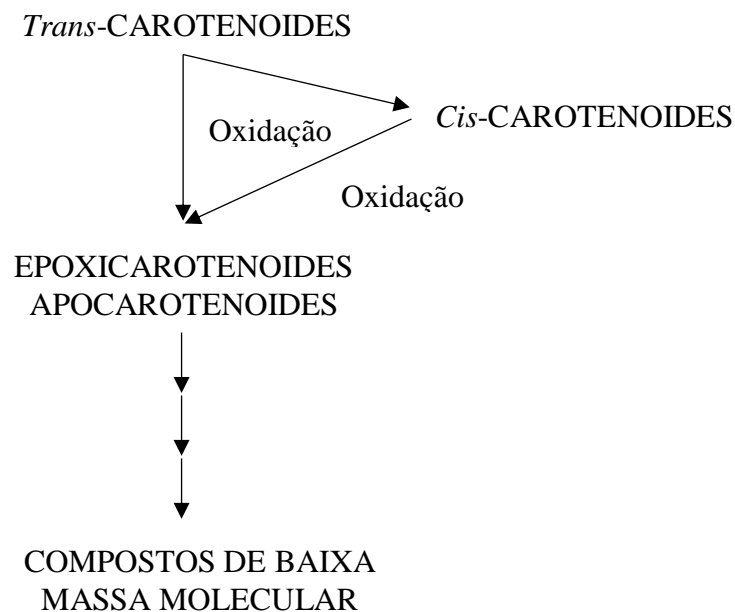
É essencial que os pigmentos naturais sejam estáveis durante todas as etapas do processamento de alimentos, porém no caso dos carotenoides, além de tornarem as moléculas insolúveis em água, as insaturações lhes conferem alta reatividade, facilitando as alterações ou perdas, que podem ser desencadeadas por fatores ou condições muitas vezes inerentes ao processamento e estocagem dos produtos. Os dois principais mecanismos que levam a degradação dos carotenoides são a isomerização ou oxidação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; AMAN; SCHIEBER; CARLE, 2005; GHIDOUCHE et al., 2013; DE LIMA PETITO et al., 2016).

Altas temperaturas, presença de luz, ácidos, extremos de pH e adsorção em uma superfície ativa (como alumina), promovem a isomerização de carotenoides *trans* (sua configuração usual e mais estável), para a forma *cis*, resultando na perda de cor e da atividade pró-vitáminica A. Este processo pode ocorrer durante o processamento industrial como desidratação, trituração e cocção (MELENDEZ-MARTINEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004).

A degradação oxidativa, por sua vez, depende da disponibilidade de oxigênio e é estimulada por diversos fatores como enzimas, metais, luz e co-oxidação com hidroperóxidos lipídicos. Em um primeiro momento, ocorre a formação de epóxidos e apocarotenoides (carotenoides com esqueleto de carbono encurtado). Posteriormente as fragmentações produzem uma série de compostos de baixo peso molecular parecidos aos produzidos na oxidação de ácidos graxos, ocasionando a perda total de atividades biológicas e da cor. A Figura 5 contém um mecanismo simplificado das mudanças que são esperadas no processo de degradação dos carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Assim, é reconhecido que um dos principais fatores limitantes do uso de carotenoides como corante alimentar é sua natureza instável, grande suscetibilidade à degradação química por isomerização e oxidação, além da baixa solubilidade em água o que dificulta o uso em matrizes alimentares (GUTIÉRREZ et al., 2013; MEDEIROS et al., 2019).

**Figura 5** – Esquema de degradação esperada dos carotenoides.



Fonte: Adaptado de Rodriguez-Amaya (1999).

No entanto, o processamento e armazenamento de alimentos deve ser otimizado para prevenir ou reduzir a degradação, enquanto acentua a biodisponibilidade, começando pela produção e/ou obtenção deste material, passando pelas etapas de processamento e se estendendo até o armazenamento e consumo do produto.

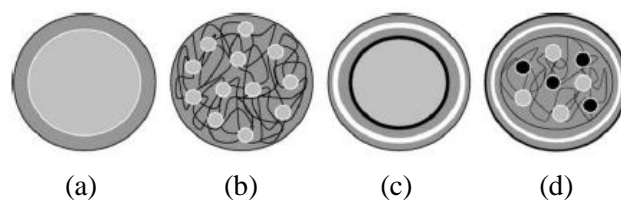
## 2.5 ENCAPSULAMENTO

Os carotenoides detêm capacidade antioxidante e atividade pró-vitáminica A e são utilizados também como corantes. No entanto, são susceptíveis a reações de oxidação e isomerização na presença de oxigênio e outros fatores externos. Neste sentido, o método de encapsulamento tem sido considerado atraente e promissor, sendo amplamente estudado e empregado como estratégia eficaz, capaz de promover o aumento da solubilidade em água dos carotenoides. Além disso, facilita o manuseio, o aumento da biodisponibilidade e estabilidade destes compostos contra fatores externos como oxigênio, umidade, calor, luz, radicais livres, aos quais os produtos são submetidos durante o processamento e armazenamento dos alimentos (COOK et al., 2012; RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016; MEDEIROS et al., 2019).

O material encapsulado é intitulado recheio ou núcleo e o material que forma a cápsula, por sua vez, é denominado encapsulante, revestimento, material de parede ou cobertura (BARRETO et al., 2015; ETCHEPARE et al., 2015; VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017). Quanto ao tamanho, as cápsulas podem ser classificadas em macro- (se forem maiores que 5000  $\mu\text{m}$ ), micro- (com tamanho variando entre 0,2-500  $\mu\text{m}$ ) e nanocápsulas (se forem menores que 0,2  $\mu\text{m}$ ) (AZEREDO, 2005).

Em termos de estrutura, encontram-se as microcápsulas, as quais contém um único núcleo rodeado por uma camada de material de parede, as microesferas com núcleo disperso de forma contínua em uma rede de matriz e, aquelas com estruturas mais complexas, como as de multicamadas de mesma ou várias composições ou numerosos núcleos em uma mesma estrutura (Figura 6), sendo que as diferenças em termos de estruturas e morfologias ocorrem conforme os métodos e materiais envolvidas em sua preparação (NESTERENKO et al., 2013).

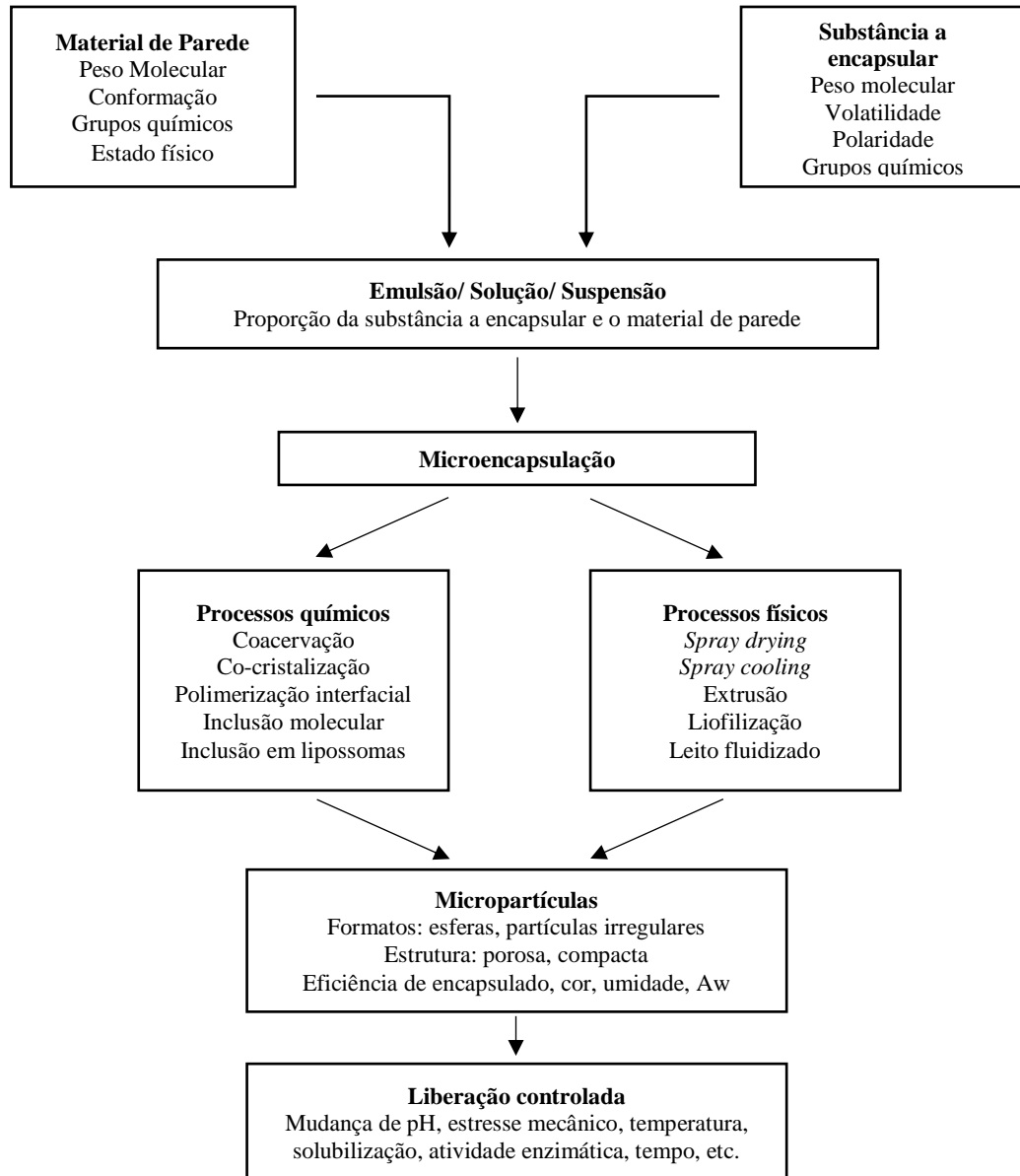
**Figura 6** - Diferentes morfologias de microcápsulas obtidas por microencapsulação: (a) microcápsula; (b) microesfera; (c) microcápsula multicamadas; (d) microesfera multicamada e multinuclear.



Fonte: Nesterenko et al. (2013).

O processo de encapsulamento envolve diversas variáveis e a Figura 7 mostra a representação esquemática de todo o processo, incluindo as principais técnicas e etapas que estão envolvidas na preparação de micropartículas.

**Figura 7** – Representação esquemática dos diferentes processos envolvidos na microencapsulação.



Fonte: Adaptado de Huertas; Adolfo (2010); Estevinho; Rocha (2018).

Assim, conforme a Figura 7, existem várias etapas do encapsulamento cada qual com suas variações, fatores e parâmetros a serem levados em conta e otimizados, iniciando pela compreensão do composto que irá ser encapsulado, escolha do material de parede, seguindo para o preparo da solução, escolha do método de microencapsulação mais adequado e condições de processo e logo após a obtenção das cápsulas, realização das análises para sua efetiva caracterização e melhor aplicação, os quais serão discutidos a seguir.

### 2.5.1 Agentes encapsulantes

A escolha do material de revestimento é a etapa inicial do encapsulamento e, embora o método de encapsulamento possa afetar o mecanismo de liberação do núcleo, a formulação do material de parede é o fator mais importante, pois afeta particularmente o rendimento, a estabilidade de armazenamento, a eficiência do processo e a proteção e liberação do núcleo das micropartículas (ALDANA; SANDOVAL; APONTE, 2004; NESTERENKO et al., 2013).

Por isso, o material escolhido deve atender alguns critérios que dependem das características químicas do material encapsulado, aplicação, condições de armazenamento e processo ao qual será exposto. Neste sentido, um bom material de parede é aquele que possui baixo custo, sabor insípido, que tenha grande capacidade de incorporar o material de interesse e protegê-lo contra condições adversas, mas que, ao mesmo tempo seja insolúvel e não reativo com o núcleo. Deve ainda apresentar baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos e baixa higroscopicidade, visando facilitar o manuseio e evitar a agregação do material, ter propriedades de liberação do material a encapsular e ser solúvel em determinados solventes (CHANG et al., 2018; GERANPOUR; ASSADPOUR; JAFARI, 2020).

Porém, como é difícil encontrar uma única substância que atenda todos requisitos para atuar como um bom material de parede, na prática, eles são usados em combinação uns com os outros para obter propriedades específicas e benéficas de ambos.

A escolha do encapsulante a ser utilizado no processo geralmente é feita através de procedimentos de tentativa e erro, mediante planejamento experimental, baseando-se em critérios tais como: a estabilidade durante a estocagem, grau de proteção do núcleo, características microscópicas da superfície e a eficiência de encapsulado (PÉREZ-ALONSO et al., 2003).

A maior parte dos materiais utilizados para o encapsulamento na área de alimentos são os de base biológica, a citar carboidratos (amido, maltodextrinas, xarope de milho ciclodesxtrinas), gomas (goma arábica, ágar, alginato, quitosano, pectina), celuloses (carboximetilcelulose, metilcelulose, etc.), proteínas (proteína de soro de leite e de soja, caseína, gelatina, albumina) e lipídios (cera, óleos, gorduras, parafina, fosfolipídios) (ALDANA; SANDOVAL; APONTE, 2004; BEZERRA; DEVILLA; DE PAULA, 2019).

Dentre estes, os carboidratos como, por exemplo as maltodextrinas e as gomas como a goma arábica, têm sido amplamente utilizados como agentes encapsulantes devido as suas propriedades, as quais serão discutidas a seguir (CANO-HIGUITA; VELEZ; TELIS, 2015; CORRÊA-FILHO et al., 2019).



### 2.5.1.1 Maltodextrinas

As maltodextrinas são polissacarídeos ou carboidratos, onde cada molécula possui em média 5 a 10 unidades de  $\alpha$ -D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,4). Apresentam baixa viscosidade (mesmo em altas concentrações), são solúveis em água e não possuem sabor de amido. No mercado, estão disponíveis como pós brancos ou soluções concentradas sendo categorizadas como ingrediente geralmente reconhecido como seguro (*Generally Recognized As Safe*, GRAS) pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) (STORZ; STEFFENS, 2004; DA SILVA; BOGDAN; JESUI, 2014).

As maltodextrinas são classificadas de acordo com o grau de hidrólise do amido, expresso em dextrose equivalente (DE), que é uma medida do total do número de unidades de  $\alpha$ -D-glicose anidro e está ligada ao seu grau de polimerização (DP), ou seja, ao número de unidades monoméricas em uma molécula de polímero, de maneira que  $DE = 100/DP$ . Assim, maltodextrina é todo material que tenha DE entre 3 e 20. Conforme o grau de hidrólise aumenta, a média do peso molecular diminui e a DE aumenta (KESHANI et al., 2015).

Além disso, existe uma correlação direta entre o valor DE de um amido hidrolisado e a estabilidade oxidativa conferida ao núcleo, ou seja, maiores valores de DE são melhores para barrar o oxigênio e, assim aumentar a estabilidade oxidativa. Porém, menor será a temperatura de transição vítrea (aumento da mobilidade molecular) o que amplia as chances de aglomeração do pó obtido, pelo aumento de sua higroscopicidade, solubilidade em água e fluidez. Assim observaram os autores Wagner e Warthesen (1995): quanto maior a DE de um amido hidrolisado maior é a eficiência da cápsula em proteger o  $\beta$ -caroteno contra oxidação. Por outro lado, com a diminuição da DE, ou seja, com massa molecular maiores, ocorre aumento na viscosidade, auxiliando na produção do pó, reduzindo a higroscopicidade e pegajosidade (AZEREDO, 2005; BEZERRA; DEVILLA; DE PAULA, 2019).

Normalmente as maltodextrinas são aplicadas como agentes encapsulantes na liofilização e também na secagem por *spray dryer*. Seu uso durante o processo de secagem ajuda a manter algumas propriedades do produto como cor, teor de nutrientes e sabor. Adiciona-se ainda o fato de terem baixo custo, o que as tornam a escolha preferida para encapsulamento (MADENE et al., 2006; ESTEVINHO; ROCHA, 2018; EUN, et al., 2019).

Apesar de todas as características descritas acima, a utilização das maltodextrinas na formação das cápsulas não é suficiente para suprir todas as características e qualidade desejadas, sendo preferida para o uso em combinação com outro material de parede devido à sua baixa capacidade de emulsificação. Dentre os polímeros, a goma arábica é um dos materiais de parede

mais utilizados na microencapsulação, por causa de suas propriedades de emulsificação, sendo capaz de conferir maior estabilidade, viscosidade e proteção (BEZERRA; DEVILLA; DE PAULA, 2019), sendo descrita a seguir.

#### 2.5.1.2 Goma arábica

A goma arábica é considerada um dos agentes encapsulantes mais importantes na indústria de alimentos. É o produto obtido da dessecação do exsudato gomoso dos troncos e dos ramos do gênero *Acácia senegal (Limne)*. É um polissacarídeo complexo de estrutura ramificada, neutro ou ligeiramente ácido, cuja cadeia principal é constituída por unidades de D-galactopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3), na qual estão ligadas as cadeias laterais com diferentes estruturas químicas, através de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6). Sendo assim, possui diferentes frações: a maior (cerca de 70% da goma) corresponde a cadeia de polissacarídeos (D-galactose, L-arabinose, L-ramnose e ácido D-glucurônico) com pouco ou nenhum material nitrogenado; outra parte (menor com cerca de 2% do peso total), é a fração proteica e parece ser a responsável pelas suas propriedades emulsificantes e estabilizantes; pode ainda apresentar cerca de 3 a 4% de substâncias associadas, como polifenóis e minerais (magnésio, potássio, cálcio, sódio, etc.) (KAUSHIK; ROOS, 2007; OLIVEIRA et al., 2013; CARVALHO, 2017; GONÇALVES; ESTEVINHO; ROCHA, 2017). Prevê-se que os carotenoides interajam com a região hidrofóbica (proteica) da goma arábica por meio de interações hidrofóbico-hidrofóbicas (ORDOÑEZ; HERRERA, 2014; CORRÊA-FILHO et al., 2019).

Em geral, a goma arábica é considerada um biopolímero viável e um dos mais utilizados para o encapsulamento, devido a sua capacidade de formar uma matriz seca em torno de compostos dispersos, emulsões estáveis, baixo teor de proteínas, baixa viscosidade em meio aquoso, por não ter cor ou cheiro, apresentar sabor sutil, facilitar o processo de secagem, conferir proteção ao pigmento, boa retenção de voláteis e alta estabilidade oxidativa (ESTEVINHO; ROCHA, 2018).

Escolhido o material de parede, a próxima etapa envolve a seleção da técnica de encapsulamento, que entre muitos fatores, deve ser baseada de acordo com o material a ser encapsulado, propósito de uso, custos e viabilidade do equipamento.

## 2.5.2 Métodos de encapsulamento

Um método totalmente eficiente para todas as condições a que este possa ser empregado é inatingível. Assim, inúmeros métodos foram desenvolvidos para encapsular compostos cada um com seus méritos e deméritos, diferindo de acordo com as especificações e adaptações, e sua seleção está atrelada, principalmente, as propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação das micropartículas, tamanho médio de partículas requerido, mecanismos desejados de liberação, escala de produção industrial, custos e valor do produto final (AZEREDO, 2005; ESTEVINHO; ROCHA, 2018).

Dentre os métodos, destacam-se a atomização (*Spray drying* - secagem de gotículas; *Spray cooling* – solidificação de gotículas por resfriamento), liofilização (*Freeze-drying*), extrusão (modelamento de microesferas por meios mecânicos), recobrimento em leito fluidizado (fluidização), coacervação (separação do polímero encapsulante de um meio líquido e sua precipitação na superfície do material ativo disperso no mesmo meio), polimerização interfacial (reação de polimerização no limite entre duas soluções, uma delas contendo o material ativo em suspensão), inclusão molecular (encapsulação de certas moléculas por outras), inclusão em lipossomas (encapsulação por membranas lipídicas), entre outros (ALDANA; SANDOVAL; APONTE, 2004; AZEREDO, 2005; WEN et al., 2017).

Dos métodos citados acima, a secagem por atomização em *spray dryer* é o processo mais usado para o encapsulamento de compostos ativos pela indústria de alimentos (LOCHNECKEL et al., 2018; COELHO; ESTEVINHO; ROCHA, 2021), motivo pelo qual se encontra detalhado na próxima subseção.

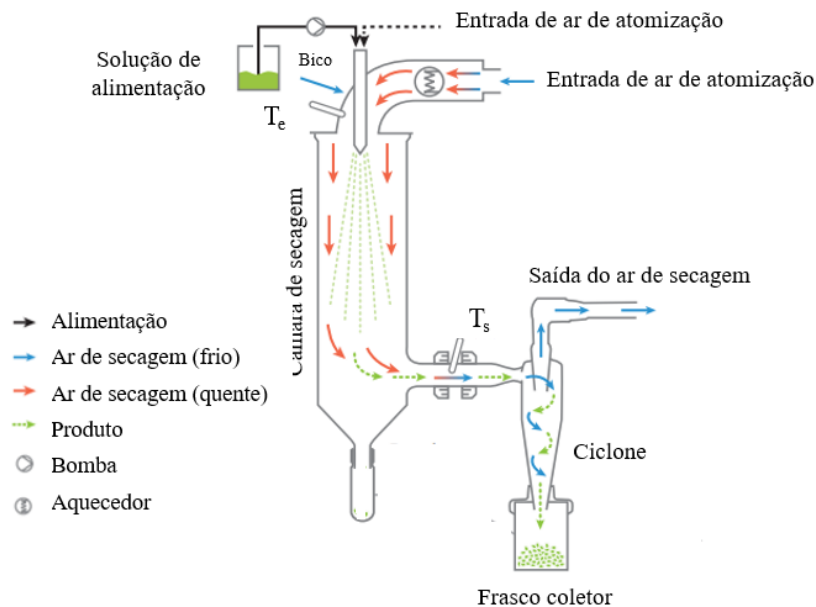
### 2.5.2.1 Secagem por atomização (*spray drying*)

Mesmo que muitas técnicas tenham sido desenvolvidas para microencapsular componentes alimentícios, a secagem por *spray dryer* é a mais comum devido as suas vantagens tais como a disponibilidade de equipamentos (inclusive para escala industrial), operação contínua e o baixo custo operacional relatado na literatura como sendo cinco vezes mais econômico do que a liofilização e quase três vezes mais econômico do que a secagem a vácuo (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). Além disso, a secagem por *spray dryer* inclui altas taxas de produção, reprodutibilidade, ampla gama na escolha de materiais encapsulantes, boa eficiência de encapsulamento quando os parâmetros operacionais são ajustados corretamente (entre 30-90%) e produção de partículas de pó de boa qualidade e estáveis devido ao seu baixo teor de umidade e atividade de água, o que reduz também os custos

de transporte (ESTEVINHO; ROCHA, 2018; CORRÊA-FILHO et al., 2019; TAO et al., 2019; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

O processo de secagem por atomização baseia-se no princípio de transferência simultânea de calor e massa, sendo definido como a transformação de um produto que se encontra no estado fluido para o estado sólido em forma de pó, através da dispersão de gotículas do material dentro de uma câmara em contato com ar aquecido. Conforme mostra a Figura 8, um secador por *spray drying* comum é composto por um reservatório e bomba de alimentação, um atomizador, um aquecedor e fornecedor de ar de secagem, uma câmara de secagem, um ciclone de separação de partículas secas e um exaustor e filtro para a saída do ar de secagem (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

**Figura 8** - Esquema de funcionamento de um *Spray dryer*.



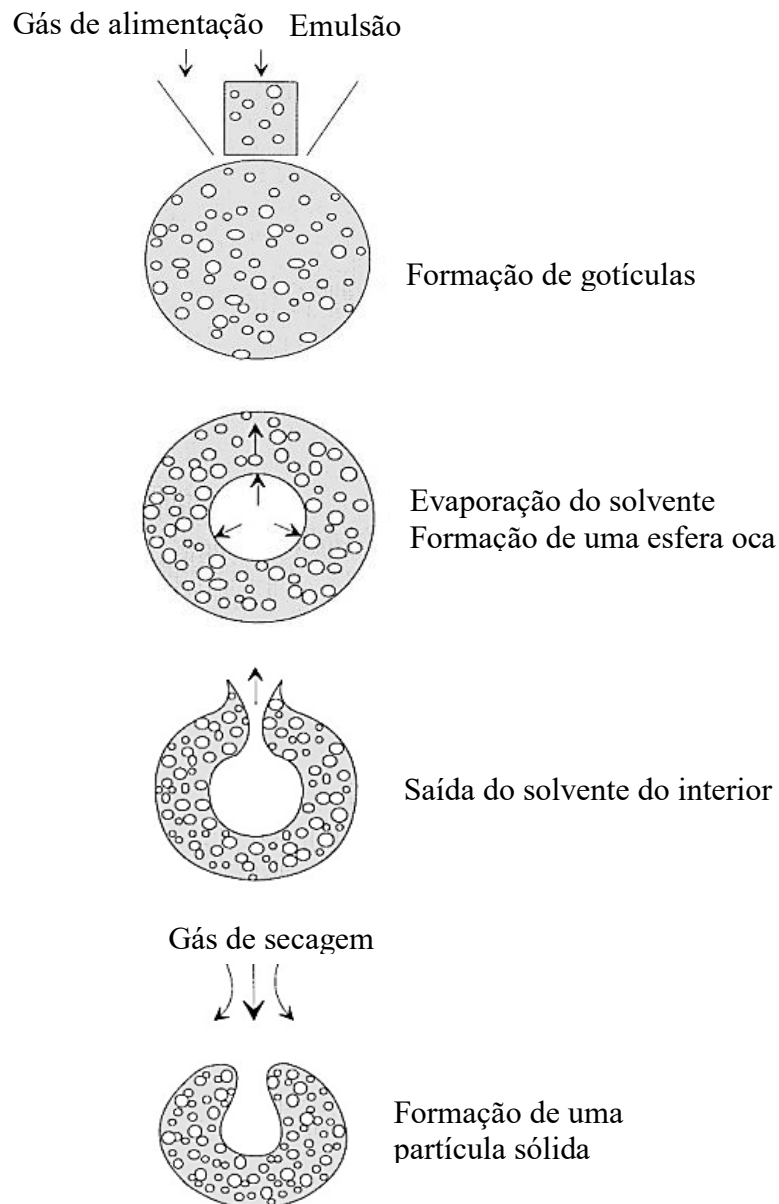
Fonte: Adaptado de Assadpour; Jafari (2019).

O processo é contínuo e, de acordo com a literatura, envolve basicamente as seguintes etapas: atomização da amostra de alimentação, contato das gotículas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor e secagem de gotículas líquidas com a evaporação do solvente. A Figura 9 propõe um esquema de formação da partícula sólida pelo método de secagem por aspersão (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010; GONÇALVES; ESTEVINHO; ROCHA, 2017).

Em detalhes, o processo inicia-se com o preparo e dissolução dos materiais de parede em um solvente, no qual será adicionado o núcleo ativo para formar a solução, dispersão ou emulsão. Em seguida, esta solução é bombeada para o atomizador (com temperatura de entrada que varia de 110°C a 220°C), no qual a alimentação líquida é quebrada em um spray de gotículas

pequenas, que são direcionadas para dentro da câmara de secagem junto com um gás de secagem aquecido para a vaporização da umidade, fazendo com que a gota encolha e os sólidos restantes formem uma camada seca (cápsula) ao redor do material central por atração de massa e rápida remoção de água. Após o término da secagem, as partículas secas são separadas do ar úmido por meio de ciclone e transportadas por uma corrente de ar contínua até o final do ciclone equipado com frasco de vidro coletor e o ar de secagem é removido do secador através de um exaustor (ALDANA; SANDOVAL; APONTE, 2004; SHISHIR; CHEN, 2017; ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

**Figura 9** - Formação da partícula sólida através da secagem por aspersão (*spray drying*).



Fonte: Adaptado de Cao et al. (2000); Oliveira; Petrovick (2010).

O produto formado apresenta tamanho médio da cápsula variando de 10 e 100  $\mu\text{m}$ , com estruturas esféricas ou ovais, com crosta lisa ou áspera, dependendo das características do produto e das condições de secagem (BRENNAN, 2003; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007; ESTEVINHO; ROCHA, 2018).

Os principais parâmetros operacionais de um secador *spray dryer* são: o material de alimentação (temperatura do material de alimentação, o quociente de vazão e a concentração inicial), atomização (tipo, diâmetro e pressão de alimentação no bico), câmara de secagem (altura e comprimento), fluxo do ar de entrada (temperatura, vazão e umidade) e fluxo do ar de saída (temperatura e umidade). A otimização se dá principalmente pela variação dos parâmetros de concentração e vazão do material disperso no líquido atomizado (material de parede mais extrato) e temperatura de entrada do ar de secagem (WOO; BHANDARI, 2013; ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

Quanto as cápsulas, as principais análises e controle são o rendimento do pó, tamanho de partícula, morfologia, higroscopicidade, conteúdo de umidade, densidade, porosidade, solubilidade, cor, eficiência de encapsulamento, conteúdo dentro no núcleo e na superfície, perfil de liberação, estabilidade de armazenamento, estabilidade em relação aos parâmetros de processamento e ambientais, propriedades organolépticas e qualitativas em formulações de alimentos (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

Portanto, é essencial avaliar como a técnica de secagem por *spray drying* e as condições operacionais influenciam nas propriedades do pó e como otimizar as faixas adequadas. Na literatura, existem estudos realizados sobre este tema, alguns específicos sobre o encapsulamento de carotenoides, conforme Tabela 2.

**Tabela 2** – Alguns estudos da literatura de encapsulamento de carotenoides empregando *spray dryer*.

Material encapsulado	T (°C)	Agente encapsulante	EE (%)	Autor
Suco de <i>Physalis peruviana</i> L. rico em carotenoides	140	MD (DE 12) (20% p/p)	55,00	Etzbach et al. (2020)
		GA (20% p/p)	57,00	
		MD (DE 12):GA (10% p/p)	50,00	
Fucoxantina extraída da microalga <i>Chaetoceros calcitrans</i>	100	MD:GA (1:1) + Tween 20 (CTS 20%)	39,32	Foo; Khong; Yusoff (2020)
		MD:GA (1:1) + Tween 20 (CTS 20%)	74,27	
		MD:GA (3:1) + Tween 20 (CTS 40%)	71,70	
Carotenoides cristalinos (CCS) Carotenoides dissolvidos em gotículas de lipídeos (CCE)	195	MD (50% p/p)	86,64 88,2	Haas et al. (2019)
Norbixina	150	MD:GA (100:0) (CTS 20%)	22,50	Tupuna et al. (2018)
		MD:GA (85:15) (CTS 20%)	25,00	
		MD:GA (65:35) (CTS 20%)	33,00	
		MD:GA (50:50) (CTS 20%)	32,00	
		MD:GA (35:65) (CTS 20%)	32,00	
		MD:GA (15:85) (CTS 20%)	36,00	
		MD:GA (0:100) (CTS 20%)	50,00	
Carotenoides do suco de <i>Tamarillo</i>	150	MD (20% p/p suco)	84,77	Ramakrishnan et al. (2018)
		GA de baixa viscosidade (20% p/p suco)	91,41	
		MD resistente (20% p/p suco)	88,45	
		GA (20% p/p suco)	94,83	
Carotenoides de <i>Phaffia rhodozyma</i>	130	XG (1% p/v) + Tween 80 (2% p/v)	70	Menegazzi et al. (2020)
Carotenoides do resíduo e da polpa de <i>Malphigia emarginata</i>	170	GA:MD (1:1 p/p)	37	Rezende; Nogueira; Narain (2018)
			41	
Suco de cenoura rico em carotenoides	160	MD (DE 11) (CTS 20%)	48	Janiszewska-Turak et al. (2017)
		GA (CTS 20%)	59	
		MD (DE 11):GA (1:1) (CTS 20%)	54	
		MD (DE 11):GA (2:1) (CTS 20%)	62	
		MD (DE 11):GA (3:1) (CTS 20%)	50	

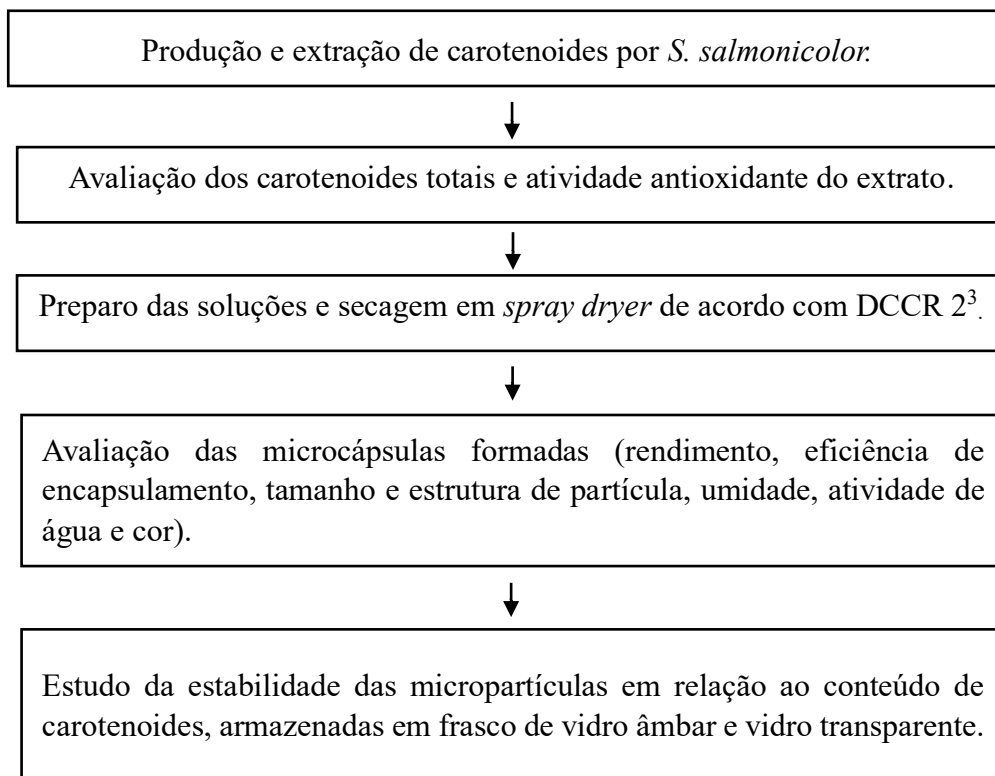
Legenda: T = temperatura de secagem; MD = maltodextrina; DE= dextrose equivalente; GA = goma arábica; AM= amido modificado; XG = goma xantana; CTS = conteúdo total de sólidos; CCS= concentrado de cenoura do tipo suspensão; CCE = concentrado de cenoura tipo emulsão.

Assim, o maior desafio durante o encapsulamento por atomização utilizando *spray dryer* é a obtenção de condições otimizadas que resultem em um alto rendimento em produto com elevada eficiência de encapsulação, teor de umidade e atividade de água adequados, estabilidade química durante o armazenamento, minimização da aderência de partículas na câmara de secagem e com características tecnológicas específicas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos experimentais relacionados à produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* e recuperação dos mesmos com subsequente encapsulamento pela técnica de *Spray-drying* e avaliação das cápsulas produzidas. A Figura 10, apresenta um fluxograma esquemático das etapas realizadas no estudo.

**Figura 10** – Fluxograma esquemático das etapas realizadas no estudo.



Fonte: O autor (2021).



### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Reagentes

A seguir serão descritos os reagentes utilizados nos experimentos:

- Acetona (Vetec<sup>®</sup>);
- Ágar (Vetec<sup>®</sup>);
- Álcool etílico P.A. 95 % (Química Moderna<sup>®</sup>);
- Dimetilsulfóxido (Nuclear<sup>®</sup>);
- Éter de petróleo (Dinâmica<sup>®</sup>);
- Extrato de levedura (Vetec<sup>®</sup>);
- Extrato de malte (Acumedia<sup>®</sup>);
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. 98 % (Vetec<sup>®</sup>);
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. 98 % (Synth<sup>®</sup>);
- Glicerol (glicerina bidestilada) P.A. 85% (Merck<sup>®</sup> – Alemanha);
- Glicose (Nuclear<sup>®</sup>);
- Goma arábica em pó puro P.A. 85 % (Vetec<sup>®</sup>);
- Maltodextrina aglomerada Globe<sup>®</sup> A 1910 P.A. (Ingredion<sup>®</sup>);
- Metanol (Quimex<sup>®</sup>);
- Peptona de carne (Himedia<sup>®</sup>);
- Persulfato de potássio (Dinâmica<sup>®</sup>);
- Radical ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Trolox (Ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Sigma<sup>®</sup>);
- Tween 80 (Polysorbate 80).

#### 3.1.2 Soluções

As seguir encontram-se descritas as soluções utilizadas:

- Ácido clorídrico 2 mol/L (Êxodo<sup>®</sup>);
- Ácido fosfórico (Nuclear<sup>®</sup>) 1 mol/L;
- Solução tampão fosfato pH 7,0 (mistura de fosfato de sódio monobásico anidro 0,2 mol/L e fosfato de sódio dibásico anidro 0,2 mol/L).
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2 mol/L (Vetec<sup>®</sup>);

#### 3.1.3 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados nos experimentos foram:

- Agitador orbital (modelo: 430 RDB; fabricante: Nova Ética)
- Agitador Magnético (modelo: 752A; fabricante: Fisatom);
- Agitador Digital Vórtex (modelo: K40-10208; fabricante: KASVI);
- Autoclave (modelo: AV75; fabricante: Phoenix);
- Balança Analítica (modelo: AL500; fabricante: Marte Científica) e (modelo: AY220; fabricante: SHIMADZU);
- Balança de Infravermelho (modelo: ID200; fabricante: Marconi);
- Banho Ultrassônico (modelo: USC-1800A; fabricante: Unique UltraSonic Cleaner);
- Biorreator (modelo: Biostat B 5-Liter Fermentor; fabricante: Braun Biotech International)
- Centrífuga (modelo: D-78532; fabricante: Hettich Zentrifugen)
- Centrífuga (modelo: MPW-351R; fabricante: MPW Med. Instruments);
- Colorímetro digital (modelo: Chroma Meter CR-400; fabricante: Konica Minolta);
- Estufa (modelo: TE 393/2; fabricante: Tecnal);
- Espectrofotômetro (modelo: UV-1600 Epectrophotometer; fabricante: PRÓ-ANÁLISE);
- Evaporador Rotativo (modelo: RV 10 D; fabricante: IKA), acoplado ao banho de aquecimento (modelo: HB 10 D; fabricante: IKA);
- Liofilizador (modelo: Modulyo; fabricante: Edwards), acoplado a uma bomba de vácuo (modelo: RV8; fabricante: Edwards);
- Medidor de atividade de água (modelo: Novasina AG - CH-8853; fabricante: Lachen Switzerland);
- Microscópio de Varredura Eletrônico (MEV) (modelo: ECO LS25; fabricante: Zeis)
- Refrigerador Air Flow System (modelo: DC47; fabricante: Electrolux);
- *Spray Dryer* (modelo: SD-05; fabricante: LabPlant);

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Microrganismo e preparo do inoculo

A produção de carotenoides em biorreator (modo semicontínuo) foi realizada com a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Holanda) segundo Colet (2016) e Colet et al. (2017). Inicialmente, a cultura liofilizada de *S. salmonicolor* CBS 2636 foi hidratada em meio YM em estufa, a 25°C por 72 h. Posteriormente, a cultura foi transferida para placas de Petri contendo meio YMA (*Yeast, Manitol, Ágar*), e incubada por 48 h, a 25°C. Após o crescimento, as placas foram mantidas refrigeradas em freezer a 4°C. A cada dois meses foram realizados repiques do microrganismo.

Para a manutenção da cultura utilizou-se meio YMA composto de 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona de carne, 10 g/L de glicose e 20 g/L de agar, e para o preparo do inóculo, o meio *Yeast Malt Extract* (YM) constituído de 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glicose. Após o preparo, ambos os meios foram esterilizados a 121°C, por 15 min.

Para o preparo do inóculo, uma alçada de células da cultura estoque foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM e incubado em agitador orbital a 25°C, 180 rpm, por aproximadamente 48 h (ou até atingir uma densidade óptica (DO) de aproximadamente 0,7), sem iluminação.

### **3.2.2 Produção de carotenoides em biorreator em sistema semi-contínuo**

Para a produção de carotenoides, um volume inicial de 1 litro do meio de cultura composto de 80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz com pH ajustado em 4,0 (com ácido clorídrico 2 mol/L) foi autoclavado a 121°C pelo tempo de 15 min, juntamente com o biorreator e, separadamente em Erlenmeyer, o meio a ser alimentado periodicamente, afim de serem esterilizados.

Após o resfriamento do sistema, o início da produção se deu adicionando-se um volume de 100 mL do pré-inóculo ao biorreator com o meio de cultura nas condições: pH inicial 4,0, tempo de fermentação de 96 h, temperatura de 25°C, agitação de 180 rpm e vazão de ar de 1,5 vvm. Após 96 h, foi feito um corte de 50% do volume de trabalho do biorreator, ou seja, 500 mL foram retirados e, em seguida, o mesmo volume (500 mL de meio de cultura fresco esterilizado) foi repostado ao biorreator, mantendo as mesmas condições de operação. Conduziu-se o processo por 288 h efetuando 3 cortes a cada 96 h de produção (COLET, 2016; COLET et al., 2017).

### **3.2.3 Recuperação dos Carotenoides Totais**

A extração e recuperação dos carotenoides totais foi conseguida seguindo o método descrito por Valduga et al. (2009a) e Valduga et al. (2009b) com algumas modificações.

Após a produção, o meio fermentado foi centrifugado a 4°C, 4534 x g, por 10 min em centrífuga. Em seguida foi feita uma centrifugação (4°C, 4534 x g, por 10 min) com 10 mL de água destilada, mais uma centrifugação nas mesmas condições, mas agora com 10 mL de éter de petróleo para remoção do glicerol residual. E, por fim, novamente uma centrifugação (4°C, 4534 x g, por 10 min) com 10 mL de água destilada.

Terminada esta etapa, o rompimento celular foi alcançado através de macerações sucessivas com almofariz e pistilo utilizando nitrogênio líquido. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado posteriormente em uma proporção de 2:1, DMSO:célula (v/v), e o material foi vertido em tubos de centrifuga para serem aquecidos em banho ultrassônico a 55°C por 30 min com homogeneização periódica em Agitador Digital Vórtex. Posteriormente, adicionou-se 10 mL da mistura de acetona:metanol na proporção 7:3 (v/v) e os tubos foram centrifugados a 4°C, 4534 x g, por 10 min. O sobrenadante foi coletado e foram realizadas sucessivas extrações com a mistura acetona:metanol, até que as células ficassem incolores, obtendo-se assim o extrato que foi solubilizado em metanol para ajuste do volume em balão volumétrico e a quantificação dos carotenoides totais foi realizada por espectrofotometria.

O extrato carotenogenico foi armazenado em frasco de vidro âmbar recoberto com papel alumínio e caracterizado em termos de carotenoides totais, atividade antioxidante e armazenado sob refrigeração para utilização nas etapas de encapsulamento.

### 3.2.4 Encapsulamento de carotenoides

#### 3.2.4.1 Preparo das amostras

Evaporou-se o solvente do extrato de carotenoides em um evaporador rotativo (3852,75 µg/L) isolado com papel alumínio, em temperatura de 65°C, rotação de 165 rpm e pressão de 600 mmHg, obtendo-se um extrato de coloração vermelha/alaranjado, conforme Figura 11.

**Figura 11** – Extrato de carotenoides concentrado.



Fonte: O autor (2021).

### 3.2.4.2 Formação das microcápsulas

Inicialmente para a formação das microcápsulas, realizaram-se ensaios preliminares e também baseados em informações da literatura (ETZBACH et al., 2020; FOO; KHONG; YUSOFF, 2020; MENEGAZZI et al., 2020), para a definição da composição da matriz a base de maltodextrina, goma arábica, quantidade de extrato, condições de secagem em *spray dryer* e quantidade de Tween 80, este último sendo bem conhecido como surfactante de baixo peso molecular, indicado para aumentar a eficiência da microencapsulação ao estabilizar emulsões (SHAMAEI et al., 2017), conforme a Tabela 3, avaliando a eficiência de encapsulamento (EE%).

**Tabela 3-** Ensaios preliminares do encapsulamento de carotenoides variando a temperatura, extrato de carotenoides, a proporção de maltodextrina e goma e Tween 80.

Ensaio	T (°C)	Extrato de carotenoides (%)	Material de parede (%) (MD:GA)	Tween 80 (%)
1	100	5	1 (1:1)	2
2	130	5	5 (1:1)	2
3	130	5	5 (1:1)	-
4	130	5	5 (1:1)	4
5	130	10	5 (1:1)	2
6	130	15	5 (1:10)	2
7	130	5	10 (1:1)	2
8	130	5	5 (0:1)	2
9	130	5	5 (1:0)	2
10	160	5	5 (1:1)	2

Legenda: T = temperatura; MD = maltodextrina; GA= goma arábica.

Posteriormente, um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> (quintuplicata do ponto central – totalizando 19 pontos) foi utilizado para o encapsulamento, sendo que as variáveis independentes, temperatura, goma arábica (GA) e maltodextrina (MD) e os respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 4.

**Tabela 4 -** Variáveis independentes e níveis utilizados no DCCR 2<sup>3</sup> para o encapsulamento de carotenoides.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0**	+1	+1,68
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	113	120	130	140	147
Goma arábica (g/L)	X <sub>2</sub>	12,4	17,5	25	32,5	37,6
Maltodextrina (g/L)	X <sub>3</sub>	12,4	17,5	25	32,5	37,6

\* Variáveis independentes fixas: volume concentrado de extrato de carotenoides (5% v/v) volume da solução tampão fosfato pH 7,0 (90% v/v) e quantidade de Tween 80 (2% p/v).\*\* Quintuplicata do ponto central.

As variáveis independentes como o volume de extrato concentrado de carotenoides (5% v/v), solução tampão fosfato pH 7,0 (90% v/v) e a quantidade de Tween 80 (2% p/v) foram fixadas. As variáveis dependentes (resposta) foram a eficiência de encapsulamento, os índices de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e chroma  $C^*$ , atividade de água e umidade e rendimento.

Para os ensaios, inicialmente a goma arábica e a maltodextrina foram pesadas de acordo com o planejamento e totalmente dissolvidas em um béquer, com 45 mL da solução tampão fosfato pH 7,0 em banho ultrassônico a 50°C. Após, adicionou-se 2 g de Tween 80 e novamente levou-se a mistura para o banho ultrassônico a 50°C até completa dissolução. Em seguida, após o resfriamento da mistura à temperatura ambiente (~25°C), 5 mL do extrato de carotenoides foi adicionado à mistura e completou-se o volume com tampão fosfato pH 7,0 até 100 mL (totalizando um volume final de tampão fosfato de aproximadamente 90 mL).

### 3.2.4.3 Secagem em *spray dryer*

Após preparadas as emulsões equivalentes a cada ensaio do planejamento, foi realizada a secagem por atomização em *spray dryer* operando em co-corrente, equipado com um bico injetor de 0,5 mm de diâmetro, pressão de atomização da amostra de 0,08 a 0,12 bar e vazão média de alimentação da amostra no secador de 5,83 mL/min, conforme a Figura 12.

**Figura 12-** Aspecto geral do *spray dryer* utilizado no encapsulamento do extrato concentrado carotenoides.



Fonte: O autor (2021).

A amostra em solução (extrato concentrado de carotenoides/materiais encapsulantes/solução tampão fosfato pH 7,0/Tween 80) foi mantida sob agitação em um agitador magnético e bombeada até o topo do atomizador, onde entrou em contato com o ar aquecido na câmara de secagem, com temperatura dos ensaios de acordo com o DCCR 2<sup>3</sup> (Tabela 4), propiciando à evaporação imediata da umidade contida no material. A corrente de ar quente-sólido foi direcionada em um ciclone para a separação do extrato encapsulado em recipiente de vidro (coletor de pó). O encapsulado em pó foi coletado e armazenado em frascos de vidro âmbar, envoltos em papel alumínio e armazenados a 22°C ± 2°C, para imediata análise de eficiência de encapsulamento, rendimento, umidade, atividade de água e índices de cor.

#### 3.2.4.4 Rendimento do encapsulado

O rendimento (RE) do encapsulado em pó foi determinado utilizando-se a massa total de sólidos antes da microencapsulação (MSA) e a massa total de sólidos obtidos após a microencapsulação (MSD), conforme equação descrita por Nunes e Mercadante (2007) (Equação 1).

$$\%RE = \frac{MSD}{MSA} \times 100 \quad (1)$$

Onde %RE é o rendimento do encapsulado em pó, MSA é massa total (g) de sólidos antes do encapsulamento e MSD é massa total de microcápsulas (g) obtida após encapsulação.

#### 3.2.4.5 Eficiência de Encapsulamento

A determinação da eficiência de encapsulamento (%EE) baseia-se na quantificação dos carotenoides superficiais e internos da cápsula, uma vez que carotenoides são lipofílicos e solúveis em hexano, sendo a matriz maltodextrina e goma arábica solúvel em tampão fosfato e insolúvel em hexano (SUTTER; BUERA; ELIZALDE, 2007).

Assim, para quantificar os carotenoides em superfície, pesou-se em triplicata 0,1g de amostra em tubos de centrífuga e adicionou-se 5 mL de hexano em cada um. Cada tubo foi agitado em um agitador Vórtex durante 10 segundos a 500 rpm e centrifugados a 10732 x g durante 10 min, a 25°C e coletou-se o sobrenadante em outros três tubos de ensaios que foram novamente centrifugados a 10732 x g durante 20 min a 25°C e reservados.

Para a quantificação dos carotenoides internos, adicionou-se 5 mL de tampão fosfato pH 7,0 à fração que sobrou nos tubos (um precipitado branco) e procedeu-se a agitação em vortex durante 3 min a 3000 rpm. Em seguida, os tubos foram colocados em banho ultrassônico a 50°C por 4 min. Após, adicionou-se 10 mL de hexano em cada tubo e novamente foram agitados em vortex por 2 min a 3000 rpm. Os tubos foram centrifugados a 10732 x g durante 15 min a 25°C.

Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram retirados 2 mL de cada tubo e passados para tubos Eppendorfs, os quais foram centrifugados por 20 min a 13000 rpm. Passado esse tempo, o líquido dentro dos Eppendorfs foi transferido para outros Eppendorfs e novamente os tubos foram centrifugados por aproximadamente 40 min ou até a leitura permanecer estável na avaliação em espectrofotômetro (450 nm) o qual foi previamente zerado com hexano.

O resultado foi expresso em percentual de eficiência de encapsulamento (%EE), com o cálculo realizado através da Equação 2 (SUTTER; BUERA; ELIZALDE, 2007).

$$\%EE = \frac{ABS\ carotenoides_{totais} - ABS\ carotenoides_{superficie}}{ABS\ carotenoides_{totais}} \times 100 \quad (2)$$

Onde  $ABS\ carotenoides_{Stotais}$  são a soma da absorbância dos carotenoides internos (multiplicados pela diluição) com a absorbância dos carotenoides superficiais.

### 3.2.5 Estabilidade de estocagem das microcápsulas

A melhor condição do DCCR 2<sup>3</sup> (Tabela 4) em termos de eficiência de encapsulamento, foi avaliada quanto a estabilidade dos carotenóides encapsulados armazenados a 22°C ± 2°C em vidro âmbar e transparente. Para tanto, logo após o encapsulamento, armazenou-se as cápsulas produzidas em 5 frascos de vidro transparente e 5 frascos de vidro âmbar, cada um contendo 1,5 g do encapsulado. Nas amostras avaliou-se semanalmente o teor de carotenoides totais, índices de cor L\*, a\*, b\* e chroma C\* e umidade e atividade de inicial e final. Os resultados foram expressos em termos de concentração de carotenoides específicos relativa (%), cor L\* relativa (%) e chroma C\* relativa (%).

#### 3.2.5.1 Modelagem matemática da estabilidade das microcápsulas

Foram ajustados os seguintes modelos para a concentração de carotenoides específicos em função do tempo: cinética de ordem zero, ordem um, ordem dois (CORRADI, PELEG,



2006) e Weibull (DEROSSO; DE PILLI; FIORE, 2010), os quais estão expressos pelas Equações de 3 a 6, respectivamente.

$$[CE(t)] = [CE]_0 - kt \quad (3)$$

$$[CE(t)] = [CE]_0 \exp(k_0 + (-kt)) \quad (4)$$

$$[CE(t)] = \frac{[CE]_0}{1+kt[CE]_0} \quad (5)$$

$$[CE(t)] = [CE]_0 \exp(-k(t^\gamma)) \quad (6)$$

Onde  $[CE(t)]$  corresponde à concentração de carotenoides específicos no instante  $t$ ,  $[CE]_0$  representa a concentração inicial de carotenoides específicos,  $k$  é igual à constante de velocidade de reação,  $\gamma$  é um parâmetro de forma e  $\exp$  corresponde à função exponencial.

### 3.2.6 Caracterização morfológica dos encapsulados por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos encapsulados foi analisada em um microscópio de varredura eletrônica – MEV. A superfície após ser revestida com uma fina camada de ouro foi analisada com uma ampliação de 1, 10 e 100  $\mu\text{m}$  e tensão de 10 KV.

O diâmetro de partícula foi medido pelo Software Size Meter (versão 1.1) usando uma média de 100 partículas observadas nas micrografias dos experimentos.

### 3.2.7 Determinação analíticas

#### 3.2.7.1 Carotenoides totais do extrato ( $C_t$ )

A concentração total de carotenoides foi estimada pelo valor medido da absorbância a 448 nm, conforme Equação 7, descrita por Davies (1976). O coeficiente de extinção utilizado foi referente ao  $\beta$ -caroteno para o metanol,  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2550$  (SILVA, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). Os resultados da concentração de carotenoides foram expressos em termos de carotenoides totais ( $\mu\text{g/L}$ ).

$$C_t = \frac{Ey}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100} \times 10^6 \quad (7)$$

Onde  $C_t$  é são os carotenoides totais em  $\mu\text{g/L}$ ,  $y$  é o volume da solução (L),  $E$  é a absorvância a 448 nm e  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  é coeficiente de extinção específico para o  $\beta$ -caroteno (2550).

### 3.2.7.2 Carotenoides específicos (CE) do encapsulado

A determinação dos carotenoides específicos do encapsulado foi realizada de acordo com a Equação 8 (DAVIES, 1976).

$$CE = \frac{ABS \times V \times 10^6}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times m} \quad (8)$$

Onde CE é a concentração de carotenoides específicos ( $\mu\text{g/g}$ ), ABS é a média da leitura em absorvância a 450 nm, V é o volume da amostra (mL),  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  (2590) relacionado ao coeficiente de extinção utilizado referente ao  $\beta$ -caroteno para o hexano e m (g) é massa de amostra.

### 3.2.7.3 Atividade antioxidante do extrato

A capacidade para sequestrar o cátion radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS<sup>+</sup>) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Rufino et al. (2007) com adaptações. O radical ABTS<sup>+</sup> foi preparado a partir da reação de 1 mL da solução estoque de ABTS com 17,6  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Passado este tempo, 1 mL desta mistura foi dissolvido em álcool etílico até obter uma absorvância de  $0,70 \pm 0,05$  nm em um comprimento de onda de 734 nm.

Para a solução padrão de Trolox, foram dissolvidas 5 mg de Trolox em álcool etílico e completou-se o volume até 10 mL em um balão volumétrico que, posteriormente foi homogeneizado e transferido para um frasco de vidro âmbar.

A partir da solução padrão de Trolox (2.000 M), foram preparadas (em balões volumétricos de 1 mL), soluções variando a concentração de 100  $\mu\text{M}$  a 2.000  $\mu\text{M}$ , conforme a Tabela 5.

A determinação da curva padrão foi feita transferindo-se uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de cada solução de Trolox (100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1.000  $\mu\text{M}$ , 1.500  $\mu\text{M}$  e 2.000  $\mu\text{M}$ ) para tubos de ensaio, aos quais se misturou 2,0 mL da solução do radical ABTS. Os tubos foram homogeneizados em agitador e após 6 minutos de repouso no escuro, procedeu-se a leitura (734 nm) em espectrofotômetro previamente calibrado utilizando-se álcool etílico como branco. Em seguida,

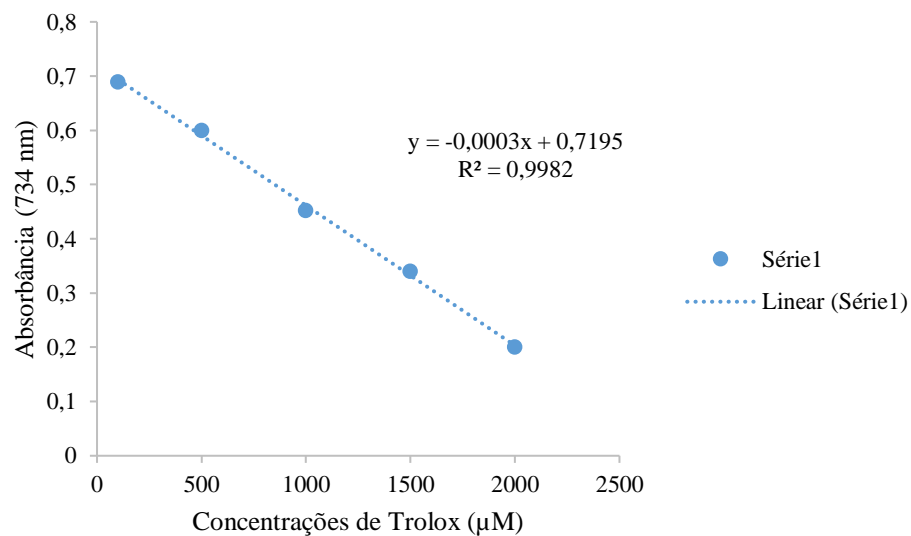
foram plotadas as concentrações de Trolox ( $\mu\text{M}$ ) no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y conforme a Figura 13.

**Tabela 5** – Preparo das solução para curva padrão.

Concentração final ( $\mu\text{M}$ )	Solução padrão do Trolox (mL)	Álcool etílico (mL)
100	0,5	9,5
500	2,5	7,5
1.000	5,0	5,0
1.500	7,5	2,5
2.000	10	0

Fonte: O autor (2021).

**Figura 13**– Curva padrão de Trolox.



Fonte: O autor (2021).

Em seguida, calculou-se a equação da reta e a absorbância referente a 1.000  $\mu\text{M}$  de Trolox, (NENADIS et al., 2004) de acordo com a Equação 9.

$$y = -ax + b \quad (9)$$

Onde o x é 1.000  $\mu\text{M}$  do Trolox e y é absorbância correspondente a 1000  $\mu\text{M}$  de Trolox.

Para a obtenção e preparo do extrato, a solução foi liofilizada por 48 horas obtendo-se o extrato seco do mesmo. Pesou-se 0,1 g do extrato de carotenoides seco e realizou-se a diluição

em dimetilsulfóxido e completou-se o volume com álcool etílico em um balão volumétrico de 5 mL, homogeneizou-se e transferiu-se a solução para um frasco de vidro âmbar. A partir do extrato, foram preparadas sete diluições diferentes, conforme a Tabela 6.

**Tabela 6** - Diluições utilizadas para o cálculo da atividade antioxidante total.

Concentrações do extrato (mg/L)	Solução padrão do Trolox (mL)	Álcool etílico (mL)
1250	0,06	0,94
2500	0,125	0,875
5.000	0,25	0,75
7.500	0,375	0,625
10.000	0,5	0,5
15.000	0,75	0,25
20.000	1	0

Fonte: O autor (2021).

Transferiu-se uma alíquota de 20 µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 2,0 mL do radical ABTS e homogeneizou-se em agitador de tubos. Após 6 minutos da mistura permanecer em repouso no escuro, realizou-se a leitura em 734 nm e utilizou-se o álcool etílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Em seguida, foi determinada a equação da reta.

Para o cálculo da atividade antioxidante total (AAT), substituiu-se na equação da reta a absorbância equivalente a 1.000 µM do padrão Trolox (Equação 9). O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de Trolox (Equação 10).

$$y = -ax + b \quad (10)$$

Onde o y é a absorbância correspondente a 1.000 µM de Trolox e o x é a diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de Trolox. A partir do resultado encontrado (x) na Equação 10, o valor obtido foi dividido por 1.000 para se obter o mesmo em gramas (Equação 11). O resultado final foi calculado pela divisão de 1.000 (µM) pelo valor de X (g) e multiplicado por 0,1 (g) para encontrar o valor final (TEAC) que é expresso em µM Trolox / gramas de extrato de carotenoides (Equação 12).

$$X (g) = \frac{x}{1000} \quad (11)$$

$$TEAC (\mu\text{M trolox/g}) = \frac{1000}{X(g).0,1} \quad (12)$$

#### 3.2.7.4 Atividade de água

A atividade de água das micropartículas foi determinada utilizando o equipamento Medidor de Atividade de Água, após prévia estabilização das amostras a 27°C. Aproximadamente 1 g de cada amostra foi colocada no fundo de um pote de plástico pequeno e o material foi introduzido no equipamento para leitura.

#### 3.2.7.5 Umidade

A umidade foi quantificada utilizando balança de infravermelho, na qual 3 g de cada amostra foram colocadas sobre um prato de alumínio previamente tarado. Programou-se o modo de secagem automático no qual o material foi mantido a 105°C até atingir peso constante. A radiação infravermelho incide sobre a amostra, gerando a perda de massa da mesma. O teor de água é dado em %, sendo resultado da diferença de massa da amostra entre o seu  $t_0$  (tempo inicial) e o  $t_f$  (tempo final) (GARCIA-AMOEDO; ALMEIDA-MURADIAN, 2002).

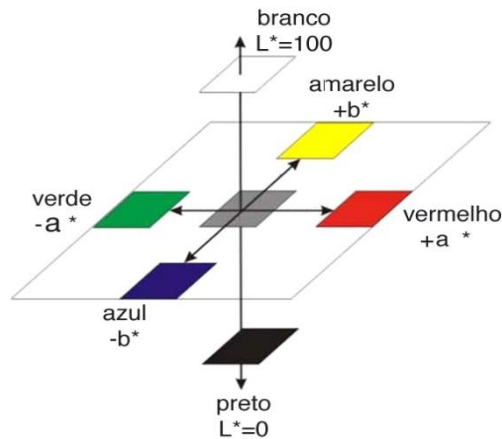
#### 3.2.7.6 Índices de cor ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ e chroma $C^*$ )

A cor é um atributo de fundamental importância para um produto. O sistema mais utilizado para avaliação deste parâmetro é o conjunto de três coordenadas retangulares, as quais juntas são responsáveis pela definição da cor e de sua intensidade, sendo representada por  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . O  $L^*$  representa o eixo da luminosidade e varia de 0 a 100, ou seja, de preto/escuro a branco/claro, respectivamente;  $a^*$  corresponde ao eixo da variação da cromaticidade das cores verde (-60) a vermelho (+60) e o parâmetro  $b^*$ , por sua vez, varia de azul (-60) a amarelo (+60), conforme exposto na Figura 14 (SILVA et al., 2010).

Os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram determinados com aparelho colorímetro digital, previamente calibrado com placa de porcelana branca padrão, seguindo as instruções do fabricante. Aproximadamente 1 g de cada amostra foi colocada no fundo de um pote de plástico pequeno e procedeu-se com as leituras em triplicata.

O índice chroma ( $C^*$ ) foi calculado utilizando-se a Equação 13. Este parâmetro está relacionado a saturação, que se refere diretamente à concentração do elemento corante e representa um atributo quantitativo para intensidade, ou seja, quanto maior o seu valor, maior a saturação das cores (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013).

**Figura 14-** Representação tridimensional do sistema colorimétrico.



Fonte: <http://a-cordosdias.blogspot.com.br/2010/12/lab-color.html>. Acesso em: 29/01/2021.

$$C^* = \sqrt{[(a^*)^2 + (b^*)^2]} \quad (13)$$

Assim, as cores neutras possuem baixa saturação, enquanto cores puras possuem alta saturação e são mais perceptíveis e brilhantes aos olhos humanos. É definida como a distância radial do centro do espaço até o ponto da cor. No centro do espaço, estão os valores mínimos de saturação e, à medida que se caminha para as extremidades, aumenta-se este valor (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013).

### 3.2.8 Análise Estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente mediante metodologia de planejamento de experimentos, e análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ), usado para verificar as diferenças significativas entre as médias das análises/amostras, com auxílio do software Statistica, versão 5.0 (StatSoft, Inc., USA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente item tem por objetivo apresentar e discutir os resultados alcançados no decorrer deste trabalho, no qual primeiramente se apresenta a quantificação dos carotenoides totais e atividade antioxidante do extrato bioproduzido a base de resíduos agroindustriais seguido do encapsulamento pela secagem por atomização em *spray dryer* e caracterização das microcápsulas com diferentes proporções de material de parede e temperaturas de encapsulamento.

### 4.1 CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO

A concentração de carotenoides totais no extrato produzido por *S. salmonicolor* utilizando um meio de cultura composto de 80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L foi de 3852,75 µg/L, valor semelhante ao encontrado por Colet, Di Luccio e Valduga (2015) que nas mesmas condições obtiveram uma concentração de carotenoides de 4400 µg/L.

Em relação a atividade antioxidante do extrato, o pigmento extraído do microrganismo, *S. salmonicolor* apresentou atividade antioxidante pela eliminação do cátion radical ABTS de 1,11 mM de Trolox/g. O valor calculado como equivalente de Trolox (mM) foi semelhante ao obtido por Miller et al. (1996) os quais, avaliaram a atividade antioxidante do β-caroteno e encontraram valores de 1,9 mM e Zeaxantina 1,4 mM. O valor encontrado pode ser justificado pelo fato de que para *S. salmonicolor* o carotenoide majoritário no processo semi-contínuo nas mesmas condições foi o all-trans-β-caroteno (85,2%) (COLET, 2016).

Segundo Miller et al. (1996), a capacidade dos carotenoides de desativarem o radical ABTS aumenta com a extensão do sistema de ligações duplas conjugadas, entretanto, a presença de grupos terminais cíclicos reduz a contribuição da dupla ligação na capacidade de desativação do radical.

Mandelli et al. (2012) determinou a atividade antioxidante do extrato rico em carotenoides da linhagem *Thermus filiformis* ATCC 43280 onde o mesmo apresentou capacidade de desativar o radical ABTS com valor antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) de 2,87, valor superior ao encontrado neste estudo.

Miranda (2010) obteve valores de TEAC dos extratos de carotenoide das linhagens *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarium* de 5,07 e 5,28, respectivamente. Re et al.

(1999) por sua vez, encontrou o valor de 2,57 para o  $\beta$ -caroteno, e o autor Bohm et al. (2002) obteve 1,4 para o TEAC, semelhante ao que foi encontrado no presente estudo.

Nota-se, porém, uma grande diferença entre os valores encontrados neste trabalho e também entre os próprios autores citados. Esta diversidade ocorre pelo modo como os cálculos são realizados e o próprio experimento, como por exemplo, a maneira como o radical ABTS foi gerado e os solventes utilizados.

## 4.2 ENCAPSULAMENTO DOS CAROTENÓIDES

### 4.2.1 Definição da composição da matriz e condição de secagem

A escolha dos níveis das variáveis foi baseada em testes preliminares, cujos os resultados da eficiência de encapsulamento estão apresentados na Tabela 7. Onde é possível verificar que não se conseguiu realizar a secagem do material em temperatura de 100°C (Ensaio 1), pois o mesmo acabou aderindo às paredes da câmara de secagem ou se juntou formando um aglomerado ao invés de ir para o recipiente de vidro receptor do secador. No entanto, quando foi usado 160°C de temperatura de entrada (Ensaio 10) houve degradação dos carotenoides, e consequentemente menor eficiência de encapsulado.

**Tabela 7** – Resultados dos testes preliminares do encapsulamento de carotenoides.

Ensaio	T (°C)	Extrato de carotenoides (%)	Material de parede (%) (MD:GA)	Tween 80 (%)	%EE
1	100	5	1 (1:1)	2	-
2	130	5	5 (1:1)	2	59,9
3	130	5	5 (1:1)	-	24,5
4	130	5	5 (1:1)	4	35,6
5	130	10	5 (1:1)	2	29,5
6	130	15	5 (1:1)	2	32,5
7	130	5	10 (1:1)	2	40,0
8	130	5	5 (0:1)	2	40,4
9	130	5	5 (1:0)	2	42,6
10	160	5	5 (1:1)	2	15,3

Legenda: T = temperatura; MD = maltodextrina; GA = goma arábica; %EE = eficiência de encapsulamento.

Ao utilizar Tween 80 na matriz de encapsulamento houve um incremento na eficiência de encapsulamento. Sendo que, a maior eficiência (59,9%) foi obtida ao utilizar-se 2% de Tween 80 (Ensaio 2), corroborando com a literatura de que a adição de um surfactante durante



o processo de encapsulamento facilita as interações entre os componentes por meio de forças de atração, repulsão e cargas elétricas, facilitando ligações químicas entre os polímeros na parede (MENEGAZZI et al., 2020).

O uso de maior quantidade de extrato (Ensaio 5 e 6) não resultou em maior eficiência de encapsulamento, fato que pode ser explicado pela falta de material de parede suficiente para conseguir encapsular todos carotenoides, o que deixou a maioria fora da cápsula, conforme as baixas EE (%) obtidas de 29,5 e 32,5, respectivamente.

Quanto aos ensaios com GA e MD isoladas (Ensaio 8 e 9), a eficiência foi menor (40,4 e 42,6%, respectivamente) do que quando utilizado a combinação dos materiais (Ensaio 2).

Baseados nestes resultados definiu-se as variáveis temperatura, concentração de goma arábica e maltodextrina, Tween 80 e concentração do extrato de carotenoides a serem utilizadas num planejamento DCCR 2<sup>3</sup>.

#### **4.2.2 Maximização do processo de encapsulamento dos carotenoides**

A Tabela 8 apresenta a matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> com os valores codificados e reais das variáveis independentes (temperatura, concentração de goma arábica e maltodextrina) estudadas, e os respectivos resultados (rendimento) e respostas em termos de eficiência de encapsulamento atividade de água umidade e cor.

**Tabela 8** - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> (valores codificados e reais) e respostas encontradas.

Ensaio	Variáveis Independentes					Resposta					
	T (°C)	GA (g/L)	MD (g/L)	%RE	%EE	Aw	U (%)	L*	a*	b*	C*
1	-1 (120)	-1 (17,5)	-1 (17,5)	45,62	27,38	0,313	0,8	67,66	0,70	26,28	26,29
2	1 (140)	-1 (17,5)	-1 (17,5)	44,93	28,51	0,176	0,5	61,35	0,61	21,34	21,35
3	-1 (120)	1 (32,5)	-1 (17,5)	41,94	43,13	0,288	1,1	64,31	0,30	19,44	19,44
4	1 (140)	1 (32,5)	-1 (17,5)	45,06	35,56	0,219	0,5	66,07	0,32	17,44	17,44
5	-1 (120)	-1 (17,5)	1 (32,5)	49,23	42,44	0,250	0,8	72,81	0,28	18,32	18,32
6	1 (140)	-1 (17,5)	1 (32,5)	53,94	25,44	0,220	1,1	70,81	-0,21	18,32	18,32
7	-1 (120)	1 (32,5)	1 (32,5)	55,46	22,66	0,260	0,8	72,32	0,12	16,69	16,69
8	1 (140)	1 (32,5)	1 (32,5)	49,77	29,03	0,240	0,7	65,49	0,78	11,85	11,87
9	-1,68 (113)	0 (25)	0 (25)	49,28	34,12	0,134	1,1	73,59	-0,21	18,44	18,44
10	1,68 (147)	0 (25)	0 (25)	49,14	24,61	0,159	1,2	68,06	0,33	18,58	18,58
11	0 (130)	-1,68 (12,4)	0 (25)	51,36	21,89	0,160	1,2	72,43	0,27	16,55	16,55
12	0 (130)	1,68 (37,6)	0 (25)	56,11	48,39	0,178	1,4	72,72	-0,03	15,28	15,28
13	0 (130)	0 (25)	-1,68 (12,4)	48,17	32,30	0,154	1,4	69,63	0,39	19,77	19,77
14	0 (130)	0 (25)	1,68 (37,6)	54,72	40,79	0,130	1,8	78,08	0,11	18,04	18,04
15	0 (130)	0 (25)	0 (25)	50,11	59,91	0,182	1,0	69,02	0,14	24,22	24,22
16	0 (130)	0 (25)	0 (25)	49,83	61,73	0,216	1,1	71,36	0,05	24,70	24,70
17	0 (130)	0 (25)	0 (25)	50,33	58,06	0,189	1,2	69,98	0,68	20,79	20,80
18	0 (130)	0 (25)	0 (25)	54,61	59,60	0,215	1,0	70,12	0,29	23,24	23,24
19	0 (130)	0 (25)	0 (25)	51,22	60,81	0,229	1,3	82,36	0,14	20,08	20,08

Variáveis independentes fixas: volume de extrato concentrado de carotenoides (5% v/v), solução tampão fosfato pH 7,0 (90% v/v) e a quantidade de Tween 80 (2% p/v).

Legenda: T (°C) = temperatura; GA (g/L) = goma arábica; MD (g/L) = maltodextrina; %RE= rendimento de secagem; %EE = eficiência de encapsulamento; Aw = atividade de água; U (%) = umidade; L\*, a\*, b\*, C\* = parâmetros de cor.

### 4.2.3 Rendimento de secagem

O rendimento de secagem associado a cada amostra, bem como as temperaturas de secagem e a quantidade de material de parede utilizado no encapsulamento de carotenoides usando *spray drying* encontram-se na Tabela 8. O rendimento variou de 41,94 a 56,11%, sendo que maior rendimento foi obtido ao utilizar temperatura do ar de secagem de 130°C e matriz de parede composta por 37,6 g/L de GA, 25 g/L de MD e 2% (p/v) de Tween 80 e 5% (v/v) de extrato concentrado de carotenoides (Ensaio 12).

O valor é influenciado pelas condições operacionais selecionadas para o experimento como, por exemplo, temperatura de secagem, escala de produção, volume de amostra, viscosidade e adesão da solução alimentada na câmara de secagem (ESTEVINHO et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020b). Desta forma, os maiores rendimentos podem estar relacionados as altas temperaturas, as quais permitem uma secagem rápida, o que significa uma maior perda de água no interior das partículas, reduzindo a aderência das mesmas às paredes da câmara de secagem aumentando, assim a quantidade do pó recuperado (LOURENÇO, 2017).

Os valores obtidos no presente estudo foram superiores aos obtidos por Álvarez-Henao et al. (2018) que ao encapsular luteína, usando maltodextrina e goma arábica (1:1), através de secagem por pulverização a 185°C, obtiveram 21% de rendimento de encapsulado. Já Eitzbach et al. (2020) encapsularam o extrato de *Physalis peruviana L.* rico em carotenoides por *spray dryer* na temperatura de 140°C, utilizando maltodextrina e goma arábica (10%) na proporção 1:1 (p/p) como material de parede, obtiveram um rendimento de secagem de 60,57%.

Assim, pode-se dizer que um parâmetro que influencia neste processo é a temperatura de entrada, se for baixa, a água não evaporará completamente resultando em um produto úmido que tende a aderir às paredes do ciclone ou ainda da câmara de secagem, resultando em baixos rendimentos. Por outro lado, altas temperaturas podem provocar rachaduras nas cápsulas resultando em excessiva degradação, além disso a mistura e proporções corretas dos materiais de parede afetam a formação das cápsulas impactando no rendimento (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016; TROYA; TUPUNA-YEROVI; RUALES, 2018).

Este parâmetro é importante pois um alto rendimento possibilita o estabelecimento de uma relação custo-benefício que determina a viabilidade do método de secagem por pulverização, as formulações da emulsão e parâmetros de operação para encapsular

compostos de interesse. Embora os valores encontrados no presente estudo estejam de acordo com os trabalhos citados da literatura, o rendimento não é considerado elevado. Provavelmente as partículas de diâmetro pequeno e finas e a quantidade reduzida de extrato utilizado para secagem por pulverização podem ter levado a perdas, como por exemplo na aspiração de parte do pó pelo sistema de exaustão e adesão do produto nas paredes da câmara de secagem e no ciclone.

#### 4.2.4 Eficiência de Encapsulamento de carotenoides

A eficiência de encapsulamento define o teor da substância de interesse retida no interior das microcápsulas e depende, entre outros fatores, da afinidade desta substância com o material de parede.

Os dados obtidos na Tabela 8 foram tratados estatisticamente e a Tabela 9 (Apêndice A) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(4), para o percentual de eficiência de encapsulamento obtido nos ensaios.

A Equação 14 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a eficiência de encapsulamento de carotenoides em função das variáveis independentes (temperatura, concentração de goma arábica e maltodextrina), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 10 – Apêndice A) e apresentou um coeficiente de correlação de 0,95 e o F calculado 4,71 vezes maior que o valor tabelado (3,01), o qual permitiu a validação do modelo e a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 15.

$$\%EE = 60,03 - 2,42 X_1 - 10,92. X_1^2 + 3,75. X_2 - 8,87. X_2^2 - 8,37.X_3^2 + 1,83.X_1.X_2 - 4,87. X_2.X_3 \quad (14)$$

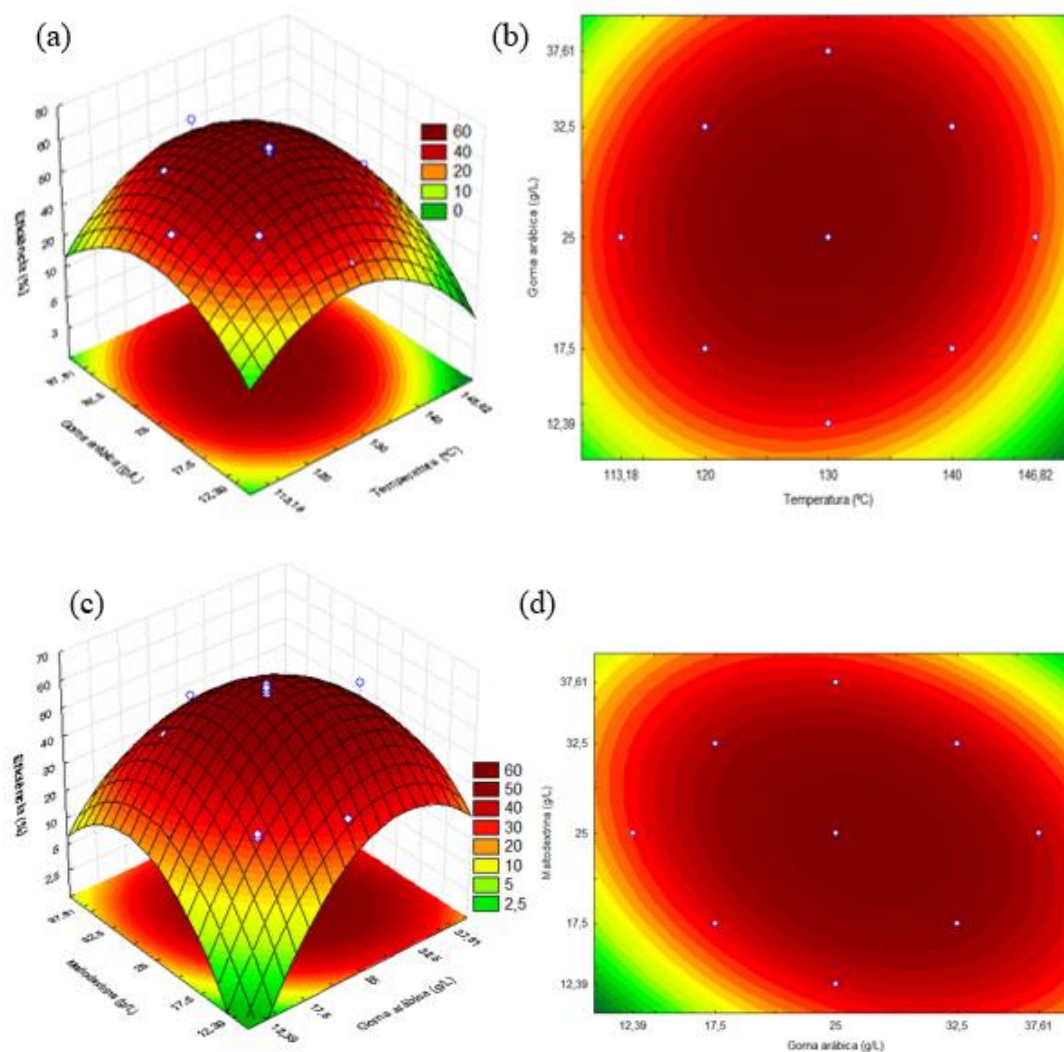
Onde:  $X_1$  = Temperatura;  $X_2$  = Goma arábica (g/L);  $X_3$  = Maltodextrina (g/L).

Os coeficientes lineares mostram que a temperatura e goma arábica e as correlações entre temperatura/goma arábica e goma arábica/maltodextrina foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no processo de encapsulamento e secagem de carotenoides em relação a eficiência de encapsulamento.

Conforme observado nas Figuras 15 a, b, c e d, as quais permitem acompanhar o comportamento das variáveis em relação a %EE, a região de máxima eficiência, encontra-

se próxima as faixas de temperatura entre 128 a 132°C, concentração de GA de 20 a 30 g/L e de MD de 19 a 29 g/L, demonstrando a otimização do encapsulamento de carotenoides. Os resultados sugerem que, embora o aumento da concentração de goma arábica tenha sido significativo, não necessariamente o uso das maiores concentrações obtiveram as maiores eficiências. O efeito da temperatura foi negativo, ou seja, indica que ao aumentar a temperatura, houve uma tendência na redução da eficiência de encapsulamento, justificando-se pelo fato de que os carotenoides são sensíveis a altas temperaturas sendo degradados com o aumento desta variável.

**Figura 15** - Superfície de resposta e curva de contorno para a eficiência de encapsulamento em função da temperatura e goma arábica (a) e (b) e goma arábica e maltodextrina (c) e (d), respectivamente.



Fonte: O autor (2021).

O efeito da goma arábica foi positivo demonstrando que ao aumentar sua quantidade, houve uma tendência no aumento do teor de encapsulamento de carotenoides.

Isso provavelmente se deve à estrutura da goma arábica, que é um heteropolímero altamente ramificado de açúcares, ácido glucurônico e uma parcela de proteína unida covalentemente à cadeia de carboidratos, sendo conhecido por suas propriedades de formar filmes aprisionando o material do núcleo e ainda, atuando como um bom emulsificante em substâncias apolares. No caso dos carotenoides, a interação ocorre na região hidrofóbica da amostra de goma arábica (DICKINSON, 2003; BARBOSA, 2009), em consequência, a %EE é significativamente afetada pela sua presença. Em contrapartida, o efeito da maltodextrina e da interação entre temperatura/maltodextrina não foram significativos ( $p > 0,05$ ).

Uma alta eficiência de encapsulação é necessária para reduzir a degradação oxidativa de compostos na superfície da partícula e para aumentar a estabilidade do produto. Nem todas as misturas dos materiais de parede avaliados no presente estudo foram capazes de encapsular o extrato carotenogênico obtido a partir da levedura *S. salmonicolor* de maneira satisfatória. Os valores encontrados variaram de 21,89 a 61,73%.

Resultado inferior, quando comparado com este estudo, foi encontrado pelos autores Álvarez-Henao et al. (2018) os quais, ao encapsular luteína com GA e MA (1:1), obtiveram uma eficiência máxima de encapsulamento de apenas 38,82%.

Outro estudo, realizado pelos autores Menegazzi et al. (2020), teve como objetivo otimizar as condições do processo de microencapsulação de carotenoides produzidos pela levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268 por atomização utilizando goma xantana (XG) como material de revestimento. As condições para maximização do processo de atomização foram avaliadas segundo os efeitos da temperatura do ar de entrada (110 a 130°C), fluxo de alimentação (0,15 a 0,25 g/L) e concentração de GX (0,5 a 1,0%), tendo como resultados de que a adição do surfactante Tween 80 aumentou a eficiência, chegando a um percentual de 70%, reforçando que a composição do material de revestimento é um dos principais fatores interferentes nas propriedades da cápsula, nesse caso, na capacidade de preservar os carotenoides em seu interior, mantendo a funcionalidade do biocomposto.

Barbosa (2009), encapsulou bixina extraída de sementes de urucum, pelo método de atomização utilizando uma temperatura de ar de entrada de 180°C. Foram testados os seguintes materiais de parede: 100% maltodextrina e 99,8% maltodextrina + 0,2% Tween 80, para a microencapsulação de bixina. As microcápsulas elaboradas com 99,8%

maltodextrina + 0,2% Tween 80 apresentaram uma eficiência de encapsulamento de 75%, valor maior do que nas cápsulas obtidas apenas com maltodextrina, nas quais a eficiência foi de 54%, provando que a adição de Tween 80 é benéfica e aumenta a interação entre as substâncias contribuindo para a emulsão. Além disso, na etapa seguinte do estudo, utilizaram as misturas de maltodextrina e goma arábica nas proporções de 1:1 (MD/GA) e 4:1 (MD/GA) como materiais de parede para microencapsulação de bixina e obtiveram uma eficiência de 89% e 81%, respectivamente, comprovando que a proporção MD/GA<sub>1:1</sub> é melhor para o encapsulamento do que maiores quantidades de maltodextrina em relação a goma arábica, o que vai ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo.

Os autores Etzbach et al. (2020), encapsularam o extrato de *Physalis peruviana* L. rico em carotenoides através do método de secagem em *spray dryer* com temperatura fixa de entrada em 140°C, utilizando MD e GA na proporção 1:1 (p/p) e obtiveram, aproximadamente, 50% de eficiência de encapsulamento, valor próximo, porém ligeiramente inferior ao obtido nos pontos centrais do presente estudo.

Lourenço (2017) encapsulou o extrato etanólico de repiso de tomate composto essencialmente por carotenoides usando GA como material de parede, com temperatura de secagem no *spray dryer* variando de 110 e 200°C. Verificou que a eficiência de encapsulação aumentou com o aumento da temperatura do ar de entrada, chegando ao valor de 24% de eficiência a 200°C e 20% de GA. Por outro lado, o aumento da concentração de GA, mantendo a mesma temperatura, fez com que a eficiência diminuísse. Resultados estes que vão contra o presente estudo, sendo que a eficiência de 24% encontrada por Lourenço (2017) é bem inferior a eficiência nas condições otimizadas do presente trabalho, provando que a combinação de MD e GA aumentou a eficiência de encapsulamento e preservou a integridade dos carotenoides durante a secagem, posto que, como matriz encapsulante, a MD frequentemente aparece associada a GA e que o aumento da temperatura não trouxe acréscimos, muito pelo contrário, reduziu a %EE, seguindo a exata lógica de que os carotenoides, por serem sensíveis ao calor se degradam em altas temperaturas. Além disso, a temperatura de alimentação modifica diversas propriedades tais como a fluidez e a viscosidade e, portanto, a capacidade da emulsão em ser atomizada de forma homogênea (GHARSALLAOUI et al., 2007).

É necessário considerar que a eficiência de encapsulamento não foi maior, pois pode ter ocorrido pequenas perdas de carotenoides ao longo do processo de secagem

como exposição à luz ou ao calor, embora, alguns autores defendem que a ligeira exposição e a rápida evaporação da água conseguem manter o interior das cápsulas a temperaturas inferiores tais que não afetariam a sua composição (GHARSALLAOUI, 2007; RIBEIRO et al., 2020a).

Diferenças na %EE encontradas nos resultados do presente estudo e também nos diversos trabalhos da literatura podem ser atribuídas as diferenças físico-químicas dos materiais do núcleo e da parede e nas matrizes poliméricas formadas a partir dos materiais de parede e em sua viscosidade. A GA por exemplo é formada por uma cadeia ramificada de carboidratos e algumas glicoproteínas ligadas por ligações covalentes, além de apresentar moléculas de proteína arabinogalactana (AGP) as quais fornecem características emulsificantes da água e a capacidade de formação de filme, permitindo que a GA interaja com as seções hidrofílicas e hidrofóbicas das moléculas. A MD, por sua vez, é um amido de cadeia curta hidrolisado que atua como uma barreira contra o oxigênio (CASTELLANI et al., 2010; AKHAVAN MAHDAVI et al., 2016; TROYA; TUPUNA-YEROVI; RUALES, 2018; TUPUNA et al., 2018). Além disso, a viscosidade influencia a movimentação das correntes no interior das gotículas durante a secagem e conseqüentemente na retenção do material no interior das cápsulas. Assim, se a viscosidade for abaixo do ideal, a mistura interna nas gotículas durante a secagem resulta na formação de uma película superficial semipermeável, causando a perda do recheio (BARBOSA, 2009; ETZBACH et al., 2020).

Cabe destacar que os resultados sobre a eficiência de microencapsulação de carotenoides são muitas vezes difíceis de serem avaliados e comparados, pois as metodologias usadas para esta determinação são diferentes, com etapas a mais ou a menos, temperaturas diversas e centrifugações com velocidades e tempos diferentes, variação de solventes, leituras a comprimentos de onda variados, entre outros, além do fato de que alguns dos parâmetros de encapsulamento não são reportados na maioria dos estudos.

#### **4.2.5 Características físico-químicas e morfológicas dos encapsulados**

As microcápsulas foram avaliadas quanto a atividade de água, umidade, índices de cor e características morfológicas (MEV).



#### 4.2.5.1 Atividade de água e Umidade

Entre os parâmetros que influenciam a estabilidade dos compostos bioativos encapsulados estão a atividade de água ( $A_w$ ) e o teor de umidade. Assim, é significativo compreender e ter um bom controle desses parâmetros durante o processamento e armazenamento de pós (GUADARRAMA-LEZAM et al., 2012). Em relação a estas análises obtidas nos 19 ensaios, a Tabela 8 apresenta os resultados que, na sequência, são discutidos e comparados com a literatura.

Os valores da  $A_w$  variaram entre 0,130 a 0,313 e da umidade variaram entre 0,5 a 1,8%. A menor atividade de água foi obtida na temperatura de secagem de 130°C, 37,6 g/L de MD e 25 g/L de GA (Ensaio 14). Em relação a umidade, os ensaios com os menores valores foram o Ensaio 2 (0,5%), utilizando 140°C e proporções iguais de material de parede 17,5 g/L (GA:MD) e o Ensaio 4, também com 140°C de temperatura de secagem, porém com maiores quantidades de GA (32,5 g/L) do que de MD (17,5 g/L).

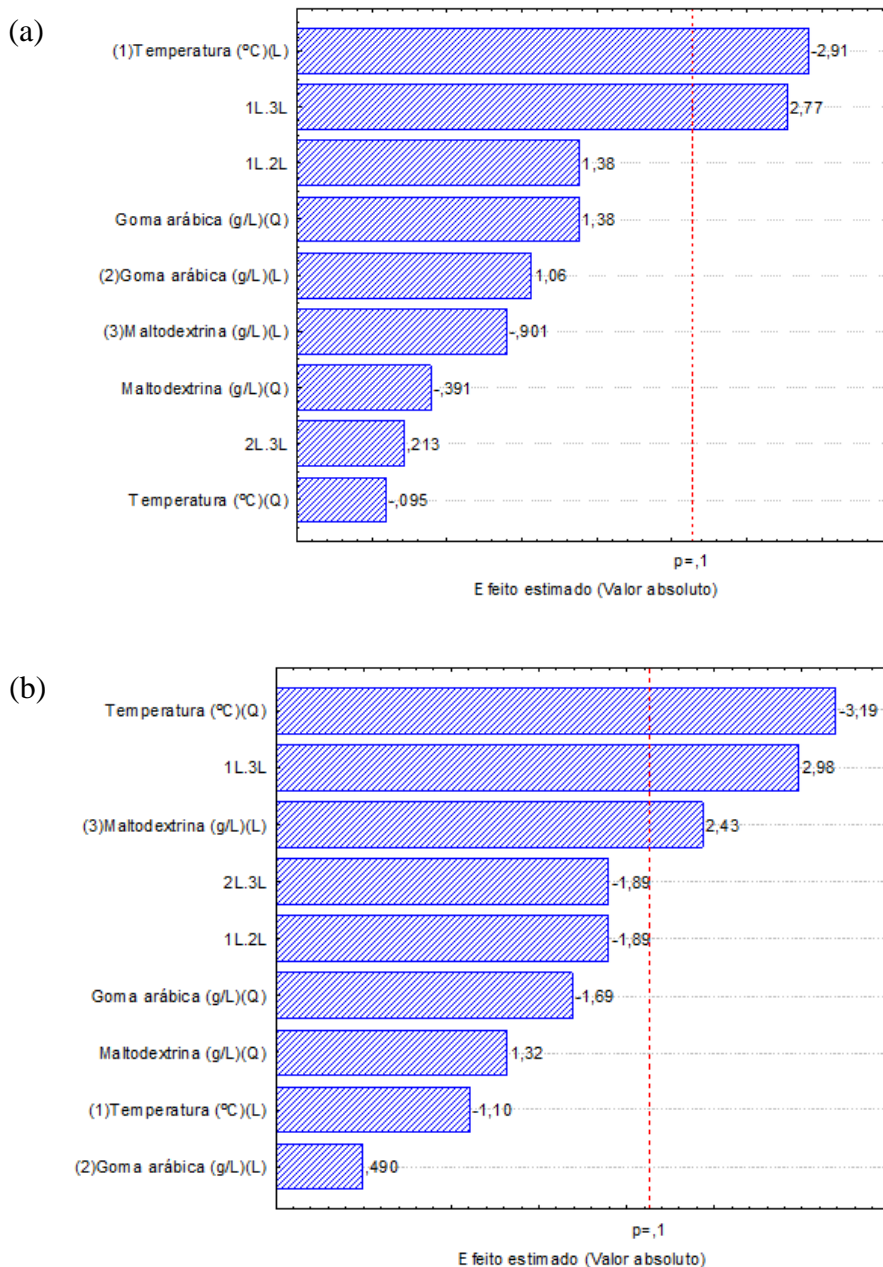
Os dados obtidos na Tabela 8 foram tratados estatisticamente e os resultados podem ser melhor visualizados pelo Gráfico de Pareto (Figura 16 a e b), que descreve os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento em relação as respostas em atividade de água (a) a 90% de confiança e umidade (b) a 95% de confiança.

De acordo com a Figura 16a e 16b a variável independente temperatura e a correlação temperatura/maltodextrina foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no processo de encapsulamento e secagem de carotenoides em relação a atividade de água e umidade. A temperatura, tendo um efeito negativo em ambos os casos, indica que um deslocamento do nível de temperatura estudado de -1 para +1, resultaria na diminuição, tanto da  $A_w$  quanto da umidade. A capacidade de retenção da água em uma partícula está intimamente relacionada a porosidade do pó, sua estrutura e também a parâmetros do processo de secagem como as diferenças entre as temperaturas de entrada e saída do ar e também a taxa de alimentação da amostra. Assim, em relação a temperatura, os resultados obtidos se justificam pelo fato de que uma maior temperatura de ar de secagem, promove um aumento na taxa de transferência de calor, a qual serve de força motriz para evaporação da água, gerando, conseqüentemente, pós com menor teor de umidade e atividade de água (DELFINI, 2016; GULSAH; DIRIM, 2016).

Em contrapartida, a interação temperatura/maltodextrina foi significativamente positiva, indicando que ao aumentar a correlação entre temperatura/maltodextrina, possivelmente haverá um aumento na  $A_w$  e umidade das cápsulas. Além disso,

observando a Figura 16b, verifica-se que a maltodextrina foi positiva significativa ( $p < 0,05$ ) também para a umidade, indicando que há uma tendência de aumento da umidade ao aumentar suas quantidades na formulação das cápsulas, o que não seria interessante visto que quanto menor for a  $A_w$  e umidade, mais estáveis são os pós.

**Figura 16** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis independentes testadas no planejamento fatorial  $2^3$  para o encapsulamento e secagem de extrato de carotenoides em relação a atividade de água (a) e ao teor de umidade (%) (b).



Fonte: O autor (2021).

Os autores Janiszewska-Turak et al. (2017) investigaram o efeito do tipo de carreador nas propriedades físicas e estruturais de microcápsulas de suco de cenoura puro

rico em carotenoides. Para tal, utilizaram misturas de suco e MD ou suco e GA e misturas dos dois materiais nas proporções 3:1, 2:1 e 1:1 (MD:GA) com temperatura de secagem em *spray dryer* fixa em 160°C. Todos os pós apresentaram  $A_w$  abaixo de 0,26, e nas proporções MD:GA (1:1) encontraram  $A_w$  de 0,236 valores semelhantes aos obtidos no presente estudo, mesmo que tenha sido utilizado temperaturas inferiores as quais, em nenhum ensaio, ultrapassaram 147°C.

Em outro estudo encontrado na literatura, os autores Guadarrama-Lezama et al. (2012) encapsularam carotenoides extraídos de *Capsicum annuum L.* (pimenta) por secagem por pulverização utilizando GA e MD com uma razão biopolímeros:extrato-solução de 4:1 (p/p). Para o parâmetro  $A_w$  encontraram valores de 0,15 a 0,19 e, em relação a umidade, os valores ficaram entre 3,9 e 5%.

Rezende, Nogueira e Narain (2018) microencapsularam polpa de acerola e extratos residuais contendo carotenoides, por *spray drying* usando GA e MD como agentes encapsulantes, na proporção 1:1 (10 g/100mL) e uma temperatura de secagem de 170°C. As cápsulas obtidas variaram a sua  $A_w$  de 0,07 a 0,26, valores inferiores e também superiores aos obtidos no presente estudo, provavelmente devido a temperatura de secagem utilizada, bem superior as empregadas nos ensaios testados neste trabalho.

Etzbach et al. (2020) como resultados para o encapsulamento de carotenoides utilizando diversos materiais de parede, encontraram valores de umidade inferiores a 5,25%, resultado superior aos encontrados no presente estudo no qual nenhum valor para este parâmetro ultrapassou a umidade de 1,8%.

Em seu estudo de encapsulamento de compostos bioativos hidro e lipossolúveis (como antocianinas e carotenoides) no suco de tamarillo, usando diferentes materiais de parede (20% p/p de suco) como maltodextrina (MD), goma arábica de baixa viscosidade (OSA 2), maltodextrina resistente (RMD) e goma arábica (GA), os autores Ramakrishnan et al. (2018), utilizando secagem por pulverização a 150°C de ar de entrada encontraram valores de umidade e  $A_w$ , respectivamente de: MD de 3,65 % e 0,24; OSA 2 de 3,43% e 0,26; RMD de 3,43% e 0,25; e GA de 0,33% e 0,25. Os valores de umidade foram muito superiores aos encontrados no presente trabalho, já os de  $A_w$  ficaram próximos.

Em outro estudo os autores Ordonez-Santos, Martinez-Giron e Villamizar-Vargas (2018) encapsularam  $\beta$ -caroteno obtido de resíduos de pupunheira (*Bactris gasipaes*) utilizando o processo de encapsulação com secagem por atomização, o qual foi realizado a partir de uma mistura de MD e GA 7,58% (1:1 p/p) como material de parede, 75,76%

de água, 9,09% de  $\beta$ -caroteno e temperatura do ar de entrada de 160 °C. Como resultados, encontraram valores de umidade e atividade de água de 4,60% e 0,17, respectivamente. Sendo os valores de umidade superiores e da  $A_w$  semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Dentro de um sistema alimentar, a atividade de água se refere a fração da umidade total que está livre para que reações bioquímicas e de crescimento bacteriano aconteçam. Assim, produtos com baixo teor de água apresentam maior estabilidade durante o armazenamento e, ao contrário, em condições de alta  $A_w$ , o pó tende a absorver água (DA SILVA CARVALHO et al., 2016). Todos os valores encontrados no presente estudo, com exceção do Ensaio 1, estão dentro do limite de  $A_w$  inferior a 0,3, o qual é indicado para a estabilidade de pós, pois nesta faixa, reações de deterioração, oxidação lipídica e escurecimento enzimático são baixas e limitadas. Contudo, atividade de água nas faixas de 0,3-0,5, tendem a colapsar o material em pó, originando aglomerado das partículas, endurecimento, pós úmidos e degradação de compostos bioativos. O crescimento de bolores, leveduras e bactérias é esperado em  $A_w$  acima de 0,6, valores bem superiores e distantes aos obtidos neste trabalho (LABUZA, ALTUNAKAR, 2007; SANTANA et al., 2014; JANISZEWSKA-TURAK et al., 2017; RAMAKRISHNAN et al., 2018).

De acordo com a literatura, um fator que pode influenciar em baixos valores para a umidade (0,5 a 1,8%) no presente estudo é a presença de maltodextrina como material de parede, a qual é amplamente utilizada para a secagem por atomização, já que quando utilizada em proporções corretas, consegue aumentar os sólidos e reduzir a quantidade de água a ser evaporada no processo de secagem por spray. Além disso, as maltodextrinas são conhecidas por aumentarem também a temperatura de transição vítrea das formulações, além de reduzirem a viscosidade de sólidos na parede da câmara de secagem, resultando em pós mais secos e estáveis. Esta capacidade de aumentar a temperatura de transição vítrea se destaca nas maltodextrinas com baixo teor de dextrose equivalente (ROOS, 2010; RIBEIRO et al., 2020b). E, mesmo a goma arábica sendo constituída de uma estrutura ramificada, a qual apresenta elevado número de ramificações com grupos hidrofílicos capazes de adsorver água do ambiente (DA SILVA et al. 2013), esta variável não foi significativa, chegando-se a conclusão de que a interação entre a MD e GA nas condições estudadas se prova favorável a obtenção de cápsulas com baixa  $A_w$  e umidade, conforme os bons resultados alcançados neste trabalho.

#### 4.2.5.2 Cor

As cores das microcápsulas foram medidas com um colorímetro e os valores dos parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$ ) verificados para cada ensaio realizado encontram-se na Tabela 8. Visualmente o produto se apresentou em forma de pó fino e solto e todos os pós produzidos a partir do extrato de carotenoides eram bem claros variando entre um alaranjado claro e um amarelo claro devido à coloração do extrato e também pela coloração do agente carreador, conforme pode ser observado na Figura 17.

**Figura 17.** Aspecto visual das microcápsulas secagem por *spray dryer* (Ensaio ponto central).



Fonte: O autor (2021).

De acordo com a Tabela 8, em relação ao índice  $L^*$ , que mede a brancura e/ou luminosidade de 0 (preto/escuro) a 100 (branco/claro), verificou-se que os valores variaram de 61,35 a 82,36. O menor valor obtido foi no ensaio 2, correspondente a temperatura do ar de secagem de 140°C, e proporções iguais de GA e MD (17,5 g/L). Ao contrário, o maior valor, ocorreu em um dos ensaios do ponto central (Ensaio 19) no qual utilizou-se temperatura de 130°C e proporções iguais, porém superiores ao ensaio 2 de GA e MD (25 g/L). Como o processo de encapsulamento do extrato de carotenoides foi feito utilizando os agentes encapsulantes GA e MD, ambos de cor clara, o aumento da luminosidade (parâmetro  $L^*$ ) já era esperado, pois, estes encapsulantes diluem a coloração alaranjada escura característica do extrato puro.

Os resultados apresentados na Tabela 8 foram tratados estatisticamente e a Tabela 11 (Apêndice B) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(4), para o parâmetro  $L^*$ .

A Equação 15 apresenta o modelo codificado de primeira ordem, que descreve o parâmetro de cor  $L^*$  em função das variáveis independentes (temperatura e maltodextrina), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 12, Apêndice B) e apresentou um coeficiente de correlação de 0,77 e o F calculado 2,23 vezes maior que o valor tabelado (3,63), o qual permitiu a validação do

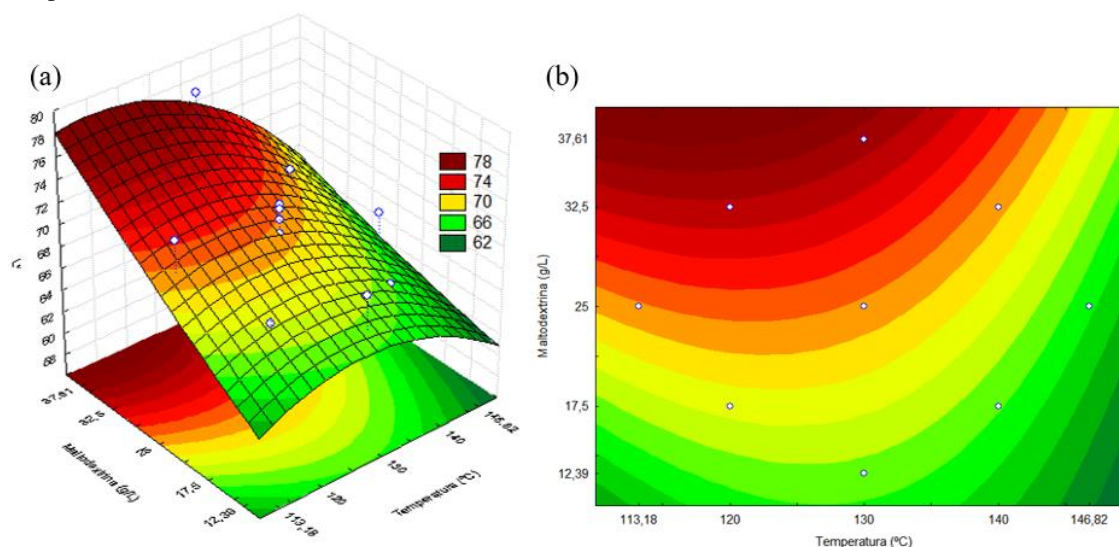
modelo e a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 18a e b.

$$L^* = 70,76 - 1,66 X_1 + 2,65 X_3 \quad (15)$$

Onde:  $L^*$  = índice de cor (cor clara, escura e luminosidade)  $X_1$  = Temperatura e  $X_3$  = Maltodextrina (g/L).

Os coeficientes lineares mostram que a temperatura e a maltodextrina foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para o parâmetro de cor  $L^*$ .

**Figura 18** - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o parâmetro de cor  $L^*$  em função da temperatura e maltodextrina.



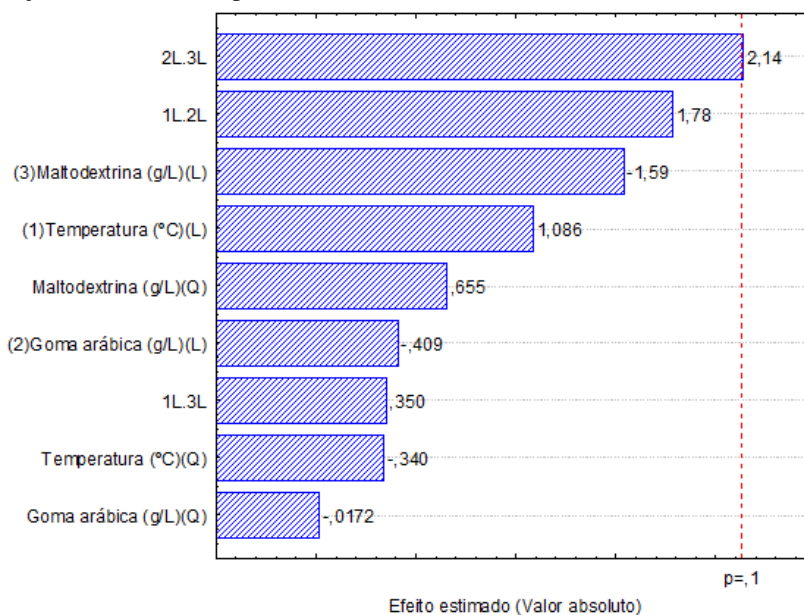
Fonte: O autor (2021).

Conforme observado nas Figuras 18a e 18b as quais permitem acompanhar o comportamento das variáveis temperatura e MD em relação ao índice  $L^*$ , os maiores valores (pós mais brancos) se encontram nas faixas de temperatura mais baixas (entre 113 e 128°C) e concentrações de maltodextrina acima de 35 g/L. O efeito da temperatura foi negativo, ou seja, indica que ao aumentar a temperatura, houve uma tendência na redução dos valores de  $L^*$ , ou seja, uma tendência ao escurecimento dos pós. Este escurecimento em virtude da alta temperatura, pode ocorrer por causa da caramelização dos açúcares presentes. O efeito da MD foi positivo o que mostra que ao aumentar sua quantidade, houve uma tendência no aumento nos valores de  $L^*$  e conseqüentemente na obtenção de pós mais claros e luminosos.

Em relação ao índice  $a^*$ , que varia do verde (-) ao vermelho (+), os resultados obtidos nos 19 ensaios, variaram de -0,21 a 0,78, sendo que o menor valor ocorreu no ensaio 6 (temperatura de 140°C, 17,5 g/L de GA e 32,5 g/L de MD) e ensaio 9 (temperatura de 113°C, 25 g/L de GA e 25 g/L de MD). Foi o Ensaio 8 que apresentou a maior coloração de  $a^*$  (0,78) com tendência ao vermelho, no qual se utilizou temperatura de 140°C e 32,5 g/L tanto de GA como MD.

Os dados obtidos na Tabela 8 foram tratados estatisticamente e os resultados podem ser melhor visualizados pelo Gráfico de Pareto (Figura 19), que descreve os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento a 90% de confiança em relação ao índice  $a^*$ .

**Figura 19** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis independentes testadas no planejamento fatorial  $2^3$  para o índice de cor  $a^*$ .



De acordo com a Figura 19, a correlação GA/MD foi a única variável estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para o índice de cor  $a^*$ , tendo um efeito positivo, o qual indica que ao aumentar a correlação GA e MD, os valores de  $a^*$  aumentariam.

Os resultados obtidos para o parâmetro de cor  $b^*$  que varia dos componentes azul (-) para amarelo (+), também estão apresentados na Tabela 8. Verificou-se que os valores variaram de 11,85 a 26,28 ou seja, a coloração dos pós tendeu para a coloração amarela. O menor valor obtido foi no ensaio 8, no qual utilizou-se temperatura de 140°C e proporções iguais de GA e MD (32,5 g/L). Ao contrário, o maior valor ocorreu no ensaio

1 correspondente a temperatura do ar de secagem de 120°C, e proporções iguais de GA e MD (17,5 g/L).

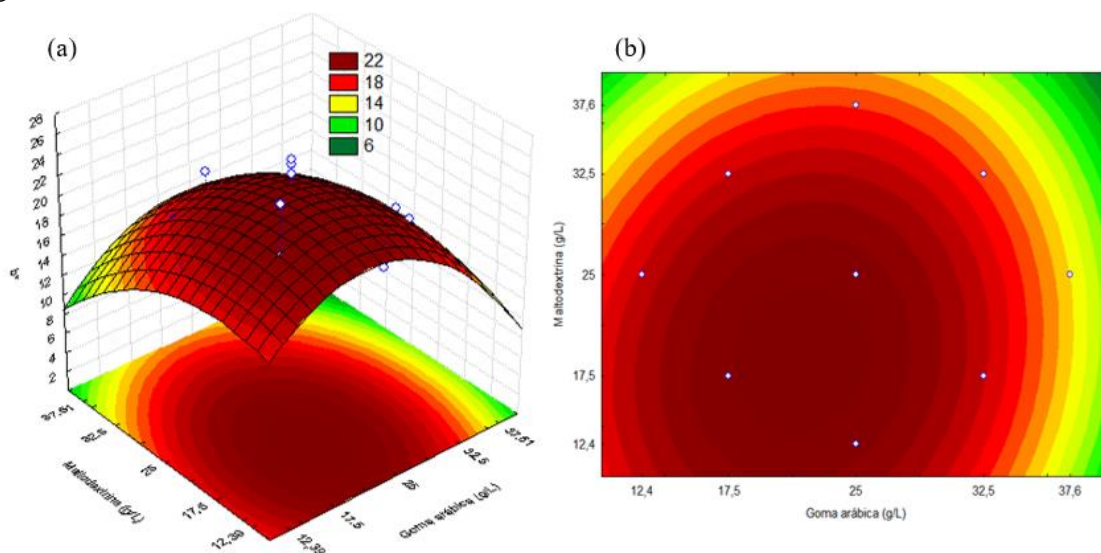
Os resultados apresentados na Tabela 8 foram tratados estatisticamente e a Tabela 13 (Apêndice C) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(4), para o parâmetro  $b^*$ .

A Equação 16 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve o parâmetro de cor  $b^*$  em função das variáveis independentes (concentração de goma arábica e maltodextrina), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 14, Apêndice C) e apresentou um coeficiente de correlação de 0,84 e o F calculado 1,35 vezes maior que o valor tabelado (3,63), o qual permitiu a validação do modelo e a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 20 (a) e (b).

$$b^* = 22,55 - 2,11 X_2^2 - 1,63 X_3 \quad (16)$$

Onde:  $b^*$  = índice de cor (azul/amarelo)  $X_2$  = goma arábica e  $X_3$  = Maltodextrina (g/L).

**Figura 20** - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o parâmetro de cor  $b^*$  em função da goma arábica e maltodextrina.



Fonte: O autor (2021).

O coeficiente quadrático da variável goma arábica e o linear da maltodextrina foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) e negativos para o parâmetro de cor  $b^*$ , ou seja, indica que ao aumentar suas concentrações, houve uma tendência na redução dos



valores de  $b^*$ . Conforme observado nas Figuras 20 a e 20b as quais permitem acompanhar o comportamento das variáveis GA e MD em relação ao índice  $b^*$ , os maiores valores (pós mais amarelos) se encontram nas faixas de concentração de GA entre 17 e 25 g/L e concentrações de MD entre 12 e 25 g/L.

Os resultados obtidos para o parâmetro  $C^*$  (cromaticidade) que indica a saturação, também estão apresentados na Tabela 8. Verificou-se que os valores variaram de 11,87 a 26,29. O menor valor obtido foi no ensaio 8, no qual utilizou-se temperatura de secagem de 140°C e proporções iguais de GA e MD (32,5 g/L). Ao contrário, o maior valor ocorreu no ensaio 1 correspondente a temperatura do ar de secagem de 120°C, e proporções iguais de GA e MD (17,5 g/L). Os valores ficaram próximos aos obtidos para o índice  $b^*$  pois os valores de  $a^*$  foram muito baixos não influenciando no cálculo para obtenção da saturação.

Os resultados apresentados na Tabela 8 foram tratados estatisticamente e a Tabela 15 (Apêndice D) apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(4), para o parâmetro  $C^*$ .

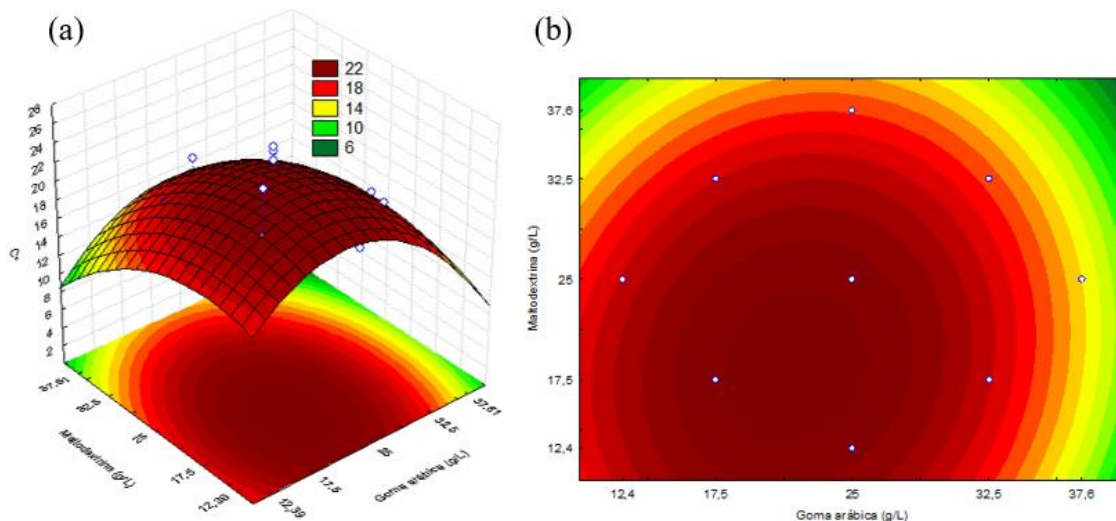
A Equação 17 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve o parâmetro de cor  $C^*$  em função das variáveis independentes (concentração de goma arábica e maltodextrina), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 16, Apêndice D) e apresentou um coeficiente de correlação de 0,85 e o F calculado 1,35 vezes maior que o valor tabelado (3,63), o qual permitiu a validação do modelo e a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 21 (a) e (b).

$$C^* = 22,56 - 2,11 X_2^2 - 1,63 X_3 \quad (17)$$

Onde:  $C^*$  = índice de cromaticidade (saturação)  $X_2$  = goma arábica (g/L) e  $X_3$  = maltodextrina (g/L).

O coeficiente quadrático da goma arábica e o linear da maltodextrina foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) e negativos para o parâmetro de cor  $C^*$ , ou seja, indica que ao aumentar suas concentrações, houve uma tendência na redução dos valores de  $C^*$ . Possivelmente indicando que o material se encontra aprisionado dentro do material de parede, o qual adquiriu a tonalidade amarelo/laranjado claro.

**Figura 21** - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o parâmetro de cor  $C^*$  em função da goma arábica e maltodextrina.



Fonte: O autor (2021).

Conforme observado nas Figuras 21a e 21b as quais permitem acompanhar o comportamento das variáveis GA e MD em relação ao índice  $C^*$ , os maiores valores se encontram nas faixas centrais/baixas de concentração de GA entre 17 e 25 g/L e concentrações de MD entre 12 e 25 g/L.

Os autores Troya, Tupuna-Yerovi e Ruales (2018), encontraram valores entre 39,23 e 45,36 para o índice  $L^*$ , 2,91 e 3,60 para o índice  $a^*$  e valores entre 2,32 e 4,39 para o índice  $b^*$ . Concluíram que os tratamentos que tinham uma proporção maior de GA mostram valores altos do parâmetro  $a^*$  isso seria devido à capacidade de encapsulamento do GA quando encontrado em maior proporção.

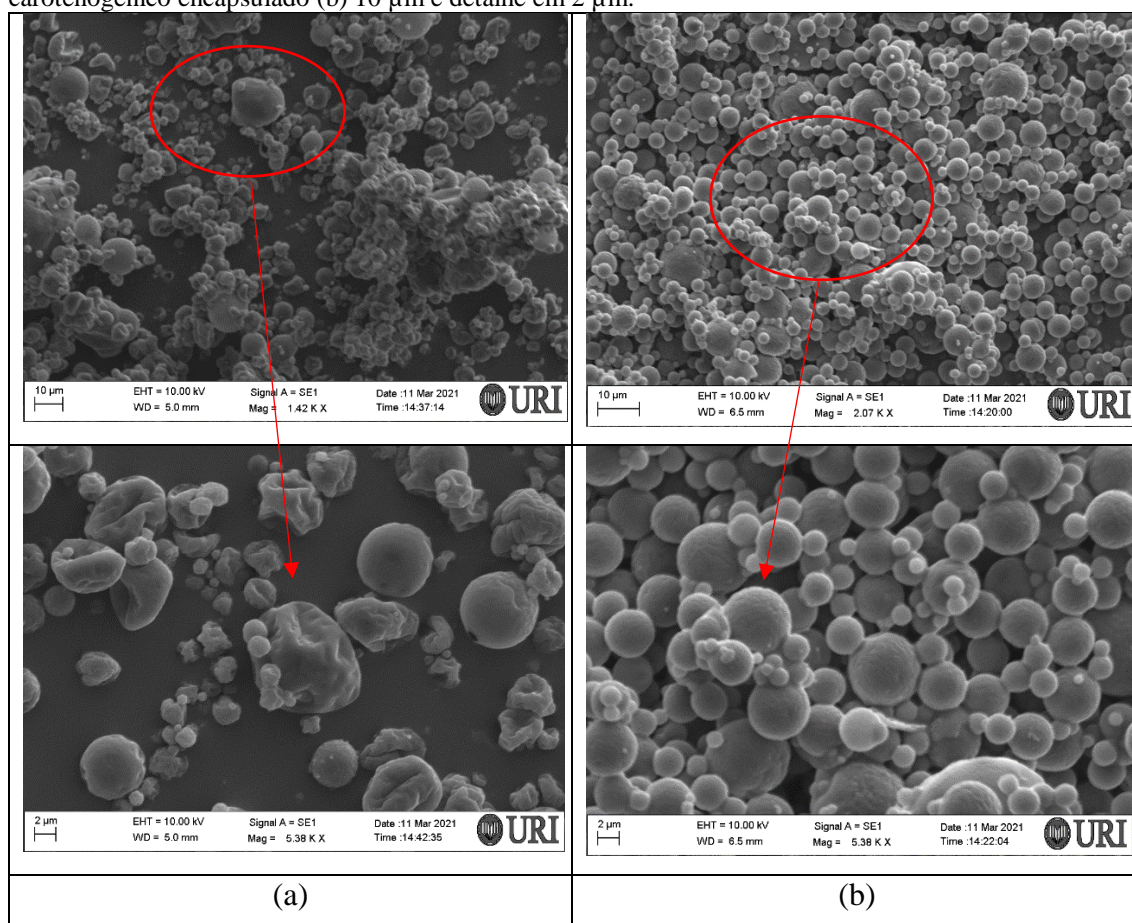
García et al. (2018) encapsularam Casca de manga (*Mangifera indica*) em pó (MP), casca de banana (*Musa paradisiaca*) pó (BP) e polpa liofilizada de tamarillo amarelo (*Solanum betaceum* Cav.) (YT), pelo método de secagem por pulverização com MD em duas temperaturas de entrada de ar (130°C e 180°C). Encontraram valores de  $L^*$  variando entre 82,82 e 88,26. Em relação aos parâmetros de cor  $a^*$  e  $b^*$ , os resultados mostraram que todos os dados estavam localizados no primeiro quadrante, variando entre 2,18 a 3,40 para  $a^*$  e 16,46 a 20,86 para o índice  $b^*$ . As principais diferenças entre os valores foram encontradas em termos de croma ( $C^*$ ), com valores variando de 17,46 a 28,87. Os valores de croma ( $C^*$ ) e  $a^*$  das cápsulas contendo YT, MD, MP e BP nas proporções 1:1:0,5:0,1 e 1:1:1:0,1 foram maiores do que nas outras amostras, como indicador de uma cor mais intensa, relacionadas aos principais carotenoides presentes. Os

valores obtidos por estes autores para o índice  $L^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$  encontram-se próximos aos obtidos no presente estudo e os valores de  $a^*$  foram levemente superiores.

#### 4.2.5.3 Caracterização morfológica das microcápsulas

As microcápsulas apresentaram um formato esférico e partículas com tamanhos similares, sem poros ou rachaduras e também com a presença de algumas concavidades ou achatamentos na superfície, sendo visível no material de parede (Figura 22a). As microcápsulas com os carotenoides (Figura 22b) são mais regulares (esferas), tornando presumível a existência de uma proteção física dos carotenoides internamente por meio dos materiais encapsulantes (goma arábica/maltodextrina/Tween 80).

**Figura 22-** Micrografias eletrônicas das microcápsulas do material de parede (a) e do extrato carotenogênico encapsulado (b) 10  $\mu\text{m}$  e detalhe em 2  $\mu\text{m}$ .



Fonte: O autor (2021).

As microcápsulas com material de parede possuem um formato diferenciado em relação as dos carotenoides encapsulados, com algumas partículas com concavidades e achatamentos. As concavidades ou achatamentos presentes nas superfícies das capsulas são típicas de produtos secos por *spray drying* (NUNES et al., 2018), normalmente

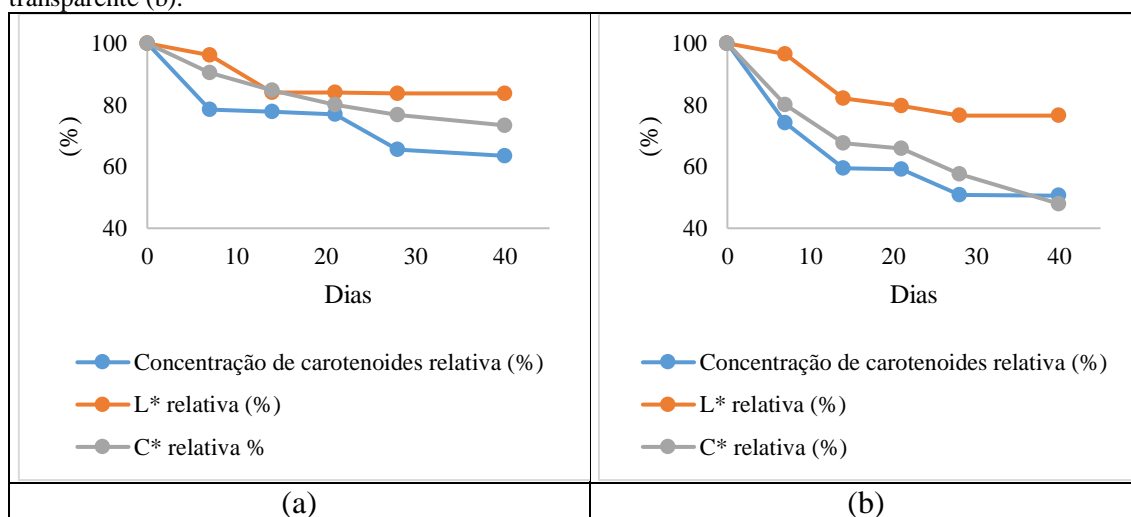
resultantes das altas temperaturas de secagem ou, também, dependem do tipo de material encapsulante utilizado no processo (LIAN et al., 2002).

O tamanho médio das partículas das microcápsulas do complexo goma arábica/maltodextrina/Tween 80/carotenoides foi de 3,48  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1,35$ ). De acordo com Kurozawa, Park e Hubinger (2009), maiores concentrações agentes encapsulantes na solução promovem um aumento no tamanho das partículas. No entanto, vale a pena mencionar que as micropartículas obtidas pelo secador por pulverização apresentaram um tamanho de partículas menores e o formato esférico das micropartículas hidrofóbicas pode facilitar a sua incorporação nos alimentos devido à redução da tensão superficial entre a microcápsula e o alimento, refletindo em maior fluidez e escoamento do material (CHEN; CHEN, 2007; BURGAIN et al., 2011).

### 4.3 ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO

A estabilidade das microcápsulas obtidas da melhor condição do planejamento em termos de eficiência de encapsulamento (130°C de temperatura e GA e MD 25 g/L (1:1)) foi investigada. O período avaliado foi de 40 dias e as amostras foram armazenadas em embalagem de vidro transparente e âmbar a 22°C  $\pm$  2°C e, para uma melhor interpretação dos resultados, os mesmos encontram-se apresentados na Figura 23a e 23b (Tabelas 17 e 18, Apêndice E).

**Figura 23-** Estabilidade das microcápsulas armazenadas a 22°C  $\pm$  2°C em frasco de vidro âmbar (a) e transparente (b).



Fonte: O autor (2021).

Conforme a Figura 23a, no primeiro momento, a redução da concentração de carotenoides relativa (%) se deu predominantemente com a fotoxidação dos carotenoides externos, pois após 7 dias o valor caiu para 78,53% no vidro âmbar, manteve-se praticamente estável até o 21º dia e no 40º dia a concentração residual de carotenoides foi de 63,50%, ou seja, uma degradação de aproximadamente 36,5%. Em relação a cor, passados 40 dias, 83,76% e 73,39% de L\* e chroma C\* relativa, respectivamente, foram preservadas, indicando que, embora houve redução, a amostra encapsulada teve suas propriedades de cor preservadas durante o período avaliado. A A<sub>w</sub> variou de 0,206 a 0,273 e a umidade de 1,12% a 1,9%.

Já para a embalagem de vidro transparente (Figura 23b), nos primeiros 7 dias a concentração de carotenoides relativa (%) caiu para 74,17%, após 14 dias para 59,48%, manteve-se estável até o 21º, e no 40º dia a concentração foi de 50,57%, ou seja, uma redução de 49,43%. Em relação a cor relativa, passados 40 dias, 76,56% e 47,94% de L\* e C\*, respectivamente, foram preservadas, indicando que, mesmo não havendo grandes alterações no índice L\*, houve drástica redução em relação ao índice chroma (C\*). A A<sub>w</sub> variou de 0,206 a 0,267 e a umidade de 1,12% a 2,5%.

Os autores Karaaslan et al. (2018) avaliaram a estabilidade de cápsulas de óleo de semente de pimenta rico em carotenoides obtidas por secagem por pulverização (184°C) utilizando GA e MD (1:5 p/p). Após 30 dias a eficiência de encapsulamento a 25°C passou de 82,75% para 79,96% e atividade de água inicialmente de 0,142 aumentou para 0,160. Já Haas et al. (2019) observaram alta retenção (cerca de 76-77%) de carotenoides durante o armazenamento a 35°C por 91 dias de pó concentrado de cenoura rico em carotenoides seco por pulverização utilizando MD como material encapsulante. Troya, Tupuna-Yerovi e Ruales (2018) estudaram a estabilidade de cápsulas de carotenoides utilizando MD e GA e concluíram que condições aquecidas de armazenamento resultam em perda de carotenoides ao longo do tempo, sendo que a 40°C após 21 dias preservou-se 77,77% dos carotenoides. Alves (2014) encapsulou o extrato de carotenoides de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) pelo método de secagem por atomização e avaliou sua estabilidade durante armazenamento a 25°C em frasco de polipropileno, obtendo como resultados a preservação de aproximadamente 63,63% dos carotenoides após 20 dias.

O alto percentual de degradação nos primeiros 7 dias pode ser explicado pela rápida diminuição dos carotenoides que não foram encapsulados, ou seja, que estavam na superfície das cápsulas e, portanto, sem a proteção do material de revestimento. Assim,

infere-se que a degradação no primeiro período se relaciona à proporção dos carotenoides perto e/ou na superfície das microcápsulas, enquanto que após essa rápida degradação, os valores permaneceram estáveis sendo que, neste período a taxa de degradação foi influenciada pelas propriedades do material, como a espessura e porosidade interna da parede o qual permitiu a difusão do oxigênio através da matriz (RAMAKRISHNAN et al., 2018).

Em relação a  $A_w$  e umidade, ligeiras alterações foram observadas. No vidro âmbar os valores variaram de 0,206 a 0,273 e 1,12 a 1,9% e no vidro transparente de 0,206 a 0,267 a 1,12 a 2,5%, respectivamente, indicando que a amostra atingiu o equilíbrio. Além disso, em ambas as embalagens a  $A_w$  foi inferior a 0,6, valor que é considerado crítico para a segurança microbiológica e química (RAMAKRISHNAN et al., 2018).

A redução dos valores de  $L^*$  indicou uma tendência ao escurecimento dos pós em ambas as embalagens, sendo mais pronunciada na embalagem transparente. Para o índice chroma ( $C^*$ ) houve tendência de redução na intensidade da cor ao longo do tempo, mais suave para embalagem âmbar e bem pronunciada para a embalagem transparente. O comportamento desses dois parâmetros, indicam que mudanças ocorreram na cor das cápsulas de carotenoides armazenadas a  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  ao longo do tempo e, conseqüentemente, no conteúdo das mesmas.

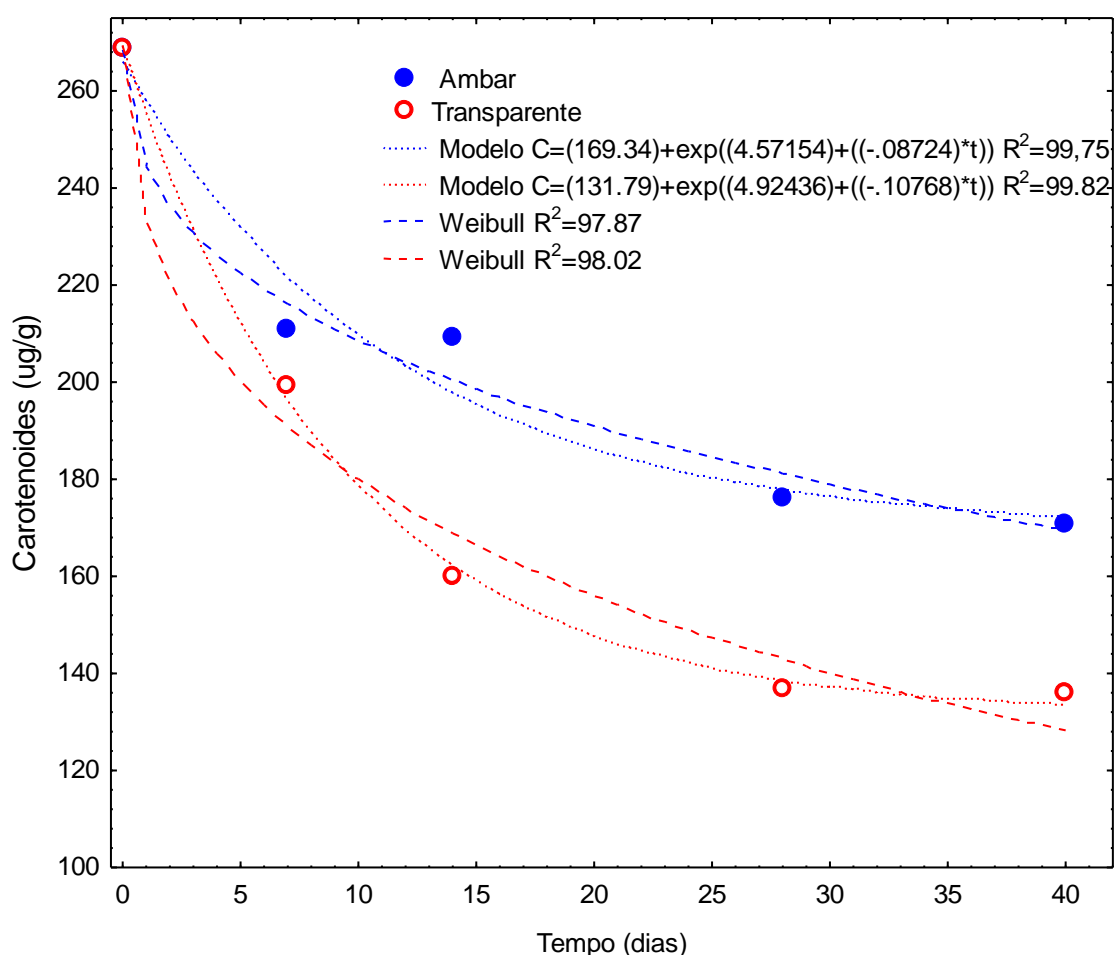
Os valores da concentração de carotenoides específico ( $\mu\text{g/g}$ ) em função do tempo, do encapsulado armazenado a  $22^\circ\text{C}$  em vidro âmbar e vidro transparente, melhor se ajustaram (maiores  $R^2$ ) aos modelos de cinética de ordem um (Equação 4:  $[\text{CE}(t)] = [\text{CE}]_0 \exp(k_0 + (-kt))$ ) e Weibull (Equação 6:  $[\text{CE}(t)] = [\text{CE}]_0 \exp(-k(t^\gamma))$ ) não linearizados. A Tabela 9 e Figura 24 apresentam os valores dos parâmetros  $k_0$ ,  $k$  (constante de velocidade de reação),  $\gamma$  (parâmetro de forma) e  $\exp$  corresponde à função exponencial dos modelos.

Todas as curvas de degradação dos carotenoides encapsulados apresentam a mesma tendência (Figura 24), com a concavidade voltada para cima, comprovando o que o parâmetro de forma ( $\gamma$ ) já havia indicado na Tabela 9, ou seja,  $\gamma < 1$  para ambos os modelos. E o parâmetro  $k$  que é o fator de escala, ou seja, quanto maior este valor mais rápida é a degradação dos carotenoides com o tempo. Logo, os carotenoides encapsulados armazenados a  $22^\circ\text{C}$  em vidro transparente, os valores de  $k$  foram superiores (Ordem um:  $k = 0,10768$ ; Weibull:  $k = 0,14563$ ) aos do vidro âmbar (Tabela 9). Os coeficientes estatísticos ( $R^2$ ) demonstram um bom ajuste dos dados experimentais e a capacidade preditiva dos modelos ( $R^2 > 97,87$ ).

**Tabela 9.** Parâmetros  $k$  e  $\gamma$  e análise estatística do ajuste ( $R^2$ ) dos modelos cinéticos de ordem um e Weibull de degradação dos carotenoides encapsulados em função do tempo, armazenados a 22°C em vidro âmbar e vidro transparente.

Modelos/Amostras	$CE_0$	$k_0$	$k$	$\gamma$	$R^2$
<i>Ordem um</i>					
Vidro âmbar	169,34	4,57154	0,08724	-	99,75
Vidro transparente	131,79	4,92436	0,10768	-	99,82
<i>Weibull</i>					
Vidro âmbar	268,48	-	0,09394	0,430113	97,87
Vidro transparente	269,29	-	0,14563	0,441357	98,02

**Figura 24 -** Modelos cinéticos de ordem um e Weibull de degradação dos carotenoides encapsulados em função do tempo, armazenados a 22°C em frascos de vidro âmbar e vidro transparente.



Assim, é possível verificar que os carotenoides encapsulados a 130°C em matriz de goma arábica/maltodextrina/Tween 80/extrato (25 g/L/25 g/L/2%/5%) armazenadas a 22°C ± 2°C em vidro âmbar preservaram melhor todos os parâmetros analisados. Porém, ao utilizar outras proporções núcleo e materiais de revestimento, condições de emulsão e

temperatura de entrada, bem como, a utilização de outras condições de armazenamento e embalagens, poderão ainda ser otimizadas a eficiências de encapsulamento e aumentar a estabilidade dos pigmentos, visando sua utilização como um potencial ingrediente alimentício.



## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho estudou-se o encapsulamento do extrato de carotenoides produzidos pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor* através da técnica de *spray drying* utilizando goma arábica e maltodextrina como materiais de revestimento, variando suas proporções e condições de secagem. Além disso, efetuou-se a caracterização das microcápsulas e a sua estabilidade durante o armazenamento.

Os resultados obtidos permitiram definir a melhor razão dos agentes encapsulantes e as condições operacionais para a conservação dos pigmentos carotenogênicos. A seguir, detalham-se as principais conclusões obtidas no presente estudo.

Relativamente aos ensaios realizados de acordo com um DCCR 2<sup>3</sup>, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o extrato de carotenoides pode ser encapsulado com misturas de GA e MD em diferentes proporções como materiais de parede pela técnica de *spray drying*. Verificou-se que o uso de uma quantidade fixa de extrato de 5% (v/v), 2% de Tween 80 (p/v), 0,9 L de Tampão fosfato pH 7,0 (v/v) temperatura intermediária de 130°C e GA e MD em proporções iguais de 25 g/L, demonstrou uma eficiência de encapsulamento de 60% e rendimento de produto de aproximadamente 51%.

O aumento da temperatura influenciou negativamente o parâmetro de eficiência de encapsulamento em virtude da degradação dos carotenoides à altas temperaturas. O rendimento, atividade de água e umidade, por sua vez, foram afetados positivamente pelas altas temperaturas de entrada por causa da evaporação mais rápida e efetiva da água permitindo que o núcleo fosse efetivamente revestido pelo material de parede, resultando em cápsulas com baixa umidade e atividade de água, parâmetros importantes para garantir a estabilidade dos pós durante o armazenamento.

Em relação aos índices de cor, no geral os pós obtidos eram brancos e claros. Para o parâmetro L\*, o aumento da temperatura fez com que os pós ficassem mais escuros, enquanto que o aumento da MD aumentou os valores de L\*. Em relação ao índice a\*, a correlação GA/MD foi positiva indicando que ao aumentar estes parâmetros os valores de a\* tenderiam mais a coloração vermelha. O parâmetro b\* melhor representou a coloração das cápsulas obtidas uma vez que os valores maiores foram obtidos para este índice, indicando a tendência dos pós à coloração amarela. A GA e MD influenciaram negativamente os valores de b\* e C\*, indicando que o seu aumento levou a redução destes índices.

Em relação a estrutura, as microcápsulas apresentaram um formato arredondado e partículas com tamanhos similares, sem poros ou rachaduras com tamanho médio de  $3,48 \mu\text{m}$  ( $\pm 1,35$ ).

A avaliação da estabilidade permitiu concluir que até 40 dias na embalagem âmbar houve a maior preservação dos carotenoides e também dos índices de cor  $L^*$  e chroma  $C^*$ .

Portanto, foi comprovado que o encapsulamento por spray drying utilizando goma arábica e maltodextrina como materiais de parede é uma alternativa promissora para aumentar a estabilidade dos carotenoides visando sua utilização como um potencial ingrediente alimentício.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao tema da pesquisa, a seguir algumas sugestões são apresentadas para trabalhos futuros:

- Avaliar novas metodologias para o preparo das soluções antes da secagem como, por exemplo, acrescentar etapas visando melhorar a homogeneização dos materiais de revestimento;
- Testar temperaturas e proporções dos agentes encapsulantes para o processo de encapsulamento de carotenoides;
- Avaliar outras técnicas de encapsulamento de carotenoides, a exemplo liofilização, *spray chiller*, super-crítica;
- Realizar estudos da estabilidade do pigmento encapsulado sob diferentes condições de umidade, temperatura e embalagens (embalagem camada dupla a vácuo);
- Aplicar o pigmento encapsulado em formulações de alimentos;
- Estudar a viabilidade econômica da produção do pigmento encapsulado.

## 7 REFERÊNCIAS

- AKHAVAN MAHDAVI, S. et al. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 379–385, 2016. ALDANA, A. S.; SANDOVAL, E. R.; APONTE, A. A. Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. **Ingeniería y Competitividad**, v. 5, n. 2, May. 2004.
- ÁLVAREZ-HENAO, M. V et al. Microencapsulation of lutein by *spray-drying*: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient. **Food Chemistry**, v. 256, p. 181-187, 2018.
- ÁLVAREZ, R. et al. Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 1–125, 2014.
- ALVES, A. I. **Getting carotenoids extract pulp pequi (*Caryocar Brasiliense camb.*) Encapsulated by *spray drying* method**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos; Tecnologia de Alimentos; Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014. 95f.
- AMAN, R.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of  $\beta$ -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9512–9518, 2005.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, Mar./Abr. 2006.
- AREPALLY, D.; GOSWAMI, T. Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by *spray drying*. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 99, 2018.
- ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Advances in *spray-drying* encapsulation of food bioactive ingredients: from microcapsules to nanocapsules. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, p. 8.1-9.29, 2019.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- BARBATO, J. **Estudo da obtenção de carotenóides por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula sp* em melão e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.
- BARBOSA, M. I. M. J. **Microcápsulas de bixina: obtenção, aplicação e estudos de fotodegradação em sistemas-modelo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.
- BARRETO, A. R. et al. Coating materials used in the microencapsulation of probiotics. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 164-174, 2015.
- BEZERRA, D. G.; DEVILLA, I. A.; DE PAULA, J. A. M. Microencapsulação: estratégia tecnológica na obtenção de bi produtos de alta qualidade. In: DE PAULA, J. A. M.; AMARAL, V. C. S. (Org). **Ciências da Saúde: saberes e práticas interdisciplinares**, Anápolis: Ed. UEG, 410 p. 2019.
- BOHM, V. et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 221-226, 2002.
- BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v.9, p. 1551-1558, 1995.

- BCC. **The Global market for carotenoids**. 2018. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>>. Acesso em: 11 Mar. 2020.
- BRENNAN, J. G. DRYING | *Spray Drying*. In: CABALLERO, B. (Org). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)**, Academic Press, p. 1929-1938, 2003.
- BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467– 483, 2011.
- BUZZINI, P. et al. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1024–1031, 2007.
- CANO-HIGUITA, D. M.; VELEZ, H. A. V.; TELIS, V. R. N. Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 39, n. 2, p. 173-182, abr. 2015.
- CAO, X. et al. *Spray-drying* of ceramics for *plasma-spray* coating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 14-15, p. 2433–2439, 2000.
- CARDOSO, L. A. C.; KANNO, K. Y. F.; KARP, S. G. Microbial production of carotenoids - A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 139–146, 2017.
- CARVALHO, G. R. **Avaliação de diferentes composições de material de parede na microencapsulação de óleo essencial *Lemongrass***. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais). Universidade Federal de Lavras, 2017, 94 f.
- CASTELLANI, O. et al. Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 1 - Emulsifying properties and interfacial characteristics of conventional (*Acacia senegal* (L.) Willd. var. *senegal*) and matured (*Acacia* (*sen*) SUPER GUM) *Acacia senegal*. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 2–3, p. 193–199, 2010.
- CHANG, H. W. et al. Microencapsulation of fish oil using thiol-modified  $\beta$ -lactoglobulin fibrils/chitosan complex: A study on the storage stability and in vitro release. **Food Hydrocolloids**, v. 80, p. 186-194, 2018.
- CHEN, J. et al. Encapsulation of carotenoids in emulsion-based delivery systems: enhancement of  $\beta$ -carotene water-dispersibility and chemical stability. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 49–55, 2017.
- CHEN, M. J.; CHEN, K. N. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, J. M. **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. United States, p. 83-107, 2007.
- COELHO, S. C.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying – A review. **Food Chemistry**, v. 339, 2021.
- COLET, R. **Bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator em batelada alimentada e semicontínuo com resíduos agroindustriais**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, Erechim, RS, 2016, 161 f.
- COLET, R.; DI LUCCIO, M.; VALDUGA, E. Fed-batch production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636): kinetic and stoichiometric parameters. **European Food Research & Technology**, v. 240, p. 173-182, 2015.
- COLET, R. et al. Kinetic parameters of fed-batch production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* using low-cost agro-industrial substrates. **Industrial Biotechnology**, v. 15, p. 311-321, 2019.

- COLET, R. et al. Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 268-274, 2017.
- COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 56-67, 2012.
- CONSTANT, P. B. L. et al. Aplicação da bixina microencapsulada em sistemas alimentícios. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 47604-47617, Jul. 2020.
- CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Prediction of vitamins loss during non-isothermal heat process and storage with non-linear kinetic models. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 24-34, 2006.
- CORRÊA-FILHO, L. C. et al. Microencapsulation of  $\beta$ -carotene by *spray drying*: effect of wall material concentration and drying inlet temperature. **International Journal of Food Science**, v. 2019, p. 1-12, 2019.
- DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DASARI, M. A. et al. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A-general**, v. 281, p. 225–231, 2005.
- DA SILVA CARVALHO, A. G. et al. Physical properties and morphology of *spray dried* microparticles containing anthocyanins of jussara (*Euterpe edulis Martius*) extract. **Powder Technology**, 294, 421-428, 2016.
- DA SILVA, F. C. et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of *spray-dried* propolis, a natural food additive, using gum arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28-36, 2013.
- DA SILVA, M.; BOGDAN, J.; JESUI, V. Production and Characterization of Maltodextrins and its Application in Microencapsulation of Food Compounds by *Spray Drying*. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 16, Jan. 2014.
- DAVIES, B. H.; Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plants and Pigments**, Academic Press, New York, p. 138-165, 1976.
- DELFINI, F. T. **Microencapsulação de óleo da semente de maracujá através da secagem por atomização**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2016.
- DE LIMA PETITO, N. Aumento da solubilidade de carotenóides de pimentão vermelho por complexação com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. **Food Chemistry**, v. 208, p. 124-131, 2016.
- DEROSSI, A.; DE PILLI, T.; FIORE, A. G. Vitamin C degradation of strawberry juice under non-isothermal conditions. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 590-595, 2010.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence of the properties of dispersed systems, **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25–39, 2003.
- EL-AGAMEY, A. et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 37-48, 2004.
- ESTEVINHO, B. N. et al. Application of a cyanobacterial extracellular polymeric substance in the 748 microencapsulation of vitamin B12. **Powder Technology**, v. 343, p. 644–651, 2019.
- ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Application of Biopolymers in Microencapsulation Processes. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. (Org). **Handbook of Food Bioengineering, Biopolymers for Food Design**, Academic Press, v. 20 p. 191-222, 2018.

- ETCHEPARE, M. A. et al. Microencapsulação de compostos bioativos pelo método de extrusão. **Ciência e Natura**, v. 37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos. p. 97–105, 2015.
- ETZBACH, L et al. Effects of carrier agents on powder properties, stability of carotenoids, and encapsulation efficiency of goldenberry (*Physalis peruviana L.*) powder produced by co-current *spray drying*. **Current Research in Food Science**, n. 3, p. 73–81, 2020.
- EUN, J-B. et al. A review of encapsulation of carotenoids using *spray drying* and freeze drying. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-27, dez. 2019.
- JAFARI, M. S. et al. Nano *spray drying* of food ingredients; materials, processing and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 632-646, 2021.
- FOO, S. C.; KHONG, N. M.H.; YUSOFF, F. M. Physicochemical, microstructure and antioxidant properties of microalgae-derived fucoxanthin rich microcapsules. **Algal Research**, v. 51, 2020.
- GARCIA-AMOEDO, L. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 676-679, 2002.
- GARCÍA, J. M. et al. Development and characterisation of carotenoid-rich microencapsulates from tropical fruit by-products and yellow tamarillo (*Solanum betaceum Cav.*), **Powder Technology**, v. 339, p. 702-709, 2018.
- GERANPOUR, M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Recent advances in *the spray drying* encapsulation of essential fatty acids and functional oils. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p. 71-90, 2020.
- GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.
- GHIDOUCHE, S. et al. A Rapid tool for the stability assessment of natural food colours. **Food Chemistry**, v. 139, p. 978–985, 2013.
- GONÇALVES, A.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Design and characterization of controlled-release vitamin A microparticles prepared by a *spray-drying* process. **Powder Technology**, v. 305, p. 411-417, 2017.
- GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 3, p. 276-290, 2010.
- GRUSZECKI, W.I.; STRZAŁKA, K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease** 1740, v. 2, p. 108–115, 2005.
- GUADARRAMA-LEZAMA, A. Y. et al. Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annum L.*) and their microencapsulates obtained by *spray-drying*, **Journal of Food Engineering**, v. 112, n. 1–2, p 29-37, 2012.
- GULSAH, C.; DIRIM, S.N. The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. **Powder Technology**, v. 287, p. 308-314. 2016.
- GUTIÉRREZ, F. J. et al. Methods for the nanoencapsulation of  $\beta$ -carotene in the food sector. **Trends in Food Science & Technology**, v. 32, p. 73–83, 2013.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society**, v. 35, n. 5, p.1147-1150, 2007.
- HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, 2015.

- HAAS, K. et al. Impact of powder particle structure on the oxidation stability and color of encapsulated crystalline and emulsified carotenoids in carrot concentrate powders. **Journal of Food Engineering**, v. 263, p. 398-408, 2019.
- HEBER D.; LU, Q. Y. Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 10, p. 920–923, 2002.
- HIGUERA-CIAPARA; I.; FÉLIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 85-196, 2006.
- HORST, M. A.; MORENO, F. S. **Funções plenamente reconhecidas de nutrientes – Carotenoides**. Série de Publicações ILSI Brasil, v. 6, 2009.
- HUERTAS, P.; ADOLFO, R. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín**, v. 63, n. 2, p. 5669-5684, 2010.
- IOM - U. S. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. **Dietary Reference Intakes: for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. Washington, D.C., National Academy Press, 797 p. 2001.
- IUPAC. Nomenclature of retinoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 721-726, 1983.
- JANISZEWSKA-TURAK, E. et al. The influence of carrier material on some physical and structural properties of carrot juice microcapsules. **Food Chemistry**, v. 236, p. 134-141, Dez. 2017.
- KAUSHIK, V.; ROOS, Y. H. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 1381–1391, 2007.
- KARAASLAN, M. et al. Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil. **Food Chemistry**, v. 337, 2021.
- KESHANI, S. et al. *Spray drying*: An overview on wall deposition, process and modeling, **Journal of Food Engineering**, v. 146, 2015.
- KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, p. 617-635, 1989.
- KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Ações carotenóides e sua relação com saúde e doença. **Aspectos Moleculares da Medicina**, v. 26, n. 6, p. 459-516, 2005.
- KUROZAWA, L.; PARK, K.; HUBINGER, M. Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of *spray dried* chicken meat hydrolysate protein. **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 2, p. 287-296, 2009.
- KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, edição 5, Amsterdam: **Elsevier**, 2011.
- LABUZA, T. P.; ALTUNAKAR, B. Water Activity Prediction and Moisture Sorption Isotherms. In: **Water activity in foods: fundamentals and applications**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, p. 109-154, 2007.
- LOCH-NECKEL, G. et al. Obtenção de extratos secos de carotenoides a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* por secagem em torre de aspersão (*spray-drying*). **Matéria (Rio de Janeiro)**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, 2018.
- LOURENÇO, M. M. S. F. **Encapsulação dos carotenoides extraídos do repiso do tomate por *Spray drying***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar), Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.



- LU, W.; MAIDANNYK, V. A.; LIM, A. S. L. Carotenoids degradation and precautions during processing. **Carotenoids: Properties, Processing and Applications**, p. 223–258, 2020.
- MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1–21, 2006.
- MALDONADE, I. R. **Produção de carotenoides por leveduras**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2002.
- MANDELLI, F. et al. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.126-134, 2012.
- MATA-GÓMEZ, L. et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, n. 13, n. 12, 2014.
- MEDEIROS, A. K. et al. Nanoencapsulation improved water solubility and color stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo L.*). **Food Chemistry**, v. 270, p. 562-572, 2019.
- MELLENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. **ALAN**, Caracas, v. 54, n. 2, p. 209-215, Jun. 2004.
- MENEGAZZI, G. S. et al. *Spray-Drying* Microencapsulation of Carotenoids Produced by *Phaffia rhodozyma*. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 5, out. 2020.
- MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, 2017.
- MILLER, N. J. et al. Antioxidant activities of carotenoids and xanthophylls. **FEBS Letters**, v. 384, p. 240-242, 1996.
- MIRANDA, V. S **Carotenóides de bactérias halófilas: produção, caracterização e atividade antioxidante**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP: 2010.
- MORGANTI, P. The photoprotective activity of nutraceuticals. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 2, p. 166-174, 2009.
- MUSSAGY, C. U. et al. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 103, p. 1095–1114 2019.
- NASCIMENTO, V. M. et al. Crescimento de *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivada em glicose, sacarose e glicerol em diferentes temperaturas. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 5, p. 429-433, 2016.
- NENADIS, N. et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS·+ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p.4669-4674, 2004.
- NESTERENKO, A. et al. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p 469-479, 2013.
- NUNES, G. L. et al. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium Bb-12* by *spray drying* and evaluation of its resistance in simulated gastrointestinal conditions, thermal treatments and storage conditions. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v.4 n. 6, 2018.
- NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Encapsulação de licopeno usando processos de secagem por atomização e inclusão molecular. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 893-900, set. 2007.
- OLIVEIRA, A. P. S. et al. Consumo de corantes artificiais em balas e chicletes por crianças de seis a nove anos. **Revista Analytica**, v. 44, p. 79–85, 2010.

- OLIVEIRA, M. I. S. et al. Estabilidade da polpa de morango atomizada utilizando diferentes agentes carreadores. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 310-318, dez. 2013.
- OLIVIER, J; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543 – 555, 2000.
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.
- ORDOÑEZ, M.; HERRERA, A. Morphologic and stability cassava starch matrices for encapsulating limonene by *spray drying*. **Powder Technology**, v. 253, p. 89-97, 2014.
- ORDONEZ-SANTOS, L. E.; MARTINEZ-GIRON, J.; VILLAMIZAR-VARGAS, R. H. Encapsulation of  $\beta$ -carotene extracted from peach palm residues: a stability study using two *spray-dried* processes. **Dyna**, Medellín, v. 85, n. 206, p. 128-134, Sept. 2018.
- ÖTLES, S.; ÇAGINGI, Ö. **Carotenoids as Natural Colorants**. In: SOCACIU, C. Food colorants: chemical and function properties. Washington: CRC Press, p. 51-70, 2007.
- PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. **Food Bioprocess Technology**. v. 6, p. 36–60, 2013.
- PENNACCHI, M. G. C. et al. A comparison of cell disruption procedures for the recovery of intracellular carotenoids from *Sporobolomyces ruberrimus* H110. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, n. 6, v. 1, p. 136-143, 2014.
- PÉREZ-ALONSO, C. et al. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for *spray-dried* microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v.53, n.2, p.197-203, 2003.
- PFANDER, H. Carotenoids: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 3-13, 1992.
- PINTO, M. R. M. R. et al. Encapsulation of carotenoid extracts from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) by emulsification (O/W) and foam-mat drying. **Powder Technology**, v. 339, p. 939–946, 2018.
- POLYAKOV, N. Carotenoids as antioxidants: spin trapping EPR and optical study. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n.1, p. 43–52, 2001.
- PREMI, M.; SHARMA, H. K. Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of *spray dried* drumstick (*Moringa oleifera*) oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, Part 1, p. 1232-1240, 2017.
- RAMAKRISHNAN, Y. et al. Effect of wall materials on the *spray drying* efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in *tamarillo* juice microencapsulation. **Powder Technology**, v. 328, p. 406–414, 2018.
- RAMEL, F. et al. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. **Plant Physiology**, v.158, n. 3, p. 1267-1278, 2012.
- RAMALHO, A. **Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: vitamina A**, 4a. ed. São Paulo: ILSI Brasil-International Life Science Institute do Brasil, 2010.
- RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76-83, 2016.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

- REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by *spray* and *freeze drying*: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food Chemistry**, v. 254, p. 281-291 Jul. 2018.
- RIBEIRO, A. M. et al. Microencapsulation of Vitamin A by *spray-drying*, using binary and ternary blends of gum arabic, starch and maltodextrina. **Food Hydrocolloids**, v.108, 2020a.
- RIBEIRO, D. et al. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 681–699, 2018.
- RIBEIRO, M. L. F. F et al. Effects of maltodextrin content in double-layer emulsion for production and storage of *spray-dried* carotenoid-rich microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 208-221, 2020b.
- RIBEIRO, J. S.; VELOSO, C. M. Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 112, 2021.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 1999. Disponível em: <<http://beauty-review.nl/wp-content/uploads/2014/11/A-guide-to-carotenoid-analysis-in-foods.pdf>>. Acesso em 18 aabr. 2020.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avanços na pesquisa de carotenóides em alimentos: contribuições de um laboratório brasileiro. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 129-138, 2004.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B; KIMURA, M. Harvest plus handbook for carotenoid analysis. Washington, DC e Cali: International Food Policy Research Institute e International Center for Tropical Agriculture, 2004.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 100 p. 2008.
- ROOS, Y. H. Glass transition temperature and its relevance in food processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 469–496, 2010.
- ROSTAMABADI, H.; FALSAFI, S. R.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of carotenoids within lipid-based nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, v. 298, p. 38-67, 2019.
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical ABTS+**. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 127, 2007.
- SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Métodos de extração de carotenoides: uma revisão de desenvolvimentos recentes. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90–103, 2018.
- SAMPAIO, J. P. **Sporidiobolus Nyland (1949)**. In: The Yeasts (Fifth Edition), Chapter 130, Elsevier, p. 1549-1561, 2011.
- SANTANA, A. A. et al. Microencapsulação da polpa de pequi por atomização: uso de amidos modificados como agente encapsulante. **Engenharia Agrícola**. Jaboticabal, v. 34, n. 5, p. 980-991, out. 2014.
- SANTIVARANGKNA, C., KULOZIK, U., & FOERST, P. Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 302–315, 2007.
- SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Carotenoid Pigments Encapsulation: Fundamentals, Techniques and Recent Trends. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 42-50, 2010.
- SIEMS, W. et al.  $\beta$ -carotene breakdown products may impair mitochondrial functions - potential side effects of high-dose  $\beta$ -carotene supplementation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 16, p. 385-397, 2005.

- SILVA, G. J. F. et al. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.
- SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 2004.
- SILVA, V. M.; VIEIRA, G.S.; HUBINGER, M.D. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by *spray drying*. **Food Research International**, v. 61, p. 132–143, 2014.
- SHAMAEI, S. et al. Microencapsulation of walnut oil by spray drying: Effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 39, p. 101-112, 2017.
- SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of *spray drying*: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 49–67, 2017.
- STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1740**, v. 2, p. 101-107, 2005.
- SHRISTI, R. et al. Bacteria as an alternative biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges, **Journal of Functional Foods**, v. 67, 2020.
- STORZ, E.; STEFFENS, K. Feasibility study for determination of the dextrose equivalent (DE) of starch hydrolysis products with near-infrared spectroscopy (NIRS). **Starch/Starke**. v. 56, p. 58-62, 2004.
- SUBAGIO, A.; MORITA, N. Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. **Food Research International**, n. 34, p. 183–188, 2001.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica – Ciências biológicas e da saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.
- SUTTER S. C; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E.  $\beta$ -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. **International Journal of Pharmaceutics**, v.332, n. 1-2, p. 45–54, 2007.
- TAO T. et al. Influence of polysaccharide as co-encapsulant on powder characteristics, survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 by *spray drying*. **Journal of Food Engineering**, v. 252, p. 10-17, 2019.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 2, p. 100-110, 2004.
- TATSCH, P.T. **Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim), Erechim, RS, 2008.
- TROYA, D.; TUPUNA-YEROVI, D. S.; RUALES, J. Effects of Wall Materials and Operating Parameters on Physicochemical Properties, Process Efficiency, and Total Carotenid Content of Microencapsulated Banana Passionfruit Pulp (*Passiflora tripartita* var. *Mollissima*) por *spray-drying*. **Food Bioprocess Technology**, v. 11, p. 1828–1839, 2018.

- TUPUNA, D. S. et al. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by *spray-drying* using different combinations of wall materials. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 846–855, 2018.
- VALDUGA, E. et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 207-213, 2014.
- VALDUGA, E. et al. Pré-tratamento de melão de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova**, v. 30, p. 1860-1866, 2007.
- VALDUGA, E. et al. Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n 9, p. 1267–1274, 2008.
- VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429–2436, 2009a.
- VALDUGA, E. et al. Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 89, v. 6, p. 1060–1065, 2009b.
- VALDUGA, E. et al. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Food Bioprocess Technology**, v. 2, p. 234-238, 2009c.
- VANISKI, R.; CORTI, D.; DRUNKLER, D. A. Técnicas e Materiais Empregados na Microencapsulação de Probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 8, n.1, p. 156-184, 2017.
- VIEIRA, M. V. **Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo carotenoides de *Haematococcus pluvialis* para aplicação tópica cutânea visando atividade quimiopreventiva e fotoprotetora**. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- WAGNER, L. A.; WARTHESEN, J. J. Stability of *spraydried* encapsulated carrot carotenes. **Journal of Food Science**, v.60, n.5, p.1048-1053, 1995.
- WATKINS, J. L.; POGSON, B. J. Prospects for Carotenoid Biofortification Targeting Retention and Catabolism. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 20, 2020.
- WEN, P. et al. Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, p. 56–68, 2017.
- WESTPHAL, A. VOLKER BÖHM, J. Carotenoids Properties, distribution, bioavailability, metabolism and health effects. **Ernahrungs Umschau**, v. 62, n. 11, p. 196–207, 2015.
- WOO, M. W.; BHANDARI, B. *Spray drying* for food powder production. In: BHANDARI, B. et al. (Org.). **Handbook of Food Powders**, p. 29–56, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. 2nd ed. Geneva: WHO/FAO; 2004.
- YABUZAKI, J. Carotenoids Database: estruturas, impressões digitais químicas e distribuição entre os organismos. **Database (Oxford)**, v. 1, 1 Jan. 2017.
- YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20–27, 2001.
- ZAGHDOUDI, K. et. al. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki L.*), peach (*Prunus persica L.*) and apricot (*Prunus armeniaca L.*). **Food Chemistry**, v. 184, p. 131-139, 2015.

## 8 APÊNDICES

### Apêndice A

**Tabela 9** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo  $2^3$  em relação a eficiência de encapsulamento.

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(4)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	60,032	0,614	97,648	0,000000
(1) Temperatura (°C) (L)*	-2,422	0,372	-6,499	0,002891
Temperatura (°C) (Q)*	-10,917	0,373	-29,258	0,000008
(2) Goma arábica (g/L) (L)*	3,747	0,372	10,056	0,000550
Goma arábica (g/L) (Q)*	-8,871	0,373	-23,774	0,000019
(3) Maltodextrina (g/L) (L)	-0,054	0,372	-0,146	0,890332
Maltodextrina (g/L) (Q)*	-8,373	0,373	-22,440	0,000023
1Lx2L*	1,833	0,486	3,768	0,019636
1Lx3L	-0,523	0,486	-1,076	0,342399
2Lx3L*	-4,873	0,486	-10,015	0,000559

\* Fatores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 10** - Análise de variância para a eficiência de encapsulamento do planejamento fatorial completo  $2^3$ .

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados (SQ)</b>	<b>Graus de liberdade (GL)</b>	<b>Quadrados médios (QM)</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	3331	7	475,9147	14,17
Resíduo	369	11	33,576	
Falta de ajuste	361,766	7		
Erro puro	7,578	4		
Total	3700,747	18		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro;  $F_{tab} = 3,01$ .

## Apêndice B

**Tabela 11** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para o índice L\*.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(4)	p
<b>Média</b>	70,765	0,582	121,578	0,000000
(1) Temperatura (°C) (L)*	-1,661	0,352	-4,709	0,009245
Temperatura (°C) (Q)	-0,963	0,353	-2,727	0,052598
(2) Goma arábica (g/L) (L)	-0,290	0,352	-0,822	0,456854
Goma arábica (g/L) (Q)	-0,344	0,353	-0,975	0,384389
(3) Maltodextrina (g/L) (L)*	2,654	0,352	7,524	0,001670
Maltodextrina (g/L) (Q)	0,108	0,353	0,306	0,774697
1Lx2L	0,403	0,460	0,875	0,430773
1Lx3L	-0,536	0,460	-1,164	0,308996
2Lx3L	-0,899	0,460	-1,951	0,122736

\* Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 12** – Análise de variância para o parâmetro de cor L\* do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>.

Fontes de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Quadrados médios (QM)	F calculado
Regressão	133,817	3	66,908	8,103
Resíduo	132,108	16	8,256	
Falta de ajuste	125,315	12		
Erro puro	6,793	4		
Total	265,925	18		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Ftab= 3,63.

### Apêndice C

**Tabela 13** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para a variável b\*.

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(4)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	22,554	0,923	24,429	0,000017
(1) Temperatura (°C) (L)	-0,846	0,559	-1,512	0,205040
Temperatura (°C) (Q)	-1,186	0,560	-2,117	0,101668
(2) Goma arábica (g/L) (L)	-1,537	0,559	-2,747	0,051518
Goma arábica (g/L) (Q)*	-2,106	0,560	-3,759	0,019791
(3) Maltodextrina (g/L) (L)*	-1,628	0,559	-2,910	0,043635
Maltodextrina (g/L) (Q)	-1,045	0,560	-1,866	0,135405
1Lx2L	-0,238	0,730	-0,326	0,760683
1Lx3L	0,261	0,730	0,357	0,738601
2Lx3L	0,332	0,730	0,454	0,672918

\* Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 14** - Análise de variância para o parâmetro de cor b\* do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>.

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados (SQ)</b>	<b>Graus de liberdade (GL)</b>	<b>Quadrados médios (QM)</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	83,135	2	41,567	4,899
Resíduo	135,732	16	8,483	
Falta de ajuste	118,641	12		
Erro puro	17,091	4		
Total	218,867	18		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Ftab= 3,63.



### Apêndice D

**Tabela 15** - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para o índice C\*.

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(4)</b>	<b>p</b>
<b>Média</b>	22,557	0,922	24,460	0,000017
(1) Temperatura (°C) (L)	-0,844	0,558	-1,510	0,205462
Temperatura (°C) (Q)	-1,185	0,559	-2,118	0,101552
(2) Goma arábica (g/L) (L)	-1,536	0,558	-2,749	0,051393
Goma arábica (g/L) (Q)*	-2,105	0,559	-3,762	0,019731
(3) Maltodextrina (g/L) (L)*	-1,628	0,558	-2,914	0,043490
Maltodextrina (g/L) (Q)	-1,045	0,559	-1,867	0,135288
1Lx2L	-0,234	0,729	-0,321	0,763708
1Lx3L	0,264	0,729	0,362	0,735459
2Lx3L	0,336	0,729	0,461	0,668597

\* Fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

**Tabela 16** - Análise de variância para o parâmetro de cor C\* do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>.

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados (SQ)</b>	<b>Graus de liberdade (GL)</b>	<b>Quadrados médios (QM)</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	83,121	2	41,560	4,906
Resíduo	135,530	16	8,470	
Falta de ajuste	118,479	12		
Erro puro	17,059	4		
Total	218,652	18		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Ftab= 3,63.

## Apêndice E

**Tabela 17** – Estabilidade dos carotenoides armazenados em vidro âmbar.

<b>Dia</b>	<b>CCR (%)</b>	<b>L* (%)</b>	<b>C* (%)</b>
0	100	100,00	100
7	78,53	96,15	90,45
14	77,87	84,10	84,81
21	77,01	84,10	80,14
28	65,52	83,76	76,84
40	63,50	83,76	73,39

Legenda: CCR = concentração de carotenoides relativa (%); L\* = luminosidade relativa; C\* = chroma relativa.

**Tabela 18** - Estabilidade dos carotenoides armazenados em vidro transparente.

<b>Dia</b>	<b>CCR (%)</b>	<b>L* (%)</b>	<b>C* (%)</b>
0	100,00	100	100
7	74,14	96,59	80,09
14	59,48	82,22	67,65
21	59,20	79,64	65,92
28	50,86	76,56	57,54
40	50,57	76,56	47,94

Legenda: CCR = concentração de carotenoides relativa (%); L\* = luminosidade relativa; C\* = chroma relativa.