



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS  
Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**PRODUÇÃO DE CORANTE NATURAL AZUL DE JENIPAPO ENCAPSULADO COM  
AMIDO DE ARARUTA E MALTODEXTRINA DE MANDIOCA**

ITAPETINGA  
BAHIA - BRASIL  
ABRIL 2021

JÉSSICA SOUZA RIBEIRO

**PRODUÇÃO DE CORANTE NATURAL AZUL DE JENIPAPO ENCAPSULADO COM  
AMIDO DE ARARUTA E MALTODEXTRINA DE MANDIOCA**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dsc. Cristiane Martins Veloso

**Co-orientadores:** Prof.<sup>a</sup> Dsc. Márcia Elena Zanuto

Prof. Dsc. Leandro Soares Santos

Prof.<sup>a</sup> Dsc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA  
BAHIA - BRASIL  
ABRIL 2021

634.7  
R369p

Ribeiro, Jéssica Souza.

Produção de corante natural azul de jenipapo encapsulado com amido de araruta e maltodextrina de mandioca. / Jéssica Souza Ribeiro. – Itapetinga-BA: UESB, 2021.

158f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Cristiane Martins Veloso e coorientação da Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Márcia Elena Zanuto, Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos e Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo.

1. Corantes naturais - Alimentos. 2. Aditivos alimentares naturais. 3. Genipocianina - Encapsulação. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Veloso, Cristiane Martins. III. Zanuto, Márcia Elena. IV. Santos, Leandro Soares. V. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. VI. Título.

**CDD(21): 634.7**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5<sup>a</sup> Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Corante natural azul
2. *Spray drying*
3. Araruta - Amido



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB  
Recredenciada pelo Decreto Estadual  
Nº 16.825, de 04.07.2016



UESB



Governo do  
Estado da Bahia

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** PRODUÇÃO DE CORANTE NATURAL AZUL DE JENIPAPO ENCAPSULADO COM AMIDO DE ARARUTA E MALTODEXTRINA DE MANDIOCA.

**Autor (a):** JÉSSICA SOUZA RIBEIRO

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso

**Coorientador (a):** Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Elena Zanuto

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTORA EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cassiara Camelo Eloi de Souza  
Membro Externo - UFBA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo  
UESB

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel  
Membro Externo - UFLA

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende  
Membro Externo - UFLA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso  
Orientadora - UESB  
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 28 de abril de 2021.

*Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;  
Glória, pois, a Ele eternamente. Amém.  
Romanos 11:36*

*A Deus,  
À minha mãe (in memoriam),  
À minha família,  
Ao meu esposo, João Augusto,  
Ao meu bebê Noah, que está a caminho,  
Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, fonte de toda a sabedoria, por me sustentar e capacitar nessa caminhada acadêmica.*

*À minha mãe, Maria de Lurdes (in memoriam), por sempre me incentivar a ler e a estudar, e que sempre se empenhou ao máximo nessa missão de oferecer aos filhos as oportunidades que ela mesma não teve.*

*À minha família, em especial ao meu pai Wilson, aos meus irmãos Aliny e Israel, à minha tia Maria e à minha prima Tânia, por todo apoio que me foi dado nesses longos anos de estudos. Vocês são essenciais em minha vida e compartilham essa vitória comigo!*

*Ao meu esposo e companheiro, João Augusto, pela ajuda, incentivo e paciência, mesmo nos momentos de maior tensão e sensibilidade. Você é um presente de Deus!*

*À Larissa Kauly, minha grande amiga, que me acompanha há tantos anos em diversos projetos, desde a graduação, e que permaneceu junto a mim até agora no final do Doutorado, me apoiando nesse momento tão especial de gestação. Deus te recompense infinitamente!*

*À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso, pela sua valiosa contribuição em minha formação acadêmica e por me conceder a oportunidade de ampliar meus horizontes, me possibilitando vivenciar experiências riquíssimas nessa construção do conhecimento.*

*Aos professores, Dr. Leandro Soares Santos, Dr.<sup>a</sup> Márcia Elena Zanuto, Dr.<sup>a</sup> Cassiara Camelo Eloi de Souza, Dr. Jaime Vilela de Resende e Dr. Diego Alvarenga Botrel, que tanto contribuíram para a realização desse trabalho, com sua disponibilidade em viabilizar as condições necessárias para a sua realização e por compartilharem conhecimentos tão valiosos.*

*Aos colegas da pós-graduação, em especial a Eduardo Viana, a Josane Cardim e a Mateus Flores, e a Matheus Ferreira, por todo apoio durante a realização das análises necessárias à construção desse estudo. Deus os abençoe!*

*Aos membros da banca examinadora, por aceitarem fazer parte da avaliação deste trabalho e pelas valiosas contribuições oferecidas.*

*À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e aos meus colegas, por possibilitarem e a realização e conclusão desse Doutorado, sempre solícitos em viabilizarem as condições necessárias para isso.*

*Ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (IMS/UFBA) e ao Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (DCA/UFLA), pela disponibilização de sua infraestrutura.*

*À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela oportunidade de poder cursar o Mestrado e o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, usufruindo de toda a sua estrutura física e funcional.*

*A todos que contribuíram para a minha formação doutoral e conclusão dessa Tese.*

*Meus sinceros agradecimentos!*



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>I. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introdução .....	1
1.2 Revisão de Literatura .....	2
1.2.1. Materiais vegetais utilizados .....	2
1.2.1.1. Araruta .....	2
1.2.1.2. Jenipapo .....	3
1.2.2. Corantes Naturais .....	5
1.2.2.1. Genipocianina G1 .....	7
1.2.3. Encapsulação .....	9
1.2.3.1. Spray Drying .....	10
1.2.3.2. Emulsificação e Produção de Lipossomas.....	12
1.2.3.3. Liofilização .....	17
1.2.3.4. Materiais de Parede e Carreadores .....	19
Amido.....	19
Maltodextrina .....	20
1.2.4. Caracterização das Micropartículas .....	21
1.2.4.1. Reologia.....	21
1.2.4.2. Rendimento do Processo .....	24
1.2.4.3. Eficiência de Encapsulação e Retenção de Corante .....	24
1.2.4.4. Atividade de Água, Densidade e Solubilidade .....	25
1.2.4.5. Cor Instrumental .....	27

1.2.4.6.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	28
1.2.4.7.	Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 30	
1.2.5.	Planejamento e Análise Estatística.....	30
1.2.5.1.	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	30
1.3	Referências.....	32
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
2.1	Objetivo Geral.....	44
2.2	Objetivos Específicos .....	44
<b>III.</b>	<b>CAPÍTULO I – Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: a review.....</b>	<b>45</b>
<b>Abstract</b>	<b>.....</b>	<b>46</b>
3.1	Introduction.....	47
3.2	Natural food colorings .....	48
3.2.1.	Anthocyanins.....	48
3.2.2.	Betalains .....	49
3.2.3.	Carotenoids.....	50
3.2.4.	Genipocyanin .....	52
3.2.5.	Phycocyanin .....	53
3.2.6.	Chlorophylls.....	54
3.3	Microencapsulation techniques.....	55
3.4	Wall materials .....	59
3.4.1.	Starch and derivatives .....	59
3.4.2.	Gums and mucilages .....	61
3.4.3.	Fibers.....	62
3.4.4.	Proteins.....	63
3.4.5.	Lipids.....	63

3.5	Microencapsulation of natural dyes .....	64
3.6	Final considerations and future perspectives .....	80
3.7	Funding .....	81
3.8	References.....	81
<b>IV. CAPÍTULO II – Arrowroot starch and cassava maltodextrin as encapsulating agents of the natural blue dye Genipocyanin G1.....</b>		<b>93</b>
<b>Abstract .....</b>		<b>94</b>
4.1	Introduction.....	94
4.2	Materials and methods .....	96
4.2.1.	Materials.....	96
4.2.2.	Obtaining the dye .....	97
4.2.3.	Encapsulation of the natural blue dye Genipocyanin G1 .....	97
4.2.4.	Apparent viscosity of the encapsulating solutions containing the dye.....	98
4.2.5.	Encapsulation efficiency and dye retention .....	99
4.2.6.	Water activity, yield, apparent density, and solubility of the microparticles.....	100
4.2.7.	Instrumental color of the encapsulated dyes .....	100
4.2.8.	Morphology of the microparticles by Scanning Electron Microscopy (SEM) ....	101
4.2.9.	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) .....	101
4.2.10.	Statistical analysis .....	101
4.3	Results and Discussion .....	101
4.4	Conclusion .....	111
4.5	Acknowledgments .....	112
4.6	References.....	112
<b>V. CAPÍTULO III – Encapsulação de corante azul de genipocianina G1 em lipossomas estabilizados com amido de araruta e maltodextrina .....</b>		<b>117</b>
<b>Resumo .....</b>		<b>118</b>
5.1	Introdução .....	118
5.2	Materiais e métodos .....	120

5.2.1.	Materiais.....	120
5.2.2.	Obtenção do corante.....	120
5.2.3.	Encapsulação do corante azul de genipocianina G1 .....	121
5.2.4.	Análise da morfologia por microscopia óptica .....	122
5.2.5.	Eficiência da encapsulação.....	122
5.2.6.	Rendimento, densidade, atividade de água e solubilidade das microcápsulas.....	123
5.2.7.	Variação da cor instrumental dos corantes encapsulados .....	123
5.2.8.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	124
5.2.9.	Análise estatística.....	124
5.3	Resultados e discussão.....	124
5.4	Conclusão.....	135
5.5	Agradecimentos .....	135
5.6	Referências.....	135
<b>VI.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>139</b>
<b>VII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>139</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>I. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
Figura 1. Raiz de araruta ( <i>Maranta arundinacea</i> L.).....	2
Figura 2. Fruto maduro de jenipapo ( <i>Genipa americana</i> L.).....	4
Figura 4. Estrutura química da genipina e do geniposídeo.....	7
Figura 5. Reação de formação do corante azul de jenipapo. ....	8
Figura 6. Corante azul de jenipapo (genipocianina G1) em diferentes concentrações.....	9
Figura 7. Equipamento para secagem por atomização ( <i>spray drying</i> ).....	11
Figura 8. Deposição do emulsificante na interface das gotículas em emulsão.....	13
Figura 9. Exemplos de emulsões. ....	14
Figura 10. Estrutura de emulsões múltiplas A/O/A.....	14
Figura 12. Distribuição dos compostos de interesse nos lipossomas, de acordo com sua polaridade.....	15
Figura 13. Estrutura das vesículas de acordo com suas características (as linhas são bicamadas fosfolipídicas).....	16
Figura 14. Diagrama de fases da água. ....	18
Figura 15. Estrutura de um liofilizador.....	18
Figura 16. Estrutura química do amido (amilose e amilopectina).....	20
Figura 17. Diagrama de cisalhamento (curvas de escoamento) e classificações de acordo com o comportamento dos fluidos.....	22
Figura 18. Efeito da atividade de água nas alterações microbianas, enzimáticas e químicas nos alimentos. ....	26
Figura 19. Diagrama de cálculo de $\Delta E^*$ no diagrama CIELAB.....	28
Figura 20. Possibilidades de condução de experimentos com 3 variáveis: (a) Análise Univariada; (b) Matriz combinando todos os fatores; e (c) Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	31
<b>III. CAPÍTULO I – Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: a review.....</b>	<b>45</b>

Graphical abstract. Factors that promote discoloration or color change of natural dyes and color preservation through encapsulation with biopolymers. ....	46
Figure 1. Basic structure of an anthocyanidin, the chromophore constituent of anthocyanins (the R radicals are usually replaced by OH, H, OCH <sub>3</sub> groups, giving rise to several anthocinidins).....	49
Figure 2. Structure of betanine, the main betalain found in red beet ( <i>Beta vulgaris</i> L.). ....	50
Figure 3. Structures of the main carotenoids used as food dyes.....	51
Figure 4. Structure of genipocyanin G1 (dimer).....	53
Figure 5. Structure of phycocyanobilin. ....	53
Figure 6. Structures of chlorophylls a and b. ....	54
Figure 7. Basic shapes of microcapsules, microspheres and microparticles. ....	56
<b>IV. CAPÍTULO II – Arrowroot starch and cassava maltodextrin as encapsulating agents of the natural blue dye Genipocyanin G1.....</b>	<b>93</b>
Graphical abstract. Obtaining of blue genipap dye (genipocyanin G1) encapsulated with arrowroot starch and cassava maltodextrin.....	94
Figure 1. Contour graph and Pareto diagram for the apparent viscosity parameter. ....	105
Figure 2. Contour graph and Pareto diagram for the yield parameter. ....	105
Figure 3. Contour graph and Pareto diagram for the solubility parameter. ....	107
Figure 4. Contour graph and Pareto diagram for the blue color variation parameter ( $\Delta b^*$ ). .....	107
Figure 5. Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs of arrowroot starch (A), cassava maltodextrin (B) and genipocyanin G1 blue dye microcapsules - Treatment 9 (C). .....	109
Figure 6. FTIR spectra of carbohydrates used as wall material and of selected microcapsules of genipocyanin G1 blue dye - Treatment 9. ....	110
<b>V. CAPÍTULO III – Encapsulação de corante azul de genipocianina G1 em lipossomas estabilizados com amido de araruta e maltodextrina .....</b>	<b>117</b>
Figura 1. Estruturas da Emulsão 1 e dos lipossomas observadas nas suspensões utilizadas na encapsulação. ....	125
Figura 2. Gráfico de contorno e diagrama de Pareto para o parâmetro rendimento.....	127
Figura 3. Gráfico de contorno e diagrama de Pareto para o parâmetro densidade.....	127

Figura 4. Gráfico de contorno e diagrama de Pareto para o parâmetro solubilidade.....	128
Figura 5. Fotografia dos diferentes tratamentos de lipossomas liofilizados de genipocianina G1 estabilizado com amido de araruta e maltodextrina de mandioca. ....	130
Figura 6. Espectros de FTIR dos materiais de parede e estabilizantes (A) e dos diferentes tratamentos do corante azul de genipocianina G1 encapsulado em lipossomas (B).....	132

## LISTA DE TABELAS

<b>I. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
Tabela 1. Principais modelos reológicos ajustados (STEFFE et al., 1996.).....	23
<b>III. CAPÍTULO I – Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: a review.....</b>	<b>45</b>
Table 1. Main microencapsulation techniques applied to food products. ....	57
Table 2. Encapsulation conditions and characteristics of the different microparticles containing natural dyes. ....	65
<b>IV. CAPÍTULO II – Arrowroot starch and cassava maltodextrin as encapsulating agents of the natural blue dye Genipocyanin G1.....</b>	<b>93</b>
Table 1. Experimental design (CCRD) to optimize the production of microencapsulated blue natural dye.....	98
Table 2. Rheological parameters of the solutions used for microencapsulation obtained by adjusting the Power Law model.....	102
Table 3. Result of the characterization of microencapsulated blue dye solutions and powders.....	104
Table 4. Instrumental color and variation of the color of the blue dye.....	108
<b>V. CAPÍTULO III – Encapsulação de corante azul de genipocianina G1 em lipossomas estabilizados com amido de araruta e maltodextrina .....</b>	<b>117</b>
Tabela 1. Desenho experimental (DCCR) para otimização da produção de corante natural azul microencapsulado.....	122
Tabela 2. Resultado da caracterização das suspensões e do corante azul de genipocianina G1 encapsulado e liofilizado.....	126
Tabela 3. Cor instrumental e variação da cor do corante azul. ....	129



## RESUMO

É crescente a procura por aditivos naturais pela indústria de alimentos, como resposta a um mercado cada vez mais exigente quanto ao apelo do que remete ao natural e a uma maior cobrança da sociedade, que se preocupa cada vez mais com os riscos à saúde relacionados ao consumo de alguns aditivos artificiais e com as questões ambientais que envolvem a produção de insumos para a indústria alimentícia. Um grupo de compostos que pode ser utilizado pela indústria são os corantes, que visam conferir ou realçar a cor dos produtos alimentícios, tornando-os mais atrativos ao consumidor e preservando suas características visuais durante o processamento e armazenamento. Com a finalidade de aumentar a disponibilidade e estabilidade desses aditivos, neste estudo foi realizada a encapsulação de genipocianina G1, um corante natural azul obtido de frutos verdes de jenipapo (*Genipa americana* L.), utilizando amido de araruta (*Maranta arundinacea* L.) e maltodextrina de mandioca (*Manihot esculenta*) como materiais de parede ou estabilizantes, empregando as técnicas de *spray drying* e produção de lipossomas liofilizados. Pela técnica do *spray drying*, foram obtidas microcápsulas com elevada eficiência de encapsulação (maior que 95%), baixa atividade de água (menor que 0,51) e alta solubilidade (superior a 72%), características desejáveis para corantes naturais encapsulados, e os resultados indicam que a formulação ótima para a sua produção equivale a concentrações inferiores a 3,0% (m/v) de amido e a 3,5% (v/v) de genipocianina G1. Já para a técnica de produção de lipossomas, os resultados demonstram que a encapsulação de corante azul de genipocianina G1 é uma técnica viável e simples, e quantidades entre 15 e 20 mL de Emulsão 1 (46,3% de óleo de coco extra virgem, 0,01 % de genipocianina G1, 6,9% de maltodextrina de mandioca e 0,5% de lecitina de soja em pó) e entre 8 e 9 g de sólidos estabilizantes produzem melhores formulações, por gerarem rendimentos próximos a 100% e maiores solubilidades em água, além de eficiência de encapsulação maior que 97%.

**Palavras-chave:** genipocianina G1; microencapsulação; *spray drying*; lipossomas; liofilização.

## ABSTRACT

There is a growing demand for natural additives by the food industry, in response to an increasingly demanding market as to the appeal of what refers to the natural and to a greater demand from society, which is increasingly concerned with health risks related to food. consumption of some artificial additives and environmental issues involving the production of inputs for the food industry. A group of compounds that can be used by the industry are dyes, which aim to confer or enhance the color of food products, making them more attractive to the consumer and preserving their visual characteristics during processing and storage. In order to increase the availability and stability of these additives, in this study the encapsulation of genipocyanin G1, a natural blue dye obtained from green fruits of genipap (*Genipa americana* L.), was carried out, using arrowroot starch (*Maranta arundinacea* L.) and maltodextrin from cassava (*Manihot esculenta*) as wall materials or stabilizers, using spray drying techniques and the production of lyophilized liposomes. By spray drying technique, microcapsules were obtained with high encapsulation efficiency (greater than 95%), low water activity (less than 0.51) and high solubility (greater than 72%), desirable characteristics for encapsulated natural dyes, and the results indicate that the optimum formulation for its production is equivalent to concentrations below 3.0% (w/v) of starch and 3.5% (v/v) of genipocyanin G1. As for the liposome production technique, the results demonstrate that encapsulation of genipocyanin G1 blue dye is a viable and simple technique, and amounts between 15 and 20 mL of Emulsion 1 (46.3% extra virgin coconut oil, 0.01% of genipocyanin G1, 6.9% of cassava maltodextrin and 0.5% of soy powder lecithin) and between 8 and 9 g of stabilizing solids produce better formulations, as they generate yields close to 100% and greater solubilities in water, in addition to encapsulation efficiency greater than 97%.

**Keywords:** genipocyanin G1; microencapsulation; spray drying; liposomes; lyophilization.

## I. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Introdução

A utilização de corantes pela indústria de alimentos é uma prática comum que, tem por finalidade conferir ou realçar a cor dos produtos alimentícios, tornando-os mais atrativos ao consumidor e preservando suas características visuais durante o processamento e armazenamento. De maneira geral, os corantes artificiais apresentam uma maior estabilidade e são mais baratos que os corantes naturais, mas também apresentam desvantagens, podendo-se destacar as evidências de riscos à saúde. Além disso, é crescente o apelo ao consumo do que é mais natural e saudável, o que gera uma demanda à indústria de alimentos, que precisa se adequar a este mercado e procurar alternativas naturais para esses corantes e para outros aditivos alimentares (PRADO; GODOY, 2003; POLÔNIO; PERES, 2009; FREITAS, 2012; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016).

Nesse contexto, os aditivos alimentares naturais surgem como alternativa aos artificiais, pois representam baixo risco à saúde e possuem, por vezes, diversas funcionalidades biológicas. Dentre esses compostos naturais, encontra-se a genipocianina G1, que pode ser utilizada como substituta dos corantes artificiais azuis e é obtida a partir do jenipapo (*Genipa americana* L.), um fruto comumente consumido pela população. Além disso, diversos estudos apontam para potenciais benefícios à saúde relacionados ao seu consumo, devido ao fato de os corantes azuis de jenipapo possuírem em sua composição constituintes bioativos com capacidade de inibir a expressão gênica e a cascata de sinalização de diversas citocinas envolvidas com respostas inflamatórias e autoimunes, indicando seu potencial na utilização na prevenção e tratamento de doenças crônicas (RENHE et al., 2009; WANG et al., 2012; NERI-NUMA et al., 2017).

Entretanto, os corantes naturais geralmente são compostos sensíveis à oxidação, de modo que a sua descoloração ou alterações na sua cor durante o processamento e armazenamento são acentuadas, reduzindo a qualidade sensorial dos produtos onde estão naturalmente presentes ou são adicionados (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPES, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Essa problemática justifica o desenvolvimento de técnicas limpas e seguras de produção de corantes naturais, que os tornem mais estáveis, para atender a uma demanda de mercado real e crescente. Dentre elas, destaca-se a encapsulação, que tem sido

largamente estudada na Ciência de Alimentos para a preservação de compostos sensíveis (JAFARI, 2017). Devido à sua capacidade de formação de um filme contínuo e por produzir pastas translúcidas, o amido de araruta e a maltodextrina de mandioca são biopolímeros que podem ser utilizados como materiais de parede para a encapsulação de corantes naturais (FERRARI; LEONEL; SARMENTO, 2005; GRANADOS, et al., 2014; NOGUEIRA; FAKHOURI; OLIVEIRA, 2018). Além disso, tratam-se de dois carboidratos provenientes de fontes tradicionais, não transgênicas, gerando menores impactos ambientais, atendendo a consumidores mais exigentes e podendo contribuir para o desenvolvimento regional.

Diante disso, neste estudo é sugerida a microencapsulação como forma de aumentar a estabilidade do corante azul de genipocianina G1, obtido a partir do jenipapo, utilizando o amido de araruta (*Maranta arundinacea*) e a maltodextrina como materiais de parede, empregando as técnicas de spray drying e produção de lipossomas liofilizados.

## 1.2 Revisão de Literatura

### 1.1.1. Materiais vegetais utilizados

#### 1.1.1.1. Araruta

As fontes de amido mais exploradas comercialmente são o milho, o trigo, a batata e a mandioca, mas outras fontes de amido não-convencionais também são produzidas para fins comerciais (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2015; RODRIGUES et al., 2020). A araruta (Figura 1) explorada industrialmente (*Maranta arundinacea* L.) é uma planta herbácea, com caule articulado de 1,20 m de altura, rizoma fuziforme, casca brilhante, escamoso e produzido em tufos aderentes aos rizomas (MONTEIRO; PERESSIN, 2002).

**Figura 1.** Raiz de araruta (*Maranta arundinacea* L.).



Fonte: Internet (imagem original: Bùi Thụy Đào Nguyễn - [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:C%E1%BB%A7\\_dong.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:C%E1%BB%A7_dong.jpg)).

A araruta apresenta 15,24% de umidade, 0,33% de cinzas, 0,40% de proteínas, 0,12% de lipídios e 83,91% de carboidratos, com um teor de amido em torno de 16,00% a 18,00% em base seca, com 25,10% de amilose aparente (FERRARI; LEONEL; SARMENTO, 2005; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016; NOGUEIRA; FAKHOURI; OLIVEIRA, 2018). Em estudo realizado por Leonel e Cereda (2002), observou-se que a araruta possui em sua composição 1,08% de açúcares solúveis totais, 0,85% de açúcares redutores, 1,44% de fibras, apresentando, ainda, acidez titulável de 9,19% e pH igual a 6,67.

Os grânulos do amido de araruta apresentam tamanho heterogêneo e formato circular, variando entre elipsóide e oval, com superfície lisa, sem evidência de fissuras. Os grânulos incham rapidamente quando hidratados e submetidos a temperaturas superiores a 60°C. Independentemente da idade da planta, o amido de araruta produz pastas claras sob aquecimento, podendo ser usado em produtos que requeiram esta propriedade (GRANADOS, et al., 2014; NOGUEIRA; FAKHOURI; OLIVEIRA, 2018).

#### **1.1.1.2. Jenipapo**

O jenipapeiro é uma árvore frutífera, pertencente à família Rubiaceae, que habita todo o continente sul-americano, ocorrendo principalmente nas regiões de clima quente e úmido. No Brasil, sua distribuição ocorre nas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e no Nordeste, sendo comumente encontrado no Estado da Bahia (FAO, 1986; SANDRI, 1998). Conhecido como jenipapo na maior parte do território brasileiro, este recebe outras denominações como: jenipá ou jenipapinho no Pará, huito na fronteira entre Brasil e Peru, genipa na Guiana Francesa, guayatil no Panamá, nandipáguazú na Argentina e jagua em outros países de língua espanhola. Incluindo o gênero *Genipa*, são reconhecidas duas espécies: *Genipa americana* (planta jovem com folhas inteiras e corola hipocrateriforme) natural e cultivada em toda a América Central e América do Sul, e *Genipa infundibuliformis* (planta jovem com folhas lobadas e corola infundibuliforme), encontrada no Brasil centro-meridional (XAVIER e XAVIER, 1976; DELPRETE et al., 2005; PRADO NETO et al., 2007).

O florescimento das plantas entre outubro e dezembro, e a frutificação ocorre uma vez por ano, geralmente de novembro a março, com maturação do fruto entre maio e agosto, sendo o pico de maturação em junho. O fruto do jenipapeiro é uma baga,

subglobosa, medindo de 8 cm a 10 cm de comprimento e 6 cm a 7 cm de diâmetro, observando-se variações entre a cor parda ou pardacento-amarelada quando maduro, casca mole e solta ou firme e aderida à polpa, membranosa, fina e enrugada. A polpa apresenta coloração parda, é succulenta, adocicada e mole, contendo numerosas sementes alongadas ou arredondadas no centro. As sementes são fibrosas, albuminadas, castanho-escuras, comprimidas e achatadas, medindo de 6 mm a 12 mm de comprimento. Seu sabor é característico e pronunciado (FAO, 1986; SANDRI, 1998; SANTOS, 2001).

**Figura 2.** Fruto maduro de jenipapo (*Genipa americana* L.).

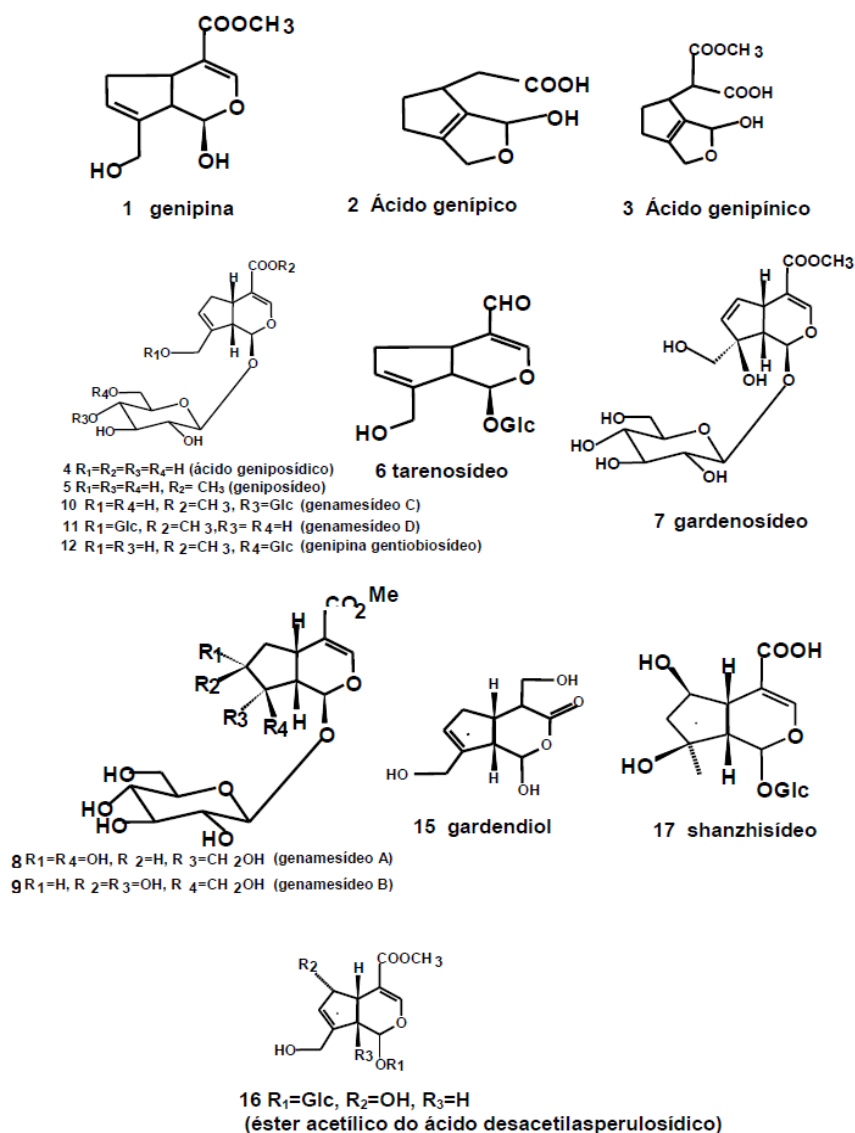


Fonte: Acervo pessoal.

O fruto de jenipapo (Figura 2) é fonte de proteínas, fibras e ferro, mostrando o potencial nutritivo deste fruto. Em sua composição, foram encontrados entre 1,55 e 5,20 g.100 g<sup>-1</sup> de proteínas, entre 0,30 e 1,78 g.100 g<sup>-1</sup> de lipídios, entre 14,05 e 25,70 g.100 g<sup>-1</sup> de carboidratos, entre 4,64 e 9,40 g.100 g<sup>-1</sup> de fibras, entre 3,60 e 15,94 mg.100 g<sup>-1</sup> de ferro, teor de umidade entre 67,60 e 77,72% e de cinzas entre 0,93 e 1,20% (IBGE, 1981; RIBEIRO et al., 2021). Os frutos apresentam pH entre 3,39 e 3,44, acidez titulável (AT) entre 1,40 e 1,42%, sólidos solúveis totais (SST) entre 16,80 e 17,18° Brix, teor de ácido ascórbico entre 2,65 e 2,76 mg.100g<sup>-1</sup>, açúcares totais entre 12,28 a 12,61%, açúcares redutores entre 8,95 e 9,26%, açúcares não redutores entre 3,31 e 3,39% e relação SST/AT entre 12,37 e 12,00 (HANSEN et al., 2008).

Os principais fitoquímicos presentes no jenipapeiro e encontrados em praticamente toda a planta (folhas, casca, frutos e raízes) são representados por iridoides, taninos, fitosteróis e tocoferóis. Na Figura 3 são apresentados os principais iridoides presentes no jenipapo (BARBOSA, 2008; DEMBITSKY et al., 2011; SOUZA; MENDONÇA; SILVA, 2013).

**Figura 3.** Iridoides presentes em jenipapo (*Genipa americana* L.).



Fonte: Barbosa, 2008.

### 1.1.2. Corantes Naturais

Os corantes são vastamente utilizados pela indústria alimentícia com o objetivo de conferir ou realçar a cor dos produtos, tornando-os mais atrativos ao consumidor. O uso desses aditivos pode ser justificado, ainda, para a correção ou compensação de alterações de cor que alguns alimentos sofrem durante o processamento e armazenamento (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2000; ESQUIAVEL, 2016).

Os corantes podem ser classificados, de acordo com sua origem, em naturais e artificiais. O Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961 (BRASIL, 1961) agrupa os

corantes alimentícios em: corantes naturais, caramelo e corantes artificiais. Já a Resolução - CNNPA nº 44, de 1977 (BRASIL, 1977) classifica os corantes como: corante orgânico natural, corante orgânico sintético (artificial e idêntico ao natural), corante inorgânico, caramelo e caramelo processo amônia.

Os corantes artificiais apresentam maior estabilidade e são mais baratos que os corantes naturais, sendo a sua utilização mais vantajosa do ponto de vista dos custos e da padronização do produto, mas apresentam diversas desvantagens, podendo-se destacar as evidências de riscos à saúde, como os indícios de potencial carcinogênico, sua relação com o desenvolvimento de problemas neurológicos e de alergias (PRADO; GODOY, 2003; FREITAS, 2012; MARTINS et al., 2016). Diante disso, e de uma maior preocupação do consumidor quanto aos aspectos ambientais, é crescente a procura por aditivos alimentícios naturais, cujo consumo está associado a menores riscos à saúde e que sejam sustentáveis (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016).

A utilização dos corantes naturais tem sido cada vez mais incentivada e utilizada como estratégia de marketing por conta de suas diversas funcionalidades biológicas, como as atividades antimicrobiana e antioxidante, pelos potenciais benefícios à saúde relacionados ao seu consumo, como a prevenção de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), e por serem encontrados em diversos alimentos comumente consumidos pela população, de modo que sua ingestão não é associada a riscos à saúde, de maneira geral (ESQUIAVEL, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016).

Os corantes naturais são compostos cromóforos produzidos por plantas, animais ou microrganismos. Tais substâncias têm características muito diversas, tanto no que se refere à sua estrutura quanto às suas demais características, como cor, estabilidade e solubilidade (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016; ARAÚJO, 2019). Uma série de corantes naturais, com as mais diversas tonalidades, podem ser obtidos a partir de diferentes fontes, sejam elas vegetais, animais ou microbianas. Dentre os corantes naturais conhecidos, destacam-se os carotenoides, que podem ser uma alternativa à utilização de corantes amarelos e laranjas (RASCÓN et al., 2011); as betalaínas e antocianinas, que podem ser utilizadas em substituição a corantes vermelhos, amarelos e roxos (OTÁLORA et al., 2015; ROSA et al., 2019); as clorofilas, que conferem coloração verde (PORRARUD; PRANEE, 2010); a genipocianina e a ficocianina, que podem ser utilizadas como substitutos dos corantes azuis (CHAIKLAHAN; CHIRASUWAN; BUNNAG, 2012; BRAUCH et al., 2016; NERI-NUMA et al., 2017).

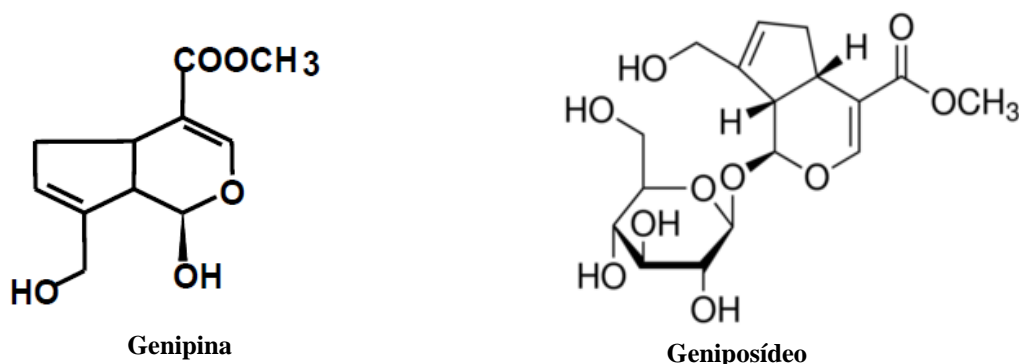


### 1.1.2.1. Genipocianina G1

Os pigmentos azuis são mais dificilmente encontrados na natureza, e tendem a ser menos estáveis, como aqueles obtidos através do ajuste do pH para as antocianinas ou por meio da extração de ficocianinas de cianobactérias (RIBEIRO; VELOSO, 2021). Porém, um corante natural azul, denominado genipocianina G1, pode ser obtido a partir dos frutos verdes do jenipapeiro (SILVA et al., 2014a; NERI-NUMA, et al., 2017).

Os frutos de jenipapo são ricos em iridoides, que são isoprenoides do tipo monoterpenoides, formados por duas unidades de isopreno. Ueda e Iwahashi (1991) isolaram a molécula do geniposídeo a partir do jenipapo (Figura 4). Este composto é a forma glicosilada e incolor do iridoide genipina, sendo esta última a substância responsável pela formação dos pigmentos originários do jenipapo.

**Figura 4.** Estrutura química da genipina e do geniposídeo.



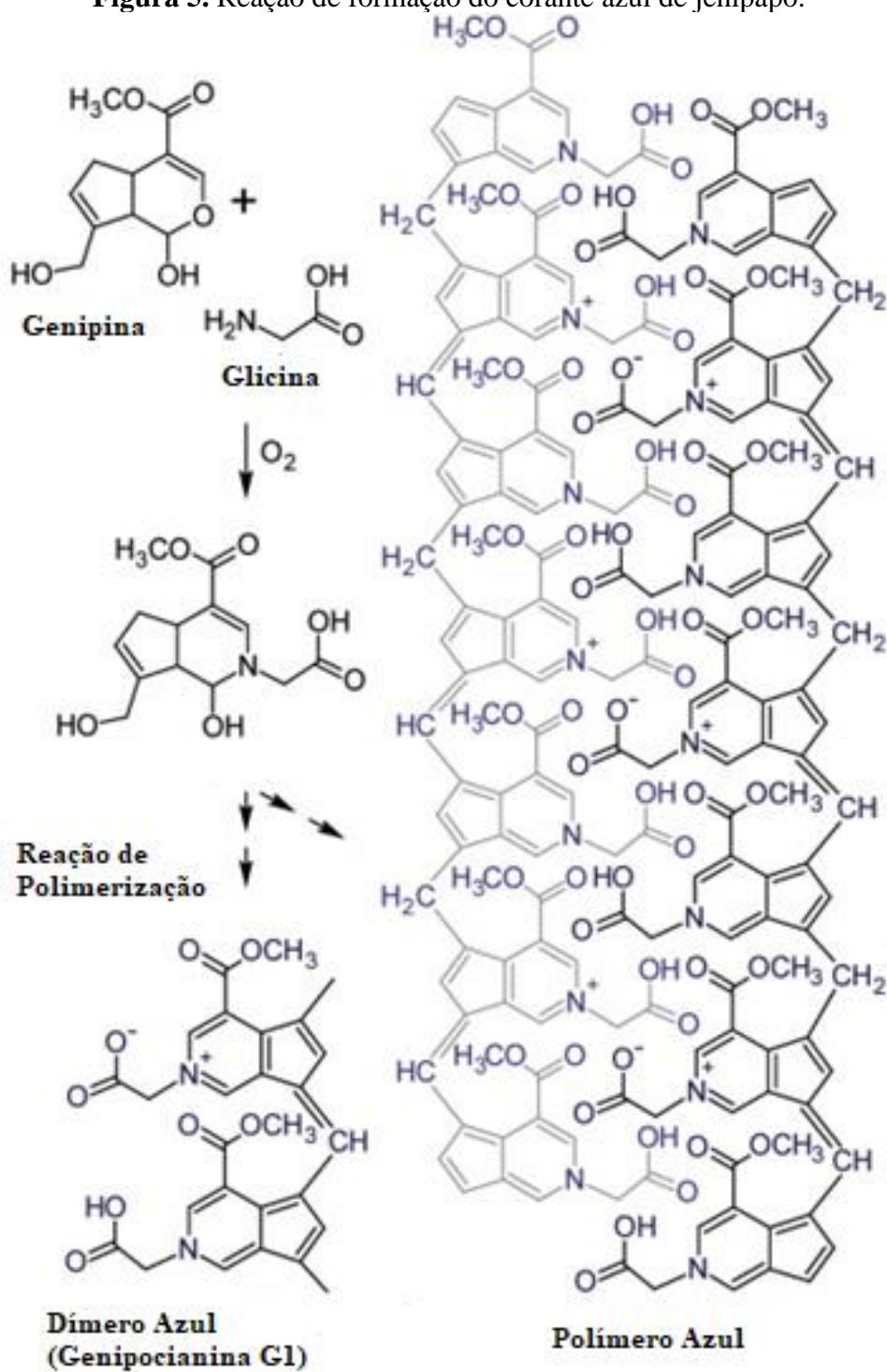
Fonte: WANG et al., 2004.

Os dois compostos têm sido estudados nos últimos anos devido às suas propriedades farmacológicas, dentre elas a sua atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, atividade colérgica, antitumoral, antiasmática e capacidade de inibição enzimática, e tecnologicamente para a produção de corante azul e reticulação de gelatina e quitosana (LIAW; CHAO, 2001; KIM et al., 2005; RENHE et al., 2009; GHIDOUCHE et al., 2013; CUI et al., 2014).

O corante azul obtido do jenipapo (Figuras 5 e 6) é resultado de uma sequência de reações que ocorrem na presença de oxigênio, onde a genipina reage com aminas primárias, como os aminoácidos. O produto dessa ligação forma dímeros de coloração azul, denominados de genipocianina G1, que podem se polimerizar e formar compostos

complexos, também de coloração azul, mas cada vez mais escuros ao longo do tempo (FUJIKAWA; FUKUI; KOGA, 1987; TOUYAMA et al., 1994; BRAUCH et al., 2016).

**Figura 5.** Reação de formação do corante azul de jenipapo.



Fonte: BRAUCH et al., 2016.

Estudos têm demonstrado que os corantes azuis produzidos a partir da genipina possuem em sua composição vários constituintes bioativos com atividades sobre a saúde, como a capacidade de inibir a expressão gênica e a sinalização de citocinas envolvidas com respostas inflamatórias e autoimunes, indicando potencial utilização na prevenção e tratamento de diversas doenças crônicas (WANG et al., 2012; NERI-NUMA et al., 2017).

**Figura 6.** Corante azul de jenipapo (genipocianina G1) em diferentes concentrações.



Fonte: Acervo pessoal.

Existem diversas limitações tecnológicas para o uso de corantes naturais, pois geralmente são sensíveis à oxidação e a altas temperaturas, de modo que a sua descoloração durante o processamento e armazenamento é acentuada, reduzindo a qualidade sensorial dos produtos onde estão naturalmente presentes ou são adicionados (ESQUIAVEL, 2016). Por conta disso, é fundamental que sejam empregadas técnicas que aumentem a estabilidade desses compostos, sendo a encapsulação uma delas.

### ***1.1.3. Encapsulação***

A encapsulação é uma técnica que pode ser utilizada com a finalidade de aumentar a estabilidade de compostos sensíveis ao processamento e armazenamento, além de promover a liberação controlada desses compostos em produtos ou no sistema digestório. A encapsulação consiste num processo de empacotamento de partículas sensíveis dentro de um material de revestimento mais resistente, que deve formar um filme ininterrupto para proteger o ingrediente de interesse. A estrutura formada em torno do encapsulado é chamada de parede e o composto interno constitui o material ativo ou núcleo. Esse

processo tem sido largamente estudado dentro da Ciência de Alimentos, com o objetivo de aumentar a estabilidade e controlar a liberação de aromatizantes, corantes, antioxidantes, nutrientes, enzimas e conservantes (KING, 1995; AZEREDO, 2005; JAFARI, 2017).

A encapsulação de corantes tem como objetivo protegê-los contra a luz, calor, água e oxidação, fornecendo um aumento da vida de prateleira, além de permitir uma solubilização e incorporação mais eficientes em alimentos. A encapsulação ainda permite uma estocagem mais eficiente de líquidos sensíveis a alterações, ao transformá-los em microcápsulas de pó (JAFARI, 2017).

O tamanho das microcápsulas é variado, podendo compreender entre nanômetros até vários milímetros. Sua forma também é diversa e depende dos materiais e métodos utilizados na sua preparação. Além disso, deve-se fazer distinção entre microcápsulas e microesferas, que diferem no fato de que nas microesferas uma pequena fração do material encapsulado permanece exposta na superfície, o que não ocorre nas microcápsulas. As microcápsulas podem ter ainda mais de um núcleo, ou várias paredes para um mesmo núcleo (AZEREDO, 2005; BARBOSA et al., 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; KRITHIKA et al., 2014).

Para a confecção de micropartículas, diversas técnicas têm sido empregadas. Tais técnicas podem ser classificadas em: métodos físicos (*spray drying*, *spray chilling*, *spray cooling*, extrusão, extrusão centrífuga de multiorifícios, cocristalização, recobrimento em leite fluidizado e liofilização), métodos químicos (inclusão molecular por complexação e polimerização interfacial) e métodos físico-químicos (coacervação, gelificação iônica, separação de fase orgânica, emulsificação e formação de lipossomas) (KING, 1995; BENITA, 1996; AZEREDO, 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; CASTRO-ROSAS et al., 2017; RIBEIRO; VELOSO, 2021). No presente trabalho, serão apresentados mais detalhes sobre as técnicas de encapsulação que utilizam o *spray drying*, a emulsificação e formação de lipossomas e a liofilização.

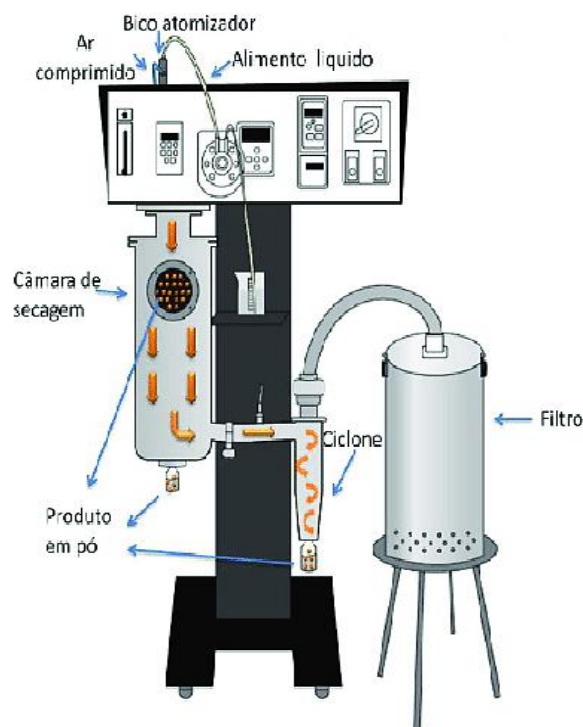
#### **1.1.3.1. *Spray Drying***

A técnica de *spray drying* ou secagem por atomização consiste na atomização de uma solução, suspensão ou emulsão contendo os materiais de parede e de núcleo contra uma coluna de ar quente, resultando na secagem instantânea e pulverização da mistura,

onde o material de parede reveste o composto de interesse (SILVA et al., 2014b; CASTRO-ROSAS et al., 2017; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

Os equipamentos de *spray drying* são compostos por três elementos básicos: o atomizador, a câmara de secagem e um sistema de ciclone para recolhimento do material seco (Figura 7). O atomizador pode ser do tipo centrífugo, de bico pressurizado, de bico de duplo fluido ou de bico ultrassônico, e o fluxo do material pode ocorrer em fluxo concorrente ou contra-corrente do ar de secagem (ORDÓÑEZ, 2005; FELLOWS, 2006).

**Figura 7.** Equipamento para secagem por atomização (*spray drying*).



Fonte: DE PAULA; AMARAL, 2019.

A desidratação ocorre quase que instantaneamente, devido à grande área superficial das gotículas atomizadas e a alta temperatura do ar de secagem (geralmente entre 100 e 300°C). Entretanto, a rápida evaporação da água e o seu curto tempo de permanência na câmara de secagem (1 a 10 s) permitem que a temperatura máxima da partícula seja relativamente baixa (entre 40 e 110°C), reduzindo a degradação dos materiais de parede e do núcleo (ORDÓÑEZ, 2005; FELLOWS, 2006; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

Os principais parâmetros a serem observados no processo de secagem por atomização são: temperatura de entrada, temperatura de saída, taxa de alimentação da

bomba que injeta o material e a vazão de ar. Esses parâmetros devem ser ajustados considerando-se diversos fatores, com destaque para a viscosidade da solução utilizada na encapsulação e a sensibilidade do material a altas temperaturas, de modo a aumentar a eficiência da encapsulação e o rendimento do processo, reduzindo perdas evitáveis (RIBEIRO; VELOSO, 2021).

O *spray drying* é o método mais popularmente empregado para a encapsulação. Isso acontece devido a algumas vantagens em relação às outras técnicas, como a disponibilidade de equipamentos, pois são largamente utilizados na indústria alimentícia, possibilitando a produção em larga escala; a boa eficiência de encapsulação, quando os parâmetros de processamento são bem ajustados; a possibilidade de utilização de materiais de parede de diversas naturezas; o aumento da estabilidade e redução dos custos de transporte e estocagem, pois o produto final é um pó; e por não necessitar de etapas de preparo preliminares ou posteriores. Entretanto, o material produzido geralmente não é uniforme e o fato desse processo ser conduzido em altas temperaturas pode promover a degradação dos corantes naturais, e o rendimento geralmente é baixo, visto que as perdas de materiais durante o processamento geralmente são elevadas (GHARSALLAOUI et al., 2012; SILVA et al., 2014b; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

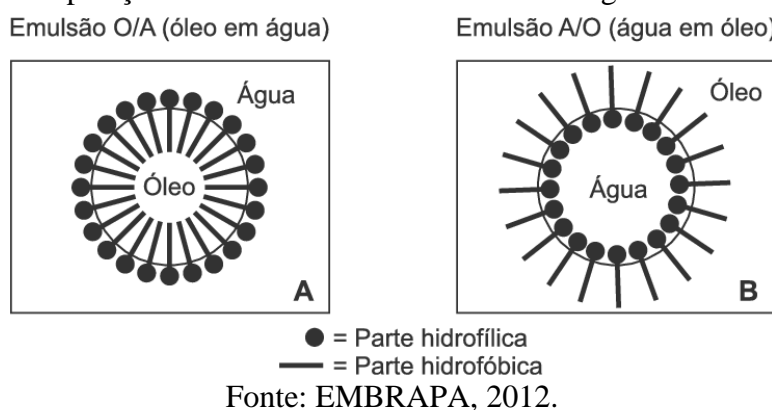
### ***1.1.3.2. Emulsificação e Produção de Lipossomas***

A emulsificação de compostos para a sua encapsulação consiste na dispersão do material do núcleo em um solvente que contém o material de parede, seguida da emulsificação do material em óleo (A/O) ou água (O/A), juntamente com um emulsificante e estabilizante. As gotículas formadas possuem diâmetro entre 0,1 e 100  $\mu\text{m}$ , e o solvente pode ser removido por evaporação sob agitação, pela secagem por atomização (*spray drying*) ou por liofilização, produzindo microcápsulas globulares (KNOLTON, 2006; SILVA et al., 2014b; CASTRO-ROSAS et al., 2017; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

Os emulsificantes são moléculas tensoativas, que possuem regiões polares e apolares e que se depositam na interface entre as fases aquosa e oleosa das emulsões (Figura 8). A terminação ou região polar volta-se para a fase aquosa, enquanto a terminação ou região apolar volta-se para a fase oleosa, estabilizando a emulsão. Eles agem reduzindo a tensão superficial, permitindo que novas superfícies sejam produzidas com mais facilidade quando energia é incorporada ao sistema (através da agitação,

homogeneização ou ultrassom), permitindo que um maior número de gotículas seja formado (FELLOWS, 2006). Os emulsificantes se classificam em sintéticos ou naturais, iônicos e não-iônicos, podendo ser poliméricos ou não. A escolha do melhor emulsificante dependerá, essencialmente, da fase em que será incorporado (aquosa ou oleosa), considerando o Balanço Hidrofílico Lipofílico (BHL). Os valores de BHL podem ser encontrados na literatura e, quanto mais baixo, mais hidrofóbico será o emulsificante (ARAÚJO, 2019).

**Figura 8.** Deposição do emulsificante na interface das gotículas em emulsão.

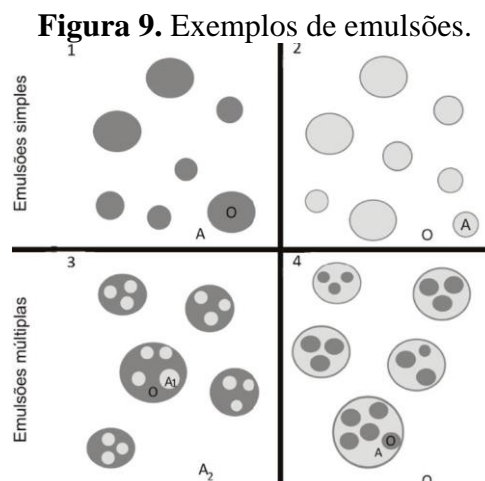


O preparo de emulsões depende do emprego de agitação, de modo a produzir energia mecânica através da alta tensão de cisalhamento. Após a interação dos componentes e produção do sistema com a fase dispersa, a fase contínua e a interface, o tamanho das gotículas pode ser reduzido e uniformizado, melhorando a estabilidade e as características sensoriais das emulsões, por meio de métodos empregando homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou ultrassom (DATE et al., 2010).

As emulsões ainda podem ser classificadas em simples (A/O ou O/A) e complexas ou múltiplas (A/O/A ou O/A/O). Para a produção dessas últimas, é inicialmente preparada uma emulsão que é, então, emulsionada novamente, formando gotículas dispersas dentro de outras gotículas (Figuras 9 e 10) (KOVÁCS; CSÓKA; KÓNYA, 2005; BOUYER et al., 2012).

Devido à sensibilidade térmica da maioria dos corantes naturais, as técnicas de encapsulação realizadas a frio, como a emulsificação, mostram-se promissoras para a obtenção de produtos com alta qualidade e maior rendimento. Quando são combinadas com a liofilização, por exemplo, observa-se elevada eficiência de encapsulação e a possibilidade de utilização das microcápsulas em matrizes alimentares com as mais

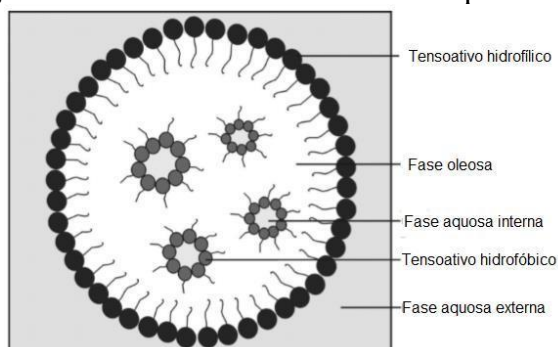
diversas características. A combinação de técnicas cria a possibilidade de utilização de corantes lipofílicos em matrizes aquosas ou de corantes hidrofílicos em matrizes gordurosas, por exemplo, além do uso de corantes sensíveis ao pH em alimentos que tenham características incompatíveis (RIBEIRO; VELOSO, 2021).



Legenda: 1: Emulsão simples O/A; 2: emulsão simples A/O; 3: emulsão múltipla A/O/A; 4: emulsão múltipla O/A/O. A: fase aquosa; O: fase óleo; A1: fase aquosa interna; A2: fase aquosa externa.

Fonte: BOUYER et al., 2012; PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015.

**Figura 10.** Estrutura de emulsões múltiplas A/O/A.



Fonte: Adaptado de KOVÁCS; CSÓKA; KÓNYA, 2005.

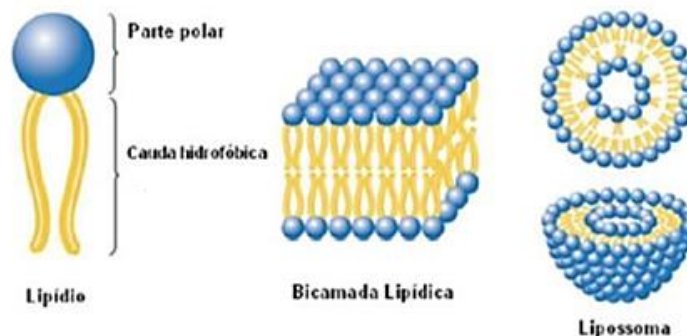
Para os corantes hidrofóbicos, como os carotenoides, a emulsificação é fundamental, seja como técnica principal de encapsulação ou como etapa preliminar à técnica principal, pois permite o melhor revestimento do corante pelo material de parede e possibilita a solubilização das microcápsulas em água. Essa técnica também pode ser utilizada para melhorar a encapsulação a frio de corantes hidrofílicos, mas são escassos



os estudos com esta finalidade (GOUIN, 2004; CHEN et al., 2017, RIBEIRO; VELOSO, 2021).

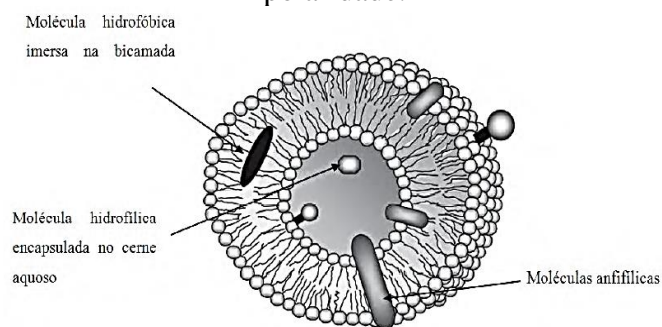
A formação de lipossomas também é uma técnica de encapsulação semelhante à emulsificação. Entretanto, nesse método são produzidas vesículas formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos, como aqueles presentes na lecitina (Figura 11). O interior da vesícula e seu exterior são compostos por um meio aquoso, e o composto de interesse pode estar localizado no interior da vesícula, caso seja hidrofílico; entre a bicamada de fosfolípidos, caso seja lipofílico; ou ainda pode atravessar a estrutura e interagir tanto com as regiões polares quanto apolares da vesícula e do meio, no caso dos compostos anfifílicos (Figura 12) (JUSTO; MORAES, 2010).

**Figura 11.** Formação de vesículas lipossomais.



Fonte: Adaptado de MACHADO, 2016.

**Figura 12.** Distribuição dos compostos de interesse nos lipossomas, de acordo com sua polaridade.



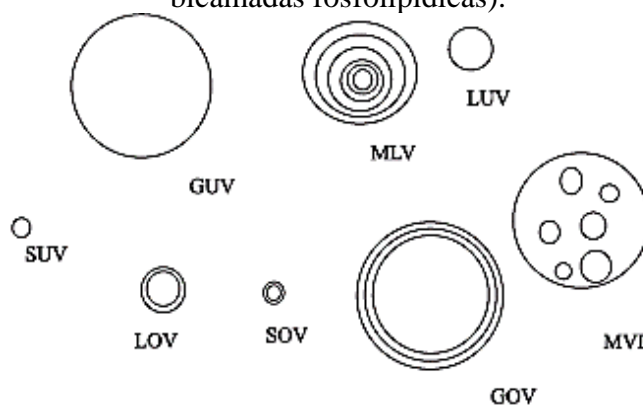
Fonte: Adaptado de JUSTO; MORAES, 2010.

Os lipossomas podem ser produzidos por diferentes técnicas, como a hidratação de um filme lipídico, a desidratação-reidratação, a microfuidização, a extrusão a injeção de etanol, a infusão de éter, a remoção de detergente e a sonicação (SANTOS; CASTANHO, 2002). Nessa última, após misturar adequadamente todos os componentes

dos lipossomas, o material é submetido a um ultrassom, cujas ondas promovem o fenômeno de cavitação, que se caracteriza pela formação, crescimento e colapso de microbolhas no centro do líquido. Esse colapso ocorre quando a bolha cessa de absorver a energia da sonicação e acaba por implodir, gerando altas pressões e temperaturas em minúsculos pontos quentes, que não são perceptíveis nas condições ambientais normais. e produzem as vesículas (LUQUE-GARCIA; LUQUE DE CASTRO, 2003; CAPELO et al., 2005).

Os lipossomas podem ser classificados em unilamelares ou multilamelares, a depender do número de bicamadas fosfolipídicas concêntricas intercaladas por camadas de água que formam as vesículas. Outra classificação está relacionada com o tamanho das vesículas formadas. Sendo assim, os lipossomas podem ser classificados em: vesículas multilamelares (MLV), maiores que 200 nm; vesículas unilamelares pequenas (SUV), com 25 a 100 nm; vesículas unilamelares grandes (LUV), com 100 a 400 nm; vesículas unilamelares gigantes (GUV), maiores que 1  $\mu\text{m}$ ; lipossomas multivesiculares (MVL); vesículas oligolamelares pequenas (SOV); vesículas oligilamelares grandes (LOV); e vesículas oligolamelares gigantes (GOV) (SANTOS; CASTANHO, 2002). A representação esquemática de cada tipo de lipossoma é apresentada na Figura 13.

**Figura 13.** Estrutura das vesículas de acordo com suas características (as linhas são bicamadas fosfolipídicas).



Legenda: GUV - vesículas unilamelares gigantes; MLV - vesículas multilamelares; LUV - vesículas unilamelares grandes; SUV - vesículas unilamelares pequenas; LOV - vesículas oligilamelares grandes; SOV - vesículas oligolamelares pequenas; GOV - vesículas oligolamelares gigantes; MVL - lipossomas de vesículas multilamelares.

Fonte: Adaptado de SANTOS; CASTANHO, 2002.

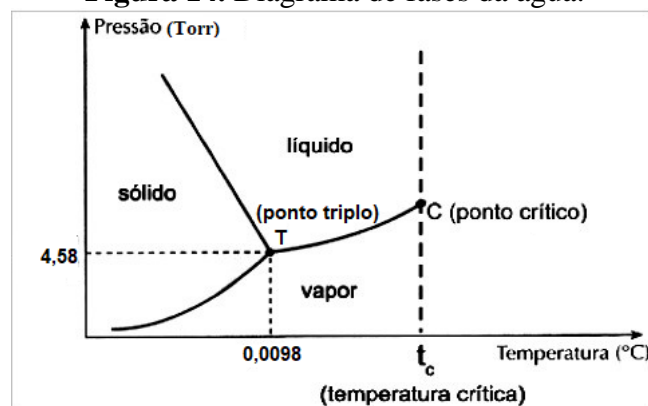
Os lipossomas são uma excelente forma de liberação controlada de medicamentos ou substâncias biologicamente ativas, devido à sua variedade estrutural, composição, tamanho e fluidez da camada fosfolipídica, além da sua capacidade de incorporação de compostos hidrofílicos, hidrofóbicos e anfifílicos. Além disso, são biocompatíveis, biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade e fácil preparação, sendo largamente estudadas e aplicadas na indústria farmacêutica e alimentícia.

### ***1.1.3.3. Liofilização***

A liofilização ou criodesidratação consiste na desidratação de um material congelado, por meio da sublimação da água sob pressão reduzida. Pode ser precedida da formação de uma matriz que será pulverizada após a desidratação, formando microesferas ou micropartículas, ou de técnicas como o preparo de uma emulsão, de coacervados ou de produtos de extrusão, para aumentar a vida de prateleira e a estabilidade desses materiais (SILVA et al., 2014b; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

A primeira etapa consiste no congelamento do material, que pode ocorrer em equipamentos convencionais ou em ultrafreezer. Alimentos sólidos devem ser congelados rapidamente, para que ocorra a formação de pequenos cristais de gelo que não danifiquem a estrutura do alimento. No caso de alimentos líquidos, deve-se promover o congelamento lento, de modo que a formação de cristais de gelo grandes favoreça a produção de canais por onde ocorrerá a saída do vapor durante o processo de desidratação (ORDÓÑEZ, 2005; FELLOWS, 2006).

Para que ocorra a sublimação, a temperatura e a pressão parcial de vapor d'água devem estar abaixo do ponto triplo (Figura 14), ou seja, inferiores a 0,0099°C e 610,5 Pa (ou 4,58 Torr), respectivamente. A desidratação ocorre em duas fases. Na fase primária, que geralmente dura entre 6 e 10 horas a depender da resistência do alimento à transferência de energia na forma de calor, elimina-se a água livre do alimento, imobilizada na forma de cristais de gelo puro, mantendo-se a pressão abaixo de 600 Pa e a temperatura abaixo do ponto triplo, para evitar que o gelo se funda. O alimento é desidratado até próximo de 15% de umidade. Na fase secundária, que dura de 2 a 6 horas na maioria dos alimentos, elimina-se, por evaporação ou dessorção, a água residual do produto, até a umidade de 2 a 8% que corresponde à água fortemente ligada (ORDÓÑEZ, 2005; FELLOWS, 2006).

**Figura 14.** Diagrama de fases da água.

Fonte: Google Imagens

Os equipamentos liofilizadores apresentam, em sua estrutura básica, uma câmara de secagem, ligada a uma bomba de vácuo, a um refrigerador (trocaador de calor) e a um condensador (Figura 15).

**Figura 15.** Estrutura de um liofilizador.

Fonte: LIOBRAS, 2012.

Os principais parâmetros do processo a serem controlados são a pressão na câmara de secagem; a temperatura do condensador de vapor, para que o vapor seja imediatamente congelado e não altere a pressão na câmara de secagem; e a temperatura do gelo na frente de sublimação, que deve ser tão alta quanto possível, mas que não possibilite que o gelo se funda (FELLOWS, 2006).

Por ser uma técnica a frio, com alto rendimento final, a liofilização é um método indicado para a desidratação de compostos sensíveis, como os corantes naturais. Entretanto, tem como limitações o seu custo elevado e longo tempo de processamento. Além disso, ao ser utilizado de forma isolada, esse método produz materiais que necessitarão ser posteriormente moídos, dando origem a micropartículas e não a microcápsulas, o que pode contribuir para uma menor eficiência da encapsulação, visto que o material estará disperso na matriz e não envolto pelos materiais de parede. Portanto, é fundamental utilizar técnicas preliminares, como a extrusão, a emulsificação ou a formação de lipossomas, antes de proceder com a liofilização para fins de encapsulação de compostos sensíveis (RIBEIRO; VELOSO, 2021).

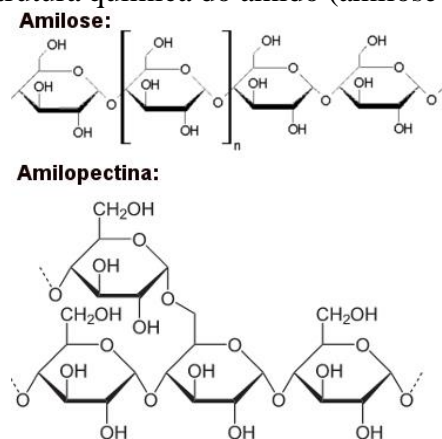
#### ***1.1.3.4. Materiais de Parede e Carreadores***

Os materiais de parede utilizados na encapsulação devem apresentar algumas características fundamentais, como a capacidade de formação de filme, produção de soluções com viscosidade baixa e não devem interagir covalentemente com o material de núcleo, além de apresentar estabilidade a variações de pH, apresentarem solubilidade, capacidade emulsificante e porosidade adequadas à finalidade a que se destinam e ao meio em que serão adicionados. Devido a isso, a grande maioria dos materiais de parede é representada por polímeros, incluindo aqueles de origem natural, como o amido e as maltodextrinas (GAONKAR et al., 2014; JAFARI, 2017).

#### ***Amido***

O amido é um polissacarídeo de reserva energética encontrado nos vegetais na forma de grânulos. Os grânulos de amido são formados pelos polímeros amilose e amilopectina, ambos polímeros de glicose, sendo o primeiro caracterizado por ser uma cadeia linear essencialmente composta por moléculas de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), enquanto o segundo caracteriza-se por ser uma cadeia ramificada de moléculas de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) e por ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) nos pontos de ramificação. A amilopectina é responsável pelas zonas cristalinas no amido nativo, enquanto que a amilose favorece à formação de redes de amido no processo de gelatinização (Figura 16) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2018).

**Figura 16.** Estrutura química do amido (amilose e amilopectina).



Fonte: Google Imagens

O teor de amilose nos grânulos de amido varia de acordo com a fonte botânica, assim como o tamanho (1-100  $\mu\text{m}$ ), a forma (esférica, lenticular ou poligonal), a distribuição da forma (uni ou bi-modal) e o tipo de associação dos grânulos (individual ou composta) (CEREDA, 2001).

Os grânulos de amido nativo são insolúveis em água fria, podendo absorver água de modo reversível. Quando aquecidos na presença de água, ocorre a gelatinização do amido, que se caracteriza pelo colapso das regiões cristalinas do grânulo de amido, promovendo alterações irreversíveis em suas propriedades, como o aumento do tamanho granular, a fusão dos cristais, perda de birrefringência, aumento da viscosidade da solução e solubilização do amido. A temperatura de gelatinização do amido também varia de acordo com a fonte botânica (CEREDA, 2001; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2018).

Por ser um polímero com capacidade de formar um filme, o amido pode ser utilizado como material de parede no processo de encapsulação. Entretanto, tem como limitação de uso o aumento de viscosidade decorrente da formação da gelatinização, necessária para a solubilização e formação do filme. Diante disso, estudos têm utilizado amidos modificados por dextrinização, oxidação ou inserção de grupos lipofílicos, que mantêm a capacidade de formar filme, mas que geram suspensões com menores viscosidades (GAONKAR et al., 2014; JAFARI, 2017; PEREIRA et al., 2018; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

### ***Maltodextrina***

As maltodextrinas são o produto da dextrinização do amido, que consiste na hidrólise parcial deste, promovida por ação enzimática ou por ácidos a quente. O valor de DE (dextrose equivalente) indica o grau de hidrólise do amido atingido ao final da dextrinização, expresso em total de açúcar redutor comparado à glicose, em base seca. O monômero de glicose apresenta DE = 100, enquanto o amido nativo padrão apresenta DE = 0 e as maltodextrinas possuem DE menores que 20 (STORZ; STEFFENS, 2004).

Amidos de diversas fontes podem ser utilizados na produção de maltodextrina, mas o mais utilizado é o amido de milho (*Zea mays*), devido à sua disponibilidade, seguido do amido de mandioca (*Manihot esculenta*). Esse último tem como vantagens ser um produto tradicional, produzido predominantemente pela agricultura familiar, e ser não transgênico (*GMO-free - genetically modified organism free*), o que contribui para o desenvolvimento regional, reduz o risco ambiental e atende a um nicho de mercado crescente de consumidores cada vez mais engajados em causas ambientais e de saúde (PALMIERI et al., 2020).

A maltodextrina tem sido muito utilizada em processos de microencapsulação, tanto isoladamente quanto em associação com outros polímeros, por apresentar a capacidade de formação de filmes e por não gerar aumentos significativos na viscosidade das soluções encapsulantes, além de atuar como adjuvante de secagem, elevando a concentração de sólidos totais em solução. Esse polímero de carboidrato ainda contribui para a redução dos custos de processamento por diminuir os gastos energéticos da secagem e por substituir total ou parcialmente outros polímeros mais caros (MAHDAVI et al., 2014; PEREIRA et al., 2018).

#### ***1.1.4. Caracterização das Micropartículas***

Durante a realização da encapsulação e avaliação das características dos produtos formados, algumas análises são fundamentais para o planejamento e avaliação do processo e da qualidade final do produto. A seguir, são apresentadas algumas dessas análises.

##### ***1.1.4.1. Reologia***

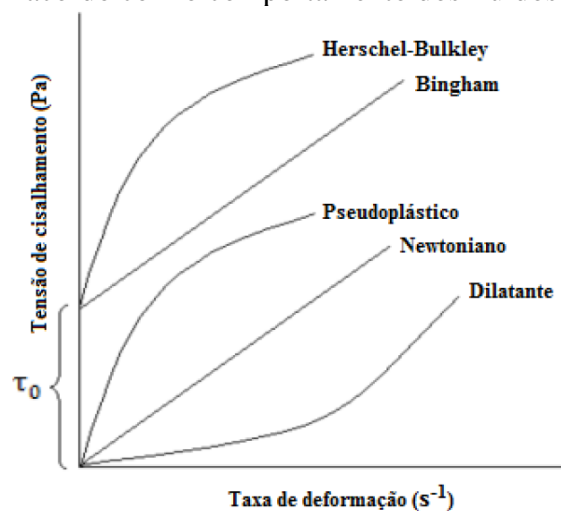
Reologia é a ciência que estuda o escoamento e a deformação de materiais sob a influência de forças de cisalhamento aplicadas aos mesmos. Ao sofrer um estresse, a taxa

e o tipo de deformação sofrida pelo material caracterizam suas propriedades reológicas (STEFFE et al., 1996).

Dentre as análises reológicas que podem ser realizadas em fluidos, podem-se citar os testes de cisalhamento no estado estacionário e os de cisalhamento oscilatório. O teste de cisalhamento do estado estacionário consiste na aplicação de uma taxa constante de cisalhamento ao fluido, aferindo-se a tensão causada por essa deformação. Considerando-se a relação entre a tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) e a taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ), são produzidas curvas de escoamento (Figura 17) que permitem classificar o comportamento reológico dos fluidos e determinar a viscosidade ou viscosidade aparente do fluido (DE CASTRO, 2003).

A viscosidade é uma característica importante para os alimentos classificados como fluidos. Ela pode ser definida como a resistência interna do líquido ao fluxo. A força que move o fluido é denominada força ou tensão de cisalhamento, e o gradiente de velocidade é a taxa de deformação. Os fluidos em que a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação gera um gráfico linear são denominados newtonianos, como água, óleo, soluções em baixa concentração de açúcares e sais. Quando essa relação produz gráficos não lineares, são denominados não-newtonianos, como emulsões, suspensões e soluções concentradas que possuem amidos, pectinas, gomas e proteínas (SILVA; SILVA JUNIOR; PINTO JUNIOR, 2019).

**Figura 17.** Diagrama de cisalhamento (curvas de escoamento) e classificações de acordo com o comportamento dos fluidos.



Fonte: STEFFE et al., 1996.



De maneira geral, os fluidos podem ser classificados da seguinte maneira (DE CASTRO, 2003; SILVA; SILVA JUNIOR; PINTO JUNIOR, 2019):

- Fluidos pseudoplásticos: a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento;
- Fluidos dilatantes: a viscosidade aumenta com a tensão de cisalhamento;
- Fluidos plásticos de Bingham ou Casson (Herschel-Bulkley): não se observa fluxo até que uma certa tensão de cisalhamento seja atingida, quando então a tensão de cisalhamento é linear (plásticos de Bingham) ou não-linear (Casson ou Herschel-Bulkley);
- Fluidos tixotrópicos: a estrutura quebra-se e a viscosidade diminui com uma tensão de cisalhamento contínua;
- Fluido reopético: a estrutura se fortalece e a viscosidade aumenta com uma tensão de cisalhamento contínua;
- Material viscoelástico: exhibe propriedades viscosas e elásticas ao mesmo tempo, de modo que, quando a tensão de cisalhamento é removida, o material nunca retorna integralmente à forma original, ocorrendo uma deformação permanente.

O comportamento dos fluidos não-newtonianos pode ser descrito por meio de modelos matemáticos ajustados, que correlacionam a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Principais modelos reológicos ajustados (STEFFE et al., 1996.).

Denominação do modelo	Modelo matemático
Casson	$\tau^{0,5} = \tau_0 + K(\dot{\gamma})^{0,5}$
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$
Lei da Potência	$\tau = K\dot{\gamma}^n$
Cross	$\tau = \tau_0 + n_\infty \dot{\gamma} + [n_0 \dot{\gamma} / 1 + (\lambda \dot{\gamma})^{1-n}]$

Legenda:  $\tau$  - tensão de cisalhamento (Pa);  $\tau_0$  - tensão inicial necessária para iniciar o escoamento (Pa);  $K$  - índice de consistência (Pa·s<sup>n</sup>);  $\dot{\gamma}$  - taxa de deformação (s<sup>-1</sup>);  $n$  - índice de comportamento de fluxo (adimensional).

O conhecimento das propriedades reológicas é fundamental para o planejamento do processamento de alimentos. Em processos de encapsulação por *spray dryer*, por exemplo, altas viscosidades podem comprometer o bombeamento e a atomização do

fluido a ser seco, devendo ser um parâmetro controlado já que pode comprometer a eficiência do processo, o rendimento e a qualidade do produto final (FELLOWS, 2006; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

#### **1.1.4.2. Rendimento do Processo**

O rendimento é um parâmetro importante para a indústria alimentícia, pois se relaciona tanto com a eficiência do processo quanto com os custos dele decorrentes, além de indicar os impactos ambientais. Na encapsulação, o rendimento é calculado considerando-se o teor de sólidos em solução ou suspensão no fluido e sua relação com a quantidade de pó obtido ao final do processo.

Diferentes técnicas de encapsulação geram diferentes rendimentos. Processos a frio, como a extrusão e a liofilização, podem gerar rendimentos próximos a 100%, quando bem planejados e ajustados. Por outro lado, técnicas que empregam altas temperaturas geralmente apresentam menores rendimentos. Quando se realiza a encapsulação por *spray drying*, por exemplo, são observadas grandes perdas durante o processo. Fluidos muito viscosos ou ricos em açúcares, por exemplo, tendem a se depositar nas paredes da câmara de secagem e/ou são mais difíceis de atomizar, o que reduz o rendimento final dos pós produzidos. Ajustar os parâmetros processuais (fluxo de alimentação, temperaturas de entrada e saída, a vazão e a pressão de ar comprimido) podem aumentar o rendimento do processo e reduzir perdas evitáveis, mas deve-se atentar, também, para a composição do material e a sua sensibilidade térmica (FELLOWS, 2006; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

#### **1.1.4.3. Eficiência de Encapsulação e Retenção de Corante**

A eficiência da encapsulação é um parâmetro fundamental para determinar a qualidade do processamento e do material encapsulado. Ela indica quanto do composto de interesse foi encapsulado, de fato, e está envolto pelo material de parede, e quanto dele está apenas adsorvido na superfície da cápsula. Quanto maior a quantidade de material de núcleo encapsulado, maior a eficiência de encapsulação e a estabilidade das cápsulas (SANTANA et al., 2016).

A eficiência da encapsulação é influenciada pela técnica empregada, pelo ajuste das condições de processamento, pela relação entre as quantidades de material de parede e de núcleo, pelo material de parede utilizado e as interações que ocorrem entre

ele e o material do núcleo. O *spray drying* é uma técnica que tende a produzir elevadas eficiências de encapsulação, por promover a atomização e secagem instantânea a quente, que favorecem a formação de um filme ao redor do material de núcleo, quando utilizados materiais de parede adequados e em quantidade suficiente. As técnicas a frio, como emulsificação, extrusão e coacervação, também têm eficiência de encapsulação próxima a 100% quando respeitadas essas condições (CASTRO-ROSAS et al., 2017; SILVA et al., 2014b; TIMILSENA et al., 2019; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

Já a retenção de corante é a medida que representa a quantidade total do corante que está contida no pó resultante da encapsulação. Esse parâmetro considera quanto de corante foi inicialmente adicionado no fluido utilizado no processo e quanto dele está presente no pó, seja encapsulado, adsorvido ou entremeado à matriz de microcápsulas/micropartículas. Juntamente com o rendimento e a eficiência da encapsulação, esse parâmetro também estima as perdas ocorridas durante o processamento e a eficiência do processo, sendo influenciado pelas mesmas condições referidas para esses outros dois parâmetros (SANTANA et al., 2016; RIBEIRO; VELOSO, 2021).

#### ***1.1.4.4. Atividade de Água, Densidade e Solubilidade***

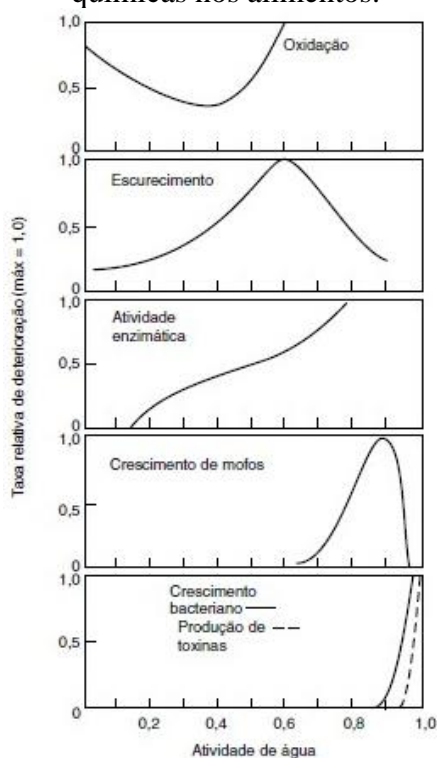
A atividade de água pode ser definida como a relação existente entre a pressão de vapor de uma solução ou de um alimento e a pressão de vapor da água pura, a uma determinada temperatura. Esse parâmetro indica a intensidade das forças intermoleculares que unem a água aos outros componentes dos alimentos, assim como a sua mobilidade e disponibilidade para microrganismos e como solvente de reações químicas e enzimáticas (Figura 18), exercendo influência direta sobre a estabilidade dos produtos alimentícios (ORDÓÑEZ, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Além do fato de as baixas atividades de água contribuírem para a estabilidade de produtos encapsulados, elas ainda contribuem para a fluidez dos pós em tubulações industriais, sendo um parâmetro importante para o processamento (JUAREZ-ENRIQUEZ et al., 2019).

A densidade é a relação entre a massa e o volume de um material, sob uma dada temperatura e pressão, e pode ser expressa em  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A densidade a granel ou densidade volumétrica dos pós depende da densidade do sólido e de sua geometria e das propriedades superficiais das partículas individuais, e está relacionada com a facilidade

de sua reidratação. Ela também depende do tamanho das partículas, se elas são ocas ou maciças, o que é determinado pela sua natureza e composição, assim como pelas condições de secagem, por exemplo, a uniformidade do tamanho das gotículas secas por atomização, a temperatura do processo, o teor de sólidos da solução/suspensão utilizada na secagem e a sua aeração. Quanto mais ampla a variação do tamanho das partículas, maior a densidade volumétrica dos pós, já que as partículas menores tendem a preencher o espaço entre as partículas maiores, excluindo o ar, o que também contribui para o aumento da estabilidade (FELLOWS, 2006).

**Figura 18.** Efeito da atividade de água nas alterações microbianas, enzimáticas e químicas nos alimentos.



Fonte: FELLOWS, 2006.

A densidade também tem grande relevância nos processos de separação, mistura e redução de tamanho. Diferenças na densidade dos diversos ingredientes alimentícios podem comprometer a mistura de pós, e a densidade ainda se relaciona com a fluidez destes em tubulações industriais (JUAREZ-ENRIQUEZ et al., 2019). Quanto menor o teor de gordura, mais fluidos serão os pós. Se o teor de gordura é alto, os pós precisarão ser instantaneizados, para evitar a formação de grumos, aumentar a solubilidade e facilitar a sua reidratação (FELLOWS, 2006).

A solubilidade dos pós encapsulados é dependente da disponibilidade de grupos funcionais em sua superfície que podem interagir com a água, como por meio de ligações de hidrogênio, além de ser influenciada pela sua porosidade e densidade, por exemplo. Esse parâmetro também é de extrema importância, pois exerce influência sobre a disponibilidade e acessibilidade de compostos encapsulados, além de indicar em quais produtos podem ser adicionados (JAFARI, 2017).

#### ***1.1.4.5. Cor Instrumental***

A colorimetria é a ciência que emprega tecnologias instrumentais para quantificar e descrever as percepções da cor, através da utilização de modelos matemáticos. As respostas são apresentadas em parâmetros que representam a cor instrumental, que tenta representar quantitativamente a percepção da cor pelos olhos e sua interpretação pelo cérebro humano (OLIVEIRA, 2006).

O sistema CIE (da Comissão Internacional de Iluminação) é utilizado para descrever a cor dos materiais, padronizando os iluminantes e incluindo a perspectiva dos observadores. Além disso, o espaço CIELAB considera as coordenadas colorimétricas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  para a quantificação da cor instrumental (KONICA MINOLTA, 2007).

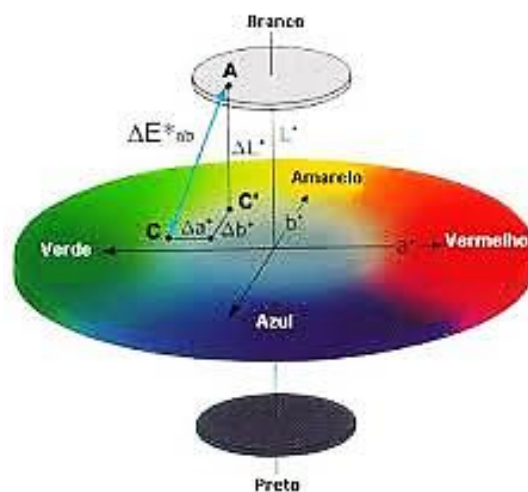
A percepção da cor depende do observador, de modo que este elemento precisa ser padronizado. O sistema CIE utiliza o observador padrão  $2^\circ$  (dois graus) e o observador padrão  $10^\circ$  (dez graus). O observador representa a sensibilidade do olho humano à mistura de cores primárias (vermelho, verde e azul), considerando duas áreas distintas da retina: em  $2^\circ$ , considera-se a fóvea, onde se concentram células do tipo cone, responsáveis pela percepção da visão em cores; em  $10^\circ$ , considera-se a retina em geral, incluindo também as células do tipo bastonete, responsáveis pela visão em preto e branco (OLIVEIRA, 2006).

Os iluminantes representam o tipo da fonte de luz, que possuem diferentes distribuições espectrais, influenciando diretamente na cor dos objetos. O iluminante A representa a luz de um corpo negro com temperatura de 2856 K, enquanto que o iluminante B foi desenvolvido para representar a luz do sol, com uma temperatura de 4900 K, aproximadamente. O iluminante C tem temperatura de cor de 6800 K e simula a luz média do dia, e os iluminantes da série D consideram condições variadas, como a localização geográfica, os horários, as condições climáticas e atmosféricas (OLIVEIRA, 2006).

Considerando-se o espaço psicométrico CIELAB, as cores são descritas pelos parâmetros claridade ( $L^*$ ), anteriormente denominado de luminosidade, coordenadas  $a^*$  (de vermelho a verde) e  $b^*$  (de amarelo a azul). Podem ser consideradas, ainda, o sistema de coordenadas cilíndricas  $L^*$ , tonalidade ( $h^\circ$ ) e croma ( $C^*$ ). No espaço CIELAB, pode-se quantificar as variações em cada parâmetro ( $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  e  $\Delta b^*$ ) e a variação total da cor ( $\Delta E^*$ ), por exemplo (Figura 19). Estudos indicam que valores de  $\Delta E^*$  superiores a 5 são evidentes a olho nu, o que pode influenciar na qualidade percebida do produto (OBÓN et al., 2009).

Tratando-se de corantes naturais, as análises colorimétricas são fundamentais, tanto para determinar a cor do produto quando para verificar alterações de cor ao longo do tempo, o que influencia diretamente sobre a sua qualidade, estabilidade e vida de prateleira.

**Figura 19.** Diagrama de cálculo de  $\Delta E^*$  no diagrama CIELAB.



Fonte: KONICA MINOLTA, 2007.

#### 1.1.4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia tem como principal função tornar visível ao olho humano objetos com tamanho muito pequeno, a ponto de impossibilitar sua percepção detalhada. O microscópio óptico convencional ilumina o objeto com luz visível ou luz ultravioleta, tendo seu limite máximo de resolução de até 2.000 vezes, visto que ele é estabelecido pelos efeitos de difração, devido ao comprimento de onda da radiação incidente, e a

profundidade dos campos é inversamente proporcional aos aumentos. Já o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar dos fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca. Isso permite que os aparelhos modernos promovam aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Devido a essa sensibilidade e resolução, o MEV é um equipamento que pode oferecer, rapidamente e com grande eficiência, informações sobre a morfologia dos mais diversos materiais sólidos, em níveis microscópicos.

Por conta da necessidade de interação do feixe eletrônico com o material analisado, alguns elétrons são absorvidos pela amostra, que deve conduzi-los para o fio terra. Por isso, é preciso que as amostras sejam condutoras. Caso contrário, é necessário torná-las condutoras através de vários processos físicos, como a evaporação com revestimento em carbono ou a deposição de íons (*sputtering*). O recobrimento das amostras ainda pode melhorar o nível de emissão de elétrons, facilitando a construção da imagem (GOLDSTEIN et al.,1992). Geralmente, a técnica mais utilizada para essa finalidade é o recobrimento por deposição de íons metálicos de ouro (Au), liga de ouro-paládio (Au-Pd) ou platina (Pt), entre outros. Para tanto, as amostras são acondicionadas em uma câmara com pressão em torno de 0,1 a 0,05 mbar e o alvo metálico é bombardeado com átomos de um gás inerte, como o argônio, sendo depositado sobre a amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A análise da morfologia de materiais é de grande valia para a indústria de alimentos, tendo as mais diversas aplicações, como a observação de estruturas de filmes e embalagens, a estrutura de pós naturais, como grânulos de amido, e de produtos, como as micro e nanocápsulas. Tratando-se dessas últimas, além de permitir a medição do tamanho das mesmas, a avaliação da sua superfície pode demonstrar características que evidenciam as condições de processamento (como a contração do material seco) e que podem ser correlacionadas com outros atributos, como a presença de rugosidades e de poros, que podem ter relação com a solubilidade, estabilidade, disponibilidade e acessibilidade ao material do núcleo (JAFARI, 2017).

#### ***1.1.4.7. Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)***

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que pode ser utilizada para a identificação de grupos funcionais de macromoléculas. Essa técnica pode ser empregada para a identificação e caracterização de compostos orgânicos ou inorgânicos e poliméricos, aferindo-se a fração da energia transmitida ou absorvida em relação àquela incidente, em determinado comprimento de onda ou número de onda (SMITH, 1979).

Existem dois tipos de vibrações que as moléculas ou grupos funcionais podem realizar ao receberem uma dada quantidade de energia: as deformações axiais e as deformações angulares. Uma vibração de deformação axial é o movimento em que a distância interatômica aumenta e diminui alternadamente ao longo do eixo da ligação, enquanto que as vibrações de deformação angular correspondem à variação de ângulos de ligação, em um conjunto de átomos (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994). A depender do tipo de vibração ocorrida, são gerados picos ou bandas de absorbância ou transmitância, característicos de cada grupo funcional, permitindo a caracterização do material e das interações existentes ou formadas durante os diversos processamentos, como no caso da encapsulação.

O equipamento utilizado para a obtenção dos espectros de absorção é chamado de espectrômetro no infravermelho. Dois modelos de espectrômetros no infravermelho médio são bastante utilizados em laboratórios: o instrumento dispersivo e o com Transformada de Fourier (FT). Ambos oferecem espectros de compostos em uma faixa comum, entre  $4.000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , mas espectros de infravermelho com FT produzem o espectro mais rapidamente e com maior sensibilidade do que os instrumentos dispersivos (PAVIA, 2010). O FTIR é uma técnica de análise atraente para a indústria de alimentos, pois medições simples, rápidas e não destrutivas de componentes físicos e químicos podem ser obtidas (CASSOLI et al., 2011; LOHUMI et al., 2015).

#### ***1.1.5. Planejamento e Análise Estatística***

##### ***1.1.5.1. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)***

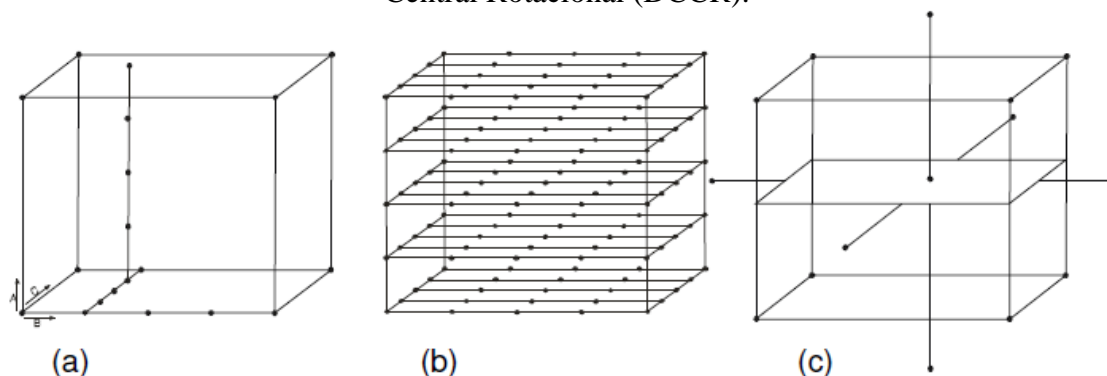
O planejamento do Delineamento Experimental é uma etapa fundamental para a condução adequada e qualificada de experimentos. Quando se trata do desenvolvimento,



melhoramento ou otimização de um processo, o planejamento deve considerar os efeitos que as variáveis independentes têm sobre as respostas observadas (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

De acordo com Haaland (1989), para a resolução de um problema experimental de 2 ou 3 variáveis, por exemplo, é possível conduzir os experimentos de três formas: um fator por vez (Análise Univariada); utilizando uma matriz com todas as combinações possíveis (Fatorial Completo); e por meio de delineamentos que permitem a redução do número de tratamentos, explorando todo o espaço experimental, como o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Figura 20).

**Figura 20.** Possibilidades de condução de experimentos com 3 variáveis: (a) Análise Univariada; (b) Matriz combinando todos os fatores; e (c) Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).



Fonte: Haaland, 1989.

Um delineamento rotacional tem como característica principal a variância do valor predito igual em qualquer ponto dentro da região experimental, sendo possível afirmar que esta é invariante para qualquer rotação feita no eixo das coordenadas. Os pontos experimentais são equidistantes em relação à origem, sendo invariante em relação a qualquer rotação realizada nos eixos cartesianos, indicando a rotacionalidade. No caso do DCCR, a redução do número de pontos experimentais, comparando-se com os delineamentos fatoriais completos, possibilita a minimização do erro experimental, além de explorar todo o espaço experimental. A adição de pontos centrais pode fornecer informações úteis sobre o comportamento das respostas entre os níveis inicialmente atribuídos aos fatores, viabilizar o cálculo dos resíduos, do erro padrão, das estimativas por intervalo, dos testes e assim por diante, além de evidenciar a qualidade e a repetibilidade do processo. A sua relevância para a aplicação experimental na indústria

se evidencia no menor número de tratamentos, reduzindo os custos e o tempo empregado no desenvolvimento e otimização de produtos e processos (RODRIGUES; IEMMA, 2014; CIRILLO, 2015).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas utilizadas para modelar e analisar problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis, buscando atingir um valor ótimo e relacionando as respostas com os níveis de fatores quantitativos e suas interações. A partir dos dados obtidos através dos experimentos realizados por meio do DCCR, é possível gerar modelos matemáticos que, uma vez validados estatisticamente, podem ser utilizados na obtenção de gráficos de Superfícies de Resposta. Por meio da análise destes, é possível determinar as condições otimizadas, conhecendo a significância estatística das respostas obtidas. Os gráficos de Superfície de Resposta permitem a visualização tridimensional do efeito de duas variáveis (MONTGOMERY, 2013).

### 1.3 Referências

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 7 ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2019.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.

BARBOSA, D. A. **Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (*Rubiaceae*)**. (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

BARBOSA, M. I. M. J. BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsuled with differentedible polysaccharide preparations. **Food Research international**, v.8, p. 989-994, 2005.

BENITA, S., **Microencapsulation methods and industrial application**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1996.

BOUYER, E; MEKHLLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions:

alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, p.359-378, 2012.

BRASIL. **Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961**. Dispõe sobre Normas Técnicas Especiais Reguladoras do Emprego de Aditivos Químicos a Alimentos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 44, de 25 de novembro de 1977**. Estabelece Condições Gerais de Elaboração, Classificação, Apresentação, Designação, Composição e Fatores Essenciais de Qualidade dos Corantes Empregados na Produção de Alimentos e Bebidas.

BRAUCH, J. E.; ZAPATA-PORRAS, S. P.; BUCHWEITZ, M.; ASCHOFF, J. K.; CARLE, R. Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? **Food Research International**, v. 89, p. 391–398, 2016.

CABALLERO, B.; FINGLAS, P.; TOLDRÁ, F. (Ed.). **Encyclopedia of food and health**. Boca Raton: Academic Press. 2015.

CAPELO, J. L.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 12, p. 225-232, 2005.

CASSOLI, L. D.; SARTORI, B.; ZAMPAR, A.; MACHADO, P. F. An assessment of Fourier transform infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 480-485, 2011.

CASTRO-ROSAS, J.; FERREIRA-GROSSO, C. R.; GÓMES-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M. L.; GUZMÁN-ORTIZ, F. A.; FALFAN-CORTES, R. N. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - a review. **Food Research International**, v. 102, p. 575–587. 2017.

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.; DEMIATE, I.M. Amidos Modificados. In: CEREDA, M.P. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Fundação Cargill, 2001.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, 47, 659–664, 2012.

CHEN, J.; LI, F.; LI, Z.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Encapsulation of carotenoids in emulsion-based delivery systems: enhancement of  $\beta$ -carotene water-dispersibility and chemical stability. **Food Hydrocolloids**, 69, 49-55, 2017.

CIRILLO, M. A. **Otimização na Experimentação**: aplicações nas Engenharias e Ciências Agrárias. Lavras, MG: Editora UFLA, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Discussion paper on the use of colours in foods**. Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Thirty-second Session. Beijing: FAO/WHO, 2000.

CUI, L.; JIA, J.; GUO, Y.; LIU, Y.; ZHU, P. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 31– 38, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 5. ed., Porto Alegre: Artmed, 2018.

DATE, A. A.; DESAI, N.; DIXIT, R.; NAGARSENKER, M. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, p. 1595-1616, 2010.

DE CASTRO, A. G. **A química e a reologia no processamento de alimentos**. Lisboa: Instituto Piaget, 2003.

DE PAULA, J. A. M.; AMARAL, V. C. S. **Ciências da Saúde**: saberes e práticas interdisciplinares. Anápolis: Editora UEG, 2019.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPES, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 173, 2000.

DELPRETE, P.G.; SMITH, L.B.; KLEIN, R.M. **Rubiaceae**. In: Reis, A. Flora Ilustrada Catarinense. vol. 2. Itajaí: Ademir Reis, 2005.

DEMBITSY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671-1701, 2011.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2012.

ESQUIAVEL, P. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages**. Woodhead Publishing, 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Food and fruit-bearing forest species 3: examples from Latin America**. Rome: FAO/OMS, 1986.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios, **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103-112, 2008.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e práticas**. 2º edição São Paulo: Artmed, 2006.

FERRARI, T. B.; LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. Características dos Rizomas e do Amido de Araruta (*Maranta arundinacea*) em Diferentes Estádios de Desenvolvimento da Planta. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 2, p. 93-98, 2005.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FREITAS, A. S. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**, v. 2, p. 65-72, 2012.

FUJIKAWA, S.; FUKUI, Y.; KOGA, K. Structure of genipocyanin G<sub>1</sub>, a spontaneous reaction product between genipin and glycine. **Tetrahedron Letters**, v. 28, p. 4699-4700, 1987.

GAONKAR, A. G.; VASISHT, N.; KHARE, A. R.; SOBEL, R. **Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide**. London: Academic Press – Elsevier, 2014.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; BENEY, L.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1713-1720, 2012.

GHIDOUCHE, S.; REY, B.; MICHEL, M.; GALAFFU., N. A Rapid tool for the stability assessment of natural food colours. **Food Chemistry**, v. 139, p. 978–985, 2013.

GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHIL, P.; JOY, D. C.; ROMIG JR, A. D.; LYMAN, C. E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. New York: Plenum Press, 1992.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, 15, 330–347, 2004.

GRANADOS, C. C.; GUZMAN, C. E.; ACEVEDO, C. D.; DÍAZ, M. M.; HERRERA, A. A. Propiedades funcionales del almidon de sagu (*Maranta arundinacea*). **Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 12, p. 90-96, 2014.

HAALAND, P. D. **Experimental Design in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, INC., 1989.

HANSEN, D. S., SILVA, S. A., FONSECA, A. A. O., HANSEN, O. A. S., FRANÇA, N. O. Caracterização química de frutos de jenipapeiros nativos do Recôncavo Baiano visando ao consumo natural e industrialização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 964-969, 2008.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Tabelas de composição de alimentos**. 2 ed. Estudo nacional da despesa familiar. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 1981.

JAFARI, S. M. **Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients: principles and applications**. London: Academic Press – Elsevier, 2017.

JUAREZ-ENRIQUEZ, E.; OLIVAS, G. I.; ORTEGA-RIVAS, E.; ZAMUDIO-FLORES, P. B.; PEREZ-VEGA, S. Water activity, not moisture content, explains the influence of water on powder flowability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 35-39, 2019.

JUSTO, O.R.; MORAES, A. M. Economical Feasibility evaluation of nanoliposome production plant. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, p. 15-20, 2010.

KIM; B.C.; KIM, H.G.; LEE, S. A.; LIM, S.; PARK, E. H.; KIM, S. J.; LIM, C. J. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 1398-1407, 2005.

KING, A. H., **Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing hydrocolloids**. In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A., Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: 1995.

KNOLTON, E. D. **A Microscopic and Macroscopic Study of Dense Emulsion Rheology**. (Tese - PhD in Chemical Engineering) – Department of Chemical Engineering, University of California, Santa Barbara, 2006.

KONICA MINOLTA. **Precise color communication: color control from perception to instrumentation**. Japão: Konica Minolta Sensing, INC., 2007.

KOVÁCS, A.; CSÓKA, I.; KÓNYA, M.; et al. Structural analysis of w/o/w multiple emulsions by means of DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 82, , p. 491–497, 2005.

KRITHIKA, V.; RADHAI, S., RAVINDRA, N.; THIRUPATHI, V. Microencapsulation of Paprika (*Capsicum annum L*) Oleoresin by Spray drying, **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 5, n. 2, 2014.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Food Science and Technology**, 22, 65-69, 2002.

LIAW, J.; CHAO, Y. Effect of in vitro and in vivo aerosolized treatment with geniposide on tracheal permeability in ovalbumin-induced guinea pigs. **European Journal of Pharmacology**, v. 433, p. 115 – 121, 2001.

LIOBRAS. **Manual de Instruções: Liofilizadores L101**. LIOBRAS, 2012.

LOHUMI, S. H.; LEE, S.; LEE, H.; CHO, B-K. A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n.1, p. 85-98, 2015.

LUQUE-GARCIA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends Analytical Chemistry**, v. 22, p. 41-47, 2003.

MACHADO, A. R. **Encapsulação de compostos fenólicos extraídos de microalgas submetidos ao sistema gastro intestinal in vitro**. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2016.

MAHDAVI, S. A.; JAFARI, S. M.; GHORBANI, M. Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. **Drying Technology**, v. 32, p. 509-518, 2014.

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 1-15, 2016.

MONTEIRO, D. A.; PERESSIN, V. A. **Cultura da araruta**. In: CEREDA, M.P. Agricultura: tuberosas amiláceas latino-americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2002.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 8 ed. New York: John Wiley & Sons; 2013.

NERI-NUMA, I. A.; PESSOA, M. G.; PAULINO, B. N.; PASTORE, G. M. Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science & Technology**, 67, 271-279, 2017.



NOGUEIRA, G. F.; FAKHOURI, F. M.; OLIVEIRA, R. A. Extraction and characterization of arrowroot (*Maranta arundinaceae* L.) starch and its application in edible films. **Carbohydrate Polymers**, 186, 64-72, 2018.

OBÓN, J. M.; CASTELLAR, M. R.; ALACID, M.; FERNANDEZ-LOPEZ, J. A. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering**, 90, 471-479, 2009.

OLIVEIRA, D. F. **Confiabilidade metrológica e validação de procedimentos espectralométricos para medição de fontes luminosas**. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Metrologia para a Qualidade e Inovação, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. v. 1. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OTÁLORA, M. C.; CARRIAZO, J. G.; ITURRIAGA, L.; NAZARENO, M. A.; OSORIO, C. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. **Food Chemistry**, 187, 174–181, 2015.

PALMIERI N, SIMEONE M, RUSSO C, PERITO MA. Profiling young consumers' perceptions of GMO products: A case study on Italian undergraduate students. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 21, 100224, 2020.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p.

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

PEREIRA, K. C.; FERREIRA, D. C. M.; ALVARENGA, G. F.; PEREIRA, M. S. S.; BARCELOS, M. C. S.; COSTA, J. M. G. Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através da secagem por atomização: revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. e2017083, 2018.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.

PORRARUD, S.; PRANEE, A. Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. **International Food Research Journal**, v. 17, p.1031-1042, 2010.

PRADO NETO, M.; DANTAS, A. C. V. L.; VIEIRA, E. L.; ALMEIDA, V. O. Germinação de sementes de jenipapeiro submetidas à pré-embebição em regulador e estimulante vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 693-698, maio/jun., 2007.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes Artificiais em Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 14, p. 237-250, 2003.

RASCÓN, M. P.; BERISTAIN, C. I.; GARCÍA, H. S.; SALGADO, M. A. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and soy protein isolate as wall materials. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 549–557, 2011.

RENHE, I. R. T.; STRINGHETA, P. C.; SILVA, F. F.; OLIVEIRA, T. V. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 649-652, 2009.

RIBEIRO, J. S.; BARROS, H. E. A.; VIANA, E. B. M.; GUALBERTO, S. A.; SILVA, A. G., SOUZA, C. C. E.; ZANUTO, M. E.; SILVA, M. V. Composition, antinutrients and antioxidant capacity of genipap (*Genipa americana* L.): activity of phenolic constituents on the thermal stability of  $\beta$ -carotene. **Journal of Culinary Science & Technology**, v. 19, p. 1-23, 2021.

RIBEIRO, J. S.; VELOSO, C. M. Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 112, 106374, 2021.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3ª ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RODRIGUES, A. A. M.; SANTOS, L. F.; COSTA, R. R.; FÉLIX, D. T.; NASCIMENTO, J. H. B.; LIMA, M. A. C. Characterization of starch from different non-traditional sources and its application as coating in ‘Palmer’ mango fruit. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 44, e011220, 2020.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 20-26, 2016.

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

ROSA, J. R.; NUNES, G. L.; MOTTA, M. H.; FORTES, J. P.; WEIS, G. C. C.; HECKTHEUER, L. H. R.; MULLER, E. I.; MENESES, C. R.; ROSA, C. S. Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: Characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 742–748, 2019.

SANDRI, S. Jenipapo. **Globo Rural**, v.13, p. 60-63, 1998.

SANTANA, A. A.; CANO-HIGUITA, D. M.; OLIVEIRA, R. A.; TELIS, V. R. N. Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. **Food Chemistry**, v. 212, p. 1-9, 2016.

SANTOS, R. O. S. Caracterização de jenipapeiro (*Genipa americana* L.) em Cruz das Almas-BA. (**Dissertação de Mestrado**) Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SILVA, A. V. C.; FREIRE, K. C. S.; LÊDO, A. S.; RABBANI, A. R. C. Diversity and genetic structure of jenipapo (*Genipa Americana* L.) Brazilian accessions. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 345-355, 2014a.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F.; BASTOS, J.; SILVA, C. B. Microencapsulation: concepts,

mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1304-1311, 2014b.

SILVA, C. M.; SILVA JUNIOR, T. L.; PINTO JUNIOR, I. M. Caracterização reológica de fluidos não newtonianos e sua aplicabilidade na indústria. **Cadernos de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 5, p 285-300, 2019.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1994.

SMITH, A. L. **Applied Infrared Spectra**. New York: John Wiley & Sons, 1979.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, p. 140-156, 2013.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2 ed. Freeman Press, 1996.

STORZ E, STEFFENS KJ. Feasibility study for determination of the dextrose equivalent (DE) of starch hydrolysis products with near-infrared spectroscopy (NIRS). **Starch/Stärke**, v. 56, p. 58-62, 2004.

TIMILSENA, Y. P.; AKANBI, T. O.; KHALID, N.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1276–1286, 2019.

TOUYAMA, R.; INOUE, K.; TAKEDA, Y.; YATSUZUKA, M.; IKUMOTO, T.; MORITOME, N.; MORITOME, N.; SHINGU, T.; YOKOI, T.; INOUE, H. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II. On the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p. 1571-1578, 1994.

UEDA, S.; IWAHASHI, Y. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1677-1680, 1991.

VILLAS-BOAS, F.; FRANCO, C. M. L. Effect of bacterial $\beta$ -amylase and fungal $\alpha$ -amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 795–803, 2016.

WANG, Q. S.; XIANG, Y.; CUI, Y. L.; LIN, K. M.; ZHANG, X. F. Dietary blue pigments derived from genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF- $\kappa$ B inactivation. **PLoS ONE**, v. 7, e34122, 2012.

WANG, S.; TSENG, T.; HUANG, C.; TSAI, T. Gardenia herbal active constituents: applicable separation procedures. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 193-202, 2004.

XAVIER, M.; XAVIER, A. T. T. N. Jenipapo: uma espécie indígena para reflorestar. **Cerrado**, v.8, p. 20-23, 1976.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um corante alimentício natural, de coloração azul, a partir de frutos verdes de jenipapo (*Genipa americana* L.), empregando diferentes técnicas de encapsulação.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Padronizar a técnica de extração de genipina e elaboração de corante azul de jenipapo (genipocianina G1);
- Encapsular o corante obtido, utilizando as técnicas de *spray drying* e emulsificação combinada com liofilização;
- Caracterizar as microcápsulas de corante elaboradas;
- Otimizar as concentrações dos componentes utilizados na formulação do corante pelas diferentes técnicas.

---

**III. CAPÍTULO I – Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: a review**

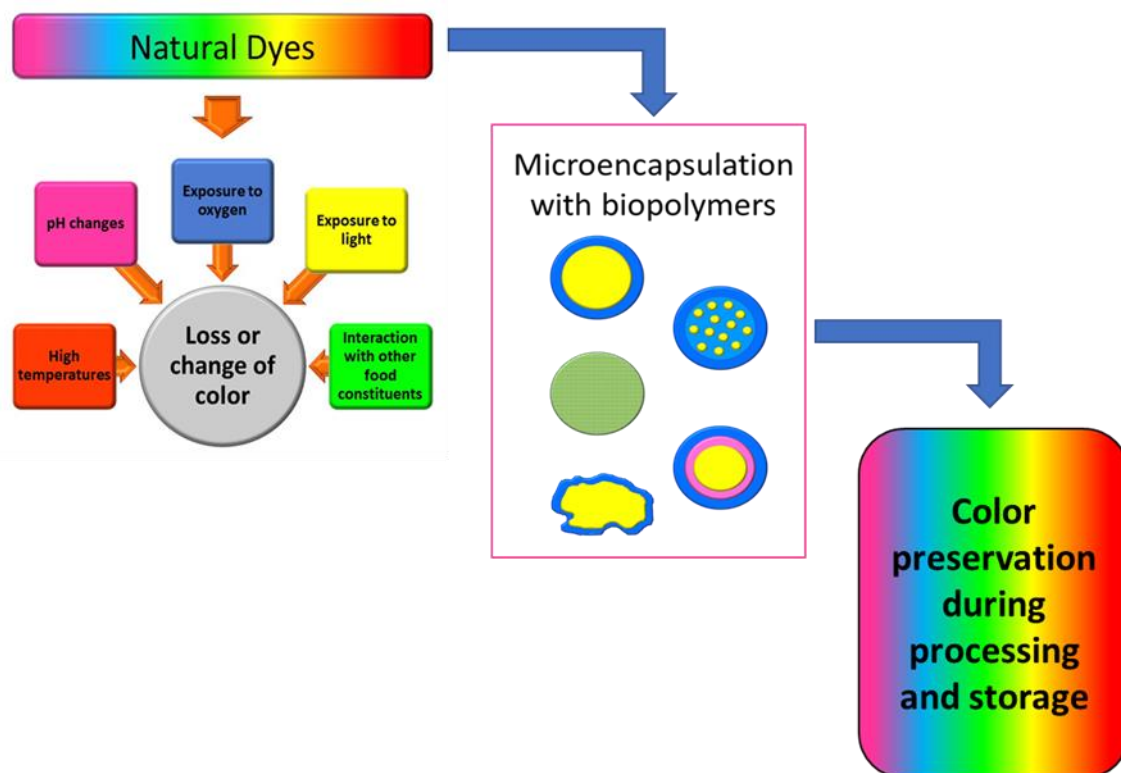
Publicado na revista Food Hydrocolloids (Qualis A1, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106374>)

---

## Abstract

Microencapsulation is a technique increasingly studied in food science aimed to increase stability and control the release of aromas, dyes, antioxidants, nutrients, enzymes, preservatives, and microorganisms. The most commonly used wall materials include hydrocolloids, proteins, starches, dextrans, lipids, various emulsifiers, and fibers, alone or associated with other compounds. Encapsulation techniques are diverse, and the choice of the most appropriate technique depends on the material to be encapsulated, the purpose of use, and the availability of equipment. In the case of the core material, several studies have focused on the encapsulation of natural dyes, due to the increasing market demand for this type of food additive. This review focuses on the microencapsulation of natural food dyes, presenting the main encapsulated compounds and wall materials, as well as the techniques used for this purpose.

**Keywords:** natural food coloring; biopolymers; wall materials; encapsulation techniques.



**Graphical abstract.** Factors that promote discoloration or color change of natural dyes and color preservation through encapsulation with biopolymers.



### 3.1 Introduction

The use of dyes is a common practice in the food industry, to provide or enhance the color of food products, making them more attractive to the consumer. From a technological point of view, the use of these additives is justified since some foods lose color during processing and storage, requiring the addition of dyes to compensate for these changes (Codex Alimentarius Commission, 2000; Esquiavel, 2016).

In general, artificial dyes have greater stability and lower price when compared to natural dyes, being, therefore, more advantageous concerning the costs and standardization of the product. However, there is evidence of health risks associated with the consumption of artificial dyes, such as carcinogenic potential and the development of allergies (Freitas, 2012; Prado & Godoy, 2003).

Although food dyes are evaluated by national and international commissions, as well as any food additive, there are limitations in this process, especially concerning allergenic potential. Therefore, several countries have sought to regulate the use of artificial coloring agents, aiming to increase the safety of consumers, by restricting or prohibiting the use or by mandatory information on labels about their presence (Codex Alimentarius Commission, 2000). The greater rigor in the use of artificial additives is also due to the increasing pressure from various segments on the appeal of a natural product-derived compound as quality improvement, suggesting natural foods as completely harmless, even though the toxicological information is insufficient (Araújo, 2019).

The use of natural dyes has been increasingly encouraged and used as a marketing strategy due to its diverse biological functionalities, such as antimicrobial and antioxidant activities, potential health benefits such as the prevention of chronic non-communicable diseases (NCDs), besides being found in various foods commonly consumed by the population, without health risks (Esquiavel, 2016; Rodriguez-Amaya, 2016). Among the known natural dyes, carotenoids stand out as an alternative to the use of yellow and orange dyes (Rascón, Beristain, García, & Salgado, 2011), while betalains and anthocyanins can replace red, yellow, and purple dyes (Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno, & Osorio, 2015; Rosa et al., 2019), chlorophylls give green color (Porrarud & Pranee, 2010), and genipin and phycocyanin, which can be used as substitutes for blue dyes (Brauch, Zapata-Porras, Buchweitz, Aschoff, & Carle, 2016; Chaiklahan, Chirasuwan, & Bunnag, 2012; Neri-Numa, Pessoa, Paulino, & Pastore, 2017).

However, there are technological limitations to the use of natural dyes, as they are generally sensitive to oxidation and high temperatures, which lead to marked discoloration during processing and storage, reducing the sensory quality of products containing these dyes (Esquiavel, 2016). Therefore, the use of techniques that increase the stability of these products is essential.

Encapsulation (nano and microencapsulation) is a technique for processing natural dyes widely studied in recent years, which allows increasing the stability of coating materials by limiting their interaction with air and other food constituents. This technique also minimizes the effects of high temperatures on the dyes, the reduction of water activity (which reduces microbial growth and the costs of storage and transportation) besides allows the use of these compounds in foods in which they would be incompatible due to pH or solubility conditions (Jafari, 2017; Rodriguez-Amaya, 2016).

Given the above, consumer claims for natural products free from artificial additives have generated a demand for the food industry, which needs to adapt to this niche market, thus requiring further studies with natural additives. In the case of dyes, it is essential to know their characteristics concerning their potential and limitations and to analyze the most appropriate techniques for increasing stability. This review presents the encapsulation techniques that can be used to increase stability and improve the possibilities of using natural dyes in foods.

### **3.2 Natural food colorings**

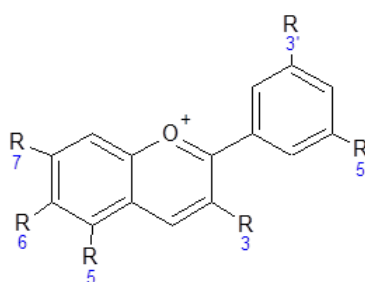
Natural dyes are chromophoric compounds produced by plants, animals, or microorganisms. These substances have very different characteristics, such as color, stability, and solubility (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2018; Rodriguez-Amaya, 2016). The main natural dyes used in foods are presented below.

#### ***2.2.1. Anthocyanins***

Anthocyanins are water-soluble dyes, belonging to the flavonoid class, responsible for a variety of attractive colors of fruits, flowers, and leaves, ranging from red to blue. The anthocyanin nomenclature is quite complex. The term anthocyanin describes the glycosylated form, usually found in nature. The anthocyanin molecule is usually composed of two or three fractions: a basic non-glycosylated structure called anthocyanidin, consisting of an aglycone, that possesses the main nucleus of the molecule

and consists of three rings with conjugated double bonds, which represents the chromophore constituent (Figure 1); one or more sugar molecules; and often one or more molecules formed between an acid and a sugar molecule. Anthocinnamic constituents are recognized for their antioxidant activity and their role in reducing the risk of developing NCDs (Damodaran et al., 2018; Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000). In addition to the most common anthocyanin sources, such as grapes and jaboticaba, several other anthocyanin sources have been studied, such as purple rice, black corn, chokeberry, and blueberry (Das, Goud, & Das, 2019; García-Tejeda, Salinas-Moreno, & Martínez-Bustos, 2015; Pieczykolan & Kurek, 2019; Rosa et al., 2019).

Several factors, such as high temperatures, exposure to light and oxygen, interaction with other food components, such as enzymes, ascorbic acid, sulfites, metal ions, other phenolic compounds, and sugars, interfere with the stability of anthocyanins. However, its most remarkable characteristic is pH instability, since pH variations lead to structural changes that result in the formation of compounds with different colors, including yellow, blue, purple and red, or even become colorless (Araújo, 2019; Damodaran et al., 2018; Rodríguez- Amaya, 2016; Rodríguez-Amaya, 2019). Such instability demonstrates the need to use techniques that can allow the use of anthocyanins in different food matrices.



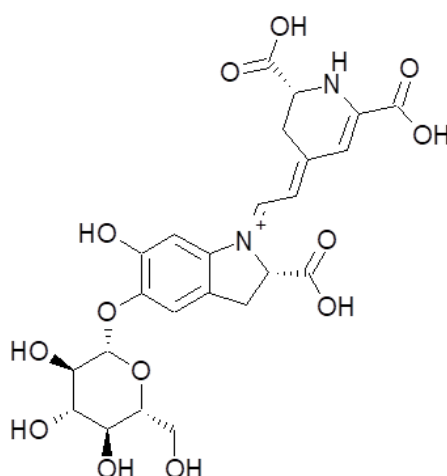
**Figure 1.** Basic structure of an anthocyanidin, the chromophore constituent of anthocyanins (the R radicals are usually replaced by OH, H, OCH<sub>3</sub> groups, giving rise to several anthocyanidins).

### 2.2.2. *Betalains*

Betalains are water-soluble dyes that contain nitrogen (Figure 2), divided into betacyanins and betaxanthines. The red and violet tones result from different substitution patterns in betacyanins, while different side chains of amino acids or amines determine the color of betaxanthines (Damodaran et al., 2018; Delgado-Vargas et al., 2000). The main source of commercial betacyanin is red beet (*Beta vulgaris* L.).

These compounds are an alternative to synthetic dyes, and present stability over a wide pH range (3.0 to 7.0), high molar extinction coefficient, in addition to being neither toxic nor allergenic. Degradation during the processing or storage includes chemical reactions such as isomerization, deglycosylation, hydrolysis, decarboxylation, and dehydrogenation, leading to changes in color and absorption. Factors that affect the stability of betalains in food include its chemical structure, amount of dye, matrix, additives, enzymes, pH, heat treatment, water activity, exposure to oxygen and light, and storage temperature (Esquiavel, 2016).

In addition, betalains may have a residual earthy flavor as a limitation of use, conferred by the presence of geosmin and pyrazine derivatives in their extract. This characteristic highlights the importance of studies on more efficient purification methods or the use of techniques that can suppress undesirable aromas and increase stability (Otálora et al., 2015; Rodriguez-Amaya, 2019; Soto-Castro et al., 2019).

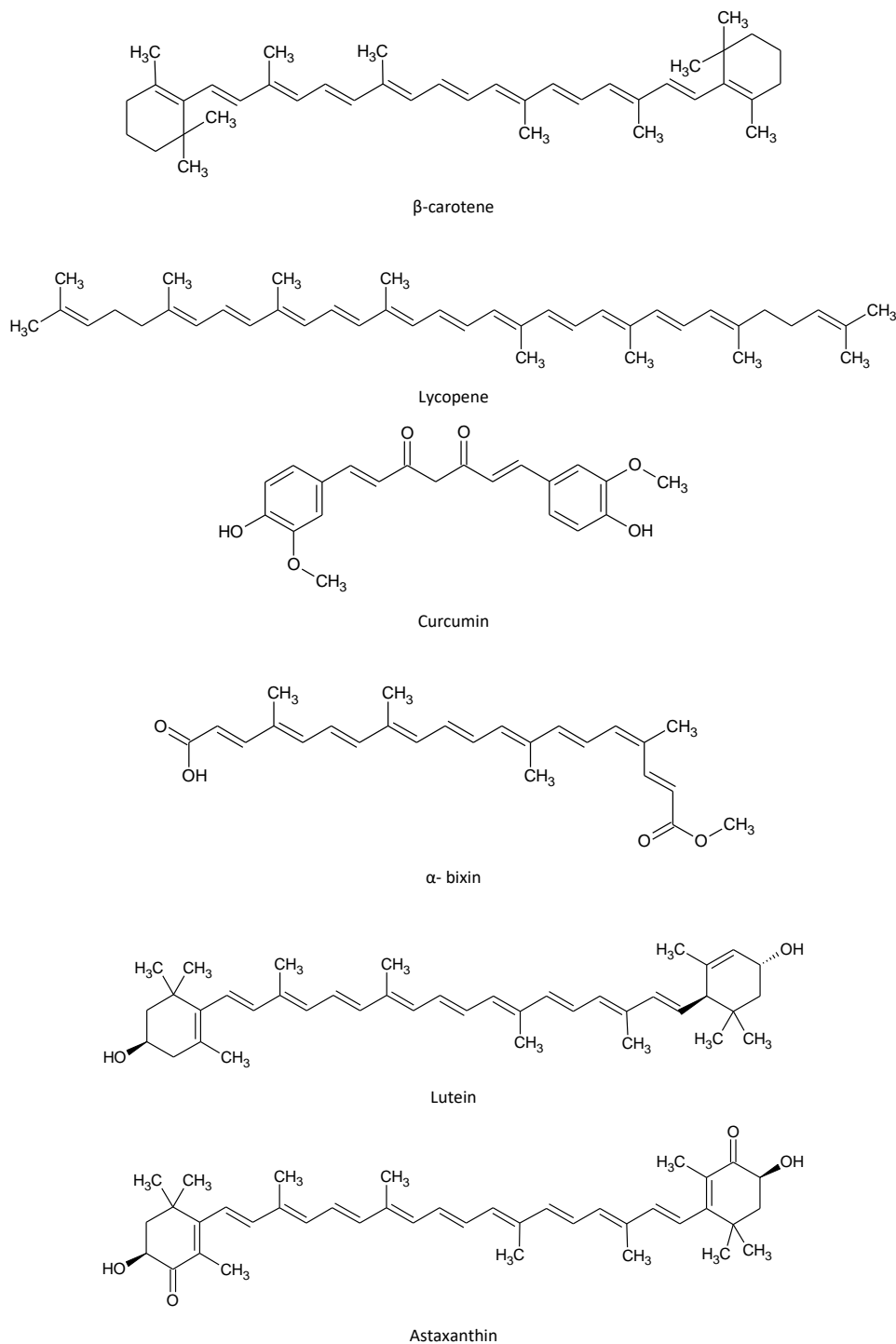


**Figure 2.** Structure of betanine, the main betalain found in red beet (*Beta vulgaris* L.).

### 2.2.3. Carotenoids

Carotenoids (Figure 3) are tetraterpenoid compounds formed by the union of eight isoprenoid units, with a long chain of conjugated double bonds, forming a chromophore system. According to the distribution and quantity of double bonds, yellow, orange, and red compounds are formed, which is present in various foods. More than 650 carotenoids are known, disregarding cis and trans isomers, and about 100 of these have already been identified in food. The  $\beta$ -carotene ( $\beta$ ,  $\beta$ -carotene),  $\alpha$ -carotene ( $\beta$ ,  $\epsilon$ -carotene),  $\beta$ -cryptoxanthin ( $\beta$ ,  $\beta$ -caroten-3-ol), lycopene ( $\psi$ ,  $\psi$ -carotene), lutein ( $\beta$ ,  $\epsilon$ -carotene-3,3'-

diol), zeaxanthin ( $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-3,3'-diol) and astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ - $\beta$ -carotene-4,4'-dione) are the most studied due to their biological functionality and availability in foods most commonly consumed by the population (Rodriguez-Amaya, 2015).



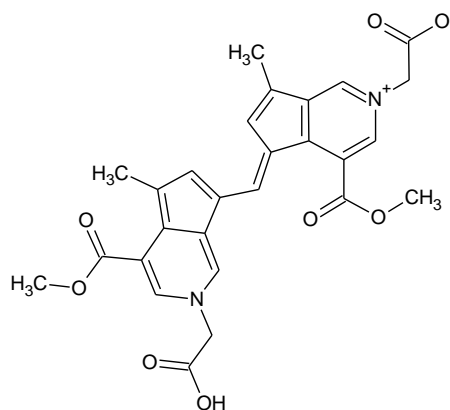
**Figure 3.** Structures of the main carotenoids used as food dyes.

In addition to their antioxidant capacity,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -cryptoxanthin are pro-vitamin A compounds, as their molecules have an unsubstituted  $\beta$ -ring followed by an 11-carbon polyenic chain. This structural arrangement occurs twice in  $\beta$ -carotene, thus it is considered the carotenoid with the highest pro-vitamin A activity, because its molecule can give rise to two retinol molecules (vitamin A), while  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin have about 50% of  $\beta$ -carotene activity, as they give rise to only one retinol molecule; in contrast, lutein, zeaxanthin, and lycopene do not present such activity. The conversion of these carotenoids to retinol occurs *in vivo* after eating foods containing these compounds (Campos & Rosado, 2005; Rodriguez-Amaya, 2015).

Although carotenoids have been used for some time by the food industry for coloring purposes, including bixin and norbixin, curcumin, lycopene, lutein, astaxanthin and  $\beta$ -carotene, carotenoids have several limitations regarding stability, due to their sensitivity to oxidation during common processing conditions, such as the presence of oxygen, exposure to light and high temperatures, which demands studies on techniques to increase its stability (Barbosa, Borsarelli, & Mercadante, 2005; O'Toole et al., 2012; Rascón et al., 2011; Rodriguez-Amaya, 2019; Spada, Marczak, Tessaro, & Noreña, 2012).

#### **2.2.4. Genipocyanin**

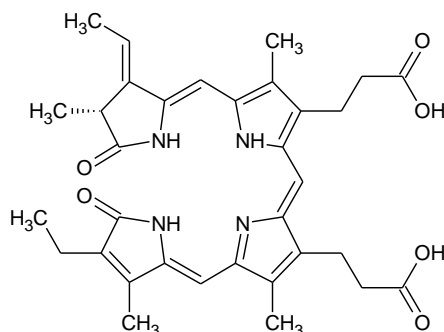
Genipocyanin G1 (Figure 4) is a natural dye resulting from the reaction between genipin and primary amines and the formation of dimers. Genipin is an iridoid present in the green fruits of genipap (*Genipa americana* L.) and gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis). Despite having good stability at high temperatures and in a wide pH range, genipocyanins can polymerize and form complex compounds, becoming darker, in addition to undergoing oxidation and blackening. Such reactions can compromise the standardization of products containing this dye, thus studies on increasing stability and decreasing undesirable changes are necessary. Encapsulation emerges as an important alternative in this context (Brauch et al., 2016; Neri-Numa et al., 2017; Ramos-De-La-Peña et al., 2014; Renhe, Stringheta, Silva, & Oliveira 2009). Studies have shown the functional and therapeutic potential of blue dyes derived from genipin, with an emphasis on anti-inflammatory activity (Wang, Xiang, Cui, Lin, & Zhang, 2012).



**Figure 4.** Structure of genipocyanin G1 (dimer).

### 2.2.5. *Phycocyanin*

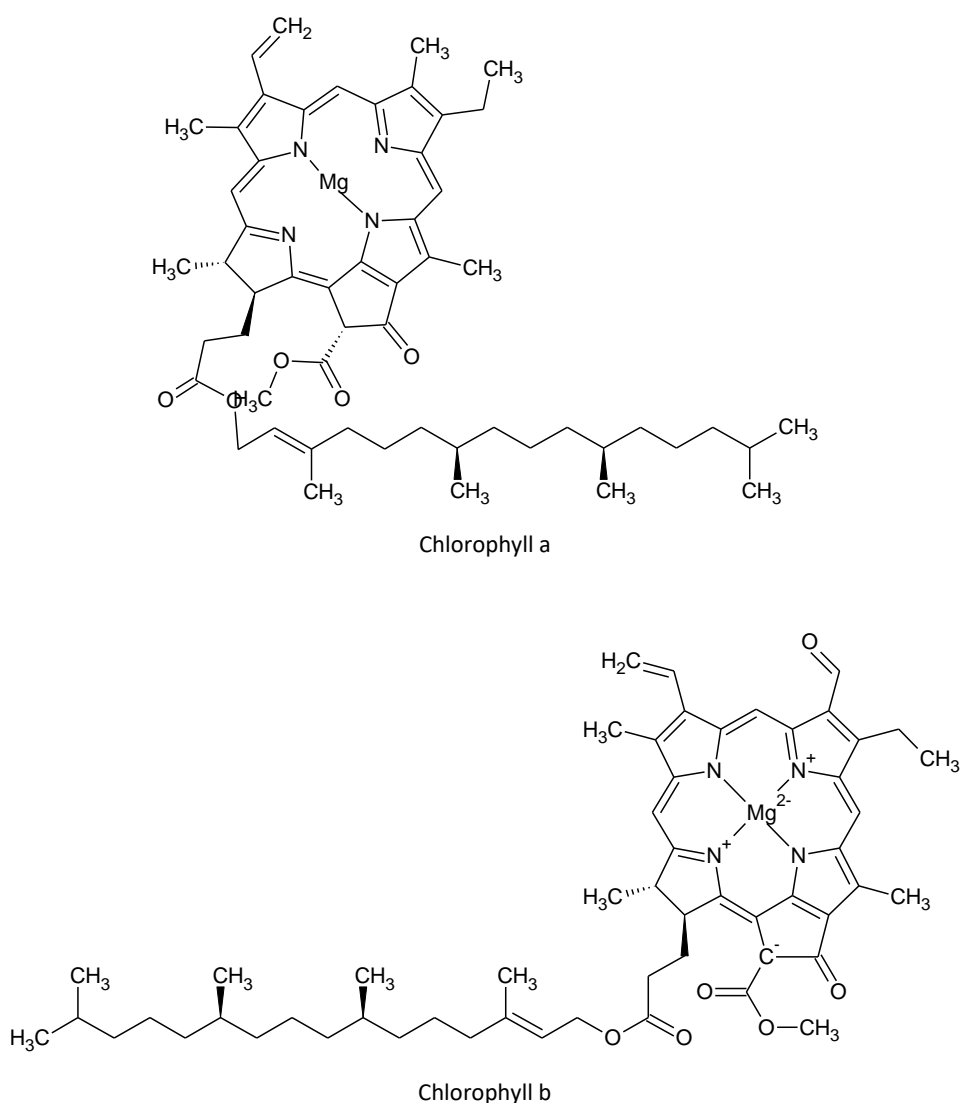
Phycocyanin is another natural blue dye that has been studied in recent years. This dye is extracted from the dry biomass of the cyanobacteria of the genus *Spirulina* (synonyms: *Arthrospira platensis* and *Arthrospira maxima*). It is a photosynthetic compound from the family of phycobiliproteins, characterized by its intense blue color. Its structure consists of a protein and a phycocyanobilin prosthetic group (Figure 5), which is the chromophore component of the structure. Despite its recognized antioxidant and anti-inflammatory activity, the dye is sensitive to light, pH variations (greater stability in pH between 5.5 and 6.0), high temperatures, and the concentration of proteins in the medium, which can lead to precipitation and color changes. This specificity limits its use in different foods, thus encapsulation can be used to reduce its interaction with other food components, minimizing such effects (Brauch et al., 2016; Chaiklahan et al., 2012; Rito-Palomares, Nuñez, & Amador, 2001).



**Figure 5.** Structure of phycocyanobilin.

### 2.2.6. Chlorophylls

Chlorophylls are also photosynthetic compounds, characteristic of the plant kingdom. Its molecules are characterized by a porphyrin ring that complexes a magnesium atom. Chlorophylls a and b (Figure 6) are the most commonly found, being characteristic of green-colored vegetables. They are sensitive to microwave treatments, high temperatures, and acidic pH (3.5-5.0). The exposure of chlorophylls to acidic media leads to the replacement of magnesium in its structure by two hydrogen atoms, producing phaeophytin, brown in color, and the reaction is favored by high temperatures. In addition, these compounds are pro-oxidants, which limits their use in free form (Damodaran et al., 2018; Rodriguez-Amaya, 2016).



**Figure 6.** Structures of chlorophylls a and b.

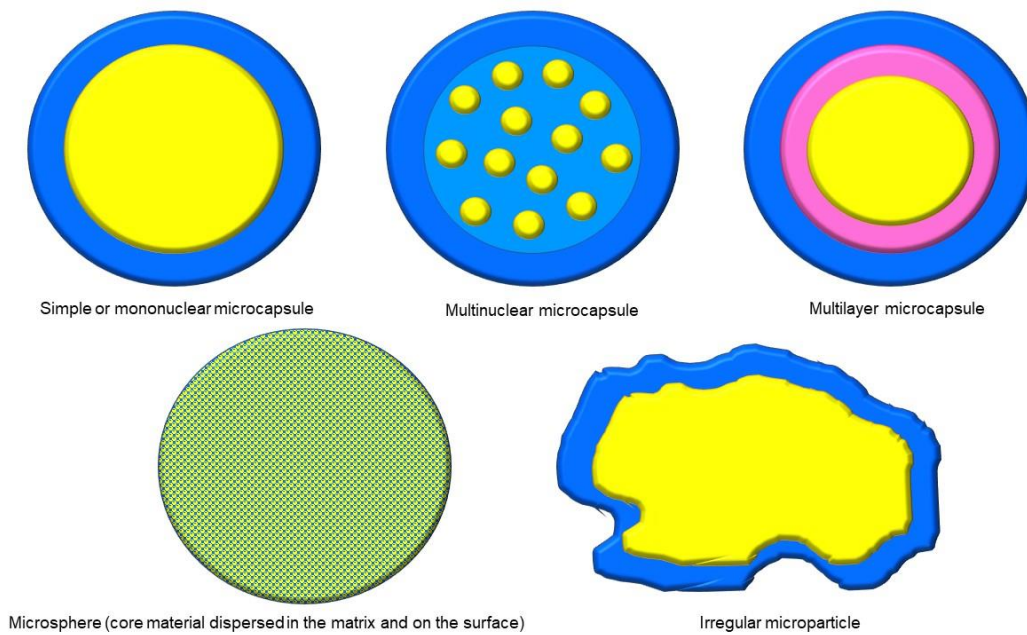


Several treatments have been proposed to increase the stability of chlorophylls during thermal processing. The alkalization of the medium presented several disadvantages, including alteration of texture, the formation of off-flavors and unpleasant aromas, crystal formation, and reduction of nutritional quality due to the degradation of vitamins, such as riboflavin. The addition of zinc or copper salts is also a common practice. Zinc interacts with chlorophyll, forming a zinc-chlorophyll complex, which gives rise to the zinc-pheophytin and zinc-pyropheophyte derivatives during processing, which has a bright green color. A similar coloring is produced by adding copper salts. The microencapsulation of these compounds has also been studied as a method of producing natural powdered dyes, due to the greater stability and lower costs of storage and transportation (Damodaran et al., 2018; Porrarud & Pranee, 2010; Ribeiro & Seravalli, 2004).

### **3.3 Microencapsulation techniques**

Microencapsulation is a process in which sensitive particles are surrounded by a resistant coating material, which should form an uninterrupted film to protect the ingredient of interest. This process has been widely studied in Food Science, to increase stability and control the release of flavorings, dyes, antioxidants, nutrients, enzymes, preservatives, and microorganisms. The encapsulation of dyes aims to protect these compounds against light, heat, moisture, and oxidation, providing an increase in shelf life and greater stability during processing (Gaonkar, Vasisht, Khare, & Sobel, 2014; Jafari, 2017).

The size of the microparticles obtained by the microencapsulation process is varied, ranging from one micrometer to several millimeters. Its shape is also diverse, with a distinction between microcapsules, microspheres, or microparticles (Figure 7). In microspheres, a small fraction of the encapsulated material remains exposed on the surface, which does not occur in the microcapsules. The microparticles may not have a spherical shape, as observed in processes that require crushing after encapsulation, as in freeze-drying. Microcapsules can have one or more cores, as well as several layers of walls for the same core (Favaro-Trindade, Pinho, & Rocha, 2008; Krithika, Radhai, Ravindra, & Thirupathi, 2014; Saifullah, Shishir, Ferdowsi, Rahman, & Van Vuong, 2019; Singh, Hemant, Ram, & Shivakumar, 2010).



**Figure 7.** Basic shapes of microcapsules, microspheres and microparticles.

Several techniques have been used to produce microparticles. Such techniques can be classified into physical methods (spray drying, spray chilling, spray cooling, extrusion, multi-hole centrifugal extrusion, co-crystallization, fluidized bed coating, and freeze-drying), chemical methods (molecular inclusion by complexation and interfacial polymerization), and physicochemical methods (coacervation, organic phase separation, emulsion system, and liposome formation) (Azeredo, 2008; Favaro-Trindade et al, 2008; Gonçalves, Estevinho & Rocha, 2016).

Table 1 presents a summary of the main techniques used for the microencapsulation of compounds for use in food.

Among the microencapsulation methods, spray drying has stood out as the most widely used microencapsulation technique, due to some advantages, including:

- i. Equipment availability, as they are widely used in the food industry, enabling large-scale production.
- ii. Good encapsulation efficiency when operating parameters are adjusted properly.
- iii. Possibility of using wall materials from different sources.
- iv. Increased stability and reduced transport and storage costs due to the powdered form of the final product, with no need for preliminary or later preparation steps.

**Table 1.** Main microencapsulation techniques applied to food products.

<b>Encapsulation techniques</b>	<b>Principle of the method</b>	<b>Reference</b>
Spray drying	Atomization of a solution, suspension, or emulsion into a wall and core material under a hot air current, resulting in instant drying and spraying of the mixture, in which the wall material covers the compound of interest.	Silva et al., 2014; Castro-Rosas et al., 2017.
Spray chilling or spray cooling	Atomization of a mixture into a wall and core material under a cold air current, resulting in the droplets solidification, in which the wall material (usually lipids) covers the compound of interest.	Silva et al., 2014.
Spray desolvation	Atomization of a polymer solution over a solvent in which it is not miscible, with instant solidification.	Silva, Ribeiro, Ferreira, & Veiga, 2003.
Fluidized bed coating	Suspension of the particles of the core material in an upward stream of hot air, forming a fluidized bed, while nebulizing a solution of the wall material, which covers the compound of interest.	Silva, Ribeiro, Ferreira, & Veiga, 2003.
Extrusion	Reaction of a polysaccharide that forms a film when in contact with an ion, immobilizing the core, as observed in the reaction with sodium alginate for the encapsulation of sensitive materials (ion gelatinization). The solution containing alginate and the material to be encapsulated is dripped into a solution of a divalent ion, such as calcium, producing the microparticles.	Silva et al., 2014; Castro-Rosas et al., 2017.
Molecular inclusion complex	Accommodation of a relatively small molecule or part of a molecule in the circular structure of cyclodextrin, through non-covalent interactions, similar to a complexation reaction.	Castro-Rosas et al., 2017.

Co-crystallization	Crystallization of sugar together with the material of interest, producing imperfect crystals that trap the core material.	Fang & Bhandari, 2010.
Emulsification	Dispersion of the core material in an organic solvent containing the wall material, followed by emulsifying the material in oil or water, together with a stabilizer. The solvent is evaporated with stirring, thus forming globular microparticles.	Silva et al., 2014, Castro-Rosas et al., 2017.
Coacervation	Affinity deposition of the polymer that makes up the wall material around the core, by changing the physicochemical characteristics of the medium, such as temperature, ionic strength, pH, solubility, and polarity. In simple coacervation, only a single macromolecule is present and coacervates are formed by the unavailability of the solvent. In the complex coacervation, there are two or more oppositely charged polymers, usually proteins and polysaccharides, and coacervation occurs mainly through electrostatic interactions.	Silva et al., 2014; Castro-Rosas et al., 2017; Timilsena, Akanbi, Khalid, Adhikari, & Barrow, 2019.
Spray-polycondensation	Condensation of a reactive water-soluble monomer by nebulizing a solution or dispersion of the core material with monomers and catalysts. Polymerization occurs around the core material, which is then encapsulated.	Silva, Ribeiro, Ferreira, & Veiga, 2003.
Freeze-drying	Drying of frozen material, by sublimation of water under vacuum. It can be preceded by the formation of a matrix that will be sprayed after drying, forming microspheres/microparticles, or by techniques such as the preparation of an emulsion, coacervates, or extrusion products, to increase the shelf life and material stability.	Silva et al., 2014.

Despite the advantages of spray drying, the resulting product may not be uniform, and the high temperatures required in the process can lead to the degradation of natural dyes (Gharsallaoui et al., 2012; Silva et al., 2014).

Therefore, cold processing techniques to prevent thermal degradation have emerged as alternatives for the encapsulation of natural dyes, with an emphasis on coacervation, emulsification, extrusion, and ionotropic gelation methods, which are low cost and require a simple operation. The encapsulation efficiency of these techniques can reach almost 100%, preventing the oxidation of the core material, and increasing the shelf life of the microcapsules. However, the limitations of these methods include the need for further treatments, such as freeze-drying, which considerably increases costs and processing time (Castro-Rosas et al., 2017; Silva et al., 2014; Timilsena et al., 2019). Therefore, the dissemination of freeze-drying in the food industry is expected to reduce the operation costs.

### **3.4 Wall materials**

The wall material, usually a polymer, is responsible for coating the compound of interest, forming the particle. The wall materials used in the microencapsulation of sensitive compounds should present some fundamental characteristics, with emphasis on the film-forming ability, and production of solutions with low viscosity, and must not interact with the core material. Other characteristics, such as pH stability, solubility, emulsifying capacity, and porosity of the final material should be considered. In addition, the type of material to be encapsulated (for example, lipids that will be dispersed in aqueous solutions) or final application of the microparticles (as aromas that are released during chewing and encapsulated vitamins that must be bioavailable in the gastrointestinal tract) must be considered. Thus, several biopolymers meet the basic requirements for wall materials and are toxicologically safe (Gaonkar et al., 2014; Jafari, 2017).

#### ***2.4.1. Starch and derivatives***

Starch is an energy reserve polysaccharide found in vegetables in the form of granules. Starch granules are formed by the polymers amylose and amylopectin, the first being characterized by an essentially linear chain composed of D-glucose molecules joined by  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) glycosidic bonds, while the latter is characterized by a branched-

chain of D-glucose molecules joined by  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) bonds and  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) bonds, creating branch points. Amylopectin is responsible for the crystalline zones in native starch, while amylose favors the formation of starch networks in the gelatinization process (Damodaran et al., 2018).

Starch has been used as a wall material for microencapsulation of various compounds, such as oils, vitamins, dyes, antioxidants, among others. However, the use of native starches for this purpose can bring some drawbacks, such as the need for gelatinization for solubilization, increasing the starch paste viscosity, which can reduce the recovery of the microparticles at the end of the process. To reduce these effects, several starch modifications have been proposed, mainly those that reduce the paste viscosity and allow the formation of the film necessary for encapsulation, such as dextrinization, oxidation, and the inclusion of lipophilic groups (Damodaran et al., 2018; Storz & Steffens, 2004; Sweedman, Tizzotti, Schäfer, & Gilbert, 2013).

Starch dextrinization consists of partial hydrolysis of starch by enzymatic action or by hot acids, giving rise to dextrans. The dextrose equivalent (DE) value indicates the degree of starch hydrolysis at the end of dextrinization, expressed as total reducing sugar compared to glucose, on a dry basis. The glucose monomer has a DE = 100, while the standard native starch has a DE = 0 and maltodextrins have a DE of less than 20. Maltodextrin has been widely used in microencapsulation processes, as it has the ability to form films with no significant increases in the viscosity of the encapsulating solutions (Loret, Meunier, Frith, & Fryer, 2004; Storz & Steffens, 2004). It has also been used in association with other polymers, as a drying aid, increasing the concentration of total solids in solution and reducing processing costs, including the costs with energy and raw material, by partially replacing other more expensive polymers (Mahdavi, Jafari, & Ghorbani, 2014; Rosa et al., 2019; Stoll, Costa, Jablonski, Flores, & Rio, 2016).

The starch oxidation process is a low-cost technique, carried out through fermentation followed by ultraviolet radiation by sun exposure, or through the use of oxidizing agents, such as sodium hypochlorite and hydrogen peroxide. This technique promotes starch depolymerization and the reduction of paste viscosity. Oxidation introduces small amounts of carboxyl and carbonyl groups in the starch molecule, reducing the association between amylose molecules, producing less viscous pastes, and less firm gels, when compared to native starch (Damodaran et al., 2018; Dias et al., 2011).

The insertion of lipophilic groups is carried out by the production of an alkenyl succinate ester of starch, which promotes the attachment of a hydrocarbon chain to the carbohydrate polymer. This modification is carried out by the action of octenyl succinic anhydride (OSA), in which hydrophobic octenyl groups are covalently bound to hydroxyls available in the starch glucose residues, giving the polymer an amphiphilic character. In addition to the emulsifying capacity and the reduction of the polymer chain length, which reduces the paste viscosity without compromising the film-forming ability, the presence of octenyl reduces the starch hygroscopicity, which is a desirable characteristic that increases the stability of microcapsules produced with this material. However, the use of octenyl succinic anhydride in modifying starch for food purposes is limited due to its toxicity, and the FDA (Food and Drug Administration) has allowed the use of a maximum of 3% w/w OSA in the process of modifying starch for food purposes (Agama-Acevedo & Bello-Perez, 2017; Damodaran et al., 2018; Sweedman et al., 2013).

#### ***2.4.2. Gums and mucilages***

Gums (guar, locusta, xanthan, carrageenan, agar, furcelans, alginates, gelan, curdlan, Arabica, Acacia) and mucilages are hydrocolloids from plant and microbial sources. They are characterized by being complex polymers, formed by several carbohydrate monomers, which can be associated with other compounds, such as proteins present in some mucilages. Due to their film-forming and gel-forming ability, these polysaccharides have been used in microencapsulation processes of several natural products, such as dyes, aromas, and bioactive compounds (Jantarathin, Borompichaichartkul, & Sanguandeeikul, 2017; Damodaran et al., 2018; Amaral et al., 2019; Pieczykolan & Kurek, 2019). At high concentrations, most of these hydrocolloids promote an increase in the viscosity of the solution, which may limit its use. In addition, there is often still the inconvenience related to the cost of production, once some gums are relatively expensive. Therefore, alternatives to their use have been studied, such as cactus mucilages still little commercially explored, as well as the mixture of these hydrocolloids with other low-cost polymers, with emphasis on maltodextrin (Mahdavi, Jafari, & Dehnad, 2016; Otálora et al., 2015; Soto-Castro et al., 2019; Stoll et al., 2016).

### 2.4.3. *Fibers*

Fibers are polysaccharides not digestible by human intestinal enzymes, mostly of plant origin, and chitosan is a representative of a fiber of animal origin. Several fibers have been used in microencapsulation processes, generally associated with other polymers, such as starch and maltodextrins. Among them, pectin, cellulose and its derivatives (carboxymethylcellulose and microcrystalline cellulose), inulin, and chitosan can be mentioned (Damodaran et al., 2018).

Pectin is a polymer found in the middle lamella and cell wall of higher plants, which is configured in a methylated ester of polygalacturonic acid. This polymer can be composed of 17 different types of monosaccharides, and D-galacturonic acid is found in greater proportion, followed by D-galactose and L-arabinose. Pectin has been extensively studied as a wall material for the encapsulation of several types of bioactive compounds, mainly in association with proteins (Rehman et al., 2019; Wusigale, Liang, & Luo, 2020; Yabe, 2018).

Chitosan is produced by extracting chitin from the crustacean exoskeleton, with subsequent deacetylation. This polymer has been widely studied as a wall material for the microencapsulation of compounds that should have controlled release, such as drugs, oils, and bioactive compounds, with emphasis on those with a lipophilic character. It is used alone or in combination with other polymers, such as alginate, xanthan gum, cyclodextrins, oligosaccharides, and whey proteins (Chang et al., 2020; Jantarathin et al., 2017; Lian, Pan, & Wang, 2016; O'Toole et al., 2012; Rosa et al., 2013; Rudke et al., 2019).

Inulin is a polymer essentially composed of fructose, which occurs as a carbohydrate reserve in several plant species. Due to its film-forming and gel-forming ability and its recognized prebiotic action, this polysaccharide has been used as a wall material in the encapsulation of bioactive compounds, dyes, and probiotic microorganisms (Lacerda et al., 2016; Pieczykolan & Kurek, 2019; Rosolen et al., 2019).

Cellulose is a linear polysaccharide of high molecular weight, with structural function in plant organisms. Cellulose derivatives, especially carboxymethylcellulose and microcrystalline cellulose, are widely used as ingredients and food additives, and present suitable characteristics for use as a wall material in encapsulation processes. Microencapsulation studies have used the association of these two materials with each other, and with other polymers, for the encapsulation of several compounds, such as dyes



and polyphenols, in addition to microorganisms (Feng, Li, Wang, & Zhu, 2018; Gaonkar et al., 2014; Huq et al., 2017; Wang, Jung, & Zhao, 2017; Zheng, Ding, Zhang, & Sun, 2011).

#### **2.4.4. Proteins**

Proteins are complex polymers made up of amino acids, with different properties, depending on their composition and their size and structural conformation. Several proteins have emulsifying property, and film-forming and gel-forming capacities, which are desirable characteristics during the encapsulation process. However, factors such as the isoelectric point and the gelatinization temperature should be considered, aimed to adjust the pH and temperature parameters during the encapsulation process, as well as to know the behavior of the protein used, as some factors that can promote the protein precipitation, such as the presence of salts and organic solvents (Damodaran et al., 2018).

In encapsulation processes, the proteins most commonly used are gelatin, soy protein, and whey protein, alone or in association with other polymers, both for their availability and their lower cost, when compared to other proteins. In addition, soy and whey proteins do not significantly increase the viscosity of encapsulating solutions, which is a desirable characteristic of wall materials. However, some limitations should be considered when using proteins as a wall material, such as their allergenic potential and high cost since polysaccharides and fats are more accessible materials (Mahdavi et al., 2016; Rascón et al., 2011; Rosolen et al., 2019; Rudke et al., 2019).

#### **2.4.5. Lipids**

Lipids are a class of widely diverse compounds, whose common characteristic is solubility in organic solvents. Its structure, composition, and size can affect other characteristics, such as packaging capacity and melting point (Damodaran et al., 2018).

For encapsulation, the most widely used lipids are those with emulsifying properties, such as phospholipids, including lecithins and fats with a high content of saturated fatty acids, which have plastic properties to act as a wall material. Lipids can be used alone or in combination with other materials, such as carbohydrates and proteins (Gonçalves et al., 2016; Huq et al., 2017; Łozińska, Głowacz-Różyńska, Artichowicz, Lu, & Jungnickel, 2020; Maurya, Bashir, & Aggarwal, 2020).

### 3.5 Microencapsulation of natural dyes

Microencapsulation has been extensively studied aimed to increase stability and expand the possibilities of using natural dyes in foods. Table 2 shows studies on the encapsulation of natural dyes, according to the core material, the wall material, the encapsulation technique, and the parameters used, as well as the main characteristics of the microparticles.

The spray drying technique was the most recurrent in the various studies with natural dyes, associated or not with other techniques. This choice is due to the advantageous cost-benefit, once fewer steps are required during the process, resulting in high encapsulation efficiency when the process parameters are adjusted accordingly. In addition, spray drying technology is widely used in the food industry, which also stimulates research into micro and nanoencapsulation of natural dyes by spray drying (Gaonkar et al., 2014; Ozkan, Franco, De Marco, Xiao, & Capanoglu, 2019).

Spray-drying encapsulation is characterized by its lower encapsulation efficiency. Studies have shown encapsulation yields ranging from 25 to 73%, which represents great processing losses. In addition, a detailed study on the processing parameters is required to prevent the degradation of natural dyes due to prolonged exposure to high temperatures. The encapsulation of natural dyes by spray drying may be unaffordable due to the high production costs arising from the losses, besides the waste disposal environmental impacts.

In the case of encapsulation technique, for hydrophobic dyes, such as carotenoids, the emulsification is essential, either as the main encapsulation technique or as a preliminary step to the main technique. Emulsification allows the best coating of the dye by the wall material and allows the microparticles to be solubilized in water (Chen, Li, Li, McClements, & Xiao, 2017; Gouin, 2004).

It is also observed the increasing use of starches and maltodextrin as wall materials, associated or not with other polymers such as gums and proteins. The use of these polysaccharides reduces the production costs and provide desirable characteristics to the microencapsulated dye, such as increasing water solubility and preventing inconveniences such as precipitation near the isoelectric point of protein (Chen et al., 2017; Lim, Griffin, & Roos, 2014; Zhang & Zhong, 2013; Zhu, 2017).

**Table 2.** Encapsulation conditions and characteristics of the different microparticles containing natural dyes.

<b>Dye / Core Material</b>	<b>Wall Material</b>	<b>Encapsulation technique</b>	<b>Parameters</b>	<b>Main results</b>	<b>References</b>
Anthocyanin ( <i>Euterpe edulis</i> )	Modified starch (OSA), inulin, and maltodextrin	Spray drying	Inlet / outlet temperature: $140 \pm 2$ °C / $59.6$ °C Air flow: $32 \text{ m}^3 / \text{h}$ Feed rate: $360 \text{ mL} / \text{h}$	Yield: 33.4% Dye retention: 16.2 mg / g, equivalent to 19.4%	Lacerda et al., 2016
Anthocyanin ( <i>Berberis vulgaris</i> )	Maltodextrin and gum Arabic  Maltodextrin and gelatin  Maltodextrin	Spray drying	Inlet / outlet temperature: $150$ °C / $100$ °C Feed rate: $800 \text{ mL} / \text{h}$	Encapsulation efficiency: 96.215%  Encapsulation efficiency: 94.972%  Encapsulation efficiency: 93.087%	Mahdavi, Jafari, & Dehnad, 2016
Anthocyanin ( <i>Euterpe edulis</i> )	Modified waxy corn starch (Hi-Cap® 100), gum Arabic, whey protein concentrate / soy protein isolate	Spray drying	Inlet / outlet temperature: $150$ °C / $90-98$ °C Air flow: $0.5 \text{ m}^3 / \text{h}$ Feed rate: $300 \text{ mL} / \text{h}$	Yield:> 55.7% Dye retention:> 85.9%	Santana, Cano-Higueta, Oliveira, & Telis, 2016
Anthocyanin ( <i>Vaccinium spp.</i> )	Chitosan and tripolyphosphate	Extrusion (ionic gelation)	Agitation followed by centrifugation	Encapsulation yield: $0.27 \text{ g} / 41 \text{ mL}$	Wang, Jung, & Zhao, 2017

			(10,000g at 4 ° C for 10 min)	Dye retention: 32.54% Encapsulation yield: 6.87g / 41 mL Dye retention: 94.02%	
Anthocyanin ( <i>Aronia menalocarpa</i> )	Maltodextrin and guar gum  Maltodextrin and gum Arabic  Maltodextrin and pectin	Spray drying	Inlet temperature: 140 ° C Feed rate: 100 mL / h	Encapsulation efficiency: 92.98% Vitamin C degradation in 7 days: 22.11% Anthocyanins degradation in 7 days: 5.81%  Encapsulation efficiency: 78.61% Vitamin C degradation in 7 days: 7.72% Anthocyanins degradation in 7 days: 20.42%	Pieczykolan & Kurek, 2019

	Maltodextrin and beta-glucan		Encapsulation efficiency: 91.85% Vitamin C degradation in 7 days: 36.75% Anthocyanins degradation in 7 days: 7.07%
	Maltodextrin and inulin		Encapsulation efficiency: 92.78% Vitamin C degradation in 7 days: 16.27% Anthocyanins degradation in 7 days: 6.04%
			Encapsulation efficiency: 88.37% Vitamin C degradation in 7 days: 46.96% Anthocyanins degradation in 7 days: 10.38%

Anthocyanin ( <i>Vaccinium</i> spp.)	Maltodextrin and resistant corn starch with high amylose content	Spray drying	Inlet / outlet temperature: 140 ° C / 100 ° C Feed rate: 450 mL / h	Encapsulation efficiency: 77.05% Stability: half-life of 115.47 days	Rosa et al., 2019
Astaxanthin ( <i>Haematococcus pluvialis - oleoresina</i> )	Gum Arabic  Whey protein  Gum Arabic and whey protein  Gum Arabic and inulin  Gum Arabic and maltodextrin	Spray drying	Inlet / outlet temperature: 120 ° C / 70 ° C Air flow: 32.9 m <sup>3</sup> / h	Yield: 58.65% Dye retention: 8.88 µg / mg  Yield: 63.00% Dye retention: 8.76 µg / mg  Yield: 61.20% Dye retention: 8.94 µg / mg  Yield: 38.95% Dye retention: 9.06 µg / mg  Yield: 50.95% Dye retention: 8.99 µg / mg	Bustos-garza, Yáñez-fernández, & Barragán-huerta, 2013

Astaxanthin ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	Sodium alginate, chitosan, and calcium chloride	Emulsification, ultrasonication, and extrusion (ionic gelation)	Agitation: 10,000 rpm for 15 min Ultrasonication: 40 kHz frequency at 130 W power	Encapsulation efficiency greater than 90% Maintenance of antioxidant activity above 50%	Taksima, Limpawattana, & Klaypradit, 2015
Astaxanthin ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	Cashew gum ( <i>Anacardium occidentale</i> L.) and gelatin	Complex coacervation and freeze-drying	Agitation with pH adjustment (the range of 3.5–5 has been studied) and ionic strength (ranging from 0 to 30 mM) Heating to $45 \pm 5$ °C followed by cooling to $10 \pm 1$ °C, under constant agitation Freeze drying (process conditions have not been presented)	Encapsulation efficiency: 59.9% Solubility in water: 28.6% Improved coloring ability and stability	Gomez-Estaca, Comunian, Montero, Ferro-Furtado, & Favaro-Trindade, 2016
Astaxanthin	Sodium caseinate	Emulsification	Agitation: 10,000 rpm for 5 minutes Homogenization: 4 cycles at 100 MPa	Physicochemical stability over 70% after 30 days of storage Bioavailability of 33%	Khalid et al., 2017

	Modified lecithin			Physicochemical stability close to 50% after 30 days of storage Bioavailability of 6%	
Astaxanthin ( <i>Phaffia rhodozyma</i> )	Zeine and oligoquitosan	Complex coacervation and freeze-drying	Agitation at 1,200 rpm for 90min Freeze-drying for 24 h (process conditions have not been presented)	Encapsulation efficiency: 94.34% Dye retention: 6.51 mg / g Stability: half-life of 71.4 weeks Improved stability to UV light and during storage	Jiang & Zhu, 2019
Astaxanthin	poly (l- lactic acid)	Supercritical anti-solvent (SAS)	Feed rate: 0.5-1.6 mL / min CO <sub>2</sub> flow: 20 g / min Temperature: 30-42 ° C Pressure: 80-120 bar	Encapsulation efficiency: 91.5% Encapsulation increased the astaxanthin stability	Liu et al., 2019
Beta carotene	Native tapioca starch	Spray drying	Inlet / outlet temperature: 170 ± 5 ° C / 95 ± 5 ° C	Dye retention: 68.35% Surface dye content: 104.08%	Loksuwan, 2007



	Modified tapioca starch (hydrolysate)  Maltodextrin			Dye retention: 82.18% Surface dye content: 19.59%  Dye retention: 46.74% Surface dye content: 73.02%	
Beta carotene	Native starch and pine nuts hydrolysate ( <i>Araucaria angustifolia</i> )	Freeze-drying	Pressure: 300 $\mu$ m.Hg Time: 30 h	4-6-fold reduction in beta-carotene degradation constant	Spada, Marczak, Tessaro, & Noreña, 2012
Beta carotene / Lutein	Trehalose, gum Arabic, sunflower oil, whey protein isolate	Emulsification (multilayer), coacervation and freeze-drying	Agitation: 10,000 rpm for 30 s Homogenization: 3 cycles at 240 bar Agitation for 30 minutes Refrigeration: -20 ° C (overnight) and -80 ° C (3 h) Freeze-drying: pressure <0.1 mbar for 72 h	Dye retention (beta-carotene): 50.7% after 70 days at 25 ° C	Lim, Griffin, & Roos, 2014

Beta carotene	Sodium caseinate, maltodextrin, and hydroxypropyl cellulose	Spray drying and fluidized bed coating	Spray drying Inlet temperature: $160 \pm 2$ ° C Air pressure: 0.5 MPa Feed rate: 1,080 mL / h  Fluidized bed coating Temperature: 70 ° C Feed rate: 420 mL / h	Dye retention: 0.126-0.285 mg / g Minimal color changes ( $\Delta E < 3$ ) of yogurt produced with the addition of encapsulated dye, stored in a refrigerator for 4 weeks.	Coronel-Aguilera & San Martín-González, 2015
Beta carotene	Whey protein isolate, corn oil, a sodium salt of alginic acid, and calcium chloride	Emulsification, ultrasonication, and extrusion (ion gelatinization)	Ultrasound: 40 kHz for 2 min Rotation: 10,000 rpm for 2 min Microfluidization: 3 passes at 12,000 psi Extrusion Frequency: 800 Hz Electrode: 800 V Pressure: 450 mbar	Encapsulation significantly reduced beta-carotene degradation during storage but compromised its bioavailability	Zhang, Zhang, & McClements, 2016
Beta carotene	Canola oil, sodium alginate, and calcium carbonate	Emulsification	Rotation: 1,000 rpm Time: 6h	Stability: half-life of 178-187 days	Soukoulis, Cambier, Hoffmann, & Bohn, 2016

Beta carotene	Maltodextrin	Emulsification, ultrasonication, and spray drying / freeze-drying	Emulsification: mixing in a mixer followed by 3 passes in a 12,000 psi microfluidizer Inlet / outlet temperature (spray drying): 100-120 ° C / 60 ° C Time (freeze-drying): 2 days	Beta-carotene remained more stable during freeze-drying, with greater losses in spray drying. The powders produced by freeze-drying showed better dispersibility, lower particle size, and better stability of the emulsion after reconstitution.	Chen, Li, Li, McClements, & Xiao, 2017
Betalain ( <i>Opuntia ficus-indica</i> )	Maltodextrin and palm cladodes ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ) mucilage  Maltodextrin	Spray drying	Inlet / outlet temperature: 170 ± 2 ° C / 98 ± 4 ° C Air flow: 100 m <sup>3</sup> / h Feed rate: 485 mL / h	Yield: 25.4% Dye retention: 0.497 mg / g Stability: 51.4 days half-life  Yield: 16.4% Dye retention: 0.495 mg / g Stability: half-life of 103.4 days	Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno, & Osorio, 2015
Betalain ( <i>Escontria chiotilla</i> )	Palm cladodes ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ) mucilage)	Spray drying	Inlet / outlet temperature: 140 ° C / 70 ° C	Yield: 53.01% Dye retention: 3.08 mg / g	Soto-Castro et al., 2019

			Feed rate: 330 mL / h		
Betalain ( <i>Stenocerus queretensis</i> )	Palm cladodes ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ) mucilage)	Spray drying	Inlet / outlet temperature: 140 ° C / 70 ° C Feed rate: 330 mL / h	Yield: 53.01% Dye retention: 3.08 mg / g	Soto-Castro et al., 2019
Bixin	Gum Arabic and sucrose  Maltodextrin and sucrose	Spray drying	Inlet / outlet temperature: 180 ° C / 130 ° C Feed rate: 30 mL / h	Dye retention: 86.4% No significant protection against photodegradation  Dye retention: 42.2% No significant protection against photodegradation	Barbosa, Borsarelli, & Mercadante, 2005
Bixin	Sodium caseinate and soluble soy polysaccharide	Spray drying and rehydration with coating	Agitation and homogenization: 15,000 rpm for 5 min Inlet temperature: 150 ° C Air flow: 35 m <sup>3</sup> / h Feed rate: 6.67 mL / h	Encapsulation reduced chemical decomposition and light sensitivity of bixin Coatings with soluble soy polysaccharide prevented the aggregation of the microcapsules at pH	Zhang & Zhong, 2013

				close to the casein isoelectric point	
Bixin	Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL), sorbitan monostearate, and capric / caprylic triglycerides	Coacervation (interfacial deposition of preformed polymers)	Agitation at 40 ° C in the absence of light, followed by concentration in a rotary evaporator	Greater stability of encapsulated bixin in light and at high temperatures	Lobato et al., 2015
Carotenoids ( <i>Capsicum annuum – oleoresina</i> )	Gum Arabic  Soy protein isolate	Emulsification and spray drying	Agitation and homogenization at 30,000 kPa	The higher the temperature used, the greater the dye retention in the microcapsules  The higher the temperature used, the greater the dye retention in the microcapsules	Rascón, Beristain, García, & Salgado, 2011
Carotenoids ( <i>Cucumis melo</i> L.)	Porcine gelatine (type A) and soybean oil	Emulsification and freeze-drying	Agitation: 17,000 rpm for 10 min  Freeze-drying Temperature: -57 ° C Pressure: 43 $\mu$ Hg	Dye retention: 90% Production of nanocapsules with good solubility in water	Medeiros et al., 2019

Chlorophyll-Zn ( <i>Pandanus amaryllifolius</i> )	Gum Arabic  Maltodextrin  Modified starch (OSA)	Spray drying	Inlet / outlet temperature: $150 \pm 5$ ° C / $90 \pm 5$ ° C Air flow: 42 m <sup>3</sup> / h Feed rate: 300 mL / h	Dye retention: ~ 1.2 mg / g Stability: half-life of 330 days  Dye retention: ~ 1.0 mg / g Stability: half-life of 385 days  Dye retention: ~ 1.9 mg / g Stability: half-life of 462 days	Porrarud & Pranee, 2010
Curcumin	Zeine, sodium caseinate, and sodium alginate	Emulsification (multilayer), coacervation and freeze-drying	Agitation at 750 rpm for 30 min Freeze drying (process conditions have not been presented)	Encapsulation efficiency: 76.06% Increase in photochemical stability Preservation of antioxidant activity Good water solubility	Liu, Jing, Han, Zhang, & Tian, 2019
Curcumin	Starch modified with 4- $\alpha$ -glucanotransferase	Freeze-drying	Agitation at 12,000 rpm for 10 min Mechanical stirring: 24h at 60 ° C	Increased solubility of curcumin in water and its stability to UV rays	Park, Rho, & Kim, 2019

			Centrifugation: 9,000 rpm, 15 min Freeze-drying of the supernatant: 4 days	at different pH conditions	
Curcumin	Lotus root amylopectin (AKI) and chitosan	Emulsification	Agitation	Encapsulation efficiency: 90.3% Improved water solubility	Liu, Huang, Zha, Li, Pan, & Luo, 2020
Curcumin	Ethylenediamine- $\beta$ -cyclodextrin	Molecular inclusion complex	Agitation and evaporation for 4 h Centrifugation: 10,000 rpm for 10 min	Encapsulation improved the corneal diffusivity of curcumin	Liu, Lee, Wu, & Wang, 2020
Phycocyanin	Polyvinyl alcohol (PVA)	Electrospray	Agitation for 16 h in the absence of light Injection through capillaries with a diameter of 0.70 mm (distance between capillary and collector 12 cm) Electrical potential: 15-25 kV Feed rate: 50-200 $\mu$ L / h Temperature: 20 $^{\circ}$ C	Encapsulation efficiency: 75.1 $\pm$ 0.2% Thermal resistance of microparticles: 216 $^{\circ}$ C	Schmatz, Mastrantonio, Costa, & Morais, 2020

			Relative humidity: 50 ± 5%		
Lycopene ( <i>Solanum lycopersicum</i> , var Romana)	β-cyclodextrin	Molecular inclusion and freeze-drying complex	Agitation for 16 h at 25 ° C under a nitrogen atmosphere	Encapsulation yield: 93.8% Stability:> 6 months	Blanch, del Castillo, del Mar Caja, Pérez-Méndez, & Sánchez-Cortés, 2007
Lycopene	Lecithin and α-tocopherol	Supercritical anti-solvent (SAS)	Feed rate: 0.2 mL / min CO <sub>2</sub> flow: 1.62 kg / h Temperature: 47 ° C Pressure: 8 MPa Time: 20 min	Less than 10% lycopene degradation (in 28 days of storage at 4 ° C)	Cheng, Lu, Huang, & Wu, 2017
Lycopene ( <i>Citrullus lanatus</i> )	Sodium alginate and calcium chloride  Partially methoxy amidated pectin	Extrusion (ion gelation)	Dripping in calcium chloride solution with stirring, keeping in solution for 30 min	Dye retention: 6375.6 ± 10.6 μg / g Stability: lycopene degradation below 20% after 8 weeks  Dye retention: 4007.3 ± 6.8 μg / g Stability: lycopene degradation below 20% after 8 weeks	Sampaio et al., 2019
Lycopene	Soybean oil, modified rice starch (by enzymatic	Emulsification and extrusion (ion gelation)	Preparation of the emulsion by mixing followed by	Dye retention after 15 days: 84.95% (at 4 °	Jain, Winuprasith, & Suphantharika, 2020



	debranching + OSA), alginic acid, and calcium chloride		homogenization at 40/4 MPa, in 3 cycles Agitation with other wall materials for 2 h Dripping in calcium chloride solution with stirring, keeping solution for 1 h	C) and 79.90% (at 25 ° C) Encapsulation increased lycopene stability during storage but reduced its bioavailability	
--	--	--	--	---	--

### 3.6 Final considerations and future perspectives

In recent years, there has been an increase in interest in natural food colorings in response to market demand, which has led to research on processes that promote increased color stability, such as microencapsulation. The increase in the popularity of natural dyes and the use of encapsulation techniques contributes to reducing the prices of products and processes. Thus, the perspectives regarding encapsulated natural food dyes are growing due to market demand, stimulating additional research in this area.

However, several techniques and materials have been used in the microencapsulation of natural food dyes, generating several possibilities, but also demonstrating the need for more solid knowledge about the materials and processes involved. The desired characteristics in the final product should be well established, for the efficient planning and execution of dye encapsulation studies. Criteria such as the characteristics of the food containing the microparticles (water activity, pH, composition, hydrophobicity, and hydrophilicity, among others), processing conditions (temperature, air incorporation), and storage conditions (temperature, exposure to light and oxygen) should be evaluated. Such aspects demonstrate the importance of further studies to select adequate materials for the encapsulation of food dyes and the establishment of ideal processing conditions.

Given the above, some techniques and materials are promising for dye encapsulation. Among the materials, mucilage, fibers from food processing residues, maltodextrins, and other starch derivatives stand out, due to their low cost and safety for consumption. These polymers can be used in combination with other compounds, such as proteins, gums, and lipids, either to improve or give new characteristics to the products, such as increasing or reducing solubility and dispersibility, providing continuity of the film that forms the particle, besides improving the encapsulation efficiency, and reducing processing costs.

Although spray drying has been the most used encapsulation technique, it is not considered the most efficient, as the exposure to high temperatures during the process can lead to the degradation of natural dyes, despite the differences between the temperature of the drying air and the temperature inside the atomized droplets. When compared to other techniques, spray drying has a considerably lower cost, due to its greater popularity. However, more detailed studies are needed on the spray drying parameters, once several variables can directly affect the encapsulation efficiency, production yield, and the preservation of natural dye, such as the feed rate, inlet and outlet temperatures, air pressure, and flow rate, in addition to the interactions between the core and wall materials.

Cold processing techniques may be promising alternatives for dye encapsulation due to the thermal sensitivity of most dyes, which allows obtaining products with superior characteristics. When combining emulsification, extrusion, or coacervation and freeze-drying, for example, a high encapsulation efficiency can be achieved, with the possibility of using the microparticles in food matrices with the most diverse characteristics. The combination of techniques allows the application of lipophilic dyes in aqueous matrices or hydrophilic dyes in lipid matrices, or the use of pH-sensitive dyes in incompatible foods, among others. Despite freeze-drying is a relatively expensive process, the more widespread use of this technique can change this scenario.

Therefore, the encapsulation of natural dyes for application in food is a promising approach for both research and the food industry, requiring further studies on the various processing possibilities and industrial applications.

### 3.7 Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

### 3.8 References

- Agama-Acevedo, E., & Bello-Perez, L.A. (2017). Starch as an emulsions stability: the case of octenyl succinic anhydride (OSA) starch. *Current Opinion in Food Science*, v. 13, p. 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.014>.
- Amaral, T. N., Junqueira, L. A., Tavares, L. S, Oliveira, N. L, Prado, M. E. T., & Resende, J. V. (2019). Effects of salts and sucrose on the rheological behavior, thermal stability, and molecular structure of the *Pereskia aculeata* Miller mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 218-229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.063>.
- Araújo, J. M. A. (2019). *Química de alimentos: teoria e prática*. 7 ed. Viçosa, MG: Editora UFV.
- Azeredo, H. M. C. (2008). Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, 16, 89-97. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012058828>.
- Barbosa, M. I. M. J., Borsarelli, C.D., & Mercadante, A. Z. (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with differentiated polysaccharide preparations. *Food Research international*, 8, 989-994. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.018>.

- Blanch, G.P., del Castillo, M.L.R., del Mar Caja, M., Pérez-Méndez, M., & Sánchez-Cortés, S. (2007). Stabilization of all-trans-lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins. *Food Chemistry*, 105, 1335-1341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.060>.
- Brauch, J. E., Zapata-Porras, S. P., Buchweitz, M., Aschoff, J. K., & Carle, R. (2016). Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? *Food Research International*, 89, 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.029>.
- Bustos-garza, C., Yáñez-fernández, J., & Barragán-huerta, B. E. (2013). Thermal and pH stability of spray-dried encapsulated astaxanthin oleoresin from *Haematococcus pluvialis* using several encapsulation wall materials. *Food Research International*, 54, 641-649. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.061>.
- Campos, F. M., & Rosado, G. P. (2005). Novos fatores de conversão de carotenoides provitamínicos A. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 571-578. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000300029>.
- Castro-Rosas, J., Ferreira-Grosso, C. R., Gómes-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Rodríguez-Marín, M. L., Guzmán-Ortiz, F. A., & Falfan-Cortes, R. N. (2017). Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - a review. *Food Research International*, 102, 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.054>.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47, 659–664. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.010>.
- Chang, H. W., Tan, T. B., Tan, P. Y., Nehdi, I. A., Sbihi, H. M., & Tan, C. P. (2020). Microencapsulation of fish oil-in-water emulsion using thiol-modified  $\beta$ -lactoglobulin fibrils-chitosan complex. *Journal of Food Engineering*, 264, 109680. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.07.027>.
- Chen, J., Li, F., Li, Z., McClements, D. J., & Xiao, H. (2017). Encapsulation of carotenoids in emulsion-based delivery systems: enhancement of  $\beta$ -carotene water-dispersibility and chemical stability. *Food Hydrocolloids*, 69, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.024>.

Cheng, Y.-S., Lu, P.-M., Huang, C.-Y., & Wu, J.-J. (2017). Encapsulation of lycopene with lecithin and  $\alpha$ -tocopherol by supercritical antisolvent process for stability enhancement. *The Journal of Supercritical Fluids*, 130, 246-252. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.021>.

Codex Alimentarius Commission. (2000). *Discussion paper on the use of colours in foods*. Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Thirty-second Session. FAO/WHO: Beijing, China.

Coronel-Aguilera, C.P., & San Martín-González, M.F. (2015). Encapsulation of spray dried  $\beta$ -carotene emulsion by fluidized bed coating technology. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie - Food Science and Technology*, 62, 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.036>.

Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O.R. (2018). *Química de Alimentos de Fennema*. 5. ed., Porto Alegre: Artmed.

Das, A. B., Goud, V. V., & Das, C. (2019). Microencapsulation of anthocyanin extract from purple rice bran using modified rice starch and its effect on rice dough rheology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 573-581. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.247>.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>.

Dias, A.R.G., Zavareze, E.D.R., Helbig, E., Moura, F. A., Vargas, C. G., & Ciacco, C.F. (2011). Oxidation of fermented cassava starch using hydrogen peroxide. *Carbohydrate Polymers*, 86, 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.026>

Esquiavel, P. (2016). *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*. Woodhead Publishing.

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

- Favaro-Trindade, C. S., Pinho, S. C., & Rocha, G. A. (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11, 103-112. <http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/bjft/2008/v11n24407.pdf>
- Feng, Z. Z., Li, M. Y., Wang, Y. T., & Zhu, M. J. (2018). Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*: Microencapsulation with carboxymethyl cellulose sodium and microcrystalline cellulose and effects of microencapsulated astaxanthin on yogurt properties. *LWT – Food Science and Technology*, 96, 152-160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.084>.
- Freitas, A. S. (2012). Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. *Acta Tecnológica*, 2, 65-72. <https://portaldeperiodicos.ifma.edu.br/index.php/actatecnologica/article/view/90/106>.
- Gaonkar, A. G., Vasisht, N., Khare, A. R., & Sobel, R. (2014). *Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide*. London: Academic Press - Elsevier.
- García-Tejeda, Y.V., Salinas-Moreno, Y., & Martínez-Bustos, F. (2015). Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 717-726. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.10.003>.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Beney, L., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2012). Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. *Food Chemistry*, 132, 1713-1720. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.028>.
- Gomez-Estaca, J., Comunian, T.A., Montero, P., Ferro-Furtado, R., & Favaro-Trindade, C.S. (2016). Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin–cashew gum complex. *Food Hydrocolloids*, 61, 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.005>.
- Gonçalves, A., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2016). Microencapsulation of vitamin A: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.001>.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330–347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>.

- Huq, T., Frascini, C., Khan, A., Riedl, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2017). Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *Carbohydrate Polymers*, 168, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.032>.
- Jafari, S. M. (2017). *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients: principles and applications*. London: Academic Press - Elsevier.
- Jain, S., Winuprasith, T., & Suphantharika, M. (2020). Encapsulation of lycopene in emulsions and hydrogel beads using dual modified rice starch: Characterization, stability analysis and release behaviour during in-vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, 104, 105730. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105730>.
- Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeekul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4, 6166-6172. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.06.111>.
- Jiang, G.-L., & Zhu, M.-J. (2019). Preparation of astaxanthin-encapsulated complex with zein and oligochitosan and its application in food processing. *LWT – Food Science and Technology*, 106, 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.055>.
- Khalid, N., Shu, G., Holland, B.J., Kobayashi, I., Nakajima, M., & Barrow, C. J. (2017). Formulation and characterization of O/W nanoemulsions encapsulating high concentration of astaxanthin. *Food Research International*, 102, 364-371. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.019>.
- Krithika, V., Radhai, S., Ravindra, N., & Thirupathi, V. (2014). Microencapsulation of paprika (*Capsicum annum L*) oleoresin by spray drying. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 5, 971-980. <https://www.ijser.org/researchpaper/Microencapsulation-of-Paprika-Capsicum-annum-L-Oleoresin.pdf>.
- Lacerda, E. C. Q., Calado, V. M. A., Monteiro, M., Finotelli, P. V., Torres, A. G., & Perrone, D. (2016). Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. *Carbohydrate Polymers*, 151, 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.093>

- Lian, Z., Pan, R., & Wang, J. (2016). Microencapsulation of norfloxacin in chitosan/chitosan oligosaccharides and its application in shrimp culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 587-592. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.074>.
- Lim, A. S., Griffin, C., & Roos, Y. H. (2014). Stability and loss kinetics of lutein and  $\beta$ -carotene encapsulated in freeze-dried emulsions with layered interface and trehalose as glass former. *Food research international*, 62, 403-409. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.059>.
- Liu, C. -H., Lee, G. -W., Wu, W. -C., & Wang, C. -C. (2020). Encapsulating curcumin in ethylene diamine- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticle improves topical cornea delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 110726. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110726>.
- Liu, G., Hu, M., Zhao, Z., Lin, Q., Wei, D., & Jiang, Y. (2019). Enhancing the stability of astaxanthin by encapsulation in poly (l-lactic acid) microspheres using a supercritical anti-solvent process. *Particuology*, 44, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2018.04.006>.
- Liu, K. Huang, R. -L., Zha, X. -Q., Li, Q. -M, Pan, L. -H., & Luo, J. -P. (2020). Encapsulation and sustained release of curcumin by a composite hydrogel of lotus root amylopectin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 232, 115810. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115810>.
- Liu, Q., Jing, Y., Han, C., Zhang, H., & Tian, Y. (2019). Encapsulation of curcumin in zein/caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. *Food Hydrocolloids*, 93, 432-442. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.003>.
- Lobato, K. B. S., Paese, K., Forgearini, J. C., Guterres, S. S., Jablonski, A., & Rios, A. O. (2015). Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. *LWT – Food Science and Technology*, 60, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.044>.
- Loksuwan. J. (2007). Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928-935. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.011>.
- Loret, C., Meunier, V., Frith, W. J., & Fryer, P. J. (2004). Rheological characterization of the gelation behaviour of maltodextrin aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 57, 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.026>.



- Łozińska, N., Głowacz-Różyńska, A., Artichowicz, W., Lu, Y., & Jungnickel, C. (2020). Microencapsulation of fish oil – determination of optimal wall material and encapsulation methodology. *Journal of Food Engineering*, 268, 109730. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109730>.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., & Ghorbani, M. (2014). Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. *Dry Technology*, 32, 509-518. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.839562>.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>.
- Maurya, V. K., Bashir, K., & Aggarwal, M. (2020). Vitamin D microencapsulation and fortification: trends and technologies. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 196, 105489. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105489>.
- Medeiros, A. K. O. C., Gomes, C. C., Amaral, M. L. Q. A., Medeiros, L. D. G., Medeiros, I., Porto, D. L., Aragão, C. F. S., Maciel, B. L. L., Morais, A. H. A., & Passos, T. S. (2019). Nanoencapsulation improved water solubility and color stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.). *Food Chemistry*, 270, 562-572. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.099>.
- Neri-Numa, I. A., Pessoa, M. G., Paulino, B. N., & Pastore, G. M. (2017). Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 271-279. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.018>.
- O'Toole, M.G., Henderson, R.M., Soucy, P.A., Fasciotto, B.H., Hoblitzell, P.J., Keynton, R.S., Ehringer, W.D., & Gobin, A.S. (2012). Curcumin encapsulation in submicrometer spray-dried chitosan/Tween 20 particles. *Biomacromolecules*, 13, 2309–2314. <https://doi.org/10.1021/bm300564v>.
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., & Osorio, C. (2015). Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 187, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.090>.

- Ozkan, G., P. Franco, G., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272, 494-506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205>
- Park, H. R., Rho, S. -J., & Kim, Y.-R. (2019). Solubility, stability, and bioaccessibility improvement of curcumin encapsulated using 4- $\alpha$ -glucanotransferase-modified rice starch with reversible pH-induced aggregation property. *Food Hydrocolloids*, 95, 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.012>.
- Pieczkolan, E., & Kurek, M. A. (2019). Use of guar gum, gum arabic, pectin, beta-glucan and inulin for microencapsulation of anthocyanins from chokeberry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 665-671. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.073>.
- Porrarud, S., & Pranee, A. (2010). Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. *International Food Research Journal*, 17, 1031–1042. [http://www.ifrj.upm.edu.my/17%20\(04\)%202010/\(24\)%20IFRJ-2010-008%20Pranee%20Thailand\[1\].pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/17%20(04)%202010/(24)%20IFRJ-2010-008%20Pranee%20Thailand[1].pdf).
- Prado, M. A., & Godoy, H. T. (2003). Corantes Artificiais em Alimentos. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, 14, 237-250. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012066469>.
- Ramos-De-La-Peña, A. M, Renard, C. M., Wicker, L., Montañez, J. C., García-Cerda, L. A., & Contreras-Esquivel, J. C. (2014). Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.06.008>.
- Rascón, M. P., Beristain, C. I., García, H. S., & Salgado, M. A. (2011). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and soy protein isolate as wall materials. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.021>.
- Rehman, A., Ahmad, T., Aadil, R. M., Spotti, M. J., Bakry, A. M., Khan, I. M., Zhao, L., & Riaz, T. (2019). Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.015>.

Renhe, I. R. T., Stringheta, P. C., Silva, F. F., & Oliveira, T. V. (2009). Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 649-652. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000600015>.

Ribeiro, E. P., & Seravalli, E. A. G. (2004). *Química de alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher, Instituto Mauá de Tecnologia.

Rito-Palomares, M., Nuñez, L., & Amador, D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoyanin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76, 1273–1280. <https://doi.org/10.1016/j.jchroomb.2004.01.008>.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2015). *Food Carotenoids: Chemistry, Biology and Technology*. Oxford: Wiley-Blackwell.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2019). Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>.

Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., Nunes, M. R., Benvenuti, E. V., Luz, S. R., D'ávila, R. F., & Rutz, J. K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46, 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.053>.

Rosa, J. R., Nunes, G. L., Motta, M. H., Fortes, J. P., Weis, G. C. C., Hecktheuer, L. H. R., Muller, E. I., Meneses, C. R., & Rosa, C. S. (2019). Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: Characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 89, 742–748. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.042>.

Rosolen, M. D., Bordini, F. W., Oliveira, P. D., Conceição, F. R., Pohndorf, R. S., Fiorentini, A. M. Silva, W. P., & Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. *LWT – Food Science and Technology*, 115, 108411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>.

Rudke, A. R., Heleno, S. A., Fernandes, I. P., Prieto, M. A., Gonçalves, O. H., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2019). Microencapsulation of ergosterol and *Agaricus bisporus* L. extracts by complex coacervation using whey protein and chitosan: Optimization study using response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology*, 103, 228-237. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.018>.

Saifullah, M., Shishir, M.R.I., Ferdowsi, R., Rahman, M.R.T., & Van Vuong, Q. (2019). Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: a critical review. *Trends Food Science & Technology*, 86, 230-251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030>.

Sampaio, G. L. A, Pacheco, S., Ribeiro, A.P. O., Galdeano, M. C., Gomes, F. S, & Tonon, R.V. (2019). Encapsulation of a lycopene-rich watermelon concentrate in alginate and pectin beads: Characterization and stability. *LWT – Food Science and Technology*, 116, 108589. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108589>.

Santana, A. A., Cano-Higueta, D. M., Oliveira, R. A., & Telis, V. R. N. (2016). Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. *Food Chemistry*, 212, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.148>.

Schmatz, D. A., Mastrantonio, D. J. S., Costa, J. A.V., & Moraes, M. G. (2020). Encapsulation of phycocyanin by electrospraying: A promising approach for the protection of sensitive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, 119, 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.008>.

Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., & Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39, 1-20. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000100002>.

Silva, P. T., Fries, L. L. M., Menezes, C. R., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, E. F., Bastos, J., & Silva, C. B. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural, Santa Maria*, 44, 1304-1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>.

- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5, 2, p. 65-77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3093624/>.
- Soto-Castro, D., Gutiérrez, M. C., León-Martínez, F. M., Santiago-García, P. A., Aragón-Lucero, I., & Antonio-Antonio, F. (2019). Spray drying microencapsulation of betalain rich extracts from *Escontria chiotilla* and *Stenocereus queretaroensis* fruits using cactus mucilage. *Food Chemistry*, 272, 715–722. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.069>.
- Soukoulis, C., Cambier, S., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2016). Chemical stability and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene encapsulated in sodium alginate o/w emulsions: Impact of  $\text{Ca}^{2+}$  mediated gelation. *Food Hydrocolloids*, 57, 301-310. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.001>.
- Spada, J. C., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Noreña, C. P. Z. (2012). Microencapsulation of  $\beta$ -carotene using native pinhão starch, modified pinhão starch and gelatin by freeze-drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 186–194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02825.x>.
- Stoll, L., Costa, T. M. H., Jablonski, A., Flores, S. H., & Rios, A. O. (2016). Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 172-181. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1610-0>.
- Storz, E., & Steffens, K. J. (2004). Feasibility study for determination of the dextrose equivalent (DE) of starch hydrolysis products with near-infrared spectroscopy (NIRS). *Starch/Stärke*, 56, 58-62. <https://doi.org/10.1002/star.200300220>.
- Sweedman, M. C., Tizzotti, M. J., Schäfer, C., & Gilbert, R. G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 92, 905-920. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.040>.
- Taksima, T., Limpawattana, M., & Klaypradit, W. (2015). Astaxanthin encapsulated in beads using ultrasonic atomizer and application in yogurt as evaluated by consumer sensory profile. *LWT – Food Science and Technology*, 62, 431-437. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.011>.
- Tiimilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International*

*Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1276–1286.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>.

Wang, Q. S., Xiang, Y., Cui, Y. L., Lin, K. M., & Zhang, X. F. (2012). Dietary blue pigments derived from genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF-kB inactivation. *PLoS ONE*, 7, e34122.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034122>.

Wang, W., Jung, J., & Zhao, Y. (2017). Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1246-1253. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.005>.

Wusigale, Liang, L., & Luo, Y. (2020). Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 391-403.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.027>.

Yabe, T. (2018). New understanding of pectin as a bioactive dietary fiber. *Journal of Food Bioactives*, 3, 95-100. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.3152>.

Zhang, Y., & Zhong, Q. (2013). Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. *Food Hydrocolloids*, 33, 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.009>.

Zhang, Z., Zhang, R., & McClements, D. J. (2016). Encapsulation of  $\beta$ -carotene in alginate-based hydrogel beads: Impact on physicochemical stability and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, 61, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.036>

Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M., & Sun, J. (2011). Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *Journal of Food Engineering*, 104, 89–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.11.031>.

Zhu, F. (2017). Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*, 229, 542-552. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.101>.

---

**IV. CAPÍTULO II – Arrowroot starch and cassava maltodextrin as encapsulating agents of the natural blue dye Genipocyanin G1**

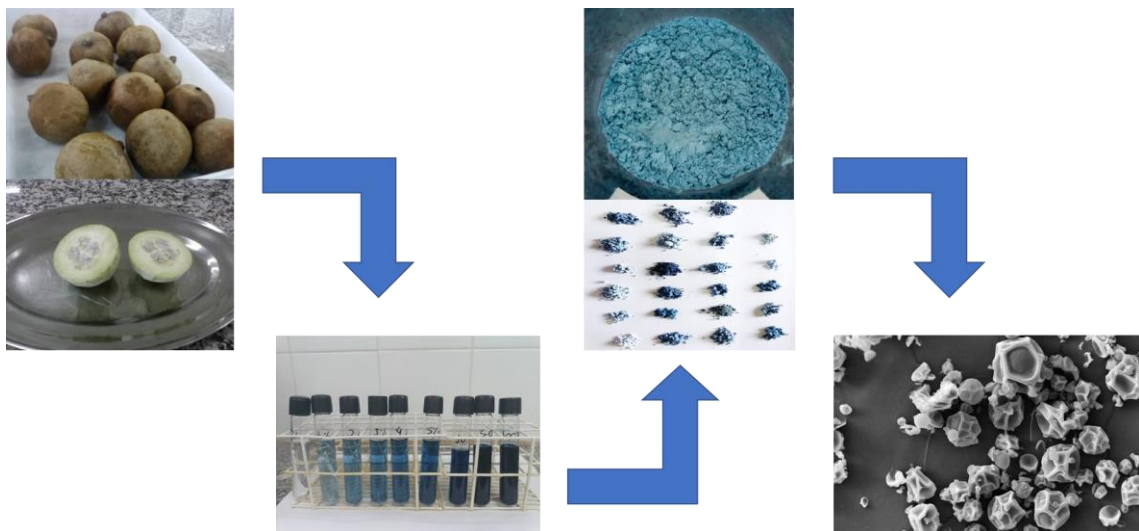
Submetido à revista Food Hydrocolloids (Qualis A1).

---

## Abstract

This study evaluated the effects of using arrowroot starch and cassava maltodextrin as wall materials in the microencapsulation by spray drying of genipocyanin G1, a natural dye produced from genipap. The treatment with the best characteristics (higher yield and lower blue color variation) contained 2.3182% arrowroot starch, 16% cassava maltodextrin, and 2% genipocyanin G1. The microparticles of the selected treatment were analyzed for morphology by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), together with the wall materials. The formation of continuous and rough particles was observed, with no pores or cracks, as well as the occurrence of hydrogen bonding interactions between the wall material and the core material, with no presence of covalent bonds. The results indicated that the optimal range for the production of microparticles is starch and genipocyanin G1 concentrations below 3.0% and 3.5%, respectively.

**Keywords:** genipin; microencapsulation; spray drying; food coloring; food additives.



**Graphical abstract.** Obtaining of blue genipap dye (genipocyanin G1) encapsulated with arrowroot starch and cassava maltodextrin.

## 4.1 Introduction

The use of dyes in the food industry is a common practice to provide or enhance the color of food products, making them more attractive to the consumer and preserving their visual characteristics during processing and storage. Dyes are high value-added products, classified into two classes according to their origin: natural and artificial dyes. Artificial dyes have greater stability and low cost when compared with natural dyes, and their use is more advantageous



from the point of view of product standardization, despite the evidence of health risks. Studies have shown the potential risks of the consumption of artificial dyes, which can lead to the development of several diseases, including the development of Hyperactivity Disorder and Attention Deficit (ADHD), autism, neoplasms, asthma, and other allergic reactions (Freitas, 2012; Martins, Roriz, Morales, Barros & Ferreira, 2016). Thus, there is a growing demand for natural food additives, which present lower risks associated with consumption and are environmentally sustainable, meeting an increasingly demanding market (Rodriguez-Amaya, 2016).

A series of natural dyes, with a wide range of shades, can be obtained from plant, animal, or microbial sources. However, blue natural pigments are more difficult to find and tend to be less stable, including those obtained by adjusting the pH of anthocyanins or extracting phycocyanins from cyanobacteria (Ribeiro & Veloso, 2021). A natural blue dye with high stability to heat and pH changes can be extracted from the fruits of the genipap tree, a tree belonging to the Rubiaceae family that inhabits the entire South American continent, occurring mainly in regions of hot and humid climate. Two species of the genus *Genipa* are recognized: *Genipa americana* (young plant with whole leaves and hypocrateriform corolla) grown in Central and South America, and *Genipa infundibuliformis* (young plant with lobed leaves and infundibuliform corolla), found in the south-central region of Brazil (Sousa, Silva, Hansen & Fonseca, 2007; Silva, Freire, Lêdo, & Rabbani, 2014; Neri-Numa, Pessoa, Paulino & Pastore, 2017).

The blue dye from genipap is extracted through a sequence of reactions occurring in the presence of oxygen. Genipin is an iridoid present in green genipap fruits, which reacts with primary amines, such as amino acids. The reaction product forms blue-colored dimers, called genipocyanin G1, which can polymerize and form complex compounds, also blue-colored (Fujikawa, Fukui & Koga, 1987; Touyama et al., 1994; Brauch, Zapata-Porras, Buchweitz, Aschoff & Carle, 2016). Regarding toxicity, the geniposide/genipin has cytotoxicity between 5,000 and 10,000 times lower than glutaraldehyde, and the geniposide, which is a glycosylated form found in ripe fruits, is less toxic than genipin (Kang, Khanal & Kim, 2012). In addition to their potential use as a dye, blue dyes extracted from genipin have been reported as bioactive compounds with various activities, such as the ability to inhibit gene expression and the signaling cascade of various cytokines involved in inflammatory and autoimmune responses, thus demonstrating potential use in the prevention and treatment of chronic diseases (Wang, Xiang, Cui, Lin & Zhang, 2012; Neri-Numa, Pessoa, Paulino & Pastore, 2017).

Although natural dyes have less or almost no toxicity and bioactive properties when compared to artificial dyes, they have lower stability and a tendency to color alterations during processing and storage, which can compromise the quality of the products. Therefore, studies on the techniques to increase the stability of natural dyes are necessary, with emphasis on microencapsulation techniques (Rodriguez-Amaya, 2016).

Microencapsulation has been studied to improve stability and control the release of aromas, dyes, antioxidants, nutrients, enzymes, preservatives, and probiotic microorganisms in food (Jafari, 2017). However, to date, there is no study in the literature on the encapsulation of genipocyanin G1. The most commonly used encapsulating agents are vegetable or microbial gum hydrocolloids, gelatin, modified starch, dextrans, lipids, various emulsifiers, and chitosan, usually using water as a solvent, which is a safe and clean strategy (Singh, Hemant, Ram & Shivakumar, 2010). Although gums and starch modified with octenyl succinic anhydride (OSA), specifically for encapsulation, such as Capsul® and Hicap®, have proven to be effective wall materials, these polymers are expensive and compromise the economic viability of the microencapsulation of sensitive compounds (Sweedman, Tizzotti, Schäfer & Gilbert, 2013; Castro-Rosas et al., 2017). In addition, the use of OSA in modifying starch for food purposes is limited due to its toxicity. The FDA (Food and Drug Administration) has allowed the use of a maximum of 3% w/w OSA in starch modification for food purposes (Agama-Acevedo & Bello-Perez, 2017). Therefore, studies on materials with lower cost and low toxicity that can be used in microencapsulation are required, such as native starches and maltodextrins, as well as blends with other biopolymers (Mahdavi, Jafari & Dehnad, 2016; Stoll, Costa, Jablonski, Flores & Rio, 2016; Rosa et al., 2019). Native starches and maltodextrins are widely available and have a low cost of production and commercialization, which can be promising alternatives to enable the encapsulation of different materials.

In this context, studies to improve the stability of natural dyes are required, with low environmental impact, using economically viable techniques. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of using arrowroot starch (*Maranta arundinacea* L.) and cassava (*Manihot esculenta*) maltodextrin as wall materials in the microencapsulation of genipocyanin G1, a natural blue dye extracted from genipap (*Genipa americana* L.).

## **4.2 Materials and methods**

### **4.2.1 Materials**

The green genipap was obtained in the Sudoeste Baiano Identity Territory, Bahia - Brazil. Cassava maltodextrin with degree of dextrose-equivalent of 11.42 was purchased from

the company Cassava S/A, Brazil. Arrowroot rhizomes were obtained from family farmers in the region of the Vale do Jiquiriçá Identity Territory, Bahia - Brazil, and the starch was extracted at the State University of Southwest Bahia, Brazil.

A traditional method of extracting arrowroot starch was used. Arrowroot rhizomes were weighed, peeled, and cut into thin slices. Then, the arrowroot was ground in a low-speed blender (3,500 rpm, JL Colombo) for 5 min, with the addition of water in the proportion of 1: 1 (w/v). The solution was sieved in a fine fabric and the retained fiber was crushed in a blender using the same proportion of water and repeating the extraction procedure. The starch suspension was left to stand for 3 h, the supernatant was removed and water was added, standing for an hour. This procedure was repeated until the water was completely clear. Finally, the starch was transferred to a container and dried in an oven with forced air circulation (Ethik Technology, 420-TD) at 40 °C for 24 h. After drying, the resulting starch was pulverized and sieved. Then, the apparent amylose content of arrowroot starch was determined using the colorimetric method as reported by Martinez and Cuevas (1989).

#### **4.2.2 *Obtaining the dye***

The genipap fruits were classified as green fruits, due to their firm texture, green to gray-green color and total soluble solids content lower than 17 °Brix. The fruits were cleaned in sodium hypochlorite solution at 200 ppm for 15 minutes, and the seeds were removed. The pulp and peel were crushed in a low-speed blender (3,500 rpm, JL Colombo) for 5 min, with the addition of distilled water (1: 3, w: v). The mixture was heated in a water bath (Fisatom, model 802) at 55 °C for 30 min, under continuous agitation and incorporation of air. Then, the material was taken to an ultrasonic bath (frequency 40 kHz, power 135 W, and maximum temperature of  $60 \pm 5$  °C (USC-1400 bath, Unique) for 30 min vacuum filtered, and centrifuged at 3,000 x g for 5 min (SL-706 centrifuge, Solab). The resulting supernatant was immediately mixed with an excess of glycine, in the proportion of 20 mg of glycine per gram of fruit. The solution was again heated in a water bath 55 °C under agitation for 30 min to develop and stabilize the blue color.

#### **4.2.3 *Encapsulation of the natural blue dye Genipocyanin G1***

For the production of the microencapsulated genipocyanin G1, two wall materials, (arrowroot starch and maltodextrin) and the dye concentration were evaluated. The experiments were performed using a central composite rotational design (CCRD), composed of a 2<sup>3</sup> full factorial design, with 2 repetitions at the central point and 6 axial points (Table 1).

For the preparation of the encapsulating solutions, the respective amounts of arrowroot starch and maltodextrin were weighed, according to Table 1, and distilled water was added (2/5 of the total volume of solution). The mixture was gelatinized in a water bath (Quimis, model Q-15-2) at 85 °C for 15 minutes. After that, the genipap blue dye solution was added and the volume was made up with distilled water, when necessary. The mixture was homogenized in a Turrax (4,000 rpm, Tecnal, Turratec TE-102) for 5 min and sonicated in an ultrasonic bath (Unique, USC-1400) at 40 kHz, 135 W, and a maximum temperature of 60 °C  $\pm$  5 °C for 15 min.

The encapsulation by spray drying was performed in a spray dryer apparatus (Labmaq, model MSDi 1.0), with an atomizing nozzle of 0.3 mm in diameter, hot air flow rate of 30 L/min, inlet temperature of 170  $\pm$  5 °C, outlet temperature of 110  $\pm$  5 °C, and feed flow rate of 0.36 L/h, according to the parameters commonly used for spray drying of natural dyes (Ribeiro & Veloso, 2021).

**Table 1.** Experimental design (CCRD) to optimize the production of microencapsulated blue natural dye.

Treatment	Wall Materials Concentration		Core Material Genipocyanin G1	Core Material: Wall Materials
	Arrowroot Starch	Cassava Maltodextrin		
1	-1 (3%)	-1 (15%)	-1 (1%)	1 : 18
2	-1 (3%)	-1 (15%)	+1 (3%)	1 : 6
3	-1 (3%)	+1 (17%)	-1 (1%)	1 : 20
4	-1 (3%)	+1 (17%)	+1 (3%)	1 : 6.67
5	+1 (5%)	-1 (15%)	-1 (1%)	1 : 20
6	+1 (5%)	-1 (15%)	+1 (3%)	1 : 6.67
7	+1 (5%)	+1 (17%)	-1 (1%)	1 : 22
8	+1 (5%)	+1 (17%)	+1 (3%)	1 : 7.33
9	-1.68 (2.3182%)	0 (16%)	0 (2%)	1 : 9.16
10	+1.68 (5.6818%)	0 (16%)	0 (2%)	1 : 10.84
11	0 (4%)	-1.68 (14.3182%)	0 (2%)	1 : 9.16
12	0 (4%)	+1.68 (17.6818%)	0 (2%)	1 : 10.84
13	0 (4%)	0 (16%)	-1.68 (0.3182%)	1 : 62.85
14	0 (4%)	0 (16%)	+1.68 (3.6818%)	1 : 5.43
15	0 (4%)	0 (16%)	0 (2%)	1 : 10
15	0 (4%)	0 (16%)	0 (2%)	1 : 10

#### 4.2.4 Apparent viscosity of the encapsulating solutions containing the dye

The apparent viscosity of the encapsulating solutions containing the dye was determined in a rheometer (Brookfield, model DV-III Ultra), using the SC4-34 spindle, and data were

analyzed using the software Rheocalc V 3.1-1. The rheological determinations were performed by varying the shear rate from 0 to 70 s<sup>-1</sup> (ascending curve, 11 points) and from 70 to 0 s<sup>-1</sup> (descending curve, 11 points), with an interval of 15 s between each point. All readings were performed 3 times. The Power Law (Equation 1) and the viscosity equation for non-Newtonian fluids (Equation 2) were adjusted to the experimental data.

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

$$\eta_{ap} = k\dot{\gamma}^{n-1} \quad (2)$$

Where  $\eta_{ap}$  is the apparent viscosity,  $k$  is the consistency index,  $\dot{\gamma}$  is the shear rate,  $n$  is the fluid behavior index ( $n = 1$  – Newtonian fluid,  $n > 1$  – dilatant fluid, and  $n < 1$  – pseudoplastic fluid), and  $\tau$  is the shear stress.

#### **4.2.5 Encapsulation efficiency and dye retention**

The encapsulation efficiency was determined by comparing the total amount of dye and the amount of dye absorbed on the surface of the particles (Santana, Cano-Higueta, Oliveira & Telis, 2016). The determination of total genipocyanin G1 was performed by mixing 10 mg of dye powder and 10 mL of absolute ethanol in 50 mL Falcon tubes. The mixture was vortexed (Warmnest, VX-28) for 5 min and centrifuged at 3,000 x g for 5 min (Solab centrifuge, SL-706). The determination of genipocyanin G1 on the surface of the particles was performed by mixing 10 mg of dye powder and 10 mL of acetone: ethanol solution (9: 1) in 50 mL Falcon tubes. The mixture was vortexed (Warmnest, VX-28) for 30 s and centrifuged at 3,000 x g for 5 min. The supernatants were collected and absorbance readings were performed on a spectrophotometer at 595 nm, considering the Lambert-Beer Law, using a molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) of 43652.

The encapsulation efficiency (EE) was calculated by the difference between the total concentration of genipocyanin G1 and the concentration on the surface, according to Equation 3.

$$EE (\%) = \frac{[(\text{Total genipocyanin G1 in the powder} - \text{genipocyanin G1 on the surface})]}{\text{Total genipocyanin G1 in the powder}} \times 100 \quad (3)$$

The retention of genipocyanin G1 (RTG) in the powder was calculated according to Equation 4. The amount of dye used for the production of the particles was considered as theoretical total genipocyanin G1, according to the experimental design.

$$RTG (\%) = \frac{\text{Total genipocyanin G1 in the powder}}{\text{Theoretical total genipocyanin G1}} \times 100 \quad (4)$$

#### **4.2.6 Water activity, yield, apparent density, and solubility of the microparticles**

The water activity (aw) of the encapsulated dyes was determined at 25 °C, using an Aqualab apparatus (series 3TE).

The yield of the encapsulated was calculated on a dry basis, according to the amount of total solids present in the encapsulating solutions. The apparent density of the dye powder was determined by the ratio between the weight measured on an analytical scale (Shimadzu, ATX) and the respective volume, measured in a 10 mL beaker (Goula & Adamopoulos, 2004; Santana et al., 2016).

The solubility of the dyes was determined by mixing 0.5 g of powder (on a dry basis) and 50 mL of distilled water in Falcon tubes, which was vortexed (Warmnest, VX-28) for 5 minutes. The mixture was centrifuged (Solab centrifuge, SL-706) at 3,000 x g for 5 minutes, and the supernatant was transferred to previously weighed porcelain crucibles. The material was oven-dried (Nova Instruments, NI 1513i) at 105 °C until constant weight (Santana et al., 2016). Solubility (S) was calculated using Equation 5.

$$S (\%) = \frac{(\text{crucible weight with residue} - \text{crucible weight})}{\text{sample weight}} \times 100 \quad (5)$$

#### **4.2.7 Instrumental color of the encapsulated dyes**

The instrumental color of the microparticles was determined using a colorimeter (Konica Minolta, CR-400), with D65 illuminant and a 10° observation angle. The CIELab color space was used to determine the color coordinates L\* [from black (0) to white (100)], a\* [from green (-) to red (+)], and b\* [from blue (-) to yellow (+)]. To determine the color variation, the microparticles were stored at room temperature in polyethylene bottles protected from light, and the color was evaluated on days 10 and 20 after manufacture. The total color variation ( $\Delta E^*$ ) was calculated as reported by Obón, Castellar, Alacid, and Fernandez-Lopez (2009), according to Equation 6.

$$\Delta E^* = [(L_{10}^* - L_0^*)^2 + (a_{10}^* - a_0^*)^2 + (b_{10}^* - b_0^*)^2]^{0,5} \quad (6)$$

Where  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  are the color coordinates at time zero ( $t_0$ , after 10 days of manufacture) and after the storage period ( $t_{10}$ , 10 days after the first measurement).

The blue color variation was determined by the difference between the final and initial values of the parameter  $b^*$ .

#### ***4.2.8 Morphology of the microparticles by Scanning Electron Microscopy (SEM)***

The wall materials and the microparticles were examined using a scanning electron microscope (model LEO 1430 VP) with an acceleration voltage of 20 kV. For that, the powders were fixed in stubs using double-sided carbon tape and coated with a gold layer at 200 Å for 180 s.

#### ***4.2.9 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)***

The wall materials and the microcapsules containing the dye powder were evaluated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR, Agilent Cary® 630) in the middle infrared range from 4,000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  and resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### ***4.2.10 Statistical analysis***

The results were subjected to Regression analysis and response surface methodology was performed using the contour curves and Pareto chart. Data were analyzed using the software Statistica 8.0 (Copyright © StatSoft).

### **4.3 Results and Discussion**

Arrowroot starch had apparent amylose content of  $16.44\% \pm 1.55\%$  (d.b.), which is lower than the value of 35.2% found by Nogueira, Fakhouri, and Oliveira (2018). Although amylose is directly related to film formation, which is essential for the production of the microparticles, the increase in viscosity of the solution due to the presence of microparticles should be considered when planning the process (Damodaran, Parkin & Fennema, 2018). The lower amylose concentration of arrowroot starch used in this study did not compromise the formation of the microparticles and may be an advantage for use in microencapsulation by spray drying, as high viscosities of the starch paste can negatively affect the process.

The results of the rheological behavior of the solutions used for microencapsulation are shown in Table 2. No time-dependent behavior was observed for the starch, maltodextrin, and

genipocyanin G1 solutions, with an overlapping of the ascending and descending curves for all readings. A precise adjustment of the Power Law model ( $R^2 > 0.99$ ) was observed for all solutions. The  $n$  values indicate a pseudoplastic behavior for most samples. Newtonian behavior was observed for treatments 3 and 4, in which the fluid behavior index ( $n$ ) tended to 1 (Genovese, Lozano & Rao, 2007).

Similar results were found by Santana et al. (2016), who evaluated spray drying of jussara pulp (*Euterpe edulis*) using ternary mixtures of gum Arabic and modified starch, and whey protein concentrate or soy protein isolate as carrier agents. The authors reported that pseudoplastic flow is the most common type of non-Newtonian behavior, usually observed for food emulsions and high-molecular-weight polymer solutions, such as those used in the present study. The pseudoplastic behavior implies a reduction of the apparent viscosity with the increase of the shear rate, thus knowledge of the rheological behavior of the encapsulating solution is fundamental for the selection of equipment and processing conditions for dye production.

**Table 2.** Rheological parameters of the solutions used for microencapsulation obtained by adjusting the Power Law model.

Treatment	k	n	R <sup>2</sup>	RMSE [N.(m <sup>2</sup> ) <sup>-1</sup> ]
1	0.04	0.87	0.9997	0.0008
2	0.04	0.87	0.9997	0.0009
3	0.01	0.95	0.9984	0.0021
4	0.01	0.97	0.9982	0.0018
5	0.06	0.81	0.9994	0.0011
6	0.11	0.78	0.9998	0.0251
7	0.15	0.71	0.9957	0.0582
8	0.18	0.80	0.9999	0.0026
9	0.04	0.88	0.9998	0.0005
10	0.34	0.77	0.9999	0.0027
11	0.08	0.84	0.9997	0.0017
12	0.05	0.83	0.9998	0.0002
13	0.04	0.86	0.9997	0.0025
14	0.09	0.83	0.9997	0.0008
15	0.05	0.82	0.9988	0.0006
15	0.05	0.80	0.9993	0.0050

Note:  $n$  is the flow behavior index,  $k$  is the flow consistency index (Pa.s),  $R^2$  is the coefficient of determination; RMSE is the root of the mean square error.

The characterization of the encapsulated dye powders produced by spray drying is presented in Table 3. The results were subjected to regression analysis and response surface



methodology. Arrowroot starch significantly affected ( $p < 0.05$ ) the apparent viscosity of the encapsulating solutions (fixed at  $35 \text{ s}^{-1}$ ) (Equation 7 and Figure 1). The yield was also significantly affected by the arrowroot starch content (Equation 8 and Figure 2). A lower viscosity was observed for arrowroot starch concentrations from 3.0 to 3.5% and lower yields for concentrations between 4.25 and close to 5.0% of arrowroot starch. The higher yields (greater than 10%) were observed for the starch concentrations below 3.0%. Based on these results, it is possible to infer that the higher viscosity of the solutions may have negatively affected the production yield of the microparticles, as observed by other authors (Kandansamy & Somasundaram, 2012), since the increase in viscosity limits water evaporation, making atomization difficult. In addition, formulations with starch concentrations below 2.5% generate higher yield values.

In the present study, maltodextrin showed a technological functionality to prepare the solutions with high solids contents, without significantly affecting apparent viscosity, thus it can be considered a suitable polymer for microencapsulation processes. Although cassava maltodextrin is the major solids component in the solutions, it did not affect apparent viscosity and allowed increasing the total solids content of the solutions used in the microencapsulation process. Spray drying processes require a high content of suspended solids, which contributes to a reduction in the energy necessary to remove the solvent, in addition to increasing the particle size and production yield (Favaro-Trindade, Pinho & Rocha, 2008). Breternitz, Fidelis, Silva, Eberlin, and Hubinger (2017) showed that increasing the concentration of the carrier agent leads to an increase in the microparticle diameter and a reduction in the hygroscopicity and glass transition temperature ( $T_g$ ) of the powder.

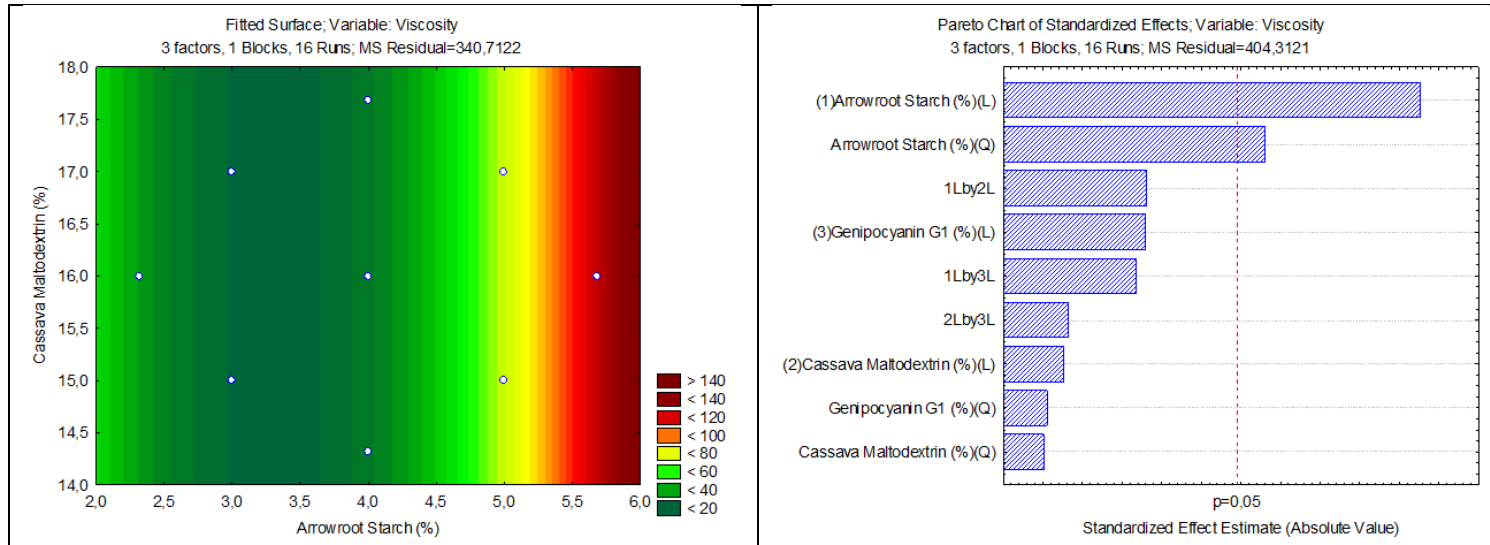
The encapsulation efficiency was over 90% for all treatments. However, there was great variation in the retention of encapsulated dye, with no significant effects for the parameters analyzed. Probably a part of the dye was lost during processing, together with the wall material, which can be confirmed by the low yield values. However, higher process efficiency was observed when considering the amount of wall material and core material used in the encapsulation. This result demonstrates the need to adjust the processing parameters, such as the use of higher temperatures, higher air flow rates, and lower feed flow rates.

**Table 3.** Result of the characterization of microencapsulated blue dye solutions and powders.

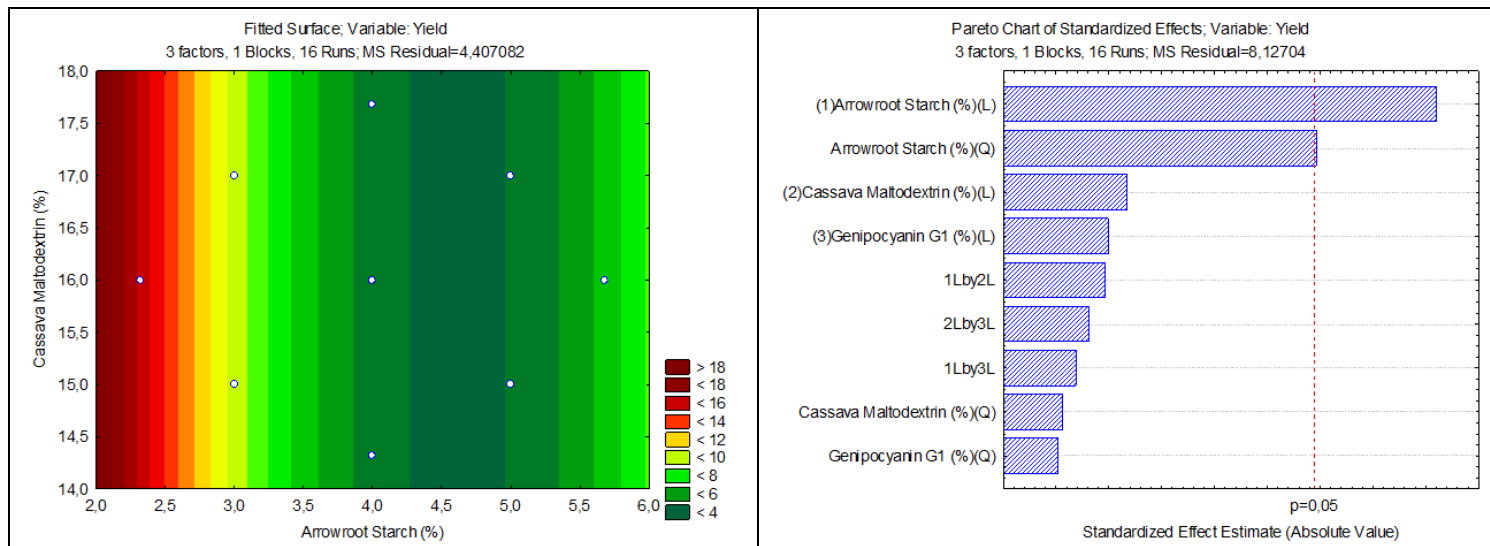
Treatment	Apparent Viscosity of Solutions at 35 s <sup>-1</sup> (MPa.s)	Encapsulation Efficiency (%)	Dye Retention Genipocyanin G1 (%)	Water Activity	Yield (%)	Density (g.mL <sup>-1</sup> )	Solubility (%)
1	28.153 ± 0.280	97.61 ± 0.25	35.86 ± 0.35	0.495 ± 0.001	7.22	0.326 ± 0.009	91.18 ± 2.20
2	27.350 ± 0.831	95.02 ± 0.26	22.73 ± 0.13	0.477 ± 0.003	8.04	0.250 ± 0.007	99.30 ± 5.72
3	12.800 ± 0.277	96.52 ± 0.09	15.40 ± 0.38	0.484 ± 0.003	9.00	0.278 ± 0.005	89.30 ± 5.43
4	11.040 ± 0.480	98.08 ± 0.10	26.30 ± 0.05	0.472 ± 0.004	6.48	0.250 ± 0.002	86.47 ± 4.91
5	34.230 ± 0.733	97.15 ± 0.04	36.40 ± 0.51	0.509 ± 0.006	3.78	0.293 ± 0.002	93.61 ± 10.65
6	56.780 ± 0.277	95.63 ± 0.13	50.82 ± 0.16	0.499 ± 0.003	3.27	0.267 ± 0.004	83.64 ± 2.76
7	46.230 ± 0.277	96.05 ± 0.38	25.17 ± 0.36	0.498 ± 0.003	5.34	0.316 ± 0.006	84.86 ± 3.14
8	87.810 ± 0.480	96.15 ± 0.07	39.52 ± 0.29	0.491 ± 0.002	5.66	0.264 ± 0.005	83.60 ± 4.15
9	27.190 ± 0.277	97.08 ± 0.06	15.56 ± 0.40	0.434 ± 0.002	19.63	0.293 ± 0.004	92.19 ± 4.37
10	151.157 ± 3.746	95.98 ± 0.06	68.56 ± 0.08	0.484 ± 0.003	4.59	0.263 ± 0.002	72.53 ± 4.90
11	45.750 ± 0.554	95.52 ± 0.05	68.93 ± 0.02	0.487 ± 0.003	4.89	0.243 ± 0.003	92.60 ± 3.91
12	27.190 ± 0.277	95.95 ± 0.06	33.11 ± 0.10	0.455 ± 0.001	6.62	0.253 ± 0.008	92.20 ± 4.02
13	27.350 ± 0.001	96.71 ± 1.04	70.57 ± 0.61	0.512 ± 0.004	3.43	0.266 ± 0.003	88.66 ± 3.14
14	47.990 ± 0.001	96.08 ± 0.09	21.97 ± 0.39	0.460 ± 0.002	7.65	0.239 ± 0.011	84.06 ± 1.99
15	23.350 ± 0.554	95.84 ± 0.18	34.15 ± 0.23	0.495 ± 0.003	4.25	0.253 ± 0.005	81.98 ± 4.14
15	26.070 ± 0.277	95.25 ± 0.15	30.77 ± 0.06	0.498 ± 0.002	4.39	0.260 ± 0.006	77.84 ± 2.78

$$\text{Apparent Viscosity} = 26.75755 + 51.87161 \text{ ara} + 36.95117 \text{ ara}^2 \quad R^2 = 0.752 \quad (7)$$

$$\text{Yield} = 4.55716 - 5.56289 \text{ ara} + 4.58975 \text{ ara}^2 \quad R^2 = 0.749 \quad (8)$$



**Figure 1.** Contour graph and Pareto diagram for the apparent viscosity parameter.



**Figure 2.** Contour graph and Pareto diagram for the yield parameter.

The microparticles presented water activity values ranging from 0.334 to 0.512. Although no significant effects were observed for all treatments, low water activity indicates less susceptibility to microbial contamination and chemical changes depending on the availability of free water. Under these conditions, there are few storage needs, once it is not necessary to use low storage temperatures. Water activity also has a great effect on the flow factor of powders, an important parameter concerning ingredients for the food industry, and the lower the water activity, the greater the powder flow (Juarez-Enriquez, Olivas, Ortega-Rivas, Zamudio-Flores & Perez-Vega, 2019).

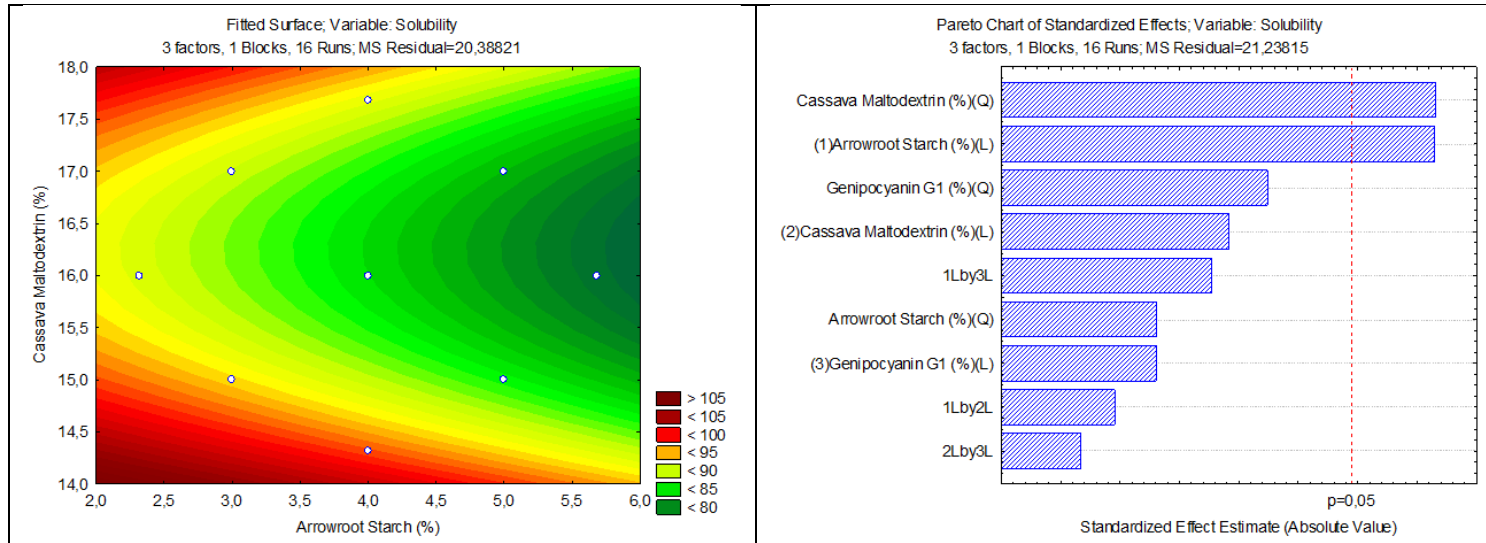
Lacerda et al (2016) evaluated jussara pulp (*Euterpe edulis* Martius) microparticles, rich in anthocyanins, produced with modified starch, inulin, and maltodextrin and reported water activity values between 0.252 and 0.484. The authors pointed out that the greater the proportion of core material to wall material, the greater the final water activity of the microparticles.

Apparent density also affects the powder flow (Novaes et al., 2019). In the present study, density was also not significantly affected by all parameters evaluated.

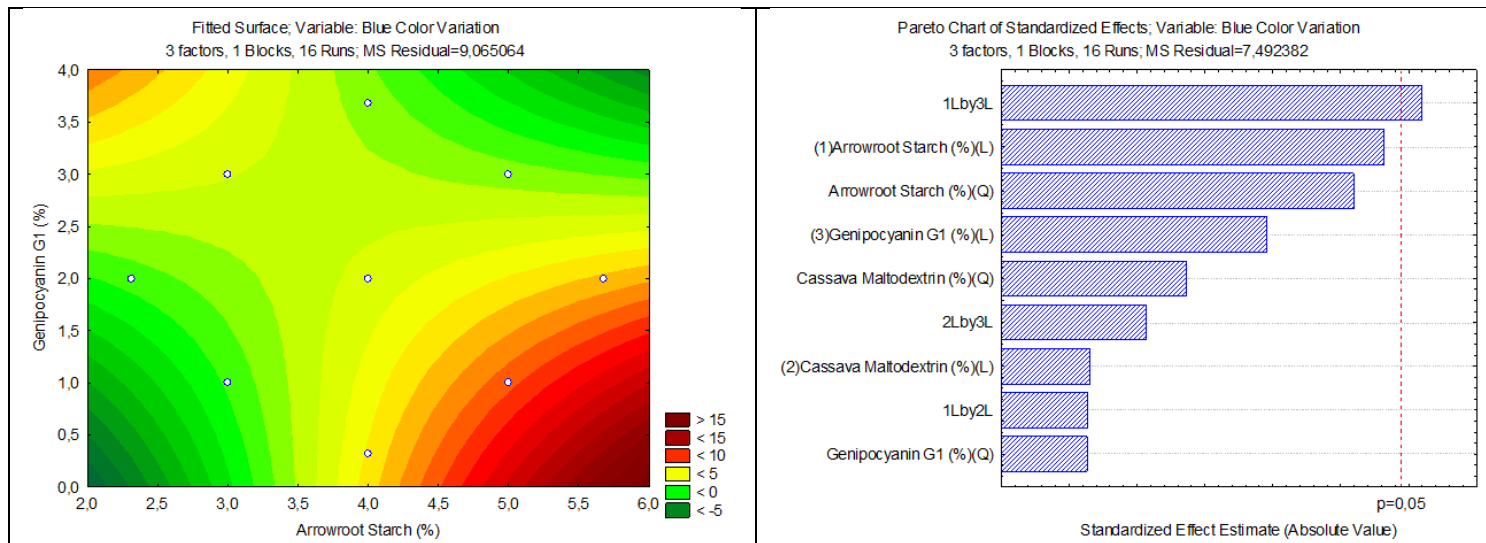
The solubility of the microparticles was significantly affected by the cassava maltodextrin concentration (Equation 9 and Figure 3). Although the  $R^2$  value is equal to 0.630, the lack of adjustment was not significant. A lower solubility was observed for the microparticles containing approximately 16.0% of maltodextrin, while higher solubility percentages were observed for concentrations < 15.0% and greater than 17.0% of this polymer. As can be seen in the contour curves, the arrowroot starch led to a reduction of solubility of the microparticles in water, which can be a desirable characteristic in products requiring a controlled release of the encapsulated compound. Despite that, all treatments showed solubility in water above 80%, which is considered high (Lacerda et al., 2016) and desirable in water-based products such as juices and soft drinks.

$$\text{Solubility} = 84.02835 - 7.83903 \text{ ara} - 3.54051 \text{ malt} + 7.25932 \text{ malt}^2 \quad R^2 = 0.630 \quad (9)$$

The results of instrumental color on days 10 and 20 after the production of the microparticles, the color variation, and the dye stability are shown in Table 4.



**Figure 3.** Contour graph and Pareto diagram for the solubility parameter.



**Figure 4.** Contour graph and Pareto diagram for the blue color variation parameter ( $\Delta b^*$ ).

There were no significant effects of the materials used in the encapsulation on the color variation ( $\Delta E^*$ ). In general, a decrease in luminosity ( $L^*$ ) was observed for most treatments. Studies have shown that  $\Delta E^*$  values  $> 5$  are perceptible to the naked eye, which can affect the perceived quality of the product (Obón et al., 2009).

The blue color variation ( $\Delta b^*$ ) was significantly affected by the arrowroot starch and genipocyanin G1 concentrations (Equation 10 and Figure 4). Lower blue color variations were observed in the formulations with 3.5% of genipocyanin G1 and starch concentrations below 4.0%.

$$\Delta b^* = -3.35562 + 3.43908 \text{ ara} - 2.15616 \text{ gen} - 5.03250 \text{ ara.gen} \quad R^2 = 0.753 \quad (10)$$

**Table 4.** Instrumental color and variation of the color of the blue dye.

Treatment	10 days			20 days			$\Delta L^*$	$\Delta b^*$	$\Delta E^*$
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$			
Genipocyanin G1	13.74	-0.07	-0.64	8.19	-0.36	-1.81	-5.55	-1.17	5.68
1	75.47	-4.14	-8.54	70.47	-3.13	-6.81	-5.00	1.73	5.39
2	61.85	-6.35	-12.28	58.13	-5.06	-10.10	-3.72	2.18	4.50
3	74.75	-4.14	-8.64	77.10	-3.92	-8.05	2.35	0.59	2.43
4	53.06	-4.39	-8.39	50.09	-4.06	-6.85	-2.97	1.54	3.36
5	75.38	-4.01	-8.24	40.04	-0.07	2.01	-35.34	10.25	37.01
6	49.46	-4.11	-7.60	50.00	-2.60	-4.28	0.54	3.32	3.69
7	75.74	-3.81	-8.26	38.76	-0.47	3.01	-36.98	11.27	38.80
8	51.22	-4.17	-7.43	54.81	-4.70	-7.96	3.59	-0.53	3.67
9	49.54	-4.48	-7.50	45.05	-6.46	-10.85	-4.49	-3.35	5.94
10	40.08	-1.13	-3.77	44.04	-1.04	-4.02	3.96	-0.25	3.97
11	31.20	-2.09	-2.85	28.68	-0.47	1.97	-2.52	4.82	5.68
12	58.05	-4.28	-6.66	31.42	-0.46	-0.04	-26.63	6.62	27.71
13	83.98	-2.92	-5.58	71.88	0.04	-3.16	-12.10	2.42	12.69
14	57.62	-7.04	-11.28	53.97	-4.34	-7.31	-3.65	3.97	6.03
15	63.40	-5.29	-7.64	38.85	-2.54	-2.56	-24.55	5.08	25.22
15	68.16	-4.74	-6.23	46.17	-2.19	2.20	-21.99	4.03	22.50

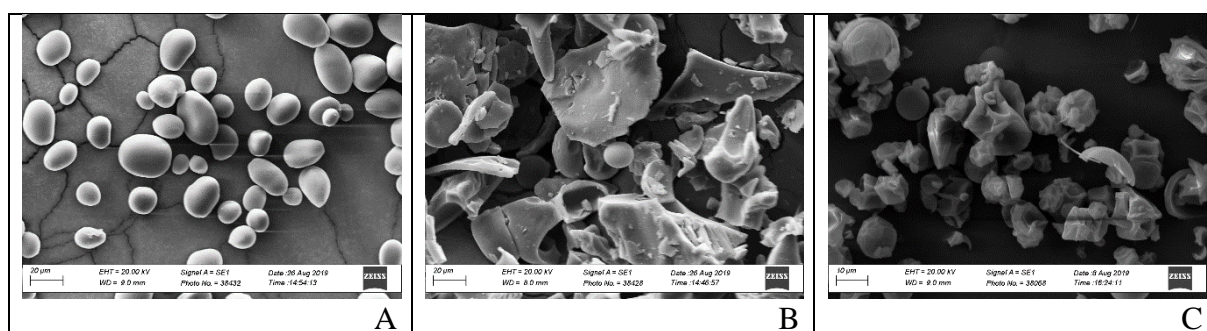
These results allowed determining the better yield values and blue color variation aimed to select the best formulation. Treatment 9 (2.3182% arrowroot starch, 16% cassava maltodextrin, and 2% genipocyanin G1) differed considerably from the others. This treatment presented the formulation found in the region of the response surface that corresponds to the lowest viscosity, the highest yield, the highest solubility and the lowest variation of the blue color, equivalent to the concentration of arrowroot starch less than 3.5% and concentration of genipocyanin G1 less than 3.0%. This singular behavior is justified by the fact that this treatment consists of the lower axial point for the concentration of arrowroot starch, since this

was the main responsible for the variation observed in viscosity and yield, in addition to being a of the main responsible for the blue color variation and solubility, according to the results obtained by ANOVA. Although an optimum point was not obtained for any of the evaluated parameters, the response surface can be used as a qualitative analysis, by observing the optimum regions for each of these parameters (lower viscosity and variation in blue color and higher yield and solubility). Therefore, it is suggested that the concentrations used in Treatment 9 compose the central point of future studies, aiming to refine the results and define the optimum points for each parameter analyzed.

This treatment showed better performance, with considerably higher values when compared to the other treatments, as well as little correlation with the blue color variation, which was significantly lower when compared to the other treatments. In addition to these desirable characteristics, Treatment 9 fit the ideal parameters shown in the contour curves, as previously discussed based on these two parameters (starch < 3.0% and genipocyanin G1 < 3.5%).

Given these results, Treatment 9 was subjected to SEM and FTIR analysis, as well as the polymers used as wall materials. The morphological characteristics of these materials are shown in Figure 5.

Arrowroot starch granules exhibited a smooth surface and oval structure, with varying sizes, and a cross-sectional diameter between 10.9  $\mu\text{m}$  and 35.1  $\mu\text{m}$ . The microstructure of cassava maltodextrin showed the disorganization of the starch granules due to the dextrinization process.



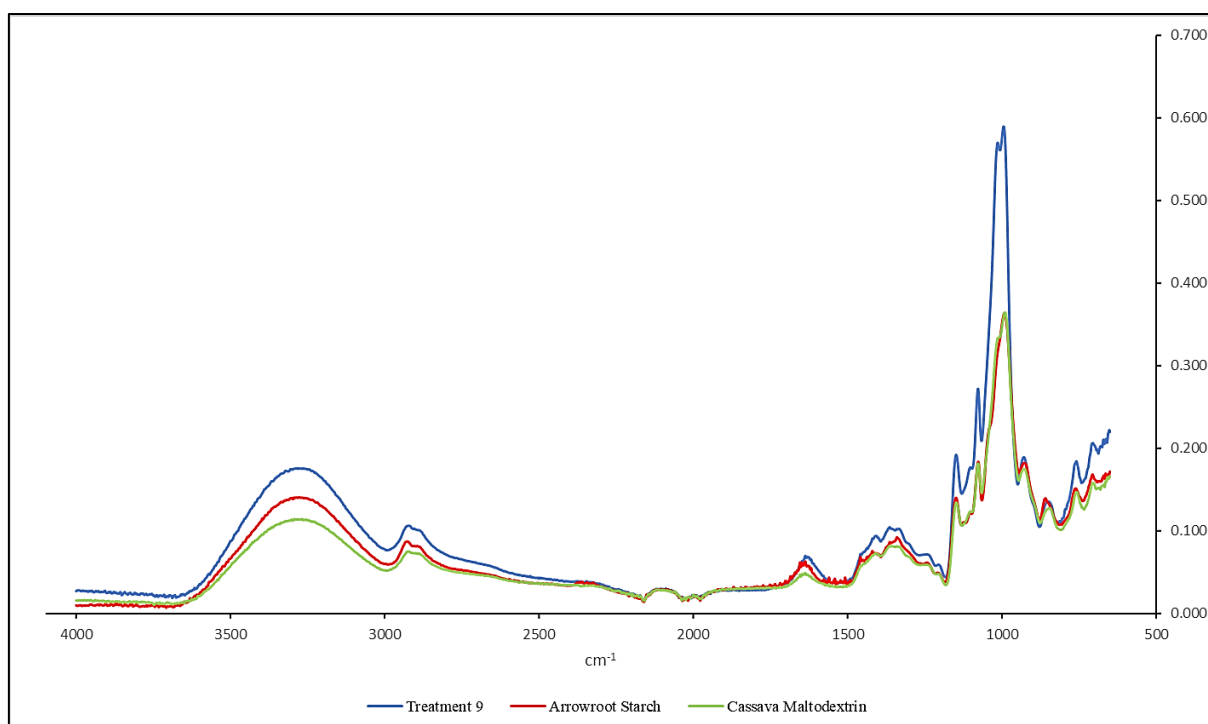
**Figure 5.** Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs of arrowroot starch (A), cassava maltodextrin (B) and genipocyanin G1 blue dye microcapsules - Treatment 9 (C).

Regarding the microparticles, in general, they exhibited spherical shapes with rough depressions that are typical of spray-dried materials, with shrinkage of the material due to the rapid water loss during the initial drying stages. No apparent cracks or pores were observed on

the particle surfaces, which is desirable for better preservation of sensitive compounds, due to less permeability to gases that can cause oxidation, and less transfer of the encapsulated material to the surface, controlling its release and ensuring a better encapsulation efficiency (Juarez-Enriquez et al., 2019; Pereira, Cattelan, & Nicoletti, 2019). The microparticles had different sizes, with an average size of 19.9  $\mu\text{m}$ . Some ruptured microparticles were observed, probably due to the mechanical stress during the fixation of the powder in the stubs.

The results of FTIR spectroscopy are shown in Figure 6. All spectra presented similar spectral bands, with no changes in location, indicating the presence of the same functional groups of the materials analyzed (Tan, Zhong, & Langrish, 2020). However, differences were observed in the intensity of specific bands related to the functional groups  $\text{NH}_2$  and  $\text{NH}$ , free or associated with primary and secondary amines, and amides ( $3,500$  to  $3,070$   $\text{cm}^{-1}$ ), hydrogen bonds ( $3,200$  to  $2,500$   $\text{cm}^{-1}$ ), and double bonds between carbons ( $1,200$  and  $870$   $\text{cm}^{-1}$ ), thus suggesting interactions between the wall material and the core material.

An increase in the band between  $3,500$  and  $3,070$   $\text{cm}^{-1}$  was observed for the microparticles of Treatment 9, which is characteristic of  $\text{NH}_2$  and  $\text{NH}$ , free or associated with primary and secondary amines, and amides. This behavior is due to the presence of the genipocyanin G1 in the material, once this dye is the result of the reaction between genipin and primary amines, such as glycine, and amino acid residues may be present in the material.



**Figure 6.** FTIR spectra of carbohydrates used as wall material and of selected microcapsules of genipocyanin G1 blue dye - Treatment 9.



The region between 3,200-2,500  $\text{cm}^{-1}$  indicated the presence of hydrogen bonds, involving carbonyls. A bell-shaped band between 3,500-3,000  $\text{cm}^{-1}$  was observed, which is related to the intermolecular interactions between the hydrogen bonds with the wall and core materials. Genipocyanin G1 is rich in C=O functional groups, which can perform hydrogen bonds with other genipocyanin G1 molecules and the starch and maltodextrin present in the wall material (Brauch et al., 2016).

The region at 3,400 to 3,200  $\text{cm}^{-1}$  indicated the presence of hydroxyl groups associated with polymerization, which is characteristic of materials containing starch and derivatives, such as maltodextrin. The bands at 1,200 to 1,000  $\text{cm}^{-1}$  were characteristic of starch and attributed to axial deformation vibration of C-O in alcohols, and axial deformation vibration of the O-C-O system. The increase in bands between 1,200 and 870  $\text{cm}^{-1}$  is characteristic of groups containing carbon-carbon double bonds, which are numerous in the genipocyanin dimer and polymer (Silverstein, Bassler & Morrill, 1991; Lima, Cabral, Neto & Tavares, 2012; Brauch et al., 2016).

Similar results were found by Madhavan, Belchenko, Motta, and Tan (2010), who reported an increased absorption band associated with C=O of genipin cross-linked collagen/chitosan scaffolds, which forms dimers or oligomers and reacts with the primary amines of the polymers. However, the authors identified a lower intensity band at 1740  $\text{cm}^{-1}$  attributed to a genipin C-O-O ester group, which was not observed in the present study.

#### **4.4 Conclusion**

It was possible to produce an encapsulated natural blue dye, from fruits of green genipap, arrowroot starch and cassava maltodextrin, adding value to these sociobiodiversity foods, which may contribute to the development of the regions that produce them.

The use of arrowroot starch and cassava maltodextrin as a wall material conferred desirable characteristics to the encapsulated natural blue dye genipocyanin G1, influencing viscosity, yield, solubility, and blue color variation. The arrowroot starch led to an increase in viscosity of the encapsulating solutions, which possibly reduced the yield of the powders.

The micrographs showed characteristics common to products encapsulated by spray drying, with continuous and rough particles, due to shrinkage of the wall material during drying, with no pores or cracks. The FTIR analysis indicated the increase in hydrogen bonds, possibly due to the interaction between the wall and core materials, with no displacement of bands, showing the absence of chemical bonds, such as covalent bonds between the materials, which is a desirable characteristic.

The best conditions for the production of encapsulated blue dye genipocyanin G1 are arrowroot starch and genipocyanin G1 concentrations lower than 3.5% and 3.0%, respectively, due to the higher yields and lower blue color variations of the samples. It is suggested that the concentrations used in Treatment 9 compose the central point of future studies, aiming to refine the results and define the optimum points for each parameter analyzed, in addition to the application of the dye developed in food matrices with different characteristics, for a better evaluation of its possibilities of use.

#### 4.5 Acknowledgments

The authors thank the Multidisciplinary Institute of Health at the Federal University of Bahia and the Department of Food Science at the Federal University of Lavras for making their infrastructure available for the development of this study.

This study was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001.

#### 4.6 References

- Agama-Acevedo, E., & Bello-Perez, L.A. Starch as an emulsions stability: the case of octenyl succinic anhydride (OSA) starch. (2017). *Current Opinion in Food Science*, v. 13, p. 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.014>.
- Brauch, J. E., Zapata-Porras, S. P., Buchweitz, M., Aschoff, J. K., & Carle, R. (2016). Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? *Food Research International*, 89, 91–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.029>.
- Breternitz, N. R., Fidelis, C. H. V., Silva, V. M., Eberlin, M. N., & Hubinger, M. D. (2017). Volatile composition and physicochemical characteristics of mussel (*Perna perna*) protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin and n-OSA modified starch. *Food and Bioproducts Processing*, 105, 12-15. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.05.008>.
- Castro-Rosas, J., Ferreira-Grosso, C. R., Gómes-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Rodríguez-Marín, M. L., Guzmán-Ortiz, F. A., & Falfan-Cortes, R. N. (2017). Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - a review. *Food Research International*, 102, 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.054>.

- Damodaran, S., Parkin, K.L., & Fennema, O.R. (2018). *Química de Alimentos de Fennema*. 5. ed., Porto Alegre: Artmed.
- Favaro-Trindade, C. S., Pinho, S. C., & Rocha, G. A. (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11, 103-112. <http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/bjft/2008/v11n24407.pdf>.
- Freitas, A. S. (2012). Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. *Acta Tecnológica*, 2, 65-72. <https://portaldeperiodicos.ifma.edu.br/index.php/actatecnologica/article/view/90/106>.
- Fujikawa, S., Fukui, Y., & Koga, K. (1987). Structure of genipocyanin G<sub>1</sub>, a spontaneous reaction product between genipin and glycine. *Tetrahedron Letters*, 28, 4699-4700. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96601-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96601-2).
- Genovese, D. B., Lozano, J. E., & Rao, M. A. (2007). The rheology of colloidal and noncolloidal food dispersions. *Journal of Food Science*, 72, R11-R20. <http://www.pfigueiredo.org/Bromono4a.pdf>.
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2004). Spray drying of tomatopulp: Effect of feed concentration. *Drying Technology*, 22, 2309–2330. <https://doi.org/10.1081/DRT-200040007>.
- Jafari, S. M. (2017). *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients: principles and applications*. London: Academic Press - Elsevier.
- Juarez-Enriquez, E., Olivas, G. I., Ortega-Rivas, E., Zamudio-Flores, P. B., & Perez-Vega, S. (2019). Water activity, not moisture content, explains the influence of water on powder flowability. *LWT - Food Science and Technology*, 100, 35-39. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.043>.
- Kandansamy, K., & Somasundaram, P. D. (2012). Microencapsulation of colors by spray drying-A Review. *International Journal of Food Engineering*, 8, 1-15. <https://doi.org/10.1515/1556-3758.2647>.
- Kang, M. J., Khanal, T., & Kim, H. G. (2012). Role of metabolism by human intestinal microflora in geniposide-induced toxicity in HepG2 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 35, 733-738. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0418-y>.

- Lacerda, E. C. Q., Calado, V. M. A., Monteiro, M., Finotelli, P. V., Torres, A. G., & Perrone, D. (2016). Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. *Carbohydrate Polymers*, 151, 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.093>.
- Lima, B. N. B., Cabral, T. B., C. Neto, R. P., Tavares, M. I. B., & Pierucci, A. P. T. (2012). Estudo do amido de farinhas comerciais comestíveis. *Polímeros*, 22, 486-490. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000062>.
- Loret, C., Meunier, V., Frith, W. J., & Fryer, P. J. (2004). Rheological characterization of the gelation behaviour of maltodextrin aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 57, 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.026>.
- Madhavan, K., Belchenko, D., Motta, A., & Tan, W. (2010). Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomaterialia*, 6, 1413-1422. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.028>.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>.
- Martinez, C., & Cuevas, F. (1989). *Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz*. Guia de estudo, CIAT.
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>.
- Neri-Numa, I. A., Pessoa, M. G., Paulino, B. N., & Pastore, G. M. (2017). Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 271-279. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.018>.
- Nogueira, G. F., Fakhouri, F. M., Oliveira, R. A. (2018). Extraction and characterization of arrowroot (*Maranta arundinaceae* L.) starch and its application in edible films. *Carbohydrate Polymers*, 186, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.024>.

Novaes, S. S. C., Dantas, F. B. H., Alvim, I. D., Miguel, A. Na. R. O., Vissoto, F. Z., & Alves, R. M. V. (2019). Experimental method to obtain a uniform food powder mixture of omega-3 microcapsules and whole milk powder. *LWT - Food Science and Technology*, 102, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.037>.

Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., & Fernandez-Lopez, J. A. (2009). Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90, 471-479. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.013>.

Pereira, A. R. L., Cattelan, M. G., & Nicoletti, V. R. (2019). Microencapsulation of pink pepper essential oil: Properties of spray-dried pectin/SPI double-layer versus SPI single-layer stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 581, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123806>.

Ribeiro, J. S., & Veloso, C. M. (2021). Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocolloids*, 112, 106374. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106374>.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>.

Rosa, J. R., Nunes, G. L., Motta, M. H., Fortes, J. P., Weis, G. C. C., Hecktheuer, L. H. R., Muller, E. I., Meneses, C. R., & Rosa, C. S. (2019). Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: Characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 89, 742–748. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.042>.

Santana, A. A., Cano-Higueta, D. M., Oliveira, R. A., & Telis, V. R. N. (2016). Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. *Food Chemistry*, 212, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.148>.

Silva, A. V. C., Freire, K. C. S., Lêdo, A. S., & Rabbani, A. R. C. (2014). Diversity and genetic structure of jenipapo (*Genipa Americana* L.) Brazilian accessions. *Scientia Agricola*, 71, 345-355. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0038>.

- Silverstein, R. M., Bassler, G. C., & Morrill, T. C. (1991). Infrared Spectrometry. In: *Spectrometric Identification of Organic Compound*, p.91, John Wiley & Sons, Singapura.
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5, 65-77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3093624/>.
- Sousa, C. S. Da, Silva, S.A., Hansen, D. S., & Fonseca, A. A. O. (2007). Correlações entre caracteres físicos e químicos de jenipapeiros nativos do Recôncavo Baiano. *Nota Científica. Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, p. 270-272. <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/245/235>.
- Stoll, L., Costa, T. M. H., Jablonski, A., Flores, S. H., & Rios, A. O. (2016). Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 172-181. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1610-0>.
- Storz, E., & Steffens, K. J. (2004). Feasibility study for determination of the dextrose equivalent (DE) of starch hydrolysis products with near-infrared spectroscopy (NIRS). *Starch/Stärke*, 56, 58-62. <https://doi.org/10.1002/star.200300220>.
- Sweedman, M. C., Tizzotti, M. J., Schäfer, C., & Gilbert, R. G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 92, 905-920. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.040>.
- Tan, S., Zhong, C., & Langrish, T. (2020). Pre-gelation assisted spray drying of whey protein isolates (WPI) for microencapsulation and controlled release. *LWT - Food Science and Technology*, 117, 1086252. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108625>.
- Touyama, R., Inoue, K., Takeda, Y., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Moritome, N., Moritome, N., Shingu, T., Yokoi, T., & Inouye, H. (1994). Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II. On the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42, 1571-1578. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.1571>.
- Wang, Q. S., Xiang, Y., Cui, Y. L., Lin, K. M., & Zhang, X. F. (2012). Dietary blue pigments derived from genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF-kB inactivation. *PLoS ONE*, 7, e34122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034122>.

---

**V. CAPÍTULO III – Encapsulação de corante azul de genipocianina G1 em lipossomas estabilizados com amido de araruta e maltodextrina**

A ser submetido à revista Carbohydrate Polymers (Qualis A1).

---

## Resumo

Os corantes naturais têm sua utilização limitada pela baixa estabilidade ao processamento e armazenamento, sendo fundamental a realização de estudos que visem a superação dessa limitação. O objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar um corante natural azul, composto por genipocianina G1 obtida a partir de frutos verdes de jenipapo, encapsulado em lipossomas de lecitina de soja e óleo de coco e estabilizado com amido de araruta e maltodextrina de mandioca, submetido a liofilização. Avaliou-se a morfologia dos lipossomas, a eficiência de encapsulação, o rendimento, a densidade, a atividade de água, a solubilidade a variação da cor das micropartículas, e foi realizada a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e a análise de superfície de resposta foram empregados como ferramentas estatísticas. A encapsulação de genipocianina G1 mostrou-se uma técnica viável e simples e, considerando os parâmetros avaliados, lipossomas produzidos com quantidades entre 15 e 20 mL de Emulsão 1 (46,3% de óleo de coco extra virgem, 0,01 % de genipocianina G1, 6,9% de maltodextrina de mandioca e 0,5% de lecitina de soja em pó) e 8 a 9 g de sólidos estabilizantes produzem melhores formulações, por gerarem rendimentos próximos a 100% e maiores solubilidades em água, além de eficiência de encapsulação maior que 97%.

**Palavras-chave:** genipina; microencapsulação; emulsificação complexa; corante alimentício; aditivos alimentares.

## 5.1 Introdução

Os lipossomas são vesículas formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos, em que o seu interior e seu exterior são compostos por um meio aquoso. Essa estrutura pode ser utilizada como forma de encapsulação e liberação controlada de diversas moléculas bioativas e compostos sensíveis, apresentando grande potencial de utilização pela indústria alimentícia e farmacêutica. O composto de interesse pode estar localizado no interior da vesícula, caso seja hidrofílico; entre a bicamada de fosfolípidos, caso seja lipofílico; ou ainda pode atravessar a estrutura e interagir tanto com as regiões polares quanto apolares da vesícula e do meio, no caso dos compostos anfifílicos (Justo & Moraes, 2010; Machado, Pinheiro, Vicente, Souza-Soares, & Cerqueira, 2019).

As vesículas lipossomais podem ser produzidas por diferentes técnicas, incluindo a aplicação da sonicação (Santos & Castanho, 2002). Nesse método, após misturar adequadamente todos os componentes dos lipossomas, o material é submetido a um tratamento



com vibrações ultrassônicas, cujas ondas promovem o fenômeno da cavitação, que se caracteriza pela formação, crescimento e colapso de microbolhas no centro do líquido. Esse colapso ocorre quando a bolha cessa de absorver a energia da sonicação e acaba por implodir, gerando altas pressões e temperaturas em minúsculos pontos quentes, que não são perceptíveis nas condições ambientais normais, e produzem as vesículas (Luque-Garcia & Luque De Castro, 2003; Capelo, Maduro, & Vilhena, 2005).

Considerando que a maioria dos solventes orgânicos, normalmente empregados em métodos de produção de lipossomas, são tóxicos e proibidos para uso em alimentos, o estudo de técnicas que não os utilizem deve ser estimulado, visando desenvolver métodos seguros para a encapsulação em lipossomas. Na indústria alimentícia, os lipossomas têm sido mais comumente estudados para o encapsulamento e entrega controlada de aromas, nutrientes e compostos antimicrobianos e antioxidantes, de modo a melhorar a conservação dos produtos (Taylor, Weiss, Davidson, & Bruce, 2005). Diante do seu potencial para a encapsulação de outros constituintes naturais, como os corantes, essa técnica pode ser considerada como mais uma alternativa para o aumento da estabilidade desses compostos.

Devido à sensibilidade térmica da maioria dos corantes naturais, as técnicas de encapsulação realizadas a frio, como a produção de lipossomas, mostram-se promissoras para a obtenção de produtos com alta qualidade e maior rendimento. Quando são combinadas com a liofilização, por exemplo, pode ser alcançada uma elevada eficiência de encapsulação, alto rendimento e a possibilidade de utilização das microcápsulas em matrizes alimentares com as mais diversas características. A combinação de métodos cria a possibilidade de utilização de corantes lipofílicos em matrizes aquosas ou de corantes hidrofílicos em matrizes gordurosas, por exemplo, além do uso de corantes sensíveis ao pH em alimentos que tenham características incompatíveis (Hua, Li, Liu, & Sun, 2003; Ribeiro & Veloso, 2021). Entretanto, poucos estudos com a encapsulação de corantes naturais em lipossomas têm sido desenvolvidos. Essa técnica tem sido empregada na encapsulação de compostos hidrofóbicos, como os carotenoides, especialmente o betacaroteno, com métodos que realizam a produção de prolipossomas por meio de *spray drying* (Moraes et al., 2013; Toniazzo et al., 2014; Carvalho et al., 2015), sendo escassos os trabalhos que combinam a produção de lipossomas com a liofilização para a encapsulação de corantes naturais.

Dado o exposto, o objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar um corante natural azul, composto por genipocianina G1 obtida a partir de frutos verdes de jenipapo (*Genipa americana* L.), encapsulado em lipossomas de lecitina de soja (*Glycine max*) e óleo de coco

(*Cocos nucifera*), estabilizados com amido de araruta (*Maranta arundinacea* L.) e maltodextrina de mandioca (*Manihot esculenta*), submetidos à liofilização.

## **5.2 Materiais e métodos**

### **5.2.1 Materiais**

O jenipapo verde foi obtido no Território de Identidade do Sudoeste Baiano, Bahia - Brasil. A maltodextrina de mandioca (dextrose equivalente: 11,42) foi adquirida da empresa Cassava S/A, Brasil. Os rizomas de araruta foram obtidos junto a produtores da agricultura familiar da região do Território de Identidade do Vale do Jiquiriçá, Bahia - Brasil, e o amido foi extraído na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil. A gelatina e o óleo de coco extra virgem foram obtidos no comércio local, e a lecitina de soja em pó foi adquirida da empresa Dinâmica Química Contemporânea Ltda.

Para a extração do amido, foi empregada uma técnica tradicional, em que os rizomas de araruta foram pesados, descascados e cortados em fatias finas. Em seguida, a araruta foi triturada em liquidificador de baixa rotação (3.500 rpm, JL Colombo) por 5 min, com adição de água na proporção de 1:1 (m/v). A solução foi peneirada em um tecido fino e a fibra que ficou retida foi novamente triturada em liquidificador com a mesma proporção de água, repetindo-se esse processo por mais uma vez. A suspensão de amido foi deixada em repouso por 3 h, sendo retirado o sobrenadante e adicionada mais água limpa, com repouso por mais uma hora. Esse procedimento foi repetido até que a água ficasse totalmente límpida. Por fim, o amido foi transferido para um recipiente e levado para secagem em estufa com circulação forçada de ar (Ethik Technology, 420-TD) a uma temperatura de 40°C por 24 h. Após seco, o amido obtido foi pulverizado e peneirado.

### **5.2.2 Obtenção do corante**

Os frutos de jenipapo foram classificados como verdes, de acordo com a textura firme, coloração verde a verde acinzentada e teor de sólidos solúveis totais menor que 17° Brix. Os frutos foram higienizados em solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos, e as sementes foram removidas. A polpa e a casca foram trituradas em liquidificador de baixa rotação (3.500 rpm, JL Colombo) por 5 min, com adição de água destilada (1:3, m:v). A mistura foi aquecida em banho maria (Fisatom, modelo 802) a 55°C por 30 min, sob agitação contínua para aeração. Após isso, foi levada a um banho ultrassônico (40 kHz de frequência ultrassônica, 135 W de potência ultrassônica e temperatura máxima de 60°C ± 5°C, marca Unique, USC-1400) por 30 min, sendo posteriormente filtrada a vácuo e centrifugada a 3.000 x g por 5 min

(centrífuga Solab, SL-706). O sobrenadante coletado foi imediatamente misturado a um excesso de glicina, na proporção de 20 mg de glicina por grama de fruto. A solução foi novamente aquecida em banho maria a 55°C sob agitação por 30 min, para desenvolvimento e estabilização da cor azul. A concentração da genipocianina G1 foi determinada por espectrofotometria de absorção molecular a 595 nm, considerando a Lei de Lambert Beer, utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) igual a 43652.

### ***5.2.3 Encapsulação do corante azul de genipocianina G1***

A encapsulação da genipocianina G1 foi realizada em duas etapas apenas, visando eliminar a utilização de solventes orgânicos geralmente empregados na produção de lipossomas, reduzindo o impacto ambiental e a presença de resíduos tóxicos no produto, além de simplificar e diminuir os custos de processamento. Primeiramente, foi preparada uma emulsão, denominada Emulsão 1, através da mistura de 150 mL de óleo de coco extra virgem, 150 mL de uma solução contendo genipocianina G1 na concentração de 238,73 mg.L<sup>-1</sup>, 22,5 g de maltodextrina de mandioca e 1,5 g de lecitina de soja em pó, que foram misturados com o auxílio de um mixer (Mallory, Trixer 400) por 3 minutos, seguindo-se à exposição a ultrassom por 30 minutos (40 kHz de frequência ultrassônica, 120 W de potência ultrassônica e temperatura de 30°C  $\pm$  5°C, marca Unique, USC-1800), para o desenvolvimento dos lipossomas. Em seguida, diferentes quantidades da Emulsão 1 foram adicionadas às suspensões de estabilizantes previamente gelatinizadas e resfriadas à temperatura ambiente, produzidas com 100 mL de água destilada e uma mistura de amido de araruta e maltodextrina de mandioca, na proporção de 3:7, com a adição de 0,1 g de gelatina, conforme a quantidade de sólidos totais apresentada na Tabela 1. A mistura da Emulsão 1 à suspensão estabilizante foi conduzida em agitador magnético (Quimis, Q-261A21), à temperatura ambiente, por 2 minutos.

Avaliou-se a influência da quantidade da Emulsão 1, que continha o corante, e da quantidade de sólidos totais presentes na suspensão estabilizante, através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), composto por um fatorial completo 2<sup>2</sup>, com 3 repetições no ponto central e 4 pontos axiais (Tabela 1).

As suspensões finais tiveram seu pH aferido (pHmetro Even, pHS-3E), foram coletadas amostras para observação por microscopia óptica e o restante foi congelado para posterior liofilização. A liofilização foi realizada em equipamento da marca Terroni, modelo Enterprise I. O processo foi conduzido a -34°C, com pressão de 10  $\mu$ Hg, por 120 horas.

**Tabela 1.** Desenho experimental (DCCR) para otimização da produção de corante natural azul microencapsulado.

<b>Tratamento</b>	<b>Emulsão 1</b>	<b>Sólidos Totais (Solução Estabilizante)</b>
1	-1 (10 mL)	-1 (7 g)
2	-1 (10 mL)	+1 (10 g)
3	+1 (30 mL)	-1 (7 g)
4	+1 (30 mL)	+1 (10 g)
5	-1,41 (5,8579 mL)	0 (8,5 g)
6	+1,41 (34,1421 mL)	0 (8,5 g)
7	0 (20 mL)	-1,41 (6,3787 g)
8	0 (20 mL)	+1,41 (10,6213 g)
9	0 (20 mL)	0 (8,5 g)
9	0 (20 mL)	0 (8,5 g)
9	0 (20 mL)	0 (8,5 g)

#### **5.2.4 Análise da morfologia por microscopia óptica**

A Emulsão 1 e as suspensões contendo os lipossomas estabilizados com o amido de araruta e a maltodextrina de mandioca foram analisadas por microscopia óptica (Coleman, 231 T), e foi determinado o tamanho médio das vesículas através da medição de 5 vesículas por lâmina.

#### **5.2.5 Eficiência da encapsulação**

Para determinar a eficiência da encapsulação foram consideradas as quantidades de corante total e na superfície das cápsulas (Santana, Cano-Higuita, Oliveira & Telis, 2016). A determinação de genipocianina G1 total foi realizada através da adição de 100 mg de pó do corante e 10 mL de água destilada em tubos com tampa. A mistura foi agitada em vortex (Phoenix Luferco, AP-59) por 5 min e centrifugada a 3.000 x g por 5 min (centrífuga Quimis, Q222-T28). A determinação da genipocianina G1 na superfície das cápsulas foi realizada através da adição de 100 mg de pó do corante e 10 mL de solução de acetona: etanol (9:1) em tubos com tampa. A mistura foi agitada em vortex (Phoenix Luferco, AP-59) por 30 s e centrifugada a 3.000 x g por 5 min (centrífuga Quimis, Q222-T28). Os sobrenadantes foram coletados em ambas as análises e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, considerando a Lei de Lambert Beer, utilizando coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) igual a 43652.

A eficiência da encapsulação (EE) foi calculada pela diferença entre a concentração da genipocianina G1 total e a da superfície do pó, conforme a Equação 1.

$$EE (\%) = \frac{[(\text{Genipocianina G1 Total no Pó} - \text{Genipocianina G1 na Superfície})]}{\text{Genipocianina G1 Total no Pó}} \times 100 \quad (1)$$

### 5.2.6 *Rendimento, densidade, atividade de água e solubilidade das microcápsulas*

O rendimento do corante encapsulado em pó foi calculado em base seca, de acordo com a quantidade de sólidos totais presente nas soluções encapsulantes. A densidade aparente do corante em pó foi determinada pela relação entre o seu peso aferido em balança semi analítica (Shimadzu, BL 320H) e o seu respectivo volume, aferido em uma proveta de 10 mL (Goula & Adamopoulos, 2004; Santana, Cano-Higuita, Oliveira & Telis, 2016).

A atividade de água ( $a_w$ ) dos corantes microencapsulados foi determinada a 25°C, utilizando equipamento Aqualab (series 3TE).

A solubilidade dos corantes foi determinada a partir da adição de 0,1 g de pó (em base seca) e 10 mL de água destilada em tubos com tampa, com agitação em agitador de tubos vortex (Phoenix Lufenco, AP-59) por 5 minutos. A solução foi centrifugada (centrífuga Quimis, Q222-T28) a 3.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para cadinhos de porcelana previamente secos e pesados. O material foi seco em estufa (Fanem, Orion 515) a 105°C até peso constante (Santana, Cano-Higuita, Oliveira & Telis, 2016). A solubilidade (S) foi calculada através da Equação 2.

$$S (\%) = \frac{(\text{peso do cadinho com resíduo} - \text{peso do cadinho})}{\text{peso da amostra}} \times 100 \quad (2)$$

### 5.2.7 *Variação da cor instrumental dos corantes encapsulados*

A cor instrumental das microcápsulas foi determinada usando um colorímetro (Konica Minolta, CR-400), com iluminante D65 e ângulo de observação de 10°. Foi utilizado o espaço de cor CIELab para a determinação dos componentes:  $L^*$  [do preto (0) ao branco (100)],  $a^*$  [do verde (-) ao vermelho (+)] e  $b^*$  [do azul (-) ao amarelo (+)]. Para a determinação da variação da cor, as microcápsulas foram armazenadas em frascos de polietileno ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, tendo sua cor avaliada no mesmo dia em que foi produzido (tempo 0) e sete dias após a sua fabricação. A variação total da cor ( $\Delta E^*$ ) foi calculada conforme proposto por Obón, Castellar, Alacid e Fernandez-Lopez (2009), de acordo com a Equação 3.

$$\Delta E^* = [(L_7^* - L_0^*)^2 + (a_7^* - a_0^*)^2 + (b_7^* - b_0^*)^2]^{0,5} \quad (3)$$

Onde  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  são as coordenadas de cor no tempo inicial ( $t_0$ , no mesmo dia da fabricação) e após o período armazenamento estabelecido ( $t_7$ , sete dias após a leitura inicial).

A variação da cor azul foi determinada pela diferença entre os valores finais e iniciais do parâmetro  $b^*$ .

### **5.2.8 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Os materiais de parede e os pós das microcápsulas dos corantes foram avaliadas por meio da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, Agilent Cary® 630), sob a faixa do infravermelho médio, com comprimento de onda variando entre 4.000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **5.2.9 Análise estatística**

Os resultados foram analisados no software Statistica 8.0 (Copyright© StatSoft), por meio de Análise de Regressão e Superfície de Resposta, utilizando gráficos de contorno e de Pareto para apresentar os mesmos.

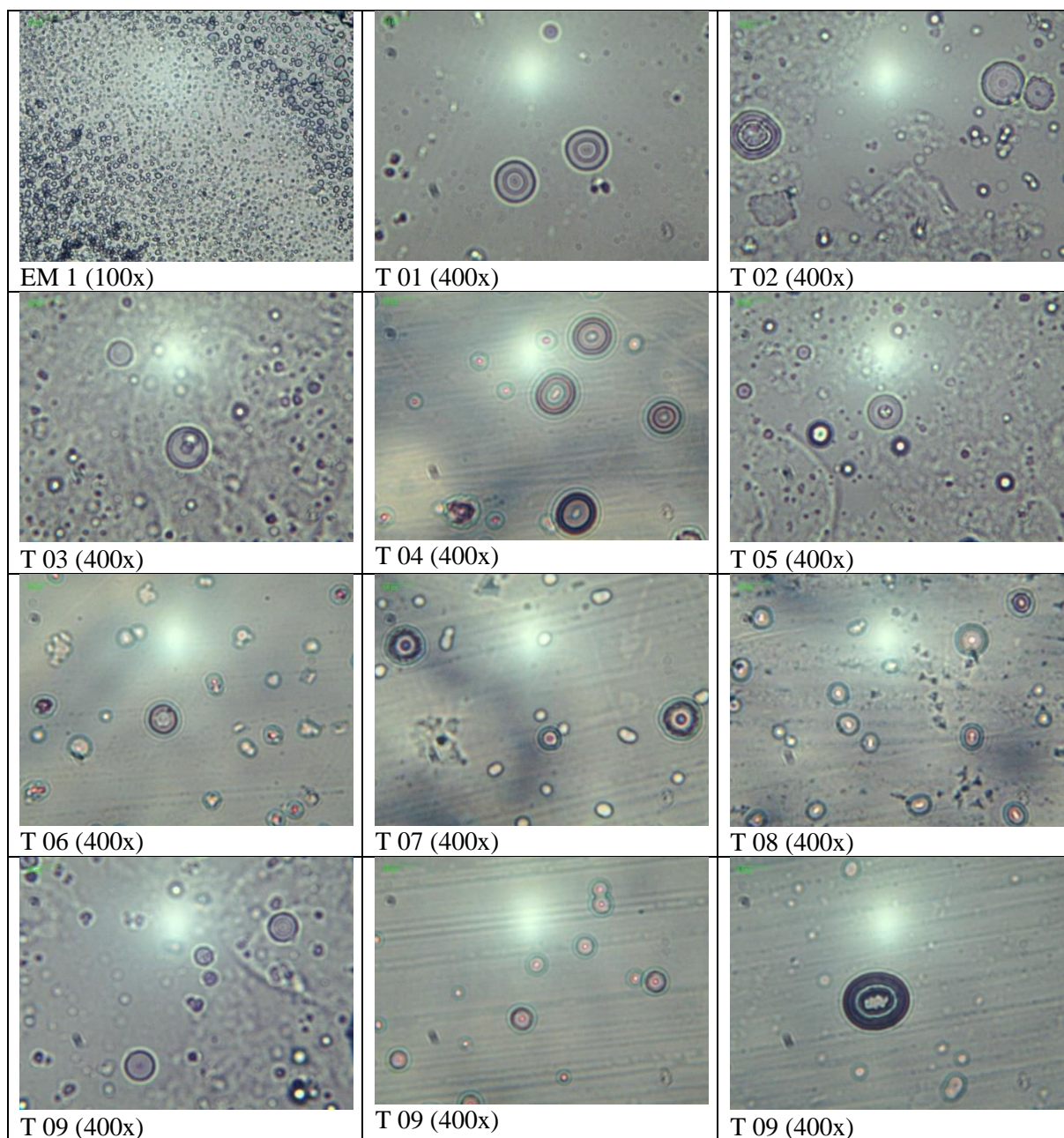
## **5.3 Resultados e discussão**

A morfologia da Emulsão 1 e dos lipossomas estabilizados com amido de araruta e maltodextrina de mandioca é apresentada na Figura 1.

Os lipossomas produzidos apresentaram um tamanho médio de  $57,22 \pm 8,78 \mu\text{m}$ , com uma estrutura formada por várias bicamadas concêntricas de fosfolipídeos intercaladas por camadas aquosas, sendo classificados como vesículas oligolamelares gigantes (GOV) (Santos & Castanho, 2002).

Como pode ser observado na Tabela 2, todas as suspensões apresentaram pH próximo à neutralidade ( $6,96 \pm 0,01$ ), não sendo necessária a realização de correções ou a preparação em solução tampão. Como as suspensões foram imediatamente congeladas para serem liofilizadas, o tempo de armazenamento não foi suficiente para a ocorrência de variações de pH capazes de desestabilizar sua estrutura (Araújo, 2019).

No presente estudo, os tratamentos apresentaram elevadas eficiências de encapsulação, superiores a 93%. Frézard et al. (2005) destacam que uma eficiência de encapsulação em lipossomas próxima a 100% pode ser obtida com substâncias lipofílicas incorporadas na membrana dos lipossomas, enquanto que para as substâncias hidrossolúveis é teoricamente impossível atingir níveis de encapsulação de 100%, devido à presença de água ao redor das partículas. Carvalho et al. (2015) também observaram elevada eficiência na encapsulação do betacaroteno encapsulado em fosfatidilcolina hidrogenada de soja, onde esse composto se apresentou 100% incorporado aos lipossomas.



**Figura 1.** Estruturas da Emulsão 1 e dos lipossomas observadas nas suspensões utilizadas na encapsulação.

O rendimento foi afetado pela quantidade de Emulsão 1 empregada na elaboração dos lipossomas, e a quantidade de sólidos totais na suspensão estabilizante apresentou efeito quadrático significativo (Equação 4 e Figura 2). O rendimento foi proporcional à quantidade de Emulsão 1, e quantidades entre 8 e 9 g de sólidos na suspensão estabilizante geraram menores valores de rendimento.

$$Rendimento = 95,62631 + 3,84184 \text{ emul} + 0,26527 \text{ solid} + 5,18041 \text{ solid}^2 \quad R^2 = 0,77493 \quad (4)$$

**Tabela 2.** Resultado da caracterização das suspensões e do corante azul de genipocianina G1 encapsulado e liofilizado.

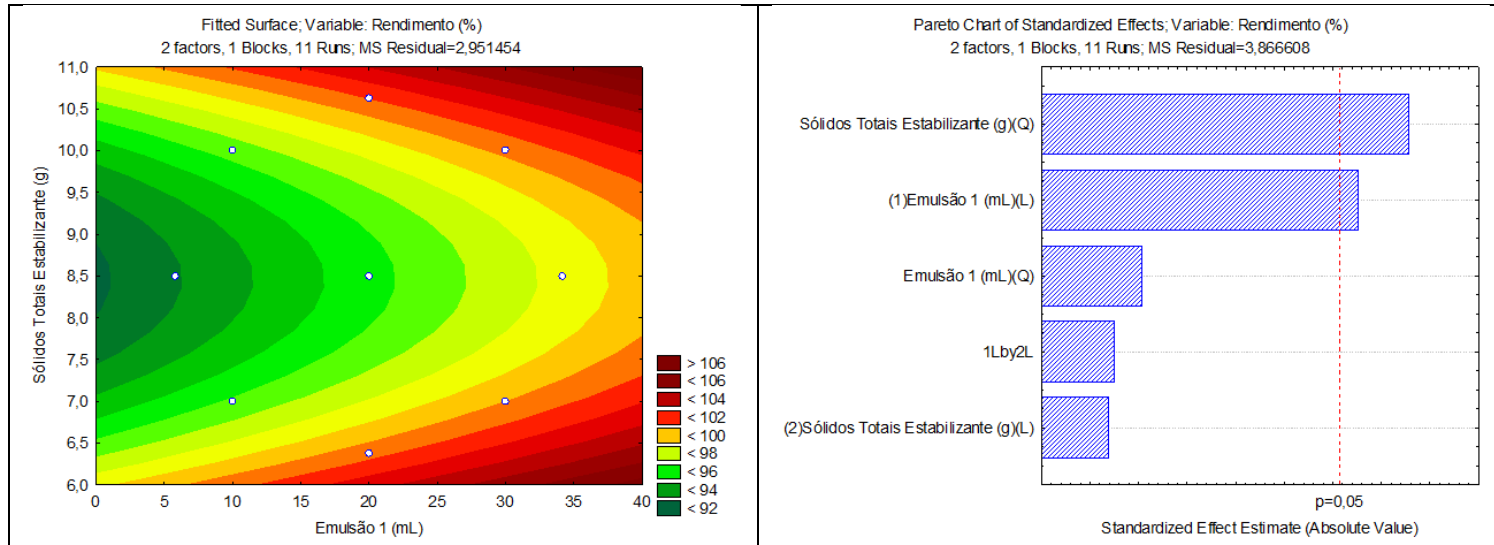
Trat.	pH	Eficiência da Encapsulação (%)	Rendimento (%)	Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	Atividade de Água	Solubilidade (%)
1	6,95 ± 0,01	97,37 ± 1,30	97,95	0,44 ± 0,01	0,528	27,43 ± 9,10
2	6,94 ± 0,00	94,23 ± 3,30	99,01	0,40 ± 0,03	0,553	31,87 ± 2,35
3	6,95 ± 0,00	97,76 ± 1,64	99,64	0,44 ± 0,02	0,625	27,90 ± 4,17
4	6,95 ± 0,00	96,47 ± 0,55	99,70	0,36 ± 0,05	0,541	22,49 ± 2,76
5	6,95 ± 0,00	93,34 ± 0,65	90,80	0,33 ± 0,06	0,548	36,12 ± 3,09
6	6,96 ± 0,00	99,04 ± 0,46	99,98	0,39 ± 0,03	0,556	25,97 ± 6,30
7	6,97 ± 0,00	98,71 ± 0,29	99,97	0,55 ± 0,04	0,929	33,21 ± 10,59
8	6,97 ± 0,00	99,40 ± 0,52	99,93	0,43 ± 0,02	0,556	32,18 ± 1,07
9	6,97 ± 0,00	98,32 ± 0,64	95,16	0,44 ± 0,02	0,513	43,55 ± 0,10
9	6,98 ± 0,01	98,05 ± 0,68	96,00	0,44 ± 0,03	0,523	45,25 ± 2,97
9	6,9 ± 0,00	98,57 ± 0,60	94,49	0,42 ± 0,01	0,508	41,19 ± 1,93

A densidade do pó de corante azul encapsulado também foi afetada pela quantidade de Emulsão 1 empregada na elaboração dos lipossomas, e pela quantidade de sólidos totais na solução estabilizante. Foi observado um efeito linear inversamente proporcional para a quantidade de sólidos, um efeito quadrático para a quantidade de Emulsão 1, além de um ponto de máxima densidade ao se utilizar quantidades menores que 6,5 g de sólidos na solução estabilizante e entre 15 e 25 mL da Emulsão 1. Estes resultados são apresentados na Figura 3, e o modelo matemático que representa esse efeito é apresentado na Equação 5.

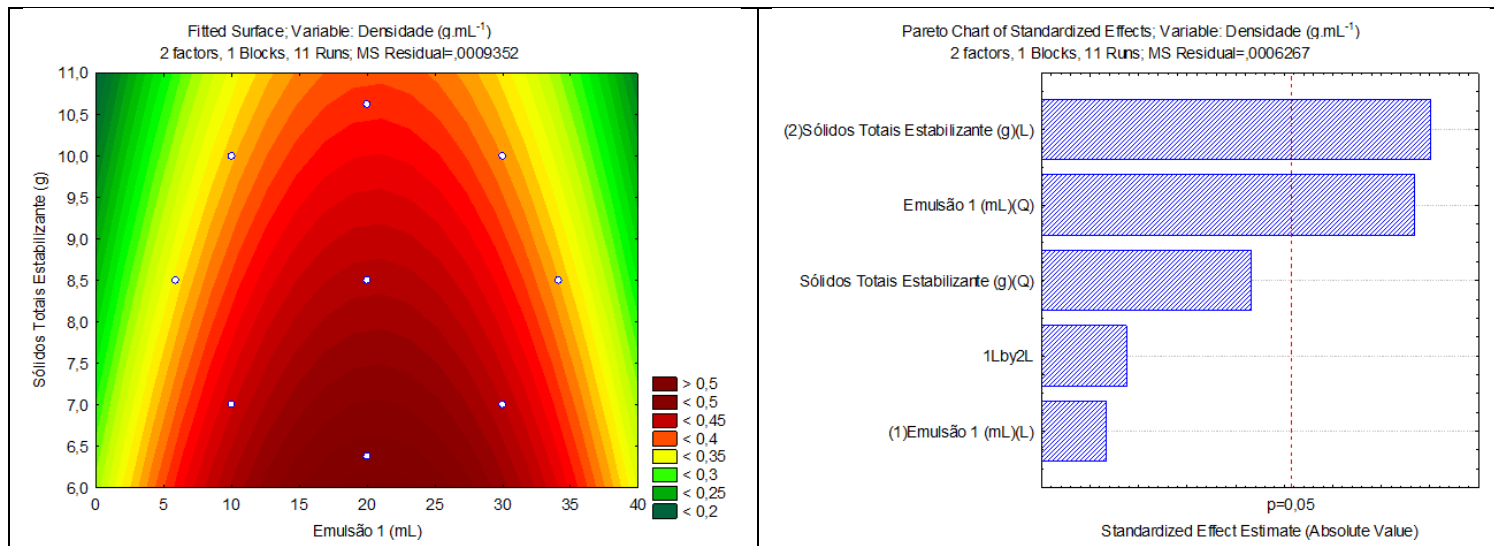
$$Densidade = 0,456090 + 0,011867 emul - 0,094365 emul^2 - 0,071006 solid \quad R^2 = 0,78658 \quad (5)$$

Atividade de água não foi afetada significativamente pelas variáveis analisadas. A maioria dos tratamentos apresentou atividade de água inferior a 0,625, exceto o Tratamento 7. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Gomez-Estaca et al. (2016), que relataram uma atividade de água de 0,59 para um extrato lipídico contendo astaxantina e encapsulado com gelatina e goma de caju. Esses baixos valores de atividade de água indicam que a maioria das formulações de corante produzidas são menos suscetíveis à contaminação e crescimento de microrganismos, bem como a alterações de natureza química dependentes da disponibilidade de água livre, resultando em menores exigências quanto às condições de armazenamento, com a possibilidade de estocagem em temperatura ambiente (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2018).

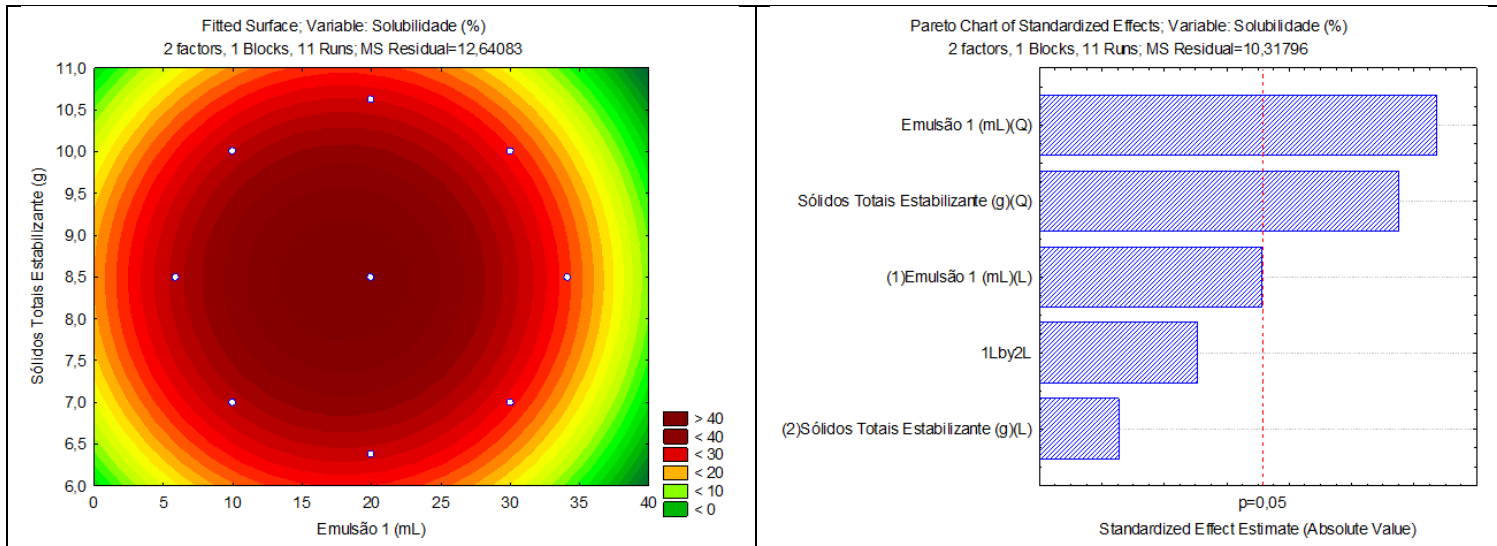




**Figura 2.** Gráfico de contorno e diagrama de Pareto para o parâmetro rendimento.



**Figura 3.** Gráfico de contorno e diagrama de Pareto para o parâmetro densidade.



**Figura 4.** Gráfico de contorno e diagrama de Pareto para o parâmetro solubilidade.

Foram observados efeitos quadráticos para a quantidade de Emulsão 1 e de sólidos totais na suspensão estabilizante sobre o parâmetro solubilidade das microcápsulas, conforme observado na Figura 4 e representado no modelo matemático apresentado na Equação 6. Pode ser identificado um ponto de máxima solubilidade ao redor de 15 a 20 mL de Emulsão 1 e entre e 8 e 9 g de sólidos totais na suspensão estabilizante.

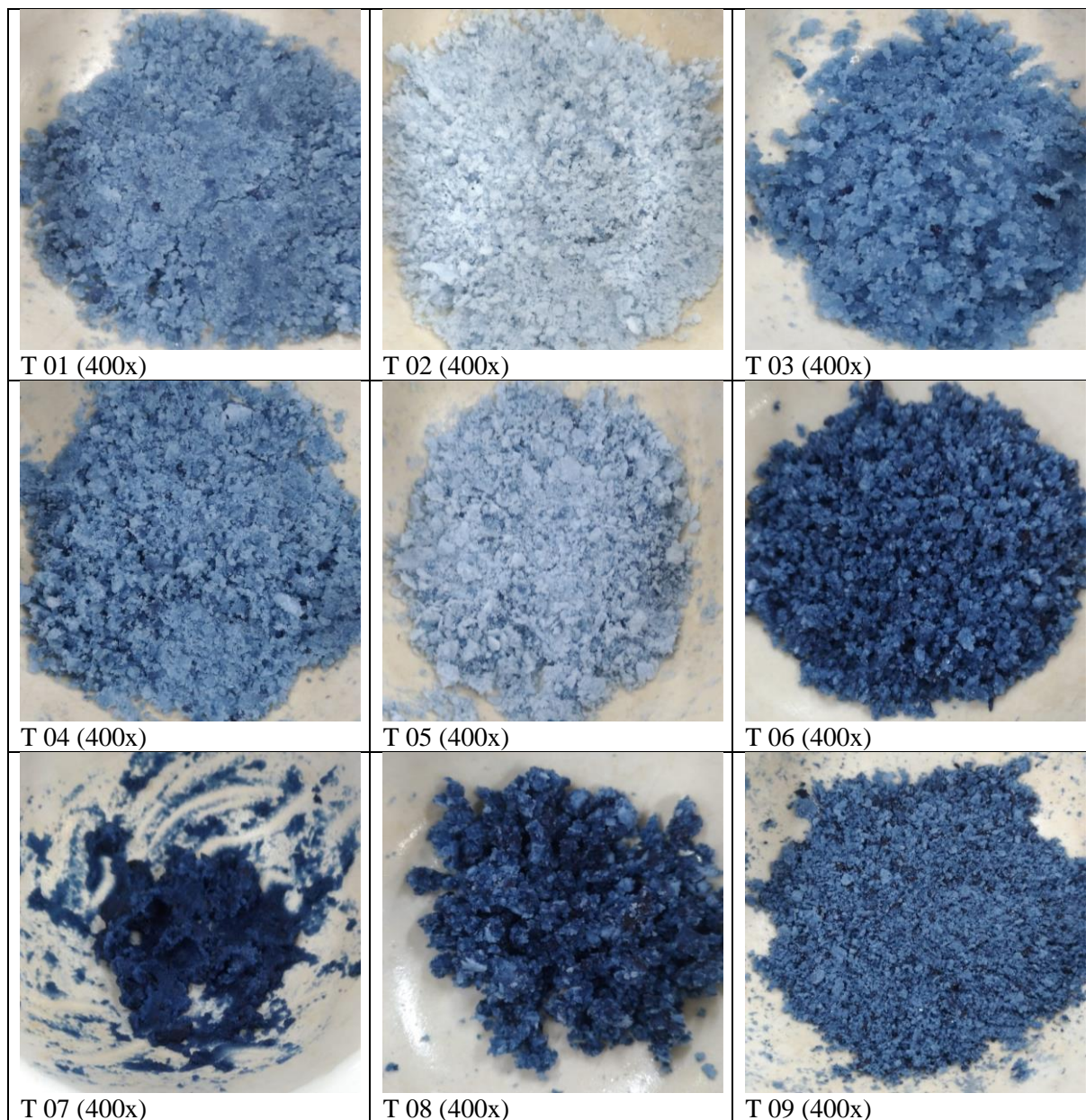
$$\text{Solubilidade} = 43,3270 - 5,8181 \text{ emul} - 14,5095 \text{ emul}^2 - 0,6093 \text{ solid} - 12,8532 \text{ solid}^2 \quad R^2 = 0,86344 \quad (6)$$

A solubilidade em água média das microcápsulas foi igual a 33,38%, valor próximo ao encontrado por Gomez-Estaca et al. (2016), que relataram uma solubilidade de 28,6% para um extrato lipídico contendo astaxantina e encapsulado com uma combinação de biopolímero de gelatina e goma de caju, por meio de coacervação complexa seguida de liofilização. Os autores destacam que esse resultado pode ser influenciado pela força de interação entre os componentes do material de parede, bem como pela espessura da camada que envolve o material do núcleo. No presente trabalho, os materiais utilizados como material de parede e estabilizantes (lecitina de soja, amido gelatinizado e maltodextrina) são solúveis em água em água, de modo que a interação entre os diferentes componentes das microcápsulas pode ser uma das causas da baixa solubilidade em água encontrada, assim como a incorporação do óleo de coco ao material. Entretanto, a redução da solubilidade em água pode ser desejável quando se pretende alcançar uma liberação controlada do material de núcleo ou empregar as microcápsulas em alimentos de base não aquosa, como a utilização de corantes em chocolates, cremes e sorvetes.

**Tabela 3.** Cor instrumental e variação da cor do corante azul.

Tratamento	0 dias			7 dias			$\Delta E^*$	$\Delta L^*$	$\Delta b^*$
	L*	a*	b*	L*	a*	b*			
1	51,62	-0,27	-13,83	49,08	0,20	-13,60	2,59	-2,54	0,23
2	72,09	-1,05	-7,34	70,38	-0,88	-8,24	1,94	-1,71	-0,90
3	40,91	0,51	-12,32	38,37	0,98	-12,09	2,59	-2,54	0,23
4	50,66	-0,08	-13,52	48,20	0,26	-13,49	2,48	-2,46	0,03
5	61,43	-0,61	-9,80	62,42	-0,47	-10,70	1,35	0,99	-0,90
6	34,42	1,06	-14,27	31,88	1,53	-14,04	2,59	-2,54	0,23
7	18,21	1,71	-8,16	15,67	2,18	-7,93	2,59	-2,54	0,23
8	30,41	1,39	-11,92	24,46	2,27	-11,21	6,05	-5,95	0,70
9	37,40	0,46	-14,83	34,83	0,89	-14,58	2,62	-2,57	0,25
10	38,16	0,83	-14,08	35,62	1,30	-13,85	2,59	-2,54	0,23
11	37,39	0,82	-14,77	34,84	1,27	-14,50	2,60	-2,55	0,27

A cor instrumental em 0 e aos 7 dias após a produção das microcápsulas e a variação da cor no período são apresentadas na Tabela 3 e pode-se observar as imagens dos corantes obtidos no presente estudo na Figura 5.



**Figura 5.** Fotografia dos diferentes tratamentos de lipossomas liofilizados de genipocianina G1 estabilizado com amido de araruta e maltodextrina de mandioca.

A variação total da cor ( $\Delta E^*$ ) e a variação da cor azul ( $\Delta b^*$ ) não foram afetadas significativamente pela quantidade de Emulsão 1 ou pela quantidade de sólidos totais utilizados como estabilizante. Observa-se que a variação total da cor foi menor que 5 para a maioria dos tratamentos, exceto para o Tratamento 8. Isso indica que a variação de cor observada no período avaliado não é perceptível ao olho nu, uma característica importante e desejável para corantes

naturais (Obón, Castellar, Alacid & Fernandez-Lopez, 2009). Foi possível obter diferentes tonalidades de corante a depender da concentração de emulsão 1 e de sólidos estabilizantes utilizados. Observa-se, ainda, que o Tratamento 7, cuja formulação é composta pelo ponto axial inferior para a quantidade de sólidos estabilizantes, apresentou um estado gomoso, indicando que o amido de araruta e a maltodextrina de mandioca interferem na transição vítrea do corante liofilizado.

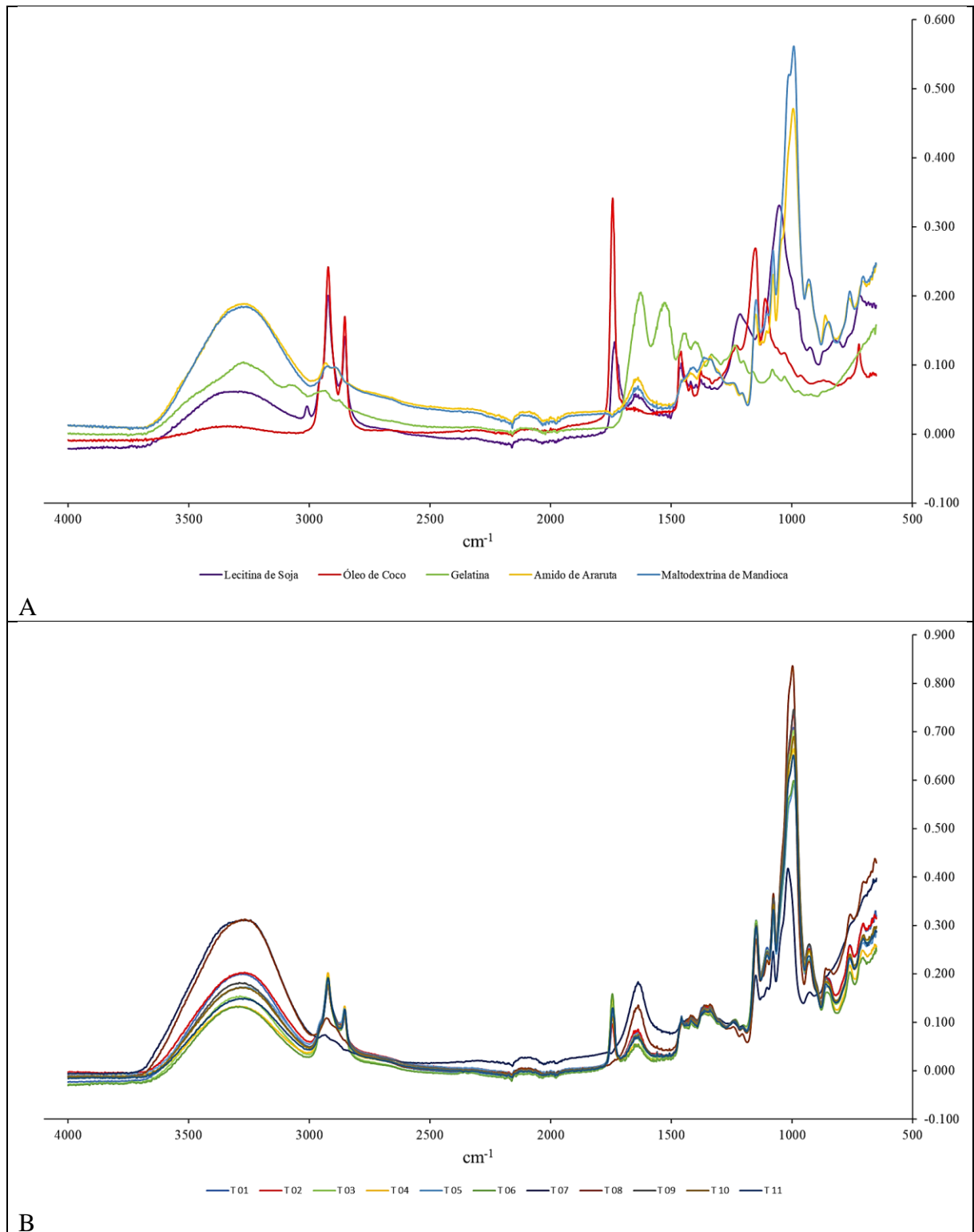
Toniazzo et al. (2014) avaliaram a variação da cor de betacaroteno encapsulado em lipossomas estabilizados com goma xantana e goma guar, e também observaram uma variação total da cor ( $\Delta E^*$ ) menor que 3 para todos os tratamentos realizados, durante o armazenamento por 95 dias, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo durante o período avaliado.

Em estudo avaliando lipossomas obtidos a partir da hidratação de prolipossomas de betacaroteno, fosfatidilcolina hidrogenada e sacarose, estabilizados com goma xantana e utilizando a técnica de *spray drying*, foi elaborado um produto altamente solúvel, com todos os componentes embutidos na matriz e capaz de preservar mais de 90% do betacaroteno incorporado por 60 dias de armazenamento refrigerado e a vácuo, preservando a cor das dispersões (Moraes et al., 2013). Esse resultado difere do presente estudo quanto à solubilidade, mas se assemelha na capacidade dos lipossomas em preservar a cor dos corantes durante o armazenamento, desde que este seja realizado de maneira adequada às características do produto.

Carvalho et al. (2015), estudando lipossomas de betacaroteno encapsulado com fosfatidilcolina hidrogenada de soja e estabilizados com goma xantana, observaram que a razão molar entre betacaroteno e fosfolípídeo é um fator limitante para a eficiência da encapsulação e aumento da estabilidade do composto de interesse durante o armazenamento, e que esses fatores não foram afetados pelo estabilizante utilizado. Os autores discutem que a inserção do carotenoide nas bicamadas de fosfolípídeos mais internas dos lipossomas multilamelares resulta em sua menor vulnerabilidade à decomposição por agentes oxidantes, o que eleva a sua estabilidade.

Observa-se, pelos espectros de FTIR (Figura 6A), que os materiais de parede e os estabilizantes utilizados na produção das microcápsulas possuem espectros de absorção característicos e distintos entre si. Para a lecitina de soja, as bandas 3650 e 3040  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento e a deformação angular de ligações OH; 3020  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença de grupos CH alifáticos; 1750 a 1720  $\text{cm}^{-1}$ , relacionados a grupos C=O de ésteres, cetonas e aldeídos; 1470 a 1430  $\text{cm}^{-1}$ , que indicam a deformação angular de  $-(\text{CH}_2)_n$ ; 1280 e 1180  $\text{cm}^{-1}$ , que inclui ligações C-O de ésteres e ligações C-N alifáticas. Esse espectro condiz

com a estrutura molecular dos fosfolipídios que constituem a lecitina de soja, como a fosfatidilcolina (Araújo, 2019).



**Figura 6.** Espectros de FTIR dos materiais de parede e estabilizantes (A) e dos diferentes tratamentos do corante azul de genipocianina G1 encapsulado em lipossomas (B).



Para o óleo de coco, foram observadas bandas em  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , referentes a cadeias alifáticas contendo CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>;  $1740\text{ cm}^{-1}$ , referentes a grupos C=O de ésteres;  $1470\text{ cm}^{-1}$ , que indicam a deformação angular de  $-(\text{CH}_2)_n$ ;  $1390\text{ cm}^{-1}$ , que indica deformação angular em CH<sub>3</sub> (Figura 6A). Essas bandas de absorção no infravermelho condizem com a composição química do óleo de coco, visto que ele é composto por triglicerídeos, que são lipídios formados por ésteres de ácidos graxos com glicerol (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2018).

Já a gelatina apresentou bandas em  $1740\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ , que compreendem ligações C=C aromáticas; entre  $1580$  e  $1480\text{ cm}^{-1}$ , que incluem ligações NH<sub>2</sub>; em  $1480\text{-}1420\text{ cm}^{-1}$ , que compreende ligações CH<sub>2</sub>; entre  $1420$  e  $1320\text{ cm}^{-1}$  e próximas a  $1200\text{ cm}^{-1}$ , que incluem ligações C-O de ácidos carboxílicos. Essas bandas de absorção são características dos aminoácidos que compõem a gelatina (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2018).

O amido de araruta e a maltodextrina de mandioca apresentaram comportamento semelhante em relação aos espectros de FTIR (Figura 5A), o que já era esperado, visto que a maltodextrina é obtida a partir da hidrólise do amido. Esses materiais apresentaram bandas de absorção no infravermelho semelhantes às relatadas por Silverstein, Bassler e Morrill (1991), que indicam que o amido apresenta bandas na região entre  $2900$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  (correspondente ao estiramento de ligações C-H); em  $1163$ ,  $1150$ ,  $1124$  e  $1103\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem ao estiramento de ligações entre C-O e C-C com alguma contribuição do estiramento C-OH; bandas em  $1077$ ,  $1067$ ,  $1047$ ,  $1022$ ,  $994$  e  $928\text{ cm}^{-1}$  que são atribuídas às deformações em C-OH e CH<sub>2</sub>, assim como a banda entre  $1150$  e  $1085\text{ cm}^{-1}$ , que indica a presença do grupo C-O-C (éter) presente em um anel piranosídico como os monômeros de glicose que formam o amido.

No presente estudo também foram identificadas bandas entre  $3650$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1700$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento e a deformação angular de ligações OH. A banda entre  $2950$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , pode ser atribuída à deformação axial de ligações C-H e as bandas na região  $1200$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$  são consideradas bandas características do amido e são atribuídas a vibrações de deformação axial de C-O em alcoóis e a vibrações de deformação axial do sistema O-C-O (Lima, Cabral, Neto & Tavares, 2012).

Para as diferentes formulações utilizadas na produção de corante natural azul de genipocianina G1 encapsulado em lipossomas, é possível observar que todas elas apresentaram um comportamento espectral semelhante (Figura 5B), não havendo mudanças significativas na localização das bandas, quando os tratamentos são comparados entre si e com os materiais de parede e estabilizantes. Isso indica que, provavelmente, não ocorreram ligações covalentes entre

o material de núcleo e os demais componentes da formulação, o que é uma característica desejável para produtos encapsulados (Tan, Zhong, & Langrish, 2020).

Entretanto, a caracterização do material por FTIR mostrou que ocorrem variações de intensidade em bandas específicas. Esse comportamento pode ser observado na região entre 3.700 a 3.000  $\text{cm}^{-1}$ , relacionada aos grupos funcionais  $\text{NH}_2$  e  $\text{NH}$  livres ou associados a aminas primárias e secundárias e a amidas, assim como a ligações diméricas e poliméricas; na região entre 3.000 e 2.800  $\text{cm}^{-1}$ , que compreende bandas relacionadas à ligação de hidrogênio intramolecular com  $\text{C}=\text{O}$  e  $\text{NO}_2$ , entre 1770 e 1630  $\text{cm}^{-1}$ , que compreende ligações  $\text{C}=\text{O}$  em diferentes grupos funcionais, como ácidos carboxílicos, ésteres, cetonas, aldeídos e amidas; e entre 1180 e 880  $\text{cm}^{-1}$ , que compreende ligações duplas entre carbonos. Essas variações foram observadas com maior intensidade nos Tratamentos 7 e 8.

O resultado apresentado é semelhante ao encontrado por Madhavan, Belchenko, Motta e Tan (2010), que observaram um aumento da absorção na banda relativa ao grupo  $\text{C}=\text{O}$  de constructos de colágeno e quitosana reticulados com genipina, nos quais este composto forma dímeros ou oligômeros e reage com as aminas primárias dos polímeros. Os autores identificaram uma banda de menor intensidade em 1740  $\text{cm}^{-1}$  atribuído a um grupo éster de  $\text{C}-\text{O}-\text{O}$  da genipina, que também pode ser observada no presente estudo, exceto para os Tratamentos 7 e 8.

Carvalho et al. (2015) afirmam que a estabilização das dispersões de lipossomas usando polissacarídeos é promovida pela capacidade que esses polímeros possuem de aumentar a viscosidade da fase contínua através da formação de uma rede polimérica, mecanismo que tem sido amplamente explorado na estabilização de emulsões.

Santos et al. (2020) ainda destacam a importância da utilização de crioprotetores durante a liofilização de lipossomas, pois pode ocorrer agregação das vesículas durante o processo, reduzindo consideravelmente a sua qualidade. O tipo de crioprotetor utilizado também influencia na variação de tamanho das vesículas e na retenção do composto encapsulado durante o armazenamento (Hua, Li, Liu, & Sun, 2003). Nesse sentido, a adição do amido e da maltodextrina na produção dos lipossomas pode promover uma menor agregação das vesículas, uma menor variação no seu tamanho e menores perdas durante o armazenamento, dadas as características desses polissacarídeos como estabilizantes e crioprotetores (Gomez-Estaca, Comunian, Montero, Ferro-Furtado, & Favaro-Trindade, 2016; Damodaran, Parkin, & Fennema, 2018).



## 5.4 Conclusão

A encapsulação de corante azul de genipocianina G1 por meio da produção de lipossomas de lecitina de soja e óleo de coco, estabilizados com amido de araruta e maltodextrina de mandioca e seguida de liofilização, mostrou-se uma técnica viável e simples, resumida a apenas duas etapas, sem a utilização de solventes orgânicos, reduzindo o impacto ambiental, a presença de resíduos tóxicos no produto e os custos de processamento. Observou-se a formação de vesículas oligolamelares gigantes (GOV), elevada eficiência de encapsulação (maior que 93%), elevado rendimento (maior que 94%), baixa solubilidade em água e baixa atividade de água, no geral, além de ser observada uma reduzida variação da cor no período avaliado. A análise por FTIR indicou características esperadas para o material de parede e os estabilizantes utilizados, e não indicaram ligações covalentes entre estes e o material do núcleo, uma característica desejável para compostos encapsulados. Considerando os parâmetros avaliados, lipossomas produzidos com quantidades entre 15 e 20 mL de Emulsão 1 e 8 a 9 g de sólidos estabilizantes produzem melhores formulações, por gerarem rendimentos próximos a 100% e maiores solubilidades em água, além de eficiência de encapsulação maior que 97%.

## 5.5 Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## 5.6 Referências

Araújo, J. M. A. (2019). *Química de alimentos: teoria e prática*. 7 ed. Viçosa, MG: Editora UFV.

Capelo, J. L., Maduro, C., & Vilhena, C. (2005). Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. *Ultrasonics Sonochemistry*. 12, 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2003.10.010>.

Carvalho, J. M. P., Toniazzo, T., Cavalcanti, L. P., Moraes, I. C. F., Oliveira, C. L. P., Pinho, S. C. (2015). Physico-chemical stability and structural characterization of thickened multilamellar beta-carotene-loaded liposome dispersions produced using a proliposome method. *Colloid and Polymer Science*, 293, 2171–2179. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3594-8>.

Damodaran, S., Parkin, K.L., & Fennema, O.R. (2018). *Química de Alimentos de Fennema*. 5. ed., Porto Alegre: Artmed.

Frézard, F., Schettini, D. A., Rocha, O. G. F., & Demicheli, C. (2005). Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, 28, 511-518. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300025>.

Gomez-Estaca, J., Comunian, T.A., Montero, P., Ferro-Furtado, R., & Favaro-Trindade, C.S. (2016). Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin–cashew gum complex. *Food Hydrocolloids*, 61, 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.005>.

Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2004). Spray drying of tomatopulp: Effect of feed concentration. *Drying Technology*, 22, 2309–2330. <https://doi.org/10.1081/DRT-200040007>.

Hua, Z-Z, Li, B-G, Liu, Z-J, & Sun, D-W. (2003). Freeze-Drying of Liposomes with Cryoprotectants and Its Effect on Retention Rate of Encapsulated Ftorafur and Vitamin A, *Drying Technology*, 21, 1491-1505. <https://doi.org/10.1081/DRT-120024489>

Justo, O.R., & Moraes, A. M. (2010). Economical Feasibility evaluation of etanol injection Liposome production plant. *Chemical Engineering and Technology*, 33, 15-20. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800502>.

Lima, B. N. B., Cabral, T. B., C. Neto, R. P., Tavares, M. I. B., & Pierucci, A. P. T. (2012). Estudo do amido de farinhas comerciais comestíveis. *Polímeros*, 22, 486-490. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000062>.

Luque-Garcia, J. L., & Luque De Castro, M. D. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends Analytical Chemistry*, 22, 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00102-X).

Machado, A. R., Pinheiro, A. C., Vicente, A. A., Souza-Soares, L. A., Cerqueira, M. A. (2019). Liposomes loaded with phenolic extracts of Spirulina LEB-18: Physicochemical characterization and behavior under simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 120, 656-667. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.023>.

Madhavan, K., Belchenko, D., Motta, A., & Tan, W. (2010). Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomaterialia*, 6, 1413-1422. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.028>.

Moraes, M., Carvalho, J. M. P., Silva, C. R., Cho, S., Sola, M. R., & Pinho, S. C. (2013). Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. *International Journal of Food Science and Technology*, 48: 274-282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03184.x>

Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., & Fernandez-Lopez, J. A. (2009). Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90, 471-479. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.013>.

Ribeiro, J. S., & Veloso, C. M. (2021). Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocolloids*, 112, 106374. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106374>.

Santana, A. A., Cano-Higuita, D. M., Oliveira, R. A., & Telis, V. R. N. (2016). Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. *Food Chemistry*, 212, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.148>.

Santos, N. C., & Castanho, M. A. R. B. (2002). Lipossomas: a bala mágica acertou? *Química Nova*, 25, 1181-1185. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000700019>.

Santos, L. S. L., Medeiros, J. S., Toledo, A. M. N., Viana, L. F., Machado, M. I. R., & Machado, A. R. (2020). Processo de encapsulação de extrato aquoso liofilizado e não liofilizado de mangaba em vesículas lipídicas. *Brazilian Journal of Development*, 6, 2180-2188. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n1-158>.

Silverstein, R. M.; Bassler, G. C. & Morrill, T. C. (1991). Infrared Spectrometry. in: *Spectrometric Identification of Organic Compound*, John Wiley & Sons, Singapura, p. 91.

Tan, S., Zhong, C., & Langrish, T. (2020). Pre-gelation assisted spray drying of whey protein isolates (WPI) for microencapsulation and controlled release. *LWT - Food Science and Technology*, 117, 1086252. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108625>.

Taylor, T. M., Weiss, J., Davidson, P. M., & Bruce, B. D. (2005) Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587-605. <https://doi.org/10.1080/10408390591001135>

Toniazzo, T., Berbel, I. F., Cho, S., Fávaro-Trindade, C. S., Moraes, I. C. F., & Pinho, S. C. (2014).  $\beta$ -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1265-1273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.021>.

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A encapsulação de corante azul de genipocianina G1 com elevada eficiência foi possível pelas duas técnicas empregadas, produzindo microcápsulas com características distintas, e o amido de araruta e a maltodextrina de mandioca puderam ser utilizados tanto como materiais de parede quanto como estabilizantes e crioprotetores. A técnica de *spray drying* produziu cápsulas com maior solubilidade em água, mas com menor rendimento. Por outro lado, a técnica de produção de lipossomas liofilizados gerou maiores rendimentos, mas com menor solubilidade em água. Diante disso, a escolha da melhor técnica dependerá da finalidade de uso do corante natural azul de genipocianina G1, sendo aquele produzido por *spray drying* mais indicado para produtos de base aquosa, como sucos, e o produzido por lipossomas e liofilização mais indicado para produtos gordurosos, como chocolates, sorvetes, cremes e coberturas.

## VII. ANEXOS

Ribeiro, J. S., & Veloso, C. M. (2021). Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocolloids*, 112, 106374. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106374>.



Get Access

Food Hydrocolloids  
Volume 112, March 2021, 106374

## Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review

Jéssica S. Ribeiro <sup>a,\*</sup>, Cristiane M. Veloso <sup>b</sup>

Show more

Outline | Share | Cite

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106374>

Get rights and content

### Highlights

- Systematization of natural food dyes, wall materials and encapsulation techniques.
- Encapsulation increases stability and extends applications of natural food dyes.
- Various hydrocolloids can be used as efficient wall materials.

### Abstract

Microencapsulation is a technique increasingly studied in food science aimed to increase stability and control the release of aromas, dyes, antioxidants, nutrients, enzymes, preservatives, and microorganisms. The most commonly used wall materials include hydrocolloids, proteins, starches, dextrans, lipids, various emulsifiers, and fibers, alone or associated with other compounds. Encapsulation techniques are diverse, and the choice of the most appropriate technique depends on the material to be encapsulated, the purpose of use, and the availability of equipment. In the case of the core material, several studies have focused on the encapsulation of natural dyes, due to the increasing market demand for this type of food additive. This review focuses on the microencapsulation of natural food dyes, presenting the main encapsulated compounds and wall materials, as well as the techniques used for this purpose.

### Graphical abstract

Factors that promote discoloration or color change of natural dyes and color preservation through encapsulation with biopolymers.



Download : Download high-res image (246KB)

Download : Download full-size image

Previous

Next

### Keywords

Natural food coloring; Biopolymers; Wall materials; Encapsulation techniques

Recommended articles

Citing articles (2)

View full text

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



About ScienceDirect

Remote access

Shopping cart

Advertise

Contact and support

Terms and conditions

Privacy policy

We use cookies to help provide and enhance our service and tailor content and ads. By continuing you agree to the use of cookies.  
Copyright © 2021 Elsevier B.V. or its licensors or contributors. ScienceDirect® is a registered trademark of Elsevier B.V.  
ScienceDirect® is a registered trademark of Elsevier B.V.

RELX™

FEEDBACK