

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**Mariana da Silva Formigheri**

**Estabilidade e potencial antioxidante de microcápsulas de ficocianina**

**Passo Fundo**

**2017**





**Mariana da Silva Formigheri**

**Estabilidade e potencial antioxidante de microcápsulas de ficocianina**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Telma Elita Bertolin.

Co-orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Colla.

**Passo Fundo**

**2017**





**Mariana da Silva Formigheri**

**Estabilidade e potencial antioxidante de microcápsulas de ficocianina**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Telma Elita Bertolin.

Co-orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Colla.

Passo Fundo, 01 de Março de 2017

Banca examinadora

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Telma Elita Bertolin – UPF – Orientadora

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Colla – UPF – Co-Orientadora

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr Wagner Priamo  
Instituto Federal do Rio Grande do Sul - IFRS

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião – UPF





CIP – Catalogação na Publicação

---

F725eFormigheri, Mariana da Silva

Estabilidade e potencial antioxidante de microcápsulas de ficocianina/ Mariana da Silva Formigheri. – 2017.

115 f. : il. color.; 30 cm.

Orientador: Profa.Dra. Telma Elita Bertolin.

Coorientador: Profa. Dra. Luciane Maria Colla.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)  
– Universidade de Passo Fundo, 2017.

1. Encapsulação da ficocianina. 2. Antioxidantes. 3. Spirulina platensis. I. Bertolin, Telma Elita, orientador. II. Colla, Luciane Maria, coorientador. III. Título.

CDU:664

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

Dedico com muito amor e carinho ao meu namorado e a minha família que sempre me apoiaram e estiveram presentes em todas as etapas de minha vida.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar concluindo esta etapa tão importante na minha caminhada.

Agradeço a meus pais e a minha irmã, base fundamental em minha vida, pelo apoio durante toda minha trajetória, pelo amor dedicado nesses anos todos. Sou imensamente grata.

Agradeço ao meu namorado, parceiro, amigo, companheiro de todas as horas, quem presenciou meus dias de vitórias, dias de alegria e também esteve junto nas horas difíceis, sempre me apoiando e caminhando comigo e traçando nossos sonhos.

Agradeço a minha orientadora, professora Telma Elita Bertolin e co-orientadora Luciane Maria Colla por sempre me mostrarem o melhor caminho a seguir, pelos ensinamentos e amizade ao longo destes anos de convívio.

Agradeço a todos os professores do programa em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a professora Charise do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo pelo conhecimento deixado pelo carinho e amizade.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Fermentações pela convivência nestes dois anos, e pelo aprendizado.



*“O fruto de um trabalho de amor atinge sua plenitude na colheita, e esta chega sempre no seu tempo certo.”*

*Autor desconhecido*



## RESUMO

O interesse na pesquisa de compostos bioativos tem aumentado, uma vez que os consumidores procuram produtos naturais e que resultem em benefícios para a sua saúde. A estabilidade desses compostos, na grande maioria, porém é de comportamento desconhecido. A utilização de técnicas que permitam garantir a funcionalidade desses ativos para diferentes fins torna-se muito importante. A encapsulação é uma tecnologia capaz de proteger o ativo das mais diversas condições de exposição, promover a liberação controlada, mascarar odor e sabor desagradáveis, além de promover a diluição homogênea do material encapsulado, em produtos alimentícios ou em formulações farmacêuticas. A ficocianina é uma ficobiliproteína, presente na cianobactéria *Spirulina platensis*, e vem sendo relatada por apresentar diferentes propriedades funcionais, dentre elas, a antioxidante. Objetiva-se estudar a microencapsulação por spray-drying da ficocianina, utilizando o encapsulante maltodextrina, em testes de estabilidade e potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*, em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostram que o processo de encapsulamento produziu microcápsulas esféricas de tamanho médio de 10  $\mu\text{m}$ , com solubilidade em água em torno de 91,71%, atividade de água e umidade de 0,209 e 3,975%, respectivamente. A maltodextrina protegeu o ativo do agente físico temperatura e promoveu liberação gradual do potencial antioxidante e manteve o mesmo após a secagem. Nos testes *in vivo* as microcápsulas aumentaram de forma estatisticamente significativa a atividade enzimática da glutatona e diminuiu os níveis de peroxidação lipídica. Conclui-se que a técnica de encapsulamento da ficocianina por spray dryer, com o encapsulante maltodextrina foi eficaz para a manutenção da atividade antioxidante do bioativo.

Palavras-chave: Encapsulação; Funcionalidade; *Spirulina platensis*.





## ABSTRACT

Interest in bioactive compounds research has increased as consumers look for natural products that result in health benefits. The stability of these compounds, in the great majority, however is of unknown behavior. The use of techniques to ensure the functionality of these assets for different purposes becomes very important. Encapsulation is a technology capable of protecting the active substance from a wide range of exposure conditions, promoting controlled release, masking unpleasant odor and taste, and promoting the homogenous dilution of the encapsulated material in food products or pharmaceutical formulations. Phycocyanin is a phycobiliprotein, present in the cyanobacterium *Spirulina platensis*, and has been reported to have different functional properties, among them, the antioxidant. The objective of this study was to study the microencapsulation by spray-drying of phycocyanin, using the encapsulant maltodextrin, in stability tests and antioxidant potential *in vitro* and *in vivo*, in *Saccharomyces cerevisiae* cells. The results show that the encapsulation process produced spherical microcapsules of average size of 10  $\mu\text{m}$ , with water solubility around 91.71%, water and moisture activity of 0.209 and 3.975%, respectively. Maltodextrin protected the active's physical agent temperature and promoted gradual release of the antioxidant potential and maintained the same after drying. In the *in vivo* tests the microcapsules statistically increased the enzymatic activity of glutathione and decreased levels of lipid peroxidation. It was concluded that the technique of encapsulating phycocyanin by spray dryer with the encapsulant maltodextrin was effective in maintaining the antioxidant activity of bioactive.

Keywords: Encapsulation; Functionality; *Spirulina platensis*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo estrutural de ficobilissomos. ....	33
Figura 2 – Fórmula estrutural da ficocianobilina (a) e da ficocianina (b). ....	33
Figura 3 - Esquema de funcionamento de Spray Dryer. ....	39
Figura 4 - Micrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura de microcápsulas de ficocianina com maltodextrina 10 DE, obtidas por spray drying a 150°C, em aproximação de 6.000x. ....	52
Figura 5 - Micrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura de microcápsulas de ficocianina com maltodextrina 20 DE, obtidas por spray drying a 150°C em aproximação de 6.000x. ....	53
Figura 6 – Tamanho de partícula das microcápsulas M10. ....	60
Figura 7 – Tamanho de partícula das microcápsulas M20. ....	60
Figura 8 - Espectro de infravermelho das amostras. ....	62
Figura 9 – Capacidade antioxidante das amostras pelo método de sequestro do radical DPPH. ....	64
Figura 10 – Análise da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (mM) das amostras. ....	66
Figura 11 – Análise da dosagem da atividade enzimática da glutatona das amostras. ....	68
Figura 12 – Termograma de calorimetria exploratória diferencial das amostras. ....	70
Figura 13 – Análises termogravimétricas das amostras analisadas. ....	72
Figura 14 – Microscópio óptico equipado com sistema de aquecimento para a análise de ficocianina e microcápsulas. ....	73



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agentes encapsulantes classificados de acordo com a sua origem.....	36
Tabela 2 - Métodos de microencapsulação .....	38
Tabela 3 - Tratamentos para os cultivos de células de <i>S. cerevisiae</i> . .....	47
Tabela 4 - Teor de proteínas das amostras. ....	51
Tabela 5 – Solubilidade em água das amostras.....	54
Tabela 6 – Atividade de água.....	55
Tabela 7 – Teor de umidade das amostras. ....	56
Tabela 8 – Densidade aparente das amostras.....	57
Tabela 9 – Parâmetros de cor das amostras. ....	58
Tabela 10 – Tamanho médio de partícula e dispersão granulométrica.....	59
Tabela 11 - Capacidade antioxidante pelo método ABTS das amostras. ....	65
Tabela12 - Ensaio da Calorimetria Exploratória Diferencial das amostras.....	66
Tabela 13 - Orçamento do projeto de pesquisa para o desenvolvimento da proposta.....	74



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	31
2.1 Antioxidantes naturais .....	31
2.2 Ficocianina .....	31
2.2.1 Degradação da ficocianina .....	34
2.3 Encapsulação .....	35
2.3.1 Agentes encapsulantes .....	36
2.3.2 Métodos de encapsulação .....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
3.1 Encapsulação da ficocianina .....	41
3.2 Quantificação de proteínas .....	41
3.3 Determinação da eficiência de encapsulação .....	42
3.4 Análise morfológica .....	42
3.5 Solubilidade em água .....	43
3.6 Atividade de água .....	43
3.7 Umidade .....	43
3.8 Densidade aparente .....	43
3.9 Colorimetria .....	44
3.10 Determinação do tamanho médio de partícula e da dispersão granulométrica .....	44
3.11 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho .....	45
3.12 Atividade antioxidante .....	45
3.12.1 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) .....	45
3.12.2 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolona-6-ácido sulfônico) .....	46
3.12.3 Avaliação do potencial antioxidante, em modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	46



3.12.3.1 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	47
3.12.3.2 Dosagem da atividade enzimática da glutathiona.....	48
3.13 Estabilidade.....	48
3.13.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) .....	48
3.13.2 Análise termogravimétrica (TGA) .....	49
3.13.3 Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento (Hot-stage) .....	49
3.13.4 Estudo da estabilidade das microcápsulas frente ao armazenamento .....	49
3.14 Análise estatística .....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1 Quantificação de proteínas.....	51
4.2 Determinação da eficiência de encapsulação.....	51
4.3 Análise morfológica.....	52
4.4 Solubilidade em água.....	54
4.5 Atividade de água .....	55
4.6 Umidade.....	56
4.7 Densidade aparente .....	57
4.8 Colorimetria .....	58
4.9 Determinação do tamanho médio de partícula e da dispersão granulométrica.....	59
4.10 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho .....	61
4.13 Atividade antioxidante.....	64
4.13.1 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical DPPH .....	64
4.13.2 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolina-6-ácido sulfônico).....	65
4.13.3 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	66
4.13.4 Dosagem da atividade enzimática da glutathiona .....	67
4.14 Estabilidade.....	69

4.14.1 Calorimetria exploratória diferencial.....	69
4.14.2 Análise termogravimétrica (TGA).....	71
4.14.3 Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento (Hot-stage).....	73
4.14.4 Estudo da estabilidade das microcápsulas frente ao armazenamento.....	74
5 CONCLUSÕES .....	78
6 ORÇAMENTO .....	79
7 CRONOGRAMA.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86





## 1 INTRODUÇÃO

O aumento pela demanda de antioxidantes naturais, devido à crescente preocupação dos consumidores com reflexo da dieta na saúde e na qualidade de vida, são os principais motivos que fortalecem a busca por novas formas de obtenção e manutenção das capacidades dos compostos bioativos.

A ficocianina é uma ficobiliproteína presente na cianobactéria *Spirulina platensis* que vem sendo estudada em diferentes modelos experimentais devido suas comprovações funcionais, com ênfase a sua atividade antioxidante. Esse potencial pode auxiliar na proteção dos alimentos e do organismo humano frente aos agentes oxidantes que conduzem ao estresse oxidativo, que por sua vez, está associado ao aumento da incidência de doenças crônicas.

Contudo, os antioxidantes de fontes naturais são instáveis e passíveis de sofrerem degradação quando expostos a situações adversas, como temperatura, pH, umidade, exposição a radiações. Esses eventos podem afetar a estabilidade dessas substâncias ativas e repercutir na sua capacidade funcional quando utilizadas para o desenvolvimento de processos e produtos.

A ficocianina é uma dessas substâncias, e, portanto, o seu uso, carece de processos e técnicas que permitam a manutenção de sua estabilidade funcional. O processo de encapsulação de compostos bioativos, através da existência de um revestimento polimérico, promove a proteção das substâncias ativas de oxidações e outras degradações provenientes do meio externo. Vários tipos de técnicas de microencapsulação, tais como a emulsificação, coacervação, *spray dryer*, *spray cooling*, pulverização, liofilização, revestimento em leito fluido, e de extrusão, vêm sendo desenvolvidas (FERNANDES, BORGES, BOTREL, 2014). A técnica do *spray dryer* é uma das tecnologias mais simples e favoráveis (EDRIS et al, 2016).

A maltodextrina, um hidrolisado de amido, vem sendo bastante utilizada como agente encapsulante. A maltodextrina é um dos principais materiais de aplicação no processo de secagem por atomização devido às suas características físicas, como: elevada solubilidade, baixa viscosidade, mesmo quando utilizadas concentrações de sólidos e, por possuir menor custo é um importante substituto da goma arábica, na formação de emulsões e de dispersões (CANO-CHAUCA et al., 2005; KRISHNAN; BHOSALE; SINGHAL, 2005). No presente estudo, a maltodextrina foi utilizada como material de revestimento para o desenvolvimento de cápsulas de ficocianina pela técnica de *spray dryer*, para posterior

avaliação de estabilidade e suas propriedades funcionais antioxidantes nos modelos *in vitro* e *in vivo* em *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antioxidantes naturais

O mercado de ingredientes naturais encontra-se em crescimento, estimulado pela preferência dos consumidores por alimentos mais seguros e saudáveis (RÉVILLION; BRANDELLI; AYUB, 2000). Os ingredientes funcionais possuem a importante função na manutenção da qualidade dos alimentos, principalmente por inibirem o crescimento de diversos microrganismos, tanto deteriorantes quanto patogênicos, também em função dos apelos antioxidantes, corantes, emulsificantes, dentre outros. Assim, instigações que mostrem a eficiência e a manutenção dessas atividades são de extrema importância para o mercado alimentício do século XXI (BERNARDI; OETTERER; CONTRERAS-CASTILLO, 2008).

Os antioxidantes naturais podem retardar a deterioração, rancidez e descoloração que são decorrentes do processo de oxidação (CONEGLIAN et al., 2011). Ainda no organismo humano, podem neutralizar a ação das espécies reativas, os radicais livres, que a ciência vem mostrando estarem relacionados com vários processos danosos ao organismo, como, por exemplo, a mutagênese, carcinogênese, envelhecimento, inflamação, isquemia cerebral, arteriosclerose, diabetes e neurodegeneração (ALEXI et al., 2000; REN et al., 2001; JOHNSON, 2004; DURACKOVA, 2010).

Em 1998, foi descrito pela primeira vez a atividade antioxidante da ficocianina, através da capacidade de varredura de radicais hidroxila ( $\bullet$  OH), radical alcóxil ( $RO \bullet$ ) e ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), e pela capacidade de inibição da peroxidação lipídica (ROMAY et al., 1998a).

### 2.2 Ficocianina

As ficobiliproteínas são um grupo de proteínas coloridas, solúveis em água, constituídas pela ficobilina (cromóforo), ligada à apoproteína (parte proteica da molécula), e estão agrupadas na superfície ou no interior dos tilacóides, formando os ficobilissomos (LAKOWICZ, 2008; ERIKSEN, 2008).

Estas ficobiliproteínas são classificadas em três grandes grupos com base nas suas cores, a ficoeritrina (rosa-vermelha), e a ficocianina (azul), e aloficocianina (verde-azul) (PANDEY; PANDEY; SHARMA, 2013).

Na medida em que ocorre a divisão celular, os tilacóides também se dividem, nos quais os componentes majoritários são as proteínas, lipídeos, carotenóides e clorofila-a. No lado oposto dessa superfície, fica os ficobilissomos, composto por grandes estruturas granulares estreitamente ligadas, que atuam como reservatório de compostos nitrogenados das células. É através dessa estrutura, que a alga garante a sua alta capacidade de absorção da energia luminosa, suprindo as faixas de absorção, e onde a clorofila a e os carotenóides não são efetivos (BERG et al., 2002; GUALTIERI; BARSANTI, 2006).

As ficobiliproteínas possuem diferentes absorções na região espectral, a ficoeritrina possui absorção máxima a 565 nm, a ficoeritrocianina em 568 nm, e já a aloficocianina em 650 nm(DUAN et al., 2012).

Por sua vez aC-ficocianina, possui a particularidade de absorver predominantemente na região espectral próxima a 615 nm e emite fluorescência em 640 nm, uma característica que tem possibilitado o desenvolvimento de estudos para a detecção, quantificação, e monitoramento dos níveis de cianobactérias (DUAN et al., 2012; SUN et al., 2012;TURNER;DESIGNER, 2007).

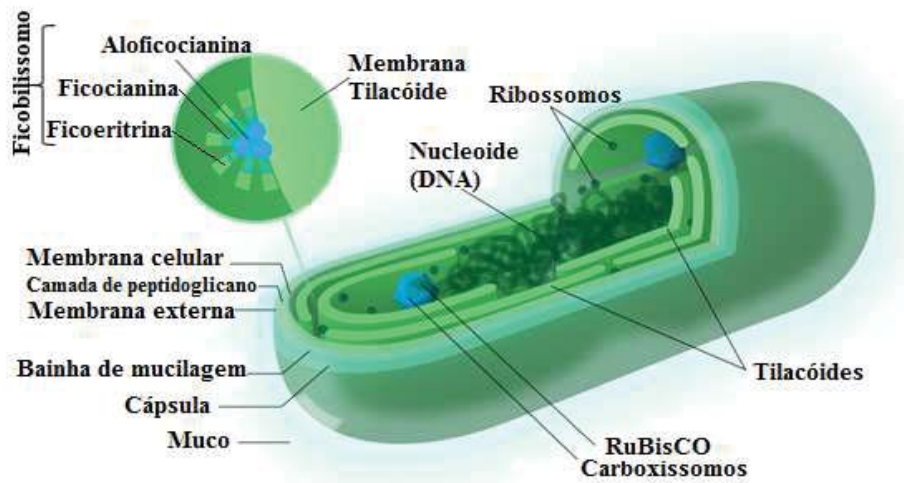
Devido a essas características de diferentes comprimentos de onda, resultando em diferentes colorações, essas proteínas são amplamente comercializadas para aplicação clínica e fluorescente em análises imunológicas, mas um crescente número de pesquisas vem demonstrando propriedades relacionadas com benefícios à saúde, com aplicação farmacêutica e alimentícia (PANDEY;PANDEY;SHARMA, 2013).

Ao contrário das outras ficobiliproteínas (ficoeritrina e aloficocianina), a ficocianina é um pigmento que está presente em todas as cianobactérias, sendo tradicionalmente isolada a partir da *Spirulina platensis*, pois esta microalga possui alta produtividade de ficocianina, cerca de 120 a 140miligrama de ficocianina por grama de biomassa seca (ERIKSEN, 2008;ZHENG et al., 2013; PLEONSIL et al., 2013;MARÍN-PRIDA et al., 2013). A ficocianina também é encontrada em outros gêneros, como a *Phormidium fragile* (KUMAR;GAUR, 2014),*Phormidium bigranulatum*(THANGAM et al., 2013), *Phormidium luridum*(PATEL et al., 2006), *Aphanothea* (GANTAR et al., 2012), *Nostoc* (SHANAB et al., 2012), *Polysiphonia urseolata* (WANG et al., 2014).

Desta forma, o ficobilissoma, extraído a partir da cianobactéria *Spirulina*sp. consiste em um núcleo de aloficocianina, rodeados perifericamente por C-Ficocianina (Figura 1).



Figura 1 - Modelo estrutural de ficobilissomos.

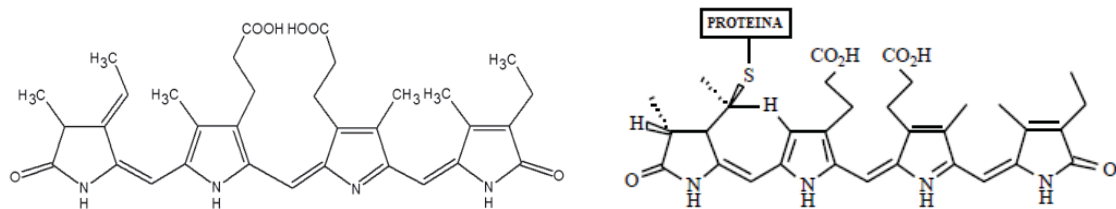


Fonte: Autor, modificado de Kelvinsong (2013).

A ficocianina pode ser classificada em três tipos, de acordo com seu processo de obtenção, a C-Ficocianina(C-PC), obtida através de cianobactérias, a R-Ficocianina(RPC), obtida de algas vermelhas, a R-Ficocianina II, que é obtida de espécies *Synechococcus*(KUDDUSet al.,2013; WANG et al., 2014). A C-Ficocianina é composta por uma proteína e um componente não proteico, conhecido como ficocianobilina, possuindo umacadeia aberta tetrapirrol responsávelpela cor azul intensa da ficocianina, e duas subunidades homólogas,  $\alpha$  e  $\beta$  globina ligadas covalentemente a ficocianobilina por ligação tioéter (Figura 2)(FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014; ROMAY et al., 2003).

Figura 2 – Fórmula estrutural da ficocianobilina (a) e da ficocianina (b).

(a)(b)



Fonte: Fernández-rojaset al.(2014); Romayet al.(2003).

A C-Ficocianina é considerada uma proteína bastante estável em temperaturas entre 4,0°C e 10°C, com ponto isoelétrico próximo a pH 4,65, e pode ser facilmente ligada a anticorpos e outras proteínas por técnicas bastante convencionais sem alterar suas características de espectro. Além disso, possui alto coeficiente de absorvância molar e

emissão, estabilidade oligomérica e fotoestabilidade elevada (VONSHAK, 1997; SILVA, 2008; PROZYME, 2010, JAOUEN et al., 1999).

Foi demonstrado em diversos estudos o potencial funcional da ficocianina, tal como proteção de eritrócitos dos danos oxidativos (PLEONSIL; SOOGARUN; SUWANWONG, 2013), indução de apoptose nas células cancerígenas ovarianas (PAN et al., 2015), neuroproteção (MIN et al., 2015; MITRA; SIDDIQUI; KHANDELWAL, 2015), efeitos benéficos contra inflamação e estresse oxidativo em osteoartrite (MARTINEZ et al., 2015), anti-hiperglicemiante (SETYANINGSIHA; BINTANGB; MADINA, 2015), anti-hipercolesterolemia (BERTOLIN et al., 2009) efeito protetor por danos causados pelo estresse oxidativo, nas patologias neurodegenerativas, principalmente para a prevenção da doença de Parkinson (BACKES, 2014), e antioxidante (WIRIYAPHAN et al., 2013; ŠLIUMPAITĒ et al., 2013; FAROOQ et al., 2014; BERTOLIN et al., 2011).

A dose letal 50 (LD50) do grau analítico da ficocianina não está ainda bem estabelecida. O nível de efeito adverso não observado (NOAEL) foi estudado por Romay, Ledón e González (1998b), em que foi obtido um NOAEL de 3g/kg. Em 2012, Ouet al. verificaram que a administração oral de ficocianina teve NOAEL de 5g/kg.

A ficocianina é classificada na categoria 5, de acordo com a Organização Internacional do Trabalho, com base na dose oral de 5g/kg. Porém, são necessárias novas pesquisas com doses mais elevadas, para estabelecer definitivamente este ativo como sendo não tóxico.

### **2.2.1 Degradação da ficocianina**

Diversos estudos têm demonstrado que a estabilidade da ficocianina é limitada, no qual Sarada, Pillai e Ravishankar (1999) e Jespersenet al. (2005) relatam que a degradação de ficocianina depende do estado de agregação da proteína, que é influenciada por parâmetros tais como a luminosidade, temperatura, pH e concentração de proteína.

Em estudos conduzidos por Benedetti et al (2006) e Wang et al (2014) demonstram que a ficocianina é sensível à luminosidade e precisa ser mantida sob proteção.

Edwards et al. (1997) avaliaram a influência da temperatura da ficocianina, e verificaram que entre 60 °C e 70°C, ocorreu a desnaturação da ficocianina. Por sua vez, Sarada et al. (1999) extraíram ficocianina da *Spirulina sp.* e estudaram sua estabilidade térmica a -4, 10, 30, 45 e 55°C, e verificaram que a ficocianina mostrou-se estável em até 45°C mostrando-se instável acima desta.

Outros estudos também demonstram essa instabilidade térmica (PATIL et al., 2006; CHAIKLAHANA;CHIRASUWANA; BUNNAGA, 2011; RAMOS; DECOSTA 2014).

O uso da ficocianina em alimentos e outras aplicações, devido à sua sensibilidade, podem resultar em desbotamento da cor azul e perda parcial ou total de sua funcionalidade. Desta forma, faz-se necessário o uso de técnicas para garantir a estabilidade dessa proteína, devido a possibilidade de manterem seu potencial por um longo tempo e assim possibilitarem a maximização do seu tempo de vida.

### **2.3 Encapsulação**

A microencapsulação é uma técnica aplicada ao acondicionamento de sólidos, líquidos ou material gasoso com finas coberturas poliméricas, na qual forma pequenas partículas que podem liberar seu conteúdo sob condições específicas (ALLEN JÚNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

O produto encapsulado é nominado de núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (GIBBS et al., 1999).

As primeiras tentativas de microencapsulamento de corantes iniciaram no final da década de 1930, e somente nos anos 60 apareceram os primeiros estudos na área de alimentos, com a microencapsulação de óleos essenciais, visando o controle da liberação do aroma, prevenção da oxidação e perda de compostos voláteis (RÉ, 2000).

As características funcionais das microcápsulas produzidas dependem das características do núcleo, do material de parede escolhido, do método utilizado para a produção de microcápsulas e do meio em que elas serão utilizadas (HEGER, 2001).

De acordo com o tamanho, as cápsulas podem ser classificadas em macro ( $> 5000 \mu\text{m}$ ), micro ( $0,2-5000 \mu\text{m}$ ) ou nanocápsulas ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ). De acordo com o formato, elas podem ser divididas em microcápsulas, nas quais o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, e microesferas, nas quais o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz. As microcápsulas são classificadas como sistema do tipo reservatório, sendo caracterizadas como as “verdadeiras microcápsulas”, e por sua vez, as microesferas são classificadas como um sistema matricial, no qual uma pequena fração do material encapsulado permanece exposta na superfície (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). O termo microencapsulação é usado tanto para a formação de microcápsulas, quanto de microesferas (DEPYPERE et al., 2003).

Desta forma, essa técnica tem a função de proteger o material encapsulado, prolongando sua funcionalidade, de fatores que possam vir a causar a sua deterioração, tais como oxigênio, luz, umidade e pH extremos, além de favorecer o aumento da vida útil, manter o sabor, aroma e cor, reduzir a volatilidade, a higroscopicidade e a reatividade, e desta forma aumentar a estabilidade do produto em condições adversas (TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; SILVA et al., 2013).

A tecnologia da microencapsulação desenvolveu-se devido a sua extensa aplicabilidade, para a necessidade constante que as indústrias alimentícia e farmacêutica demonstram em propriedades cada vez mais complexas nas formulações. Assim, através dessa tecnologia, facilita a manipulação do encapsulado, promove a liberação controlada, mascara odor e sabor desagradáveis, além de promover a diluição homogênea do material encapsulado em um produto alimentício ou formulação farmacêutica (GIBBS et al., 1999; ANAL; SINGH, 2007).

Hoje, as proteínas com potencial terapêutico são bastante utilizadas por via subcutânea, uma vez que são rapidamente desnaturadas em meio ácido do estômago. A encapsulação, dessas proteínas em sistemas micro ou nano poliméricos tem sido proposto como uma possível estratégia de superar as limitações à administração oral das proteínas (REIS et al., 2006).

### 2.3.1 Agentes encapsulantes

Os agentes encapsulantes servem como membrana de revestimento para as cápsulas, com o objetivo de proteger substâncias sensíveis, isolando-as fisicamente do meio ambiente (SUAVE et al., 2006).

Quanto a sua classificação, podem ser de origem natural, semissintética ou sintética (ANSON, 2005), conforme exemplificados na Tabela 1.

Tabela 1 - Agentes encapsulantes classificados de acordo com a sua origem.

Tipos de agentes encapsulantes	Exemplos
Naturais	Gelatina, goma agar-agar, alginato de sódio, alginato de cálcio, dextrano, maltodextrina, quitosana, sacarose e cera.
Semi-sintéticos	Acetato de celulose, nitrato de celulose,

Sintéticos	estilcelulose, hidroxipropilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, álcool miristílico, mono, di e triestearato de glicerol.  Polímeros do ácido acrílico e co-polímeros.
------------	--

Fonte: Anson (2005).

Quanto as características do encapsulante, este deve possuir baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos, ser de fácil manipulação durante o processo, ter baixa higroscopicidade, evitar aglomeração, ter habilidade para dispersar ou emulsificar, estabilizar o material do núcleo, ter boas propriedades de formação de filme, não ser reativo com o material a ser encapsulado, ter habilidade de segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula. Deve, ainda, proporcionar máxima proteção ao ingrediente encapsulado contra condições adversas como luz, pH, oxigênio e ingredientes ativos, possuir as propriedades desejadas de liberação do ingrediente encapsulado, ser de fácil reconstituição, ausência de sabor ou odor desagradável e, finalmente, ter baixo custo (GIUNCHEDI et al., 1998; CONSTANT; STRINGHETA, 2002).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) a maltodextrina  $[(C_6H_{12}O_5)_n H_2O]$ , é um hidrolisado de amido que possui unidades de glucose unidas principalmente por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), e possui uma média de 5 a 10 unidades de glicose por molécula.

As maltodextrinas são produzidas industrialmente por hidrólise ácida ou enzimática, ou a combinação de ambas, principalmente do amido de milho, sendo que o processo utilizado e a natureza do amido a ser hidrolisado possuem bastante influência na propriedade do produto final (KENNEDY; KNILL; TAYLOR, 1995; REINECCIUS et al., 1998).

As maltodextrinas são caracterizadas por sua dextrose equivalente (DE) e seu grau de polimerização (DP). O  $DE = 100/DP$  refere-se à medida do inverso do número de unidades de  $\alpha$ -D-glicose anidro. As propriedades das maltodextrinas estão ligadas ao DE e ao DP, que variam de acordo com o grau de hidrólise durante o processamento do amido (KENNEDY; KNILL; TAYLOR, 1995).

A dextrose usada como padrão é o amido (DE = 0) e a glicose (DE = 100). A maltodextrina é todo amido hidrolisado com valores de dextrose equivalente (DE) entre 3 e 20, sendo que o valor do DE reflete na sua estabilidade e funcionalidade. Por exemplo, a maltodextrina DE 20 é pouco higroscópica, não apresenta doçura e contribui como agente de corpo para formulações alimentícias (BE MILLER; WHISTLER, 1997).

As maltodextrinas estão disponíveis comercialmente na forma de um pó branco ou solução concentrada, são solúveis em água fria e apresentam baixa densidade (BE MILLER; WHISTLER, 1997; ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003).

As maltodextrinas fornecem 16736 J/g de energia, e geralmente são usadas como agentes encapsulantes na proteção de ingredientes sensíveis a fatores ambientais, por possuírem a característica de formarem paredes de superfícies lisas em microcápsulas esféricas e apresentarem boa eficácia e baixo preço (DESOBRY et al., 1999, DIB TAXI et al., 2003).

A maltodextrina é um dos principais materiais de aplicação no processo de secagem por atomização devido às suas características físicas, como elevada solubilidade baixa viscosidade, mesmo quando utilizadas em elevadas concentrações de sólidos e, por possuir menor custo é utilizada como substituta da goma arábica, na formação de emulsões e de dispersões (CANO-CHAUCA et al., 2005; KRISHNAN; BHOSALE; SINGHAL, 2005).

### 2.3.2 Métodos de encapsulação

Os métodos de microencapsulação existentes diferem no tipo de envolvimento, e atualmente existem diversos métodos para a obtenção das micropartículas, sendo que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química, conforme os métodos citados na Tabela 2 (GOUIN, 2004; SUAVE et al., 2006; MOZAFARI et al., 2008).

Tabela 2 - Métodos de microencapsulação

Métodos de microencapsulação	Exemplos
Físicos	<i>Spray drying, spray cooling, spray chilling</i> , leite fluidizado, extrusão, cocristalização e liofilização.
Químicos	Inclusão molecular e polimerização interfacial.
Físico-químicos	Coacervação, emulsificação com evaporação de solvente e lipossomas.

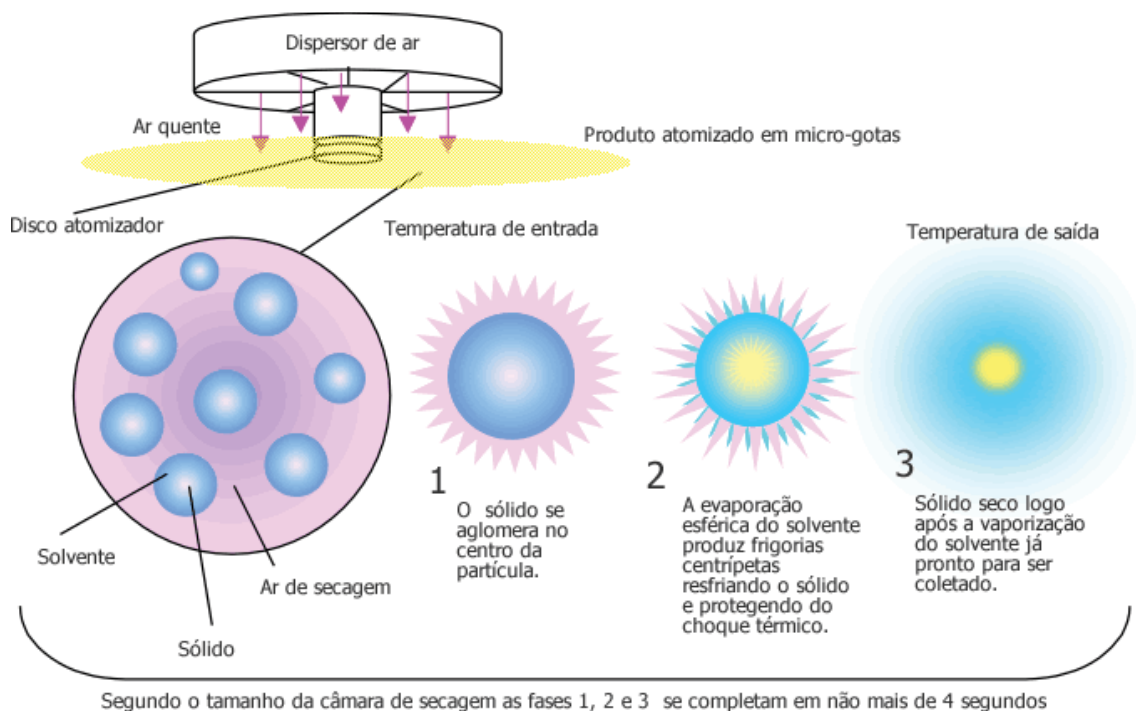
Fonte: GOUIN, 2004; SUAVE et al., 2006; MOZAFARI et al., 2008.

Através dos métodos de microencapsulação as morfologias são geradas em microesferas ou microcápsulas, de acordo com a sua estrutura (SUAVE et al., 2006; STORPIRTIS et al., 2009).

No caso da encapsulação para materiais hidrossolúveis, ao invés da existência de um núcleo e uma cobertura claramente definidos, o produto consiste de uma matriz homogênea do polímero envolvendo partículas do núcleo (DZIEZAK, 1988).

Conforme a Figura 3, o princípio da técnica de *spray dryer* consiste em alimentar o equipamento com a dispersão a ser processada, após homogeneização da mesma, ocorre a pulverização do produto em finas gotas, gerando uma névoa, que entra em contato com uma corrente de ar quente. Após, a evaporação transforma as gotículas em partículas sólidas, sendo posteriormente separadas mediante um ciclone primário, que se forma na saída da câmara de secagem. Mediante ventilação de aspiração apropriada, um ciclone secundário recupera as partículas mais finas que tendem a permanecer em suspensão no recinto de secagem. Todas as etapas interferem diretamente nas características finais do pó, como o tamanho da partícula sólida, sua densidade, aparência e umidade (MAFART, 1994; RISCH, 1995; BARROS; STRIGHETA, 2006; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Figura 3 - Esquema de funcionamento de Spray Dryer.



Fonte: Spray process (2014).

Durante o processo de secagem por pulverização, as proteínas podem se desdobrar devido a desidratação que ocorre durante o contato com a elevada temperatura



(CARPENTER; MANNING, 2002), e podem ocorrer problemas de estabilidade das proteínas, tornando-se imprescindível a utilização de um aditivo, tal como sacarose, trealose, dextrano ou maltodextrina, que permanecem na fase amorfa com a proteína e/ou ligada ao hidrogênio da proteína no local de água durante a secagem (DEPAZ et al., 2002).

Em pesquisa realizada em base de dados sobre microencapsulação com ficocianina, foi localizada somente a utilização da tecnologia de microencapsulação pelo método de gelificação ionotrópica, porém não foi localizada a microencapsulação por *spray drying*.

Dentre as vantagens do emprego do *spray drying*, que é considerada, dentre as técnicas de microencapsulação existentes, a mais utilizada na indústria de alimentos, estão a preservação da bioatividade dos componentes alimentares, ser de etapa única, econômico e flexível, e produzir partículas de boa qualidade (RISH, 1995; ADAMIEC; MODRZEJEWSKA, 2005; PÍSECKY, 2005).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Encapsulação da ficocianina

A elaboração das cápsulas seguiu o protocolo de Anarjan e Tan (2013), com modificações, em que o material encapsulante, maltodextrina 10DE ou 20DE, cedido pela Cargill, foi dissolvido em água destilada, na proporção de 30% (p/v), com agitação magnética (Agitador Fisatom, Mod 715, 60 Hz, 70 W) durante 30 minutos, e temperatura máxima de 40°C (Chapa de aquecimento Fisatom Mod 752A, 60 Hz, 650 W).

Foi utilizada a ficocianina, proveniente da *Parry Nutraceuticals Division* (Chennai, Índia), na proporção de 20% em relação ao teor de sólidos totais (material encapsulante). Após, sob agitação mecânica, a 2500 rpm em agitador Fisatom Mod 715, durante 15 minutos, foi misturada a ficocianina a maltodextrina para homogeneização. Depois desta suspensão formada, foi agitada em equipamento Turrax a 10.000 rpm (Turratec TE-102, Tecnal), por 2 minutos.

Posteriormente, a mistura foi submetida à secagem em *Spray Drying* (LM MSD 1.0), utilizando vazão de alimentação do extrato 0,4 L/h, 150 °C como temperatura do ar de entrada, 125 °C como temperatura do ar de saída e vazão do ar de entrada de 3,99 m<sup>3</sup>/min, de acordo com testes previamente realizados.

As amostras foram armazenadas em embalagens de plástico e fechadas, sob congelamento (-18°C), até o momento das análises.

#### 3.2 Quantificação de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada com o objetivo de comprovar a presença de proteínas no extrato microencapsulado, e seguiu o protocolo de Lowry et al. (1951). Foi adicionado 0,5 mL de amostra, 0,5 mL de NaOH 1 N, 2,5 mL da solução C e 0,5 mL do reagente Folin 1N em todos os tubos, agitados e armazenados em ambiente escuro, durante 30 min. Após, foi realizada a leitura das amostras (triplicatas), em espectrofotômetro a 750 nm.

Para o cálculo do teor de proteínas, foi construída uma curva de calibração com solução de albumina 1 mg/mL.

### 3.3 Determinação da eficiência de encapsulação

Conforme Carneiro et al. (2013) adicionou-se 15 ml de hexano em 0,2 g de amostra (obtido no processo de secagem por *spray dryer*) e mantidos em repouso durante 5 min no escuro à temperatura ambiente.

A suspensão contendo o material encapsulado foi filtrada utilizando um filtro de membrana (porosidade de 0,45, Millipore) e, em seguida, o material retido foi seco em estufa a 40°C.

A amostra seca foi re-dissolvida em 20 mL de água deionizada (capaz de quebrar a parede de polímero e libertar a ficocianina), sob agitação manual durante 5 min. Finalmente, a água foi evaporada em estufa e a massa resultante, medida até se observar mais nenhuma alteração (massa constante)

O hexano foi selecionado porque a maltodextrina têm baixa solubilidade neste solvente, permitindo a remoção de material não-encapsulado e também, evitando possíveis danos na parede do polímero.

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada conforme a Equação 1:

$$EE = \frac{\text{massa de ficocianina encapsulada} \times 100}{\text{massa de ficocianina} + \text{massa de material após secagem}} \quad (1)$$

Onde:

Massa de ficocianina encapsulada = massa de ficocianina (massa constante), obtido após a evaporação;

Massa de ficocianina + massa de material de parede = massa de material retido no filtro (contendo ficocianina + maltodextrina) após a secagem.

### 3.4 Análise morfológica

A análise morfológica das cápsulas formadas foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura (MEV), no Laboratório de Metalografia da Universidade de Passo Fundo.

As amostras foram colocadas sobre *stubs* e recobertas com camada de ouro, em metalizador Quorum Q150R ES, sendo em seguida micrografadas em microscópio eletrônico de varredura Tescan – Vega 3 LM em corrente de 50 mA,  $9 \cdot 10^{-2}$  Pa, tensão de 10 kV, e corrente de feixe de elétrons de 15 pA, namagnitude de 6000x.

### 3.5 Solubilidade em água

A solubilidade das amostras foi determinada segundo a metodologia modificada escrita por Cano-Chaucaet al. (2005). Para a determinação 1 g de amostra foi adicionado a 100mL de água destilada, obtendo-se uma solução, a qual foi centrifugada a 3000rpm, por 5 min., e em seguida colocado 25 mL do sobrenadante em placa de Petri seca e vazia, com massa conhecida, que foi levada à estufa de circulação de ar a 105 °C, por 5h. A solubilidade foi calculada pela diferença de massa e os resultados foram expressos em percentual de solubilidade.

### 3.6 Atividade de água

A atividade de água foi determinada utilizando equipamento Testo 650, a 25 ± 1 °C.

### 3.7 Umidade

Para determinação da umidade, foi seguido o método AOAC 926.12 (2005), 2 g de amostra foram pesadas em cápsula de vidro, previamente tarada, e deixadas durante 5 horas em estufa a 105 °C. Em seguida as amostras foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas. Esse procedimento foi repetido até que a amostra atingisse peso constante. A umidade foi calculada conforme a Equação 2:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{(\text{peso da amostra inicial}) - (\text{peso da amostra final}) \times 100}{(\text{peso amostra inicial})} \quad (2)$$

### 3.8 Densidade aparente

Para a determinação da densidade aparente, 2g de amostra foram transferidas para uma proveta graduada, e a densidade foi calculada dividindo-se a massa pelo volume ocupado (TONON; BRABET; HUBINGER, 2010).

### 3.9 Colorimetria

A cor das amostras obtidas foi avaliada através de colorímetro calibrado Color Quest II, HunterLab (EUA) para a cor branca. Para cálculo das coordenadas de cor, foi estabelecido o iluminante D65, o ângulo de 10° para o observador e a escala de leitura colorimétrica empregada foi a do sistema de coordenadas cromáticas com base no espaço de cor CIELAB  $L^*a^*b^*$ , onde  $L^*$  mede a luminosidade tendo uma variação de branco (100) a preto (0),  $a^*$  é uma indicação de tonalidade na direção do verde se assumir valores negativos ( $-a^*$ ) e na direção do vermelho se assumir valores positivos ( $+a^*$ ) e  $b^*$  é uma indicação de tonalidade na direção do azul se assumir valores negativos ( $-b^*$ ) e na direção do amarelo se assumir valores positivos ( $+b^*$ ) (SANT'ANNA et al., 2013).

A partir destes parâmetros, foram calculadas as coordenadas *Croma*, que refere-se à saturação, percebida como intensidade da cor, conforme a Equação 3 (AGUILERA, 1997):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (3)$$

Em que:

$C^*$  = Croma métrico, percebida como intensidade da cor;

$a^*$  = cromaticidade vermelho/verde;

$b^*$  = cromaticidade amarelo/azul;

### 3.10 Determinação do tamanho médio de partícula e da dispersão granulométrica

O tamanho de partícula foi avaliado por espectrometria de difração a laser, com faixa de análise entre 0,3 a 400  $\mu\text{m}$ . As amostras pulverizadas e secas foram dispersas em água filtrada e agitadas por 1 min, antes de ser realizada a medida. A partir da suspensão homogênea obtida, por meio do software específico, o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram determinados. O *span*, valor matemático definido como a medida da dispersão granulométrica (CHEN; DAVIS, 2002), que avalia a variação do volume de distribuição das partículas em relação ao diâmetro médio, foi calculado a partir da Equação 4:

$$span = \frac{d_{(V,90)} - d_{(V,10)}}{d_{(V,50)}} \quad (4)$$

Em que:

$d(v,10)$ ,  $d(v,50)$  e  $d(v,90)$  são respectivamente, o diâmetro das partículas correspondente a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada para a amostra.

### **3.11 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A análise por espectroscopia na região do infravermelho prevê a caracterização das bandas específicas de grupamentos funcionais e a detecção de possíveis interações entre o material encapsulado e o agente encapsulante.

A ficocianina pura, agentes encapsulantes e as micropartículas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho (Perkin Elmer FT-IR Spectrum Bx ATR), empregando 10 mg de cada amostra, com as seguintes condições operacionais, região de varredura  $4000-600\text{ cm}^{-1}$ , número de acumulações  $16\text{ scans}\cdot\text{min}^{-1}$ , resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ , e o registro dos espectros será em Transmitância (%T). Os espectros obtidos por infravermelho foram avaliados frente aos espectros do ativo, dos encapsulantes e das microcápsulas (MENDES, 2011).

### **3.12 Atividade antioxidante**

#### **3.12.1 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila)**

O método DPPH é baseado na captura do radical (2,2-difenil-1-picrilidrazila) por antioxidantes presentes na amostra, produzindo decréscimo da absorbância medida em comprimento de onda de 515 nm, segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), adaptado por Mensor et al. (2001) e Xiong et al. (1996), com modificações.

A solução 0,1 mmol/L de DPPH foi preparada em 10 mL de etanol absoluto, diluída na proporção de 1:100 em etanol 40%, no momento da análise. Alíquotas de 2,9 mL da solução diluída, foram transferidas para tubos de ensaio de vidro com tampa. Após, foi medida a absorbância em espectrofotômetro a 515 nm ( $A_{515\text{nm}}=A_0$ ). Em seguida, foi adicionada aos tubos, a alíquota de 0,1 mL de amostra, que foram deixadas ao abrigo de luz

por 30 minutos, e após medida a absorvância em espectrofotômetro a 515 nm ( $A_{515\text{nm}} = A_f$ ). O percentual de inibição do radical DPPH foi calculado de acordo com a Equação 5:

$$\text{Inibição} = \left(1 - \frac{A_f}{A_0}\right) * 100 \quad (5)$$

Em que:

$A_f$  = Absorvância final;

$A_0$  = Absorvância inicial;

Branco = etanol 40 %.

### 3.12.2 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolina-6-ácido sulfônico)

Esse método baseia-se na reação de forma energética com compostos doadores de hidrogênio, sendo convertido em uma forma não colorida de ABTS (CAMPOS; LISSI, 1997), sendo esta análise adaptada de REET al. (1999).

Foram preparadas a solução estoque de ABTS 7 mmol/L e a solução de persulfato de potássio 2,45 mmol/L.

A solução Radical ABTS foi preparada a partir da reação de 100 mL da solução estoque de ABTS com 100 mL da solução de persulfato de potássio, mantendo essa solução no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas, no mínimo. Após, foi diluído 1 mL desta solução até obter a absorvância de  $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$  a 734 nm.

Para a realização das leituras das amostras, foi zerado o espectrofotômetro com água em 734 nm, e realizada a leitura do branco com solução radical ABTS em 734 nm ( $A_0$ ). Em ambiente escuro, foi transferido 20  $\mu\text{L}$  de amostra para tubos de ensaio e adicionado 980  $\mu\text{L}$  do radical ABTS, e após homogeneizado em agitador. Foi deixado essa solução reagir por 6 minutos no escuro, e após realizada a leitura, em triplicatas, em cubeta de 1 mL em 734 nm ( $A_f$ ).

Foi feita uma curva padrão de ácido ascórbico 2 mmol/L, e os resultados foram expressos em mmol/L.  $100\text{g}^{-1}$  amostra.

### 3.12.3 Avaliação do potencial antioxidante, em modelo *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* foi obtida da Euroscarf, Frankfurt, Alemanha. A linhagem utilizada nos experimentos foi a Cepa BY 4741, genótipo MAT A; his 3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0.

Foi utilizado o meio de cultivo líquido YPD 2% (glicose, peptona e extrato de levedura). As culturas foram incubadas a 30 °C, em agitador orbital ajustado para 90 rpm até a primeira fase exponencial de crescimento (0,3 mg de peso seco de células/mL).

O fator de conversão em peso seco foi calculado a partir da filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0,45  $\mu$ m), que, posteriormente, foi seco em estufa a 60 °C até atingir o peso constante e a construção de uma curva de calibração.

Após o crescimento, as células de levedura foram centrifugadas e submetidas ao tratamento com sulfato ferroso, 4,0 mM, de acordo com Benetti (2013).

As células foram submetidas aos tratamentos descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Tratamentos para os cultivos de células de *S. cerevisiae*.

Tratamentos	Cultivos
1	Ficocianinapura + Levedura + Ferro
2	Microcápsulas com maltodextrina 10DE+ Levedura + Ferro
3	Microcápsulas com maltodextrina 20DE+ Levedura + Ferro
4	Controle (Levedura + Ferro)

Fonte: Autor (2016).

Os tratamentos foram realizados em erlenmeyers de 50 mL, incubados a 30 °C com agitação orbital à 90 rpm. Após foi analisado ao longo de 24 h de tratamento, em concentração de 0,8  $\mu$ L de proteínas por mL de solução, foram realizadas 2 lavagens com 5 mL de água destilada estéril e as células foram centrifugadas por 5,0 min, a 1500 rpm para a obtenção da massa celular para as análises (BENETTI, 2013).

### 3.12.3.1 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método escolhido para a quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é a análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pelo método de Ohkawa, Ohishi, Yagi (1979).

A avaliação da lipoperoxidação foi realizada incubando-se a 100 °C durante 15 minutos 250  $\mu$ L de amostra, 250  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10% (TCA) e 500  $\mu$ L de ácido

tiobarbitúrico 0,67% (TBA). O produto formado foi medido a 535 nm (OHKAWA, OHISHI, YAGI, 1979).

A curva de calibração foi obtida com soluções de malondialdeído (0,75 - 9  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ), a unidade expressa foi em  $\mu\text{M}$  MDA.

### 3.12.3.2 Dosagem da atividade enzimática da glutatona

A análise consiste quando a glutatona oxidada é reduzida pela taxa de formação de ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB), e a absorbância é lida em 412 nm, sendo proporcional a soma da glutatona (GSH) e da glutatona oxidada (GSSG) presentes (ANDERSON, 1985; CLARKE, 1997; VANDEPUTTE, 1994).

Inicialmente foi pipetado uma quantidade equivalente a 2 mL da amostra em tubos de parede grossa, e foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min. Após foi retirado o sobrenadante, e adicionado 1,3 mL de TCA 10% (ácido tricloro acético) para reagir, e centrifugado a 2000 rpm por 20 min, e então foi retirado o sobrenadante.

Ao sobrenadante foi adicionado 130  $\mu\text{L}$  de DTNB e realizada a homogeneização. A leitura foi realizada em 412 nm, sendo que o cálculo final das amostras foi obtido a partir da construção de uma curva padrão com Cisteína 0,5 mmol, TFK 0,05 mol, pH 6,8, DTNB 10 mmol e  $\text{H}_2\text{O}$ , sendo que o resultado final será expresso em  $\mu\text{M}$ .

## 3.13 Estabilidade

### 3.13.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As análises de DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão) foram realizadas para as amostras de ficocianina pura, agentes encapsulantes e as micropartículas com objetivo de avaliar possíveis interações agentes encapsulantes/ativo.

As amostras foram alocadas em micro cadinhos de alumínio seladas, com massa das amostras de 2 mg, frente a micro cadinho vazio, idêntico ao da amostra utilizada como referência, com objetivo de avaliar possíveis interações agentes encapsulantes/ficocianina. As amostras foram analisadas, sob atmosfera de nitrogênio ( $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , com taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ , na faixa de temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



### **3.13.2 Análise termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica é uma técnica que se baseia na medida de perda de massa de uma determinada amostra em função da temperatura ou do tempo. Os termogramas fornecem informações sobre a estabilidade térmica do material analisado (SKOOG et al, 1991)

As análises termogravimétricas (TGA) da ficocianina pura, agentes encapsulantes e as micropartículas, foram realizadas no laboratório de análise térmica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. As curvas termogravimétricas foram obtidas em um TGA Discovery (TA Instruments). Cada amostra foi pesada e acondicionada em micro-cadinhos de alfa-alumínio pré-tarados na termobalança. As condições de análise foram as seguintes: massa da amostra  $5,0 \text{ mg} \pm 0,5$ ; nitrogênio ultra-puro na vazão de 25 mL/min, razão de aquecimento  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , com faixa de temperatura de  $10^\circ\text{C}$  a  $600^\circ\text{C}$ .

### **3.13.3 Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento (Hot-stage)**

Hot-stage é a combinação de microscopia e análise térmica para permitir o estudo de materiais em função da temperatura e do tempo, em que visualmente o teste dá informações sobre mudanças térmicas.

Ensaio de microscopia com aquecimento foram realizados em microscópio Olympus BX41 equipado com um Mettler Toledo FP-82. As amostras da ficocianina pura e micropartículas foram aquecidas em razão de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  até sua fusão total. Todo o processo foi fotografado (software PVR plus).

### **3.13.4 Estudo da estabilidade das microcápsulas frente ao armazenamento**

Foi avaliada a estabilidade da ficocianina encapsulada durante o armazenamento, referente ao efeito de temperatura de congelamento ( $-18^\circ\text{C}$ ), refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ) e temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), sem luz, durante 4 semanas, frente ao potencial antioxidante, medido através da técnica de ABTS.

### **3.14 Análise estatística**

As análises estatísticas de cada tratamento foram realizadas através de análise de variância(ANOVA) a 0,05 de probabilidade de erro e, nos modelos significativos, as médias comparadas entre si, pelo teste de Tukey a 95% de intervalo de confiança.

## 4 RESULTADOSE DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a capacidade de formação de microcápsulas a partir do uso do polímero maltodextrina, substância permitida para uso no preparo de alimentos.

### 4.1 Quantificação de proteínas

A Tabela 4 apresenta os resultados da concentração de proteínas nas microcápsulas produzidas. A proporção encapsulante (maltodextrina)/proteína(ficocianina) foi de 1:4.

Verifica-se na Tabela 4 que as microcápsulas produzidas foram efetivas para função de manter o teor de proteína na ficocianina com encapsulante, e nas microcápsulas.

Tabela 4 - Teor de proteínas das amostras.

Ensaio	Concentração de Proteínas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Ficocianina + Maltodextrina 10 DE	271,68 $\pm$ 7,65 <sup>a</sup>
Ficocianina + Maltodextrina 20 DE	338,61 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>
Microcápsulas M10	275,46 $\pm$ 3,96 <sup>a</sup>
Microcápsulas M20	340,98 $\pm$ 2,20 <sup>c</sup>

Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, ao nível de 95% de confiança.

Fonte: Autor (2016).

Pode-se verificar que o uso da maltodextrina com maior grau de hidrólise 20 DE, quando comparada a maltodextrina 10 DE, como material encapsulante da ficocianina, promoveu os maiores valores de teor de proteína.

A correlação da concentração de proteínas, nas microcápsulas produzidas, mostrou que houve perda de 1,37 % de proteínas para as microcápsulas produzidas com maltodextrina 10 DE, e 0,69 % para as microcápsulas produzidas com maltodextrina 20 DE. Esses valores podem ser decorrentes da retenção de material na superfície do equipamento.

### 4.2 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada com a aplicação da técnica para verificar a massa de ficocianina encapsulada frente a massa de ficocianina e a massa de material encapsulante.

Os resultados mostraram eficiência de encapsulação de 80 % para as microcápsulas M10 e para as microcápsulas M20 90,14 %.

O processo de microencapsulação da ficocianina com o uso da maltodextrina e secagem em spray dryer mostrou-se eficiente dentro das condições testadas. Os nossos resultados corroboram com os achados de Rutz(2013), que aplicando diferentes encapsulantes, a maltodextrina resultou na maior eficiência, 85%. Robert et al. (2010) encapsularam *Punica granatum* (Romã) com maltodextrina em *spray dryer* e obtiveram 86,6 % de eficiência e Tonon, Brabet e Hubinger (2009) encapsularam *Euterpe oleraceae* e obtiveram 82 % de eficiência de encapsulação.

### 4.3 Análise morfológica

As Figuras 4 e 5 mostram as imagens das microcápsulas com maltodextrina 10e 20 DE por microscopia eletrônica.

Figura 4 - Micrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura de microcápsulas de ficocianina com maltodextrina 10 DE, obtidas por spray drying a 150°C, em aproximação de 6.000x.

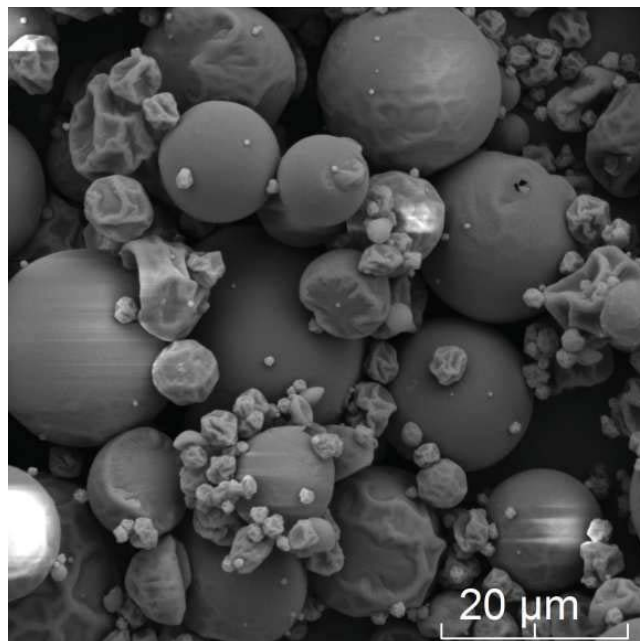
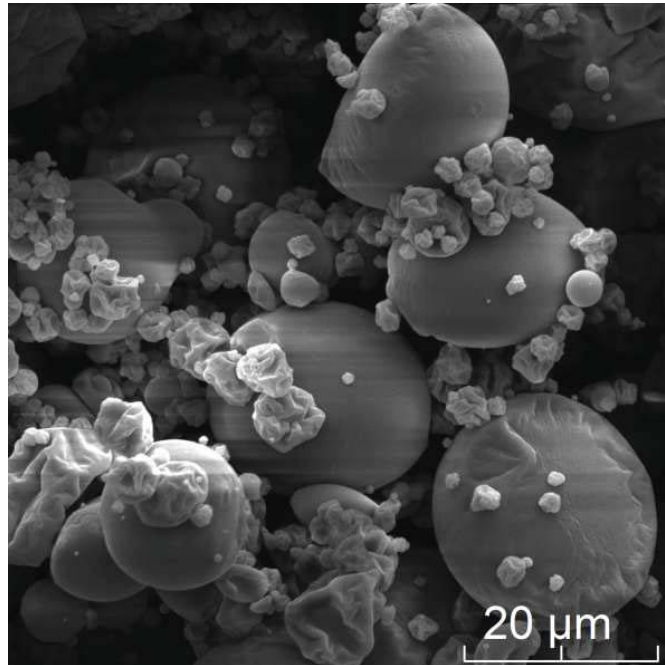


Figura 5 - Micrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura de microcápsulas de ficocianina com maltodextrina 20 DE, obtidas por spray drying a 150°C em aproximação de 6.000x.



Quando observamos as Figuras 4 e 5 pode-se verificar a formação das microcápsulas pelo encapsulante maltodextrina.

As microcápsulas produzidas apresentaram formato esférico, com tendência de formação de agregados de microcápsulas menores em torno das de maior diâmetro, bem como a presença de algumas microcápsulas com superfície externa levemente encolhida. A evidência de que o bico atomizador produziu gotas de tamanhos variados, ocorreu devido ao alto grau de aglomeração das partículas, resultando em colisão e aglomeração das partículas. A presença de concavidade, ou encolhimento da superfície, é uma característica das microcápsulas produzidas por atomização com maltodextrina como material de parede (BERTOLINI; SIANI; GROSSO, 2001). Este encolhimento da superfície ocorre quando a temperatura de secagem é relativamente baixa, fazendo com que a camada superficial permaneça úmida e flexível por mais tempo e, dessa forma, as microcápsulas murcham quando resfriadas (ARCHERI, 1999; TRINDADE, GROSSO 2000).

A formação de aglomerados de microcápsulas, pode favorecer maior retenção de material de recheio em seus interstícios sendo uma propriedade comum nos pós produzidos pela atomização com maltodextrina (BHANDARI, 1992; TRINDADE; GROSSO, 2000).

Observa-se também um leve grau de aglomeração entre as partículas menores, que tendem a aderir-se às partículas de maior diâmetro. Segundo Peleget al., (1973) a afinidade das moléculas menores pela superfície das maiores, deve-se, provavelmente, à força de atração existente entre pontes líquidas que se formaram por dissolução das camadas exteriores das partículas.

Não se evidencia a ocorrência de fragmentação de partículas ou rachaduras na superfície externa, nas microcápsulas produzidas, fator considerado benéfico, pois de acordo com Pereira (2000), a quebra de partículas pode acarretar em perdas significativas de componentes voláteis.

Keogh, Murray e O'kenedy (2003), relatam que o tamanho médio da gota atomizada está relacionado com a viscosidade do líquido, sendo que, quanto menor a viscosidade da solução de alimentação, menores são as gotas formadas durante a atomização e, portanto, menores as partículas de pó obtidas no processo.

#### 4.4 Solubilidade em água

Os valores de solubilidade de água das amostras podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 – Solubilidade em água das amostras.

Tratamentos	Solubilidade (%)
Ficocianina	92,70±0,197 <sup>d</sup>
Maltodextrina 10 DE	91,71±0,098 <sup>b,c</sup>
Maltodextrina 20 DE	87,15±0,091 <sup>a</sup>
Microcápsulas M10	92,06±0,077 <sup>c</sup>
Microcápsulas M20	91,37±0,028 <sup>b</sup>

Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, ao nível de 95% de confiança.

Fonte: Autor (2016).

As microcápsulas de ficocianina produzidas com maltodextrina em *spray dryer* a 150 °C apresentaram elevada solubilidade, isso porque os polissacarídeos contêm unidades glicosil que possuem, em média, três grupos hidroxila, sendo que cada um desses grupos tem a possibilidade de formar ligações de hidrogênio com uma ou mais moléculas de água.

Segundo Rosa et al. (2003), a solubilidade dos produtos atomizados depende, entre outros fatores, da temperatura do ar de secagem. Quanto maior a temperatura, maior o tamanho das partículas, o que promove uma maior solubilidade do pó.

Como cada unidade de açúcar da cadeia tem a capacidade de reter moléculas de água, os polissacarídeos possuem uma forte afinidade com a água hidratando-se com facilidade quando ela está disponível (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Cano-Chaucaet al. (2005) também observaram valores de solubilidade superiores a 90% no suco de manga atomizado com maltodextrina e goma arábica, assim como Moreira (2007) que estudou a secagem do extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola com maltodextrina e goma de cajueiro e concluiu que todos os pós apresentaram boa solubilidade, variando entre 90,97 e 96,92%

Propriedades como umidade e atividade de água são essenciais para a estabilidade e o armazenamento dos pós, enquanto a solubilidade está diretamente relacionada à sua reconstituição, sendo assim, a alta solubilidade das microcápsulas revela seu potencial como ingrediente em produtos alimentícios, tais como bebidas e preparados instantâneos (BICUDO, 2014, TOSONI, RODRIGUES, 2013).

#### 4.5 Atividade de água

Os valores de atividade de água das amostras variaram de 0,175 a 0,504, sendo observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ), conforme observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Atividade de água

Tratamentos	Atividade de água
Ficocianina	$0,260 \pm 0,001^c$
Maltodextrina 10DE	$0,504 \pm 0,001^e$
Maltodextrina 20DE	$0,448 \pm 0,003^d$
Microcápsulas M10	$0,243 \pm 0,002^b$
Microcápsulas M20	$0,175 \pm 0,002^a$

Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, ao nível de 95% de confiança.

Fonte: Autor (2016).

A Tabela 6 nos mostra que as microcápsulas produzidas com a maltodextrina apresentaram valores de atividade de água ( $A_w$ ) inferiores a 0,45, sendo que esse reduzido valor de atividade de água indica uma baixa disponibilidade de água para reações químicas e crescimento microbiano, o que se mostra favorável para estabilidade de produtos desidratados (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007).

Vale ressaltar que as microcápsulas de maltodextrina 10DE apresentaram a maior atividade de água, o que pode aumentar a mobilidade molecular e facilitar as reações físico-químicas de degradação, quando comparadas as microcápsulas de maltodextrina 20 DE. Valores encontrados, tanto para as microcápsulas com maltodextrina 10DE e 20DE estão dentro do limite recomendado, menores que 0,3, para garantir melhor estabilidade de pós (TONON et al., 2009).

Observou-se que o aumento da hidrólise de maltodextrina provocou diminuição na atividade de água das microcápsulas. Esses resultados foram consistentes com os relatados por outros pesquisadores (CALISKAN; DURIN, 2013; VARDIN; YASAR, 2012; TONON et al., 2009).

Porrarud e Pranee (2010) encontraram valores semelhantes (0,28 a 0,30) em microcápsulas de clorofila com parede de maltodextrina/goma arábica/Capsul®.

Augusta (2011) também encontraram valores próximos, de 0,20 a 0,28, ao microencapsular com maltodextrina 10 DE, pela técnica de pulverização, o corante extraído da casca de jambo.

Quek et al. (2007) ao realizar a secagem de suco de melancia adicionado de maltodextrina por spray dryer encontrou valores de atividade de água que variaram de 0,20 a 0,29, sendo que os autores atribuíram a baixa atividade de água do microencapsulado quando utilizado como encapsulante a maltodextrina.

Quando a atividade de água é elevada demonstra maiores teores de água livre para a ocorrência de reações bioquímicas e, portanto, menor prazo de validade, sendo assim, o conteúdo de água presente nos alimentos é comumente removido, a fim de reduzir custos de armazenamento e diminuir a atividade de água para garantir a estabilidade microbiológica do produto (NUNES, 2014).

#### 4.6 Umidade

Os valores de umidade obtidos variaram de 1,78 a 8,50 %, entre os resultados dos tratamentos estudados, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 – Teor de umidade das amostras.

Tratamentos	Umidade (%)
Ficocianina	1,78±0,021 <sup>a</sup>
Maltodextrina 10 DE	8,50±0,028 <sup>c</sup>



Maltodextrina 20 DE	7,59±0,028 <sup>d</sup>
Microcápsulas M10	4,83±0,007 <sup>c</sup>
Microcápsulas M20	3,11±0,007 <sup>b</sup>

Resultados na mesma coluna seguidos de mesma letra não há diferença significativa ao nível de 5% no teste de Tukey.

Fonte: Autor (2016).

A maltodextrina é um produto estável, de baixa higroscopicidade, sendo usada para manter baixo o nível de umidade em produtos na forma de pó (SANTOS, 2013).

Segundo Gardiner et al. (2000) e Meng et al. (2008), é necessária uma umidade residual de 5 % ou menos para o armazenamento prolongado de pós (SANTOS, 2013). Sendo assim, as microcápsulas com maltodextrina 10 e 20 DE apresentaram umidade inferior a 5 %, o que determina que estas microcápsulas podem ser armazenadas por um tempo prolongado.

De acordo com Tonon (2009) e Nijdam e Langrish (2006), temperaturas de secagem mais elevadas levam a redução da umidade do produto. O uso de temperaturas mais altas implica em maior diferença de temperaturas entre o produto atomizado e o ar de secagem, acarretando uma maior transferência de calor e, conseqüentemente, uma maior evaporação de água do produto, resultando em umidades mais baixas. Além disso, a superfície externa se torna seca e dura, de modo que as partículas não murcham quando o vapor formando dentro da microcápsula condensa (BICUDO).

#### 4.7 Densidade aparente

Os valores de densidade aparente obtidos variaram de 0,285 a 0,670 g/mL, nas quais foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados dos tratamentos estudados, conforme pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 – Densidade aparente das amostras.

Tratamentos	Densidade aparente (g/ml)
Ficocianina	0,335±0,007 <sup>b</sup>
Maltodextrina 10 DE	0,505±0,007 <sup>c</sup>
Maltodextrina 20 DE	0,670±0,014 <sup>d</sup>
Microcápsulas M10	0,285 ±0,007 <sup>a</sup>
Microcápsulas M20	0,330 ±0,000 <sup>b</sup>

Resultados na mesma coluna seguidos de mesma letra não há diferença significativa ao nível de 5% no teste de Tukey.

Fonte: Autor (2016).

A maltodextrina é um polissacarídeo obtido pela hidrólise do amido, quanto mais hidrolisado o amido, menor o volume ocupado e maior sua densidade, uma vez que as ligações rompidas resultam em cadeias menores e mais leves (OLIVEIRA et al, 2013). Observamos que a maior densidade aparente foi obtida na amostra produzida pela maltodextrina 20 DE (0,66 g/mL).

Também, as interações poliméricas entre os diferentes graus de hidrólise da maltodextrina com a ficocianina resultaram em diferentes densidades.

As microcápsulas de ficocianina juntamente com maltodextrina 10DE, ocuparam maior volume (7 ml), resultando em menor densidade (0,28 g/mL), por sua vez, as microcápsulas de ficocianina juntamente com maltodextrina 20DE, ocuparam menor volume (6 ml), resultando em maior densidade.

O conhecimento da densidade é muito importante em processos industriais, no ajuste das condições de estocagem, processamento, embalagem e distribuição. Os produtos obtidos por moagem ou secagem geralmente são caracterizados por sua densidade aparente, que considera o volume do material sólido e todos os poros fechados ou abertos para a atmosfera (BARBOSA-CÁNOVAS, JULIANO, 2005).

#### 4.8 Colorimetria

Os resultados das análises dos parâmetros de cor dos controles e das microcápsulas produzidas por *spray dryer* utilizando maltodextrina estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros de cor das amostras.

Tratamentos	L*	a*	b*	C*
Ficocianina	41,63 ± 0,00 <sup>a</sup>	-8,6 ± 0,02 <sup>b</sup>	-13,83 ± 0,02 <sup>c</sup>	13,83
Maltodextrina 10 DE	91,31 ± 0,01 <sup>e</sup>	-0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,75
Maltodextrina 20 DE	91,03 ± 0,02 <sup>d</sup>	-0,43 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,45
Microcápsulas M10	56,97 ± 0,03 <sup>b</sup>	-10,9 ± 0,09 <sup>d</sup>	-16,17 ± 0,01 <sup>e</sup>	19,50
Microcápsulas M20	61,37 ± 0,02 <sup>c</sup>	-9,89 ± 0,22 <sup>c</sup>	-14,37 ± 0,02 <sup>d</sup>	14,37

Resultados na mesma coluna seguidos de mesma letra não há diferença significativa ao nível de 5% no teste de Tukey.

Fonte: Autor (2016).

A coordenada (L\*) representa luminosidade, portanto mede a quantidade de luz que é refletida de uma cor, sendo que 0 indica a coloração preta, por sua vez 100 indica a coloração branca.

Podemos observar que houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para a luminosidade ( $L^*$ ) do encapsulante maltodextrina 10 DE e 20 DE. A maltodextrina possui amidos nativos capazes de refletir a luz o que lhe confere coloração branca.

Em relação as microcápsulas de ficocianina com maltodextrina, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a luminosidade ( $L^*$ ).

O parâmetro  $a^*$  positivo indica a coloração em direção para o vermelho, enquanto que  $a^*$  negativo vai em direção ao verde. Desta forma, o parâmetro  $a^*$  apresentou nas microcápsulas de ficocianina uma tendência a tonalidade verde do que para o vermelho.

O aumento na concentração de maltodextrina nas microcápsulas provocou uma diminuição do parâmetro  $a^*$ , ou seja, uma redução na tonalidade vermelha, também relacionada à diluição da cor, provocada pela adição deste agente carreador.

No caso do parâmetro  $b^*$ , quando positivo indica a coloração em direção ao amarelo, enquanto que negativo vai em direção ao azul. Sendo assim, menor valor foi observado para as microcápsulas de ficocianina, o que mostra uma intensificação da tonalidade azul do pó microencapsulado com esse material de parede. Por sua vez,  $b^*$  com maior valor para o encapsulante maltodextrina, determinando a expressão da cor amarela.

O Cromo, que apresenta a intensidade de cor, seguiu a mesma tendência dos valores do parâmetro  $b^*$ , indicando que o parâmetro  $b^*$  foi mais expressivo na determinação do croma das microcápsulas de ficocianina.

#### 4.9 Determinação do tamanho médio de partícula e da dispersão granulométrica

As amostras das microcápsulas com maltodextrina 10DE e maltodextrina 20DE foram avaliados através da determinação do tamanho de partícula e da dispersão granulométrica, e estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Tamanho médio de partícula e dispersão granulométrica.

Amostras	$d_{10}(\mu\text{m})$	$d_{50}(\mu\text{m})$	$d_{90}(\mu\text{m})$	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Span
Microcápsulas M10	3,674	8,465	18,137	10,09	1,70
Microcápsulas M20	4,689	9,321	17,257	10,42	1,34

Legenda:  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  que correspondem, respectivamente, aos valores que 10, 50 e 90 % da distribuição das partículas apresentam diâmetros menores.

Fonte: Autor (2016).

De acordo com o tamanho, as cápsulas podem ser classificadas em macro ( $> 5000 \mu\text{m}$ ), micro ( $0,2-5000 \mu\text{m}$ ) ou nanocápsulas ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ).

Conforme os dados obtidos, pode-se então designar, quanto ao tamanho das cápsulas, em microcápsulas, pois o diâmetro médio variou de 10,09 a 10,42 $\mu\text{m}$  para as amostras analisadas, conforme pode ser observado na Figura 6 e 7.

Figura 6 – Tamanho de partícula das microcápsulas M10.

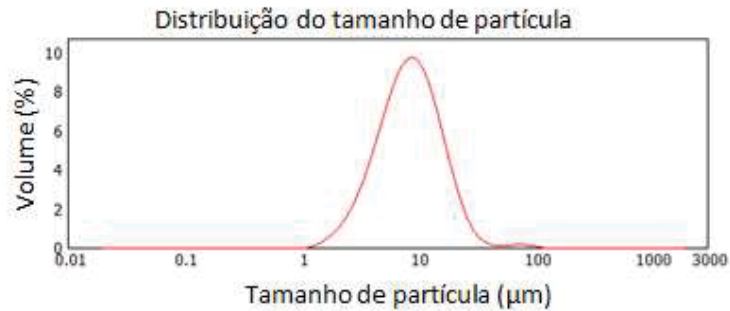
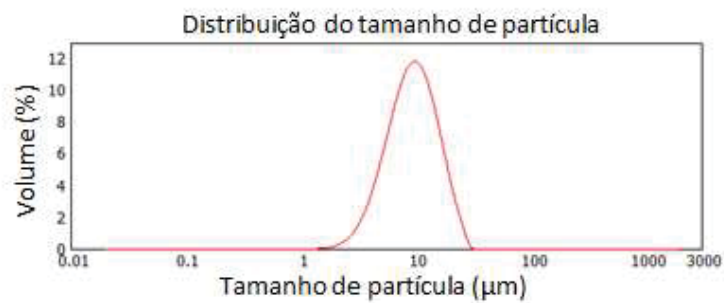


Figura 7 – Tamanho de partícula das microcápsulas M20.



As microcápsulas produzidas apresentaram um pequeno intervalo de distribuição (span), indicando a homogeneidade do processo de produção por *spray drying*.

A determinação do tamanho das partículas é considerada importante para alguns tipos de materiais, particularmente se estes são termossensíveis, isso porque partículas pequenas apresentam um maior coeficiente de transferência de massa e calor e um menor caminho difusional interno se comparadas a partículas grandes. Conseqüentemente, estas partículas apresentam inicialmente um menor teor de umidade e secam mais rápido, estando assim mais passíveis de sofrerem degradação térmica(WALTON; MUMFORD, 1999).

Além disso, o tamanho e a distribuição do tamanho das partículas influenciam nas propriedades de fluxo de um pó, sendo que os fatores podem influenciarna fluidez de um pó, como tamanho da partícula, distribuição do tamanho de partícula, morfologia da partícula, teor de umidade, grau de aglomeração das partículas(WALTON; MUMFORD, 1999).

Quanto ao grau de aglomeração das partículas, as partículas pequenas aderem-se muito mais fortemente entre si do que partículas grandes, então pós finos apresentam uma maior

tendência à aglomeração. A fluidez de um pó aumenta com o aumento do tamanho da partícula. Comportamento similar é observado para propriedades como dispersibilidade e molhabilidade dos pós(SCHULBERT, 1997).

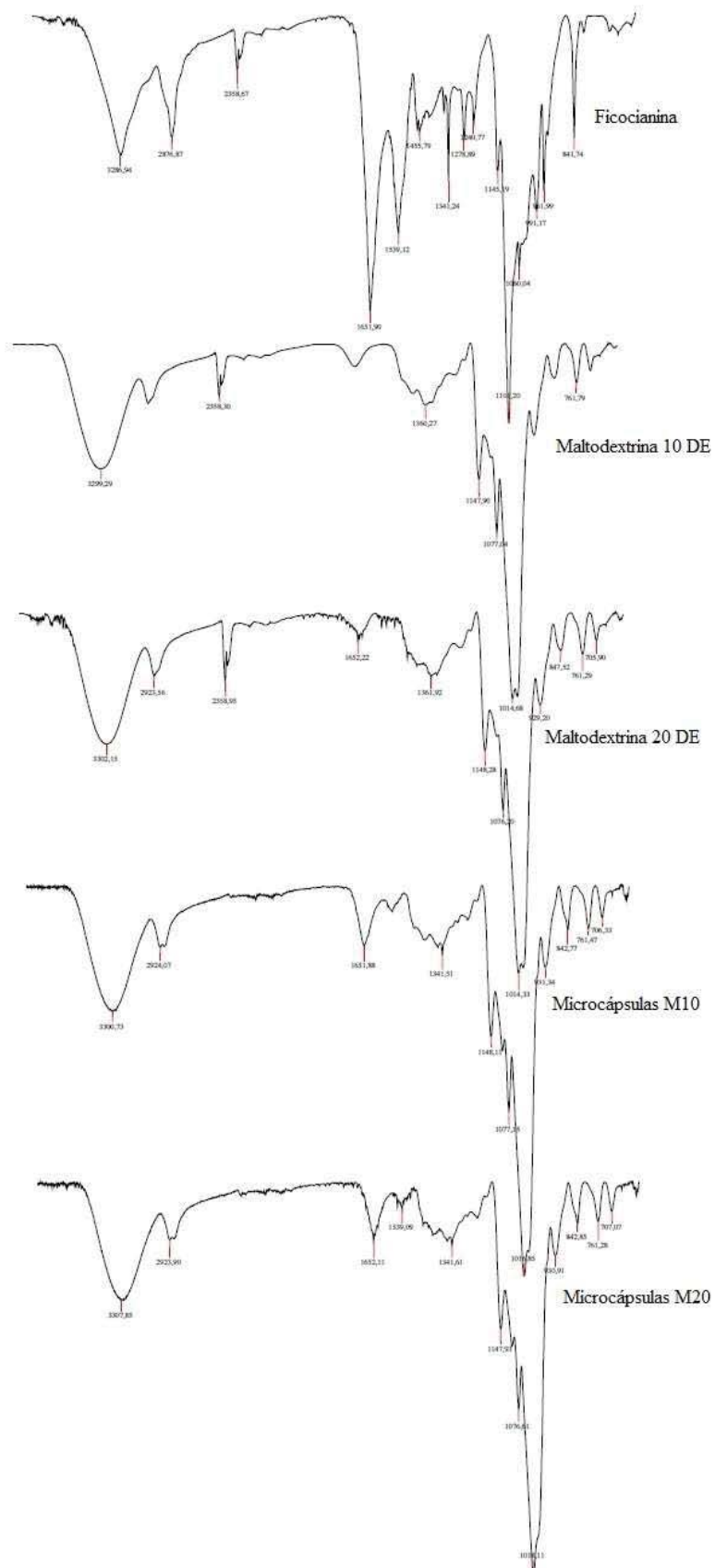
Desta forma, sugere-se que as microcápsulas produzidas, devido aos seus tamanhos, possuem boas propriedades de fluxo para serem utilizadas na indústria de alimentos.

Além disso, diâmetros médios abaixo ou próximos a 10  $\mu\text{m}$  caracterizam-se por serem de potencial aplicação para administração por via oral, visto a seus reduzidos diâmetros. Quanto menor o tamanho da partícula mais facilitada é a absorção do ativo do trato gastrointestinal à circulação sistêmica. Partículas pequenas possuem uma maior velocidade de dissolução devido ao aumento da área superficial (PEREIRA et al., 2006).

#### **4.10 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho**

As amostras dos padrões ficocianina, agentes encapsulantes e das foram avaliados pela análise de infravermelho de acordo com a Figura 8.

Figura 8 - Espectro de infravermelho das amostras.



O espectro da ficocianina nos permite verificar bandas características da estrutura da ficocianina,  $3286,94\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a deformação axial da ligação N-H das amins primárias e O-H,  $2876,87\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a deformação axial simétrica e assimétrica de C-H,  $1651,90\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento vibracional forte de C=O,  $1539,12\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular do grupamento N-H,  $1400\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular de C-H,  $1278,89\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento de C-N,  $1101,20\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação axial de C-O-H, e bandas nas regiões de  $991,17$  a  $841,74\text{ cm}^{-1}$  compreendem as regiões de deformação de C-H fora do plano (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Podemos observar que os espectros das maltodextrinas 10 e 20 DE apresentaram semelhanças entre si ( $1148$ ,  $1077$  e  $1016\text{ cm}^{-1}$ ), sendo que  $1148$  e  $1077\text{ cm}^{-1}$  apresentam bandas que são atribuídas as ligações C-O, já o pico de  $1016\text{ cm}^{-1}$  presente é devido a deformação angular das ligações =CH e =CH<sub>2</sub>, todas essas ligações vindas de grupos presentes nos carboidratos. A banda em  $3300\text{ cm}^{-1}$  é atribuída aos grupos hidroxilas a partir de álcoois e fenóis. Segundo Paiva et al. (2010) essas intensas e largas bandas centradas entre  $3400$  e  $3300$  envolvem as ligações de hidrogênio  $\text{cm}^{-1}$ . A configuração dos espectros está de acordo como Prado (2013) e Krishnaiah, Sarbatly e Nithyanandam (2012).

A banda em  $2924\text{ cm}^{-1}$  sugere a presença de compostos alifáticos. As bandas de absorção em  $1650\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento da ligação C=C de intensidade usualmente de fraca a média, típica de sistemas aromáticos. Já as bandas em  $842\text{ cm}^{-1}$  presente nos referem-se à presença de anel aromático (PAIVA et al., 2010).

Os espectros das maltodextrinas foram semelhantes, mas diferentes da ficocianina, sugerindo que ocorreu uma boa incorporação do encapsulado no material encapsulante.

Observamos também que nenhuma nova banda de absorção apareceu entre os espectros das microcápsulas e agentes encapsulantes, que mostra que a formação das microcápsulas foi promovida por interação física (YAN et al., 2007 e QV et al., 2011).

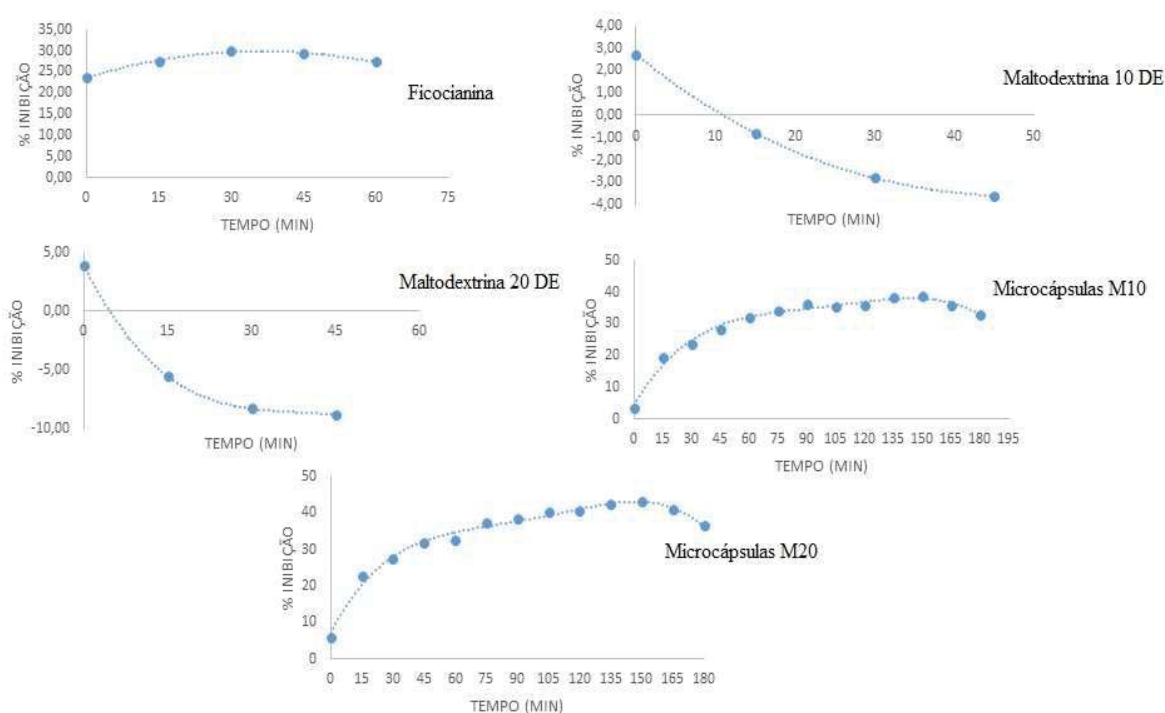
Os resultados sugeriram que ocorreu microencapsulação, pois houve, na banda de  $1017\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, um alargamento de bandas, quando comparadas ao agente encapsulante e a ficocianina.

## 4.13 Atividade antioxidante

### 4.13.1 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical DPPH

O ensaio foi estabelecido, a fim de expressar a inibição efetiva de amostra necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH, conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Capacidade antioxidante das amostras pelo método de sequestro do radical DPPH.



A atividade antioxidante da ficocianina, na sua forma livre, medida através do método de DPPH, conforme demonstrada na Figura, apresentou 30 % de inibição, enquanto as microcápsulas, mostraram potencial antioxidante de 38,62% para microcápsulas com maltodextrina 10 DE e 43,22% para microcápsulas com maltodextrina 20 DE. O aumento no porcentual de inibição pode ser explicado pela maltodextrina possuir resquícios de compostos com atividade antioxidante, provenientes do milho, o que pode ser comprovado pela Figura, onde verificamos uma porcentagem de inibição de 2,72% para a maltodextrina 10DE e 3,9% para a maltodextrina 20DE.

Conforme mostra a Figura, a atividade antioxidante da ficocianina mostrou seu pico de inibição em 30 minutos, demonstrando que o ativo ficou prontamente disponível para ocorrer a redução da concentração inicial de DPPH. Quanto ao agente encapsulante, maltodextrina 10 e 20DE, mostrou-se um pico de inibição logo após a reação quando em contato com o DPPH,



ou seja, no tempo 0 minutos. Já as microcápsulas tiveram seu pico máximo de inibição em 150 minutos.

As microcápsulas, como são produzidas frente ao ativo com o agente encapsulante por ela envolto, possuem liberação gradual do ativo, pois vai liberando seu agente encapsulante aos poucos e desta forma, o ativo com potencial antioxidante, vai ficando exposto ao decorrer do tempo com o DPPH (MENEZES et al., 2012). Através dessa liberação controlada, o ativo fica protegido de fatores externos, como temperatura, umidade e luminosidade, não deixando ocorrer degradação do composto bioativo.

Os autores Gouin (2004) e Desai e Park (2005) afirmam que, através de propriedades de liberação controlada finamente ajustadas, a microencapsulação deixa de ser somente um método de agregação de substâncias a uma formulação alimentícia, e se torna uma fonte de ingredientes totalmente novos com propriedades únicas.

#### 4.13.2 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolina-6-ácido sulfônico)

Na Tabela 11, podem ser vistos os valores da capacidade antioxidante determinada pelo método de sequestro do radical ABTS de acordo com a equivalência à vitamina C.

Tabela 11 - Capacidade antioxidante pelo método ABTS das amostras.

Tratamentos	ABTS-VCEAC ( $\mu\text{M} \cdot 100\text{g}^{-1}$ )
Ficocianina	2178,17 $\pm$ 11 <sup>a</sup>
Microcápsulas M10	2396,12 $\pm$ 6 <sup>c</sup>
Microcápsulas M20	2435,38 $\pm$ 10 <sup>b</sup>
Maltodextrina 10 DE	203,81 $\pm$ 3 <sup>d</sup>
Maltodextrina 20 DE	77,21 $\pm$ 5 <sup>e</sup>

VCEAC = atividade antioxidante equivalente à vitamina C;

Fonte: Autor (2016).

Conforme pode ser observado na Tabela 11, e de acordo com a reação ocorrida de forma energética com compostos doadores de hidrogênios que foram convertidos em uma forma não colorida de ABTS, os dados mostram que não houve degradação da ficocianina nas

microcápsulas quando exposta à temperatura no *spray dryer*, o que indica que a maltodextrina protegeu o ativo da degradação.

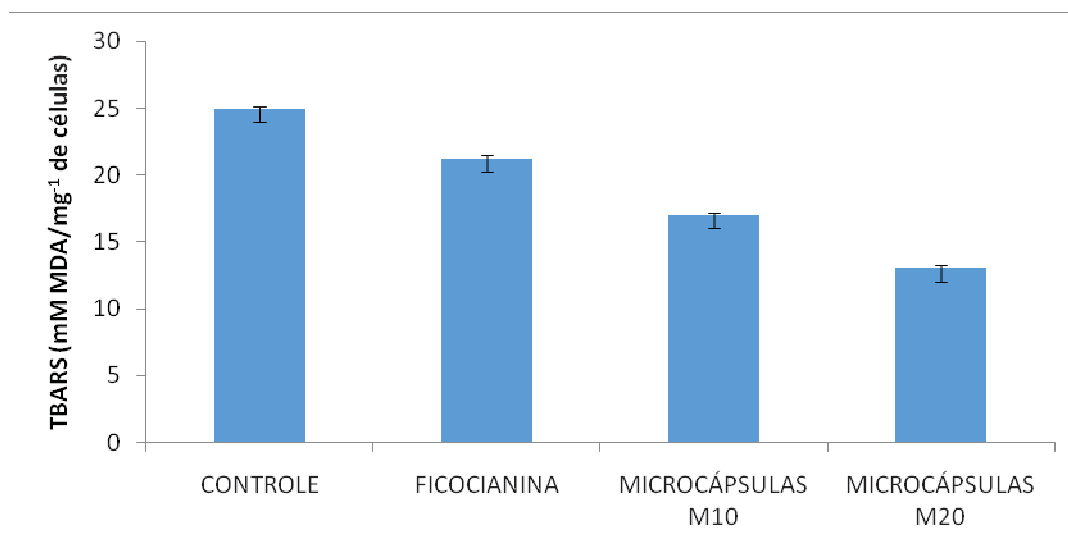
O aumento no percentual de inibição das microcápsulas pode ser explicado pela maltodextrina possuir resquícios de compostos com atividade antioxidante.

#### 4.13.3 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi realizada uma curva de calibração obtida com soluções de malondialdeído (0,75 - 9  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ), isso porque o processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagado por radicais peroxilas. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído que podem ser detectados e utilizados para se avaliar o estresse oxidativo (GAY et al., 1999). Tal curva gerou a equação da reta  $y = 0,1127x - 0,0258$ .

Na Figura 10 abaixo estão os valores encontrados para as amostras analisadas.

Figura 10 – Análise da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (mM) das amostras.



Neste método foi verificada a quantificação dos produtos da peroxidação lipídica onde foi analisada a formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no qual a análise dos produtos finais da peroxidação lipídica ao reagirem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração foi determinada espectrofotometricamente (MANNARINO et al., 2010).

A lipoperoxidação é um dos principais mecanismos de lesão causada pelo estresse oxidativo como resultado da geração de radicais livres da oxidação da camada lipídica da membrana celular. Este processo provoca alterações estruturais e funcionais da membrana, que prejudicam o metabolismo, refletindo principalmente, na sua perda de integridade, permeabilidade e fluidez, podendo levar á morte celular (MORAES, 2010).

A levedura *Sacharomyces cerevisiae* é um modelo de organismo apropriado para processos celulares eucarióticos fundamentais, como a atividade antioxidante celular frente a compostos bioativos (CIGUT et al. 2011; ZAKRAJSEK, RASPOR, JAMNIK, 2011). Nestes organismos os danos oxidativos de proteínas, lipídeos, ácidosnucleicos e outros componentes celulares, bem como sistemas de defesa contra o estresse oxidativo são semelhantes ao organismo humano em quase todos os níveis de organização celular. Assim sendo, os microrganismos são modelos úteis para estudar vários aspectos do estresse oxidativo em níveis bioquímicos, biológicos moleculares e celulares (SIGLER et al. 2009; SLATNAR et al., 2012).

Conforme podem ser observados na Figura 10, as microcápsulas foram capazes de diminuir de forma significativamente os níveis de peroxidação lipídica quando comparados com o controle e a ficocianina.

Esse comportamento sugere uma vetorização do ativo para o local a ser realizada a ação, juntamente com uma liberação prolongada que faz com que o ativo fique agindo por mais tempo no local alvo e promovendo, desta forma, maior inibição da formação de radicais livres (LENZ, 2009).

Através desta técnica também pode-se verificar que ocorreu que o encapsulante promoveu intensificação da atividade antioxidante da ficocianina.

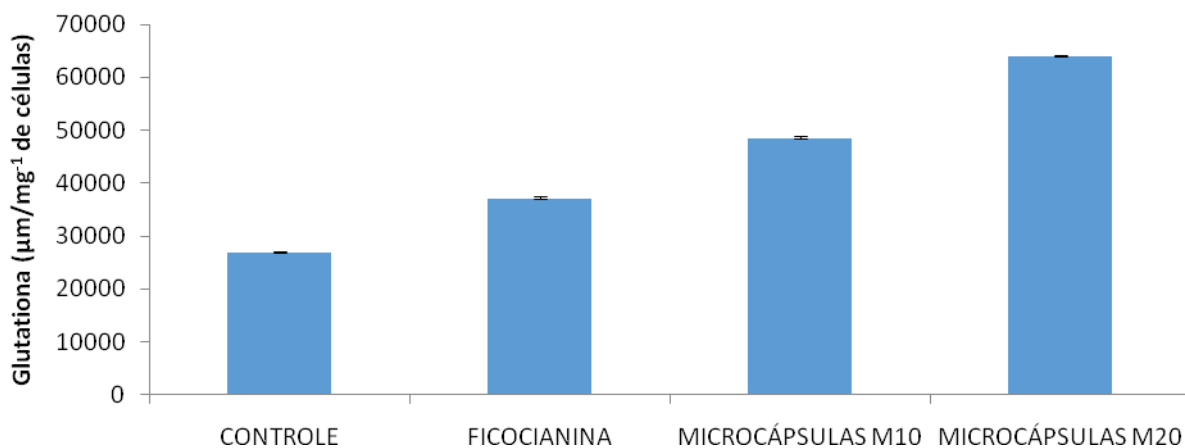
Já que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta semelhança com o organismo humano em termos de oxidação e peroxidação lipídica, este resultado demonstrado no experimento abre novos caminhos de oportunidades para o desenvolvimento de terapias preventivas ou de reversão contra os danos causados pela toxicidade celular de ferro frente a ficocianina.

#### **4.13.4 Dosagem da atividade enzimática da glutatona**

O cálculo final das amostras foi obtido a partir da construção de uma curva padrão com Cisteína 0,5 mmol, na qual esta protege a célula contra dano oxidativo através do grupamento funcional tiol, TFK 0,05 mol, pH 6,8, DTNB 10 mmol e H<sub>2</sub>O, obtendo-se a

equação da reta  $y = 0,005x + 0,1501$ , sendo que o resultado final foi expresso em  $\mu\text{M}$  conforme pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 – Análise da dosagem da atividade enzimática da glutathione das amostras.



A glutathione é uma das principais linhas de defesa celular contra o estresse oxidativo, sendo um antioxidante intracelular primário e desempenha papel importante no processo metabólico da detoxificação eletrofílica sendo considerado um fiável índice de estressor oxidativo (CLARKE et al., 1997).

A quantificação da dosagem enzimática da glutathione mostra-se, conforme Figura 11, que a ficocianina e as microcápsulas foram capazes de modular os parâmetros enzimáticos aumentando significativamente os níveis de atividade da glutathione frente à toxicidade por ferro.

A enzima glutathione fornece a primeira linha de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio através da desmutação catalisada por enzimas de  $\text{O}_2^-$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que é ainda reduzida a oxigênio e água (SALMINEN; PAUL, 2014). Estas desempenham papel importante no processo metabólico da detoxificação eletrofílica, sendo considerado um fiável índice de estressor oxidativo (HATEM et al., 2014).

Conforme já mencionado anteriormente sugere-se que as microcápsulas realizaram uma vetorização do ativo para o local a ser realizada a ação, juntamente com uma liberação prolongada que faz com que o ativo fique agindo por mais tempo no local alvo e promovendo, desta forma, maior inibição da formação de radicais livres frente ao stress causado pelo Ferro (LENZ, 2009).

#### **4.14 Estabilidade**

##### **4.14.1 Calorimetria exploratória diferencial**

Os resultados dos ensaios da Calorimetria Exploratória Diferencial das amostras são demonstrados na Figura 12 abaixo.

Figura 12 – Termograma de calorimetria exploratória diferencial das amostras.

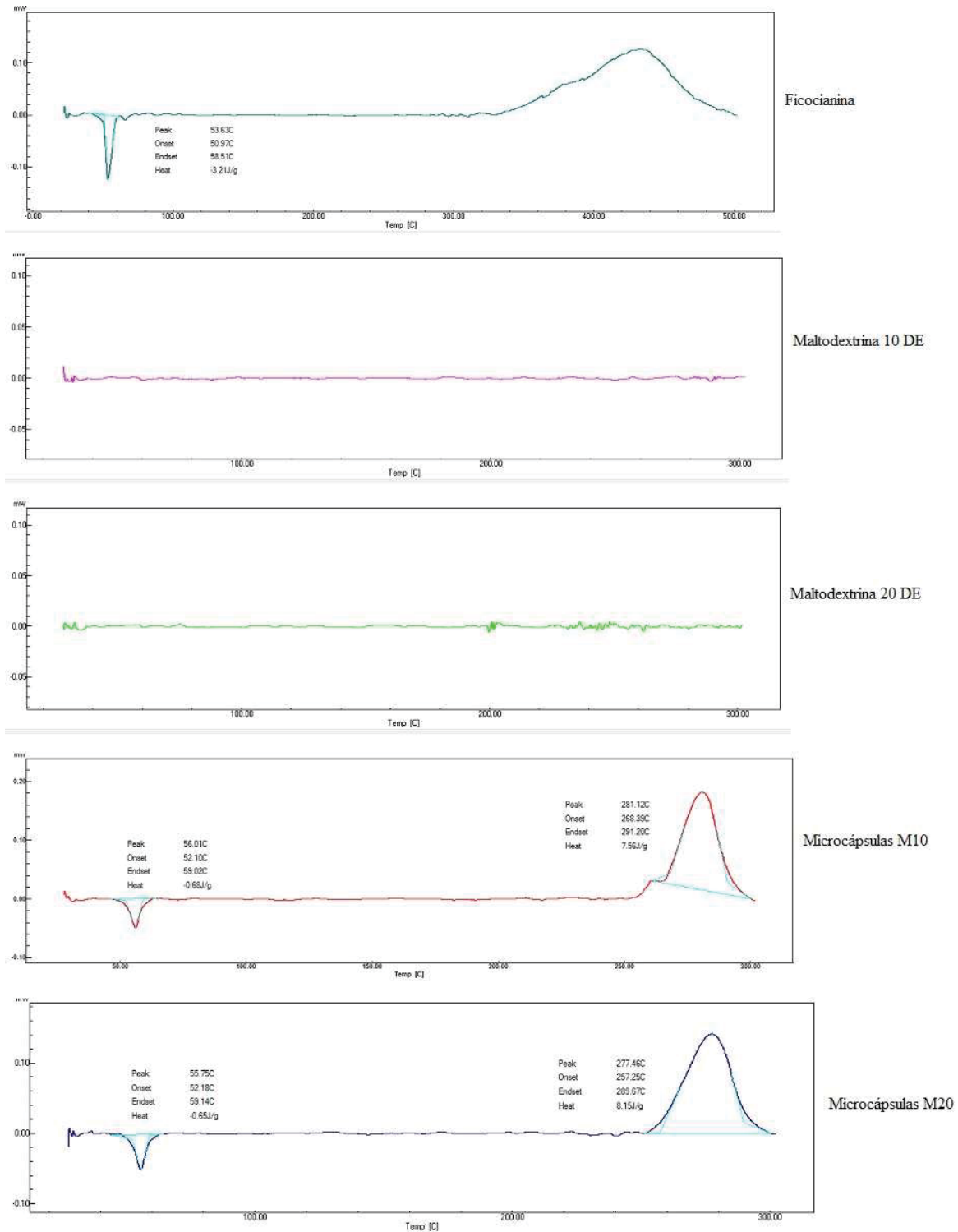


Tabela12 - Ensaio da Calorimetria Exploratória Diferencial das amostras.

Tratamentos	Ti (°C)	Tp (°C)	Tf (°C)	$\Delta H(J/g)$
Ficocianina	50,97	53,63	58,51	- 3,21

Maltodextrina 10 DE	-	-	-	-
Maltodextrina 20 DE	-	-	-	-
Microcápsulas M10	52,10	56,01	59,02	- 0,68
	268,39	281,12	291,20	7,56
Microcápsulas M20	52,18	55,75	59,14	-0,65
	257,25	277,46	289,67	8,15

---

Legenda: Ti (temperatura inicial), Tp (temperatura do pico), Tf (temperatura final),  $\Delta H$  (entalpia)

Fonte: Autor (2016).

Quando realizada a análise somente do polímero, maltodextrina, não teve um pico pronunciado, o que caracteriza a substância como amorfa, ou seja, não possui um pico de fusão específico.

A ficocianina apresentou um pico endotérmico em 53,63 °C, esse evento indica que ocorreu desnaturação da ficocianina a esta temperatura, resultado também observado por Cavalcanti et al (2010). Estudo desenvolvido por Furukawa et al (2004) verificaram que as proteínas foram desnaturadas a 55 °C, relatando que a estrutura nativa das proteínas é estabilizada por forças moleculares internas, que são reduzidas com o aumento da temperatura, sendo assim, acima de certa temperatura, ocorre uma transição do tipo ordem-desordem, quando as proteínas são desenroladas, ocorrendo um fenômeno conhecido como desnaturação.

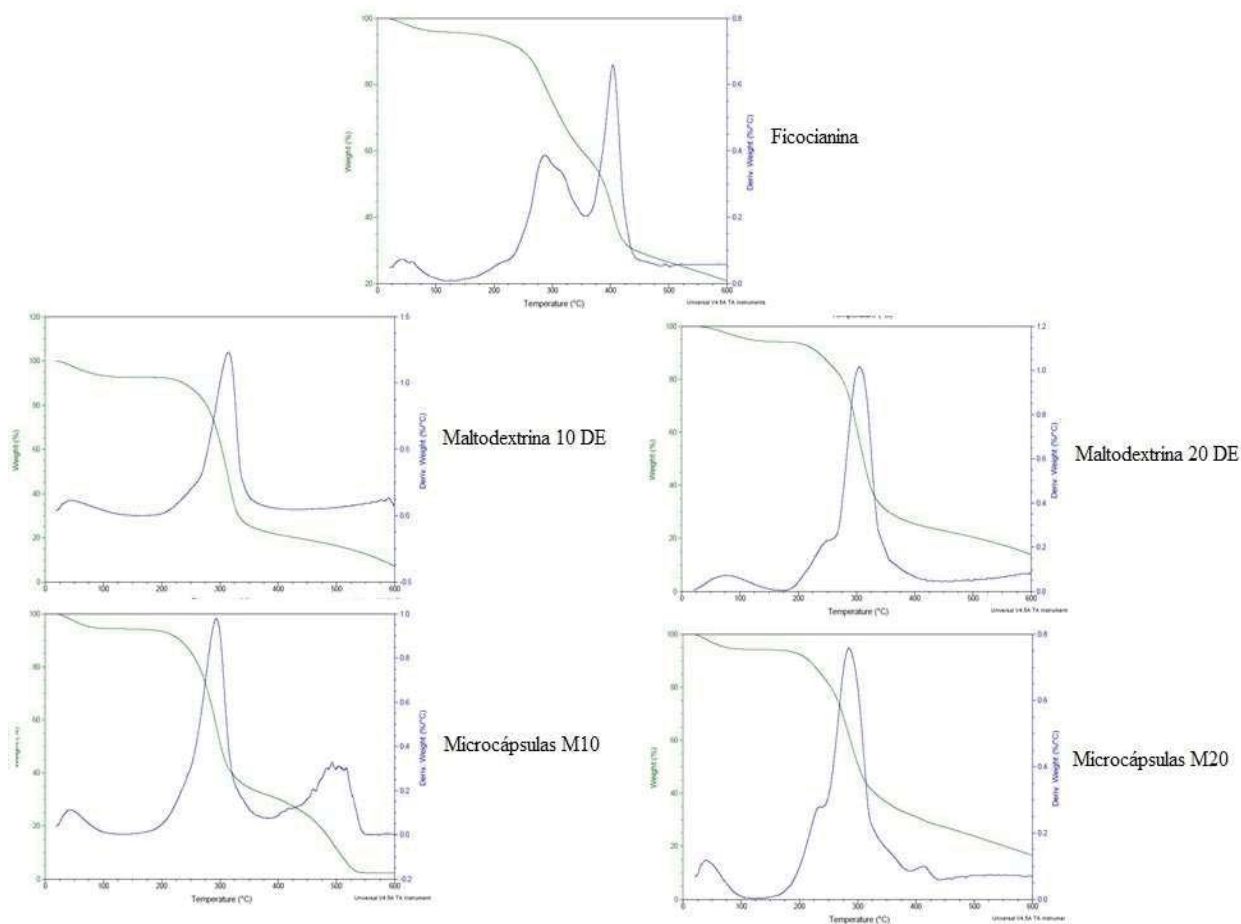
Sendo assim, e conforme pode ser observado na Tabela 12, o pico da ficocianina ocorreu em 53,63 °C, já para as microcápsulas M10 e M20 ocorreu em 56,01 °C e 55,75 °C, esse deslocamento para maior temperatura evidencia que a maltodextrina utilizada como polímero encapsulante agiu protegendo a ficocianina da temperatura.

#### 4.14.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada atingindo a temperatura mínima de 10 °C e o máximo de 600 °C.

Através da Figura abaixo é possível observar a perda de massa das amostras em função da temperatura.

Figura 13 – Análises termogravimétricas das amostras analisadas.



Quanto ao termograma da ficocianina, pode-se observar primeiro evento em até 100 °C que deve-se a desnaturação proteica, resultado corrobora com os dados da análise da calorimetria diferencial de varredura.

Após ocorrem dois eventos de degradação, um evento entre 225 °C a 350 °C com perda de massa de 37,28 %, e outro evento em 327 °C a 450 °C com perda de massa de 37,58 %.

Quanto ao termograma da maltodextrina 10 DE, pode-se observar dois eventos, um em até 100 °C com perda de massa de 7 % e outro entre 200 °C e 375 °C com perda de massa de 85,15 %. Por sua vez, o termograma da maltodextrina 20 DE também pode-se observar dois eventos, um em até 150 °C com perda de massa de 6 %, e outro entre 175 °C a 400 °C com perda de massa de 80 %.

Já o termograma das microcápsulas M10, pode-se observar três eventos, o primeiro em até 101,5 °C, com perda de massa de 5,55 %, que refere-se a desnaturação proteica, outro em



200 °C a 375 °C com perda de massa de 62,28 %, e de 400 °C a 550 °C, com perda de massa de 29,79 %, que refere-se a degradação da amostra.

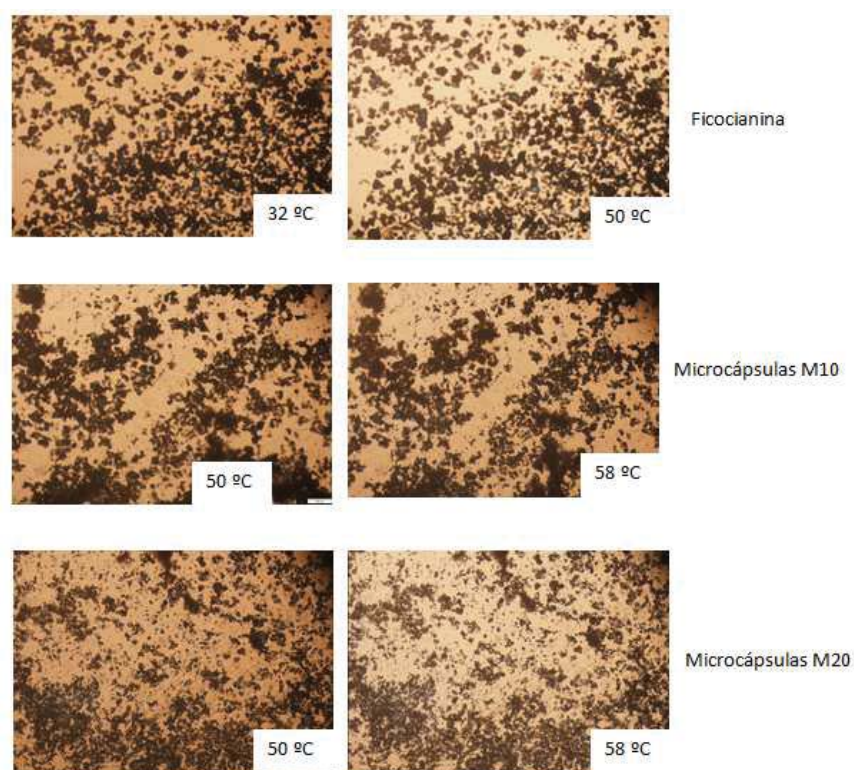
O termograma das microcápsulas M20, pode-se observar dois eventos, o primeiro em até 100 °C com perda de massa de 5,7 %, e segundo evento em 175 °C a 425 °C com perda de massa de 77 %, referente a decomposição final da amostra.

#### 4.14.3 Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento (Hot-stage)

A microscopia óptica foi realizada com célula de aquecimento, atingindo a temperatura mínima de 35 °C.

Através das Figuras gravadas no equipamento foi possível observar a fusão e degradação da amostra, conforme pode ser observado nas Figuras 14.

Figura 14 – Microscópio óptico equipado com sistema de aquecimento para a análise de ficocianina e microcápsulas.



Para a amostra das microcápsulas houve maior dificuldade em observar os eventos, o que pode ser explicada pela diminuição do tamanho de partícula e pelos defeitos que a secagem causa na amostra (PEREIRA, 2014).

Pode ver-se na Figura que teve um evento térmico a 50 ° C com ficocianina, provavelmente associada à fusão, uma vez que a temperatura à qual o evento térmico ocorreu nas microcápsulas foi de 58 ° C.

Fato ocorre, pois, a ficocianina está presa na matriz polimérica, fazendo com que o ativo fique menos exposto ao agente degradante.

Além disso, observa-se uma maior proporção de material amorfo do que estrutura cristalina, o que corrobora com os resultados de solubilidade, uma vez que o estado amorfo apresenta maior solubilidade em comparação a sua forma cristalina e interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio entre ativo e polímero (ELOY, 2012).

A melhora deste perfil de dissolução pode ser explicada pela redução de tamanho de partícula, melhorando a molhabilidade do ativo pelo polímero hidrofílico (ELOY, 2012).

De acordo com Gomes-Pinho (1999), além da melhora do perfil de dissolução, ativos na forma amorfa apresentam concentrações plasmáticas 3 a 4 vezes maiores em relação à forma cristalina, demonstrado assim que possui maior biodisponibilidade bioativa funcional do que a forma cristalina.

#### **4.14.4 Estudo da estabilidade das microcápsulas frente ao armazenamento**

A estabilidade frente ao armazenamento da ficocianina e das microcápsulas foi realizada frente ao potencial antioxidante pelo método de ABTS e utilizando as temperaturas de -18 °C, 4° C e 25 °C, conforme pode ser observado na Figura 15, 16 e 17.

Figura 15 - Estabilidade frente ao armazenamento na temperatura de – 18°C.

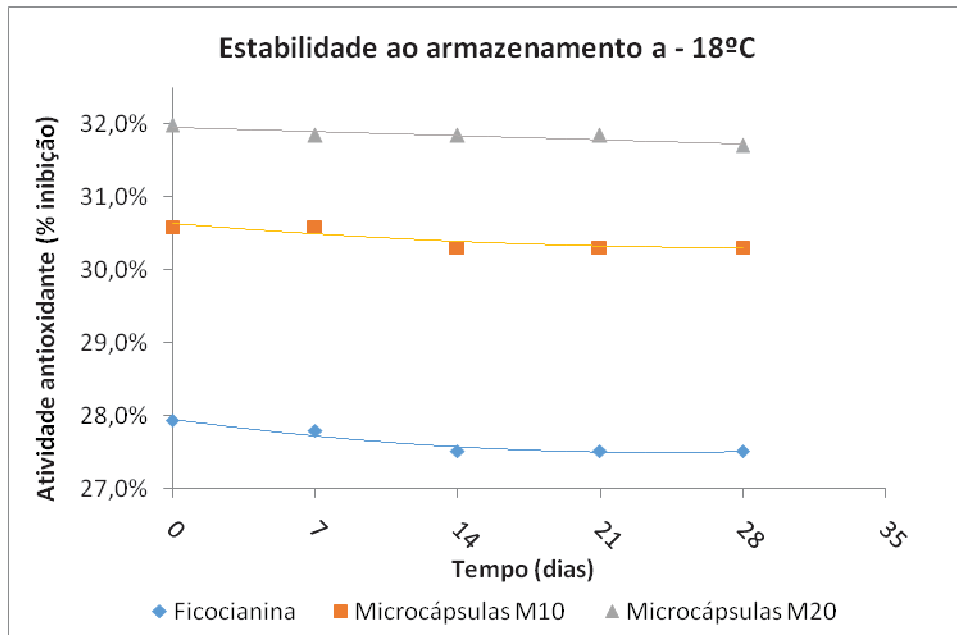


Figura 16 - Estabilidade frente ao armazenamento na temperatura de 4 °C.

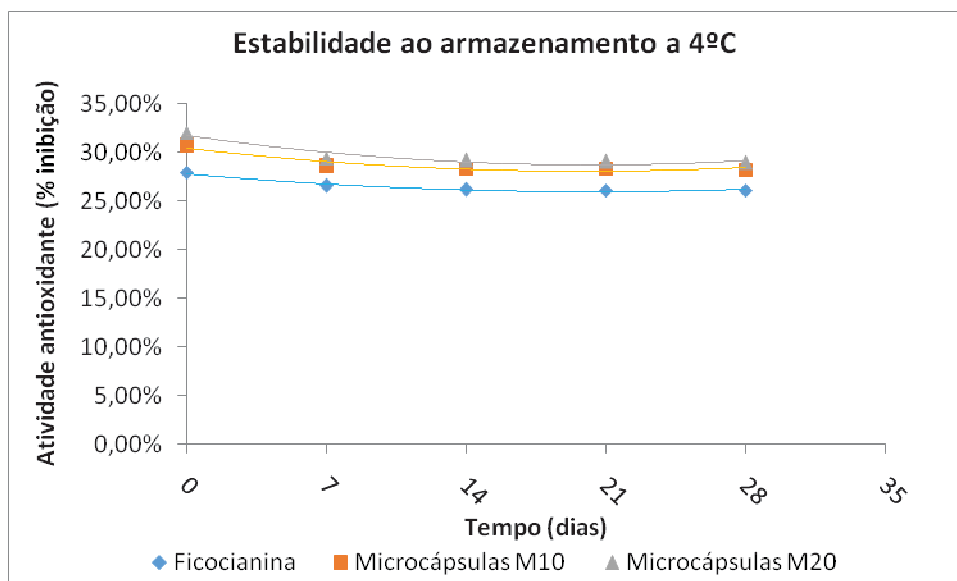
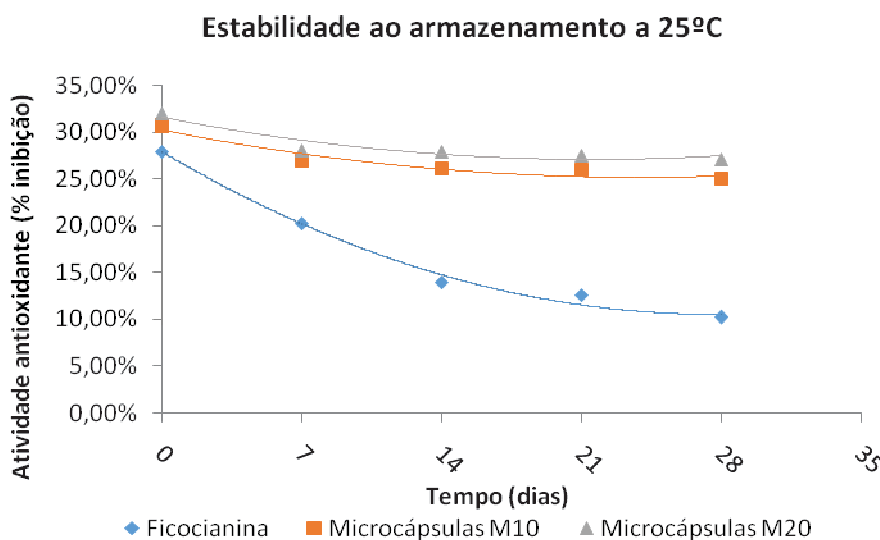


Figura 17 - Estabilidade frente ao armazenamento na temperatura de 25 °C.



Conforme se pode observar na Figura 15 e 16 nas temperaturas de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  o potencial antioxidante da ficocianina e das microcápsulas tiveram uma tendência a se manterem constantes, indicando assim que nestas temperaturas não há degradação do potencial antioxidante.

Já na Figura 17, na temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , observa-se que a ficocianina teve uma tendência a redução do potencial antioxidante (27,93% para 10,20%) quando comparado as microcápsulas. Isso demonstra que o agente encapsulante (maltodextrina) teve a ação de proteção do agente ativo (ficocianina), fazendo com que mantivesse seu potencial antioxidante.

Os dados encontrados no teste de estabilidade frente ao potencial antioxidante corroboram com dados anteriores demonstrados, indicando alta eficiência de encapsulação o que confere ao produto excelente estabilidade.

Desta forma, a microencapsulação é uma tecnologia que tem sido empregada com êxito na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia, que além de mascarar sabores indesejáveis, reduzir a volatilidade, a higroscopicidade e a reatividade, possibilita um aumento na estabilidade destes em condições ambientais adversas (ROCHA, 2009).

O teste de estabilidade indicou que a microencapsulação foi eficiente na proteção da ficocianina, uma vez que a retenção da mesma foi maior nos sistemas encapsulados em relação ao material livre. Também foi observado que a temperatura influenciou significativamente na estabilidade do pigmento, conforme esperado.



## 5 CONCLUSÕES

Nas condições estudadas concluímos:

As microcápsulas desenvolvidas apresentam características que viabilizam a sua inserção em produto alimentício ou farmacêutico, visto suas características de solubilidade, atividade de água, umidade e densidade aparente.

A técnica de encapsulamento da ficocianina por *spray dryer*, com o encapsulante maltodextrina foi eficaz para a manutenção da atividade antioxidante do bioativo.

Os resultados demonstram que as microcápsulas diminuem a peroxidação de lipídeos e aumentam a concentração de glutathione no modelo *Saccharomyces cerevisiae* estressado com o íon ferro.

Os resultados possibilitam perspectivas para o desenvolvimento de terapias nutracêuticas e de alimentos funcionais com o uso das microcápsulas de ficocianina.

## 6ORÇAMENTO

Os materiais permanentes estão disponíveis no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo, não sendo necessária sua aquisição.

A Tabela 13 apresenta o orçamento do projeto de pesquisa para o desenvolvimento da proposta.

Tabela 13 - Orçamento do projeto de pesquisa para o desenvolvimento da proposta

<b>Descrição</b>	<b>Justificativa</b>	<b>Valor Total (R\$)</b>
<b>Material existente</b>		
Balança analítica		3500,00
Espectrofotômetro		24000,00
Centrífuga		40000,00
Capela de fluxo laminar		16000,00
<i>Spray dryer</i>		60000,00
Turrax	Equipamentos para utilização nos testes propostos.	5000,00
Shaker		9000,00
Agitador mesa		1800,00
Testo		10000,00
Colorímetro		15000,00
Manta de aquecimento		800,00
Dessecador		800,00
Vidrarias	Vidrarias comuns de laboratório, tais como pipetas volumétricas, graduadas e automáticas, erlenmyers, béqueres, provetas, entre outros.	1000,00
<b>Materiais a serem adquiridos e Análises terceirizadas</b>		
Reagentes	Reagentes e insumos para a realização dos testes propostos.	4000,00
Análise no MEV		200,00/hora

Fonte: Autor (2015).







## 7CRONOGRAMA

O cronograma do projeto de pesquisa está apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Cronograma de atividades do projeto de pesquisa

ATIVIDADE PREVISTA	Ano 2015				Ano 2016				Ano 2017	
	Trimestres				Trimestres				Trimestres	
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°
Definição do objeto de estudo										
Revisão de Literatura										
Apresentação do Projeto de pesquisa										
Realização dos ensaios										
Determinações analíticas										
Qualificação										
Acompanhamento dos resultados										
Análise e discussão dos resultados										
Elaboração de relatórios parciais e finais										
Elaboração de artigos para publicação										
Apresentação à banca examinadora										

Fonte: Autor (2015).





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIEC J, MODRZEJEWSKA Z. Some structural properties of spray-dried chitosan microgranules. **Dry. Technol.** v. 23, n. 8, p. 1601-1611, 2005.

AGUILERA, J. M. **Temas en tecnología de alimentos**. Instituto Politécnico Nacional, 1997.

ACHKAR, M.T; NOVAES, G.M.; SILVA, M.J.D.; VILEGAS, W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2013.

ALEXI, T.; BORLONGAN, C.; FAULL, C.; WILLIAMS, C.; CLARK, R., GLUCKMAN, P.; HUGHES, P. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: parkinson's and huntington's diseases. **Prog. Neurobiol.** v. 60, p. 409- 470, 2000.

ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 775 p, 2007.

ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 240–251, 2007.

ANARJAN, N.; TAN, C. P. Developing a three component stabilizer system for producing astaxanthin nanodispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 437 – 447, 2013.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutatathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 548-555, 1985.

ANSON, R. Microencapsulation: For enhanced textile performance. **Performance Apparel Markets**, n. 12, p. 21-39, 2005.

ANTELO, F. S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J. A.; KALIL S. J. Extraction and Purification of C-phycoyanin from. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 921–926, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL INTERNATIONAL AOAC. **AOAC method 926.12**. 16. Gaithersburg: 2005. p.1-5. ISBN 0-9355-8475-7.

ARCHERI, D.P.R. Estudo das características de adsorção de água e da estabilidade das microcápsulas de óleo essencial de laranja na seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.3, p.367–373, 1999.

ASCHERI, D. P. R., M. O. M. MARQUEZ, MARTUCCI. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.1-6, 2003.

AUGUSTA, I. M. **Extração e secagem da casca de jambo vermelho (Syzygium malaccensis, (L.) Merryl et Perry) para obtenção de corante**. 137 f. Tese (Doutorado em

Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós- Graduação de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2011.

BACKES, L.T.H. **Ficocianina na proteção da toxicidade da alfa-synucleína e deleção do gene SIR2 em *Saccharomyces cerevisiae***. 146f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

BARBOSA-CÁNOVAS GV, ORTEGA-RIVAS E, JULIANO P, YAN H. Bulk properties. In: Food power: physical properties, processing, and functionality. New York: **Kluwer Academic**; p.81-8, 2005.

BARBOSA, M. I. M. J. Microcápsulas de bixina: obtenção, aplicação e estudos de fotodegradação em sistemas-modelo- Campinas, SP: [s.n.],2009.

BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulamento de antocianinas. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.**, v. 9, n. 36, 2006.

BE MILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, cap. 4, p. 157-224, 1996.

BENNETT, A., BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419–435, 1973.

BENETTI, F. **Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene sir2**. 2013. 232f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

BERG, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. **Biochemistry**. 5th Ed. New York: W H Freeman, 2002.

BERNARDI, S.; OETTERER, M.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J. Embutidos Cárneos: Melhoramento no valor nutritivo e aplicação de antioxidantes naturais. **Revista Nacional da Carne**, v. 32, n. 378, p. 30-38, 2008.

BERTOLIN, T. E., PILATTI, D, GIACOMINI, A.C.V.V, BAVARESCO, C.S., COLLA, L.M., COSTA, J.A.V.C. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 1253-1259, 2009.

BERTOLIN, T.E.,GARIENTTI, C., FARIAS,D., SOUZA, F.T. ; GUTKOSKI, L. C., COLLA, L. M Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 85-91, 2011.

BERTOLINI, A. C.; SIANI, A C.; GROSSO, C. R. F. Stability of monoterpenes of encapsulated in gum arabic by spraydrying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.2, p. 780785, 2001.

BHANDARI, B. H. Flavor encapsulation by spry drying: application to citral and linalyl acetate. **Journal of Food Science**, v.57, n.1, p.217–221, 1992.

BICUDO, M. O. P. **Composição fenólica, atividade antioxidante e microencapsulação de frutos de juçara (*Euterpe edulis*): aspectos de interesse para a indústria de alimentos.** 2014. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BRAND WILLIAMS, W.; CUVELIER, A. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm.-Wiss. U.- Technol.*, v. 28, p. 25-30, 1995.

CALISKAN, G.; DIRIM, S. N. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 539-548, 2013.

CARNEIRO H.C.F., TONON R.V, GROSSO C.R.F, HUBINGER M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v.115, p. 443-451, 2013.

CAMPOS, A.M; LISSI, E.A. Kinetics of the reaction between ABTS derived radical cations and phenols. **Int J Chem Kinetics**, v. 29, p. 219-224, 1997.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 420-428, 2005.

CARPENTER, J.F; MANNING, M.C. Rational Design of Stable Protein Formulations, **Theory and Practice**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

CHAIKLAHANA, R.; CHIRASUWANA, N.; BUNNAGA, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v.47, p. 659–664, 2012.

CHEN, J; DAVIS, S. The release of diazepam from poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of microencapsulation**, v.19, n.2, p. 191-201, 2002.

CICERELLI, R. **Estudo da ocorrência de cianobactérias no reservatório de Nova Avanhandava-SP por meio da inferência do pigmento ficocianina.** Rejane Ennes Cicerelli. - Presidente Prudente: [s.n], 2013.

CLARKE, J. B. et al. Modification of an enzymatic glutathione assay for the microtiter plate and the determination of glutathione in rat primary cortical cells. **Toxicologic Method**, v. 6, p. 223–230, 1996.

CONEGLIAN, S. M.; LIMA, B. S.; SILVA, L. G.; LAZZARI, C. M.; SERRANO, R. D. C.; TONELLO, C. L. **Utilização de antioxidantes nas rações.** PUBVET, Londrina, v. 5, n. 5, Ed. 152, Art. 1026, 2011.

CONSTANT, P. B. L., STRINGHETA, P. C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios, **Boletim SBCTA**, v. 36, n. 1, p. 12-18, 2002.



DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 900p.

DEPAZ R.A., DALE D.A., BARNETT C.C., CARPENTER J.F., GAERTNER A.L., RANDOLPH T.W. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 765-774, 2002.

DEPYPERE, F.E.A. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v.1, n. 2, p. 75-94, 2003.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, London, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DESOBRY SA, NETTO FM & LABUZA TP. Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25DE on encapsulated  $\beta$ -carotene loss during storage. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 23, p. 39–55, 1999.

DIB TAXI, C. M. et al. Study of the microencapsulation of camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 4, p. 443-448, 2003.

DUAN, H. et al. Evaluation of remote sensing algorithms for cyanobacterial pigment retrievals during spring bloom formation in several lakes of East China. **Remote Sensing of Environment**, v.126, p.126-135, 2012.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, n. 4, p. 459–469, 2010.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technol.**, v.42, n.4, p.136-151, 1988.

EDWARDS, M. R.; HAUER, C.; STACK, R. F.; EISELE, L. E.; MACCOLL, R. Thermophilic C-phycocyanin: effect of temperature, monomer stability and structure. *Biochimica et Biophysica ACTA*, v. 1321, p. 157-164, 1997.

ELOY, J.A. Dispersões sólidas de ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas. Dissertação (mestrado). Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnol.** v. 30, p. 1525– 1536, 2008.

FAROOQ, S.M.; BOPANA, N.B.; ASOKAN, D.; SEKARAN, S.D.; SHANKAR, E.M.; LI, C.; GOPAL, C.; BAKAR, S.; KARTHIK, H.; EBRAHIM, A.S. C-phycocyanin confers protection against oxalate-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in MDCK cells. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B. HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J., PEDRAZA-CHAVERRI, Properties of phycocyanin journal of functional foods. **J.Nutraceutical**, v. 11, p. 375–392, 2014.

FERNANDES, B., BORGES, V., & BOTREL, A. (2014). GumArabic/starch/maltodextrin/inulinas wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101, 524-532.

FURUKAWA V. A., SOBRAL, P.J.A. HABITANTE, A. M. Q., GOMES, J.D.F Análise térmica da carne de coelhos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 265-269, 2004

GANTAR, M., SIMOVIC, D., DJILAS, S., GONZALEZ, W., & MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 21-26, 2012.

GARDINER, G.E. et al. Comparative survival rates of humanderived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L-salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2605-2612, 2000.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GE, X., WAN, Z., SONG, N., FAN, A., WU, R. Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. **J. Food Eng.** v. 94, p. 122-128, 2009.

GIBBS, B. F., KERMASHA, S., ALLI, I., MULLIGAN, C. N., Encapsulation in the food industry: a review, **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213-224, 1999.

GIUNCHEDI, P., GENTA, I., CONTI, B., MUZZARELI, R. A. A., CONTE, U. Preparation and characterization of ampicilin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres, **Biomaterials**, v. 19, p.157-161, 1998.

GOMES - PINHO, J. J. R. **Desenvolvimento de comprimidos de cloridrato de metformina de liberação convencional e modificada: influência dos excipientes sobre o perfil de dissolução e avaliação termoanalítica**. 215f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 1999.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.

GUALTIERI, P.; BARSANTI, L. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC Press, Taylor e Francis Group. 301 p., 2006.

HEGER, R. Release kinetics/mechanisms. In: Vilstrup, P. (Ed.). **Microencapsulation of food ingredients**. Leatherhand Publishing, 1. Auflage, p. 55-75, 2001

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Disponível em: <<https://www.ift.org>> Acesso em: Out. 2015.

JAOUEN, P, LÉPINE, B, ROSSIGNOL, N, ROYER, R, QUÉMÉNEUR, F. Clarification and concentration with membrane technology of a phycoyanin solution extracted from *Spirulina platensis*. **Biotechnol Tech**, v. 13, p. 877-81, 1999.

JESPERSEN L, STRØMDAHL LD, OLSEN K, SKIBSTED LH. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionary and beverages. **Eur Food Res Technol**, v. 220, p.261–266, 2005

JOHNSON, I.T. New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. **Mutat. Res.** v. 551, p. 9-28, 2004.

KELVINSONG. Diagram of a cyanobacterium. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria#mediaviewer/File:Cyanobacterium>. Acesso em Abril 2015, -inline.svg, 2013.

KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J.; TAYLOR, D. W. **Maltodextrins**. In: KEARSLEY, M. W.; DZIEDZIC, S. Z. (Eds.). Handbook of Starch Hydrolysis Products and Their Derivatives. 1ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, p.65-82, 1995.

KEOGH, M. K.; MURRAY, C. A.; O'KENNEDY, B. T. Effects of ultrafiltration of whole milk on some properties of spray-dried milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 12, p. 995-1002, 2003.

KRISHNAN,S; BHOSALE, R; SINGHAL, RS. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 1, p. 95-102, 2005.

KRISHNAIAH, D, SARBATLY, R., NITHYANANDAM, R. Microencapsulation of Morinda citrifolia L. extract by spray-drying. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, p. 622-632, 2012.

KUDDUS, M., SINGH, P., THOMAS, G., & AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. **BioMed Research International**, 742859. doi:10.1155/2013/742859, 2013.

KUMAR, D., GAUR, J.P. Growth and metal removal potential of a Phormidium bigranulatum-dominated mat following long-term exposure to elevated levels of copper. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, n. 17, p. 10279–10285, 2014.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. Ed. Maryland: Springer, v. 3, 2008.

LENZ, Q. F. **Determinação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de formulações semissólidas contendo nanocápsulas de nimesulida**. Dissertação (Mestrado em Nanociências) Centro Universitário Francisco de Santa Maria, Santa Maria- RS, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima artes e textos, 2006.

LOWRY, O. H., ROSENBROUGH N.J., FARR, A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **J Biol Chem**. 193, pp. 265-275.

MAFART, P. **Processos físicos de conservação**. In: Engenharia industrial alimentaria. Espanha: Editorial Acibria, 1994. p. 253-275.

MARÍN-PRIDA, J., PAVÓN-FUENTES, N., LLÓPIZ-ARZUAGA, A., FERNANDEZ-MASSÓ, J.R., DELGADO-ROCHE, L., MENDOZA-MARÍ, Y., PEDROSO, S., CRUZ-RAMÍREZ, A., VALENZUELA-SILVA, C., NAZABAL-GALVEZ, M., CINTADO-BENÍTEZ, A., PARDO-ANDREU, G., POLENTARUTTI, N., RIVA, F., PENTÓN-ARIAS, E., PENTÓN-ROL, G. Phycocyanobilin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute cerebral hypoperfusion in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, p. 49–60, 2013.

MARTINEZ SE, CHEN Y, HO EA , MARTINEZ SA , DAVIES NM. Pharmacological effects of a Cphycocyaninbased multicomponent nutraceutical in an invitro canine chondrocyte model of osteoarthritis. **Can J Vet Res**. v.79, n. 3, p.2419, 2015.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 102-105, 2003.

MENDES, J B E. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

MENEZES, C.R., BARIN, J.S., CHICOSKI, A.J., ZEPKA, L.Q., JACOB-LOPES, E., FRIES, L.L.M, TERRA, N.N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Cienc. Rural** [online], vol.43, n.7, p.1309-1316, 2013.

MENG, X.C. et al. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v.106, p.1406-1416, 2008.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MIN, S.K., PARK, J.S., LUO, L., KWON, Y.S., LEE, H.C., SHIM, H.J., KIM, I., LEE, J., SHIN, H.S. Assessment of C-phycocyanin effect on astrocytes-mediated neuroprotection against oxidative brain injury using 2D and 3D astrocyte tissue model. **Sci Rep**, v. 24, n. 5, p. 144-18, 2015.

MITRA S, SIDDIQUI WA, KHANDELWAL S. C-Phycocyanin protects against acute tributyltin chloride neurotoxicity by modulating glial cell activity along with its anti-oxidant and anti-inflammatory property: A comparative efficacy evaluation with N-acetyl cysteine in adult rat brain. **Chem Biol Interact.**, 2015.

MOREIRA, G. E. G. Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Natal, 2007.

MOZAFARI, M. R.; KHOSRAVI-DARANI, K.; BORAZAN, G. G.; CUI, J.; PARDAKHTY, A.; YURDUGUL, S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. **International Journal of Food Properties**, v. 11, n. 4, p. 833-844, 2008.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

NETO, J. M. F. A. et al. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo Em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: *Overreaching* Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. **Revista Brasileira da Medicina do Esporte**, v. 14, n. 6, p. 548-552, 2008.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. J. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v.77, n.4, p.919– 925, 2006.

NUNES, G.L. **Microencapsulação por spray drying do extrato crioconcentrado de erva mate (*Ilex paraguariensis*) empregando maltodextrina como agente encapsulante**. Florianópolis, SC, 92 p., 2014.

OLIVEIRA, M. I. S. et al. Estabilidade da polpa de morango atomizada utilizando diferentes agentes carreadores. **Braz. J. Food Technol**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 310-318, out./dez. 2013.

OU, Y., LIN, L., PAN, Q., YANG, X., CHENG, X. Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on alloxaninjured mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 721–726, 2012.

OWUSU-ANSAH, E., YAVARI, A., BANERJEE, U. **A protocol for in vivo detection of reactiveoxygen species**. Protocol Ex- change, 2008.

PAIVA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. **Introdução a Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PAN, R., LU, R. ZHANG, Y., ZHU, M., ZHU, W., YANG, R., ZHANG, E., YING,J., XU, T., YI, H., LI, J., SHI, M., ZHOU, L., XU, Z., LI, P., BAO, Q. *Spirulina* phycocyanin induces differential protein expression and apoptosis in SKOV-3 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-35, 2015.

PANDEY, V.D., PANDEY, A., SHARMA, V. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v.2, n. 9, p. 89-97, 2013.

PATEL, A., MISHRA, S., PAWAR, R., GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 248–255, 2005.

PATEL, A., MISHRA, S, GHOSH, P.K. Antioxidant potential of C-phycocyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. **Indian J Biochem Biophys**. v. 43, n. 1, p. 25-31, 2006.

PATIL G, CHETHANA S, SRIDEVI AS, RAGHAVARAO KSMS. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. **J. Chromatogr. Av**.1127, p. 76–81, 2006.

PELEG, M.; MANNHEIN, C.H.; PASS, N. Flow properties of some food powders. **Journal of Food Science**, v.38, n.6, p.959–964, 1973

PEREIRA, R.N. Caracterização no estado sólido: hidratos de levofloxacino. 148 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

PEREIRA, A. **Avaliação microestrutural de pós de suco de maracujá obtidos por spray drying**. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PEREIRA, M.R., CRUZ, L., RÉ, M.I., GUTERRES, S.S. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 198-205, 2006.

PETERSEN SB, JONSON V, FOJAN P, WIMMER R, PEDERSEN S. Sorbitol prevents the self-aggregation of unfolded lysozyme leading to an up to 13 °C stabilisation of the folded form. **J Biotechnol**. 114, p. 269–78, 2004.

PÍSECKY, J., Spray drying in the cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 531–536, 2005.

PLEONSIL, P., SOOGARUN, S., SUWANWONG, Y. Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycoyanin and their protective effects on human erythrocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 393– 398, 2013.

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

PRADO, ANA C. P. **Identificação e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos da casca de nóz-pecã**. 2013. 244 f. Tese (doutorado em ciência de alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PROZYME. C-Phycocyanin (Specifications). Disponível em: <<http://www.prozyme.com>> Acesso em: Out. 2015.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 5, p. 386-392, 2007.

QV, X.Y., ZENG, Z.P., JIANG, J.G. Preparation of **lutein microencapsulation** by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocoll.** n. 25, p. 1596-1603, 2011.

RAMOS, A.L., DECOSTA, D.T. **Termoestabilidade da microalga *Spirulina platensis* em relação ao potencial antioxidante do extrato aquoso**. 37f. Trabalho de síntese, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

RÉ, M. I. Cápsulas inteligentes. **Ciência Hoje**, v. 27, n.162, p. 24-29, 2000.

RÉ, M. I. Microencapsulação by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1999.



REINECCIUS, G.A. **Spray-drying of food flavors**. In: RISCH, S. J.; REINECCIUS, G.A. Flavour encapsulation. ACS Symposium Series, 370. Washington, DC: ACS, p.55-66, 1998.

REIS CP, NEUFELD RJ, RIBEIRO AJ, VEIGA F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. **Nanomedicine**.v. 2, n. 2, p.53-65, 2006.

REN, X., XUE, Y., ZHANG, K., LIU, J., LUO,G., ZHENG, J., MU, Y., SHEN, J. A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. **FEBS Lett.** v. 507, p. 377-380, 2001.

RÉVILLION, J.P.; BRANDELLI, A.; AYUB, M.A.Z. Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir de soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, 2000.

RISH, S. J., **Encapsulation: overview of uses and techniques**, In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A, Encapsulation and controlled release of food ingredients, Washington, DC: p. 8 – 25, 1995.

ROCHA, G.A. Produção, caracterização, estabilidade e aplicação de microcápsulas de licopeno. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D., GONZÁLEZ; R., LEDON, N. GARCÍA. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. **Inflamm. res.** v. 47, p. 36–41, 1998-a.

ROMAY, C., LEDÓN, N., & GONZALEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycoyanin in some animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, p. 334–338, 1998-b.

ROMAY, C.; GONZÁLEZ; R., LEDON, N., REMIREZ, D., RIMBAU, V. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory andNeuroprotective Effects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, p. 207-216, 2003.

ROSA E. D., TSUKADA M., FREITAS L. A. P., **Secagem por atomização na indústria alimentícia: Fundamentos e aplicações**, 2003.

RUTZ, J K. **Caracterização e microencapsulação de suco de pitanga roxa (Eugenia uniflora L.)**.2013. 105f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SANT'ANNA, V.; GURAK, P.D.; MARCZAK, D.F.; TESSARO, I.C., Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. **Dyes and Pigments**, v. 98, p. 601-608, 2013.

SANTOS, M.S. Chemical characterization and evaluation of the antioxidant potential of guavira jam. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v.35, n. 1, p. 73-82, 2013.

SARADA R, PILLAI MG, RAVISHANKAR GA. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochem**, v. 34, p. 795–801, 1999.

SCHULBERT, H. Food particle technology. **Journal of Food Engineering**, v.6, n. 1, p. 1-32, 1997.

SETYANINGSIHA I., BINTANG M., MADINAA N. Potentially Antihyperglycemic from Biomass and Phycocyanin of *Spirulina fusiformis* Voronikhin by in Vivo Test. **Procedia Chemistry**, v.14, p. 211–215, 2015.

SHANAB, S. M., MOSTAFA, S. S., SHALABY, E. A., MAHMOUD, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidante and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 608–615, 2012.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., *Fundamental of Analytical Chemistry*, 6<sup>a</sup> ed., Forth Worth: Saunders College, p.829,1991.

SILVA, P. I.; STRINGHETA, P. C.; TEÓFILO, R. F. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extrats using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 538-544, 2013.

SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da spirulina platensis**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SILVEIRA, S. T., QUINES, L. K. D. M., BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 477–482, 2008.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X., KIEMLE, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**(7 th ed). Wiley, New York, NY, 2005.

ŠLIUMPAITĖ, P.R. VENSKUTONIS, M. MURKOVIC, A. PUKALSKAS. Antioxidant properties and polyphenolics composition of common hedge hyssop (*Gratiola officinalis* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1927–1937, 2013.

SPRAY PROCESS. Disponível em <http://sprayprocess.blogspot.com.br/2006/02/secagem-por-atomizacao.html>>, acesso em 12 de Agosto de 2015.

STEELS EL, LEARMONTH RP, WATSON K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiol**. 140, p. 569-576, 1994.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES E.G.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 321p, 2009.



SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal** v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SUN et al. A novel support vector regression model to estimate the phycocyanin concentration in turbid inland waters from hyperspectral reflectance. **Hydrobiologia**, v.680, p.199–217, 2012.

THANGAM, R., SURESH, V., ASENATH PRINCY, W., RAJKUMAR, M., SENTHILKUMAR, N., GUNASEKARAN, P., RENGASAMY, R., ANBAZHAGAN, C., KAVERI, K., KANNAN, S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. **Food Chemistry**, v. 140, p. 262–272, 2013.

TONON, R. V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M. D. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1950–1958, 2009.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpeoleraceae* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, p. 907-914, 2010.

TOSONI, Solange Fávaro; RODRIGUES, Vanessa Carvalho. **Características físico-químicas e antioxidantes de própolis microencapsulada com diferentes tipos de materiais encapsulantes**. 2013. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

TRINDADE, C. S. F.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

TRINDADE, M.A.; GROSSO, C.R.F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. **Journal of Microencapsulation**, v.17, n.2, p.169–176, 2000.

TURNER DESIGNS. **Phycoerythrin and Phycocyanin Optical Kits for the Detection of Cyanobacteria**. S-0024. 2007. Disponível em: Acesso em: 07 de Agosto de 2015.

VANDEPUTTE, C. et al. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, p. 415-421, 1994.

VARDIN, H.; YASAR, M. Optimisation of pomegranate (*Punica Granatum* L.) juice spray drying as affected by temperature and maltodextrin content. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 167-176, 2012.

VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis; p. 233, 1997.

WALTON, D. E., MUMFORD, C.J. Spray dried products – Characterization of particle morphology. **Chem. Eng. Res. Des.**, n. 77, n.1, p. 21-38, 1999.

WANG, L., QU, Y., FU, X., ZHAO, M., WANG, S., SUN, L. Isolation, purification and properties of an R-Phycocyanin from the phycobilisomes of a marine red macroalga *Polysiphonia urceolata*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

WIRIYAPHAN, C., CHITSOMBOON, B., ROYTRAKUL, S., YONGSAWADIGUL, J. Isolation and identification of antioxidative peptides from hydrolysate of threadfin bream surimi processing byproduct. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1654–1664, 2013.

XIONG, Q.; KADOTA, S.; TANI, T.; NAMBA, T. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.19, p. 446-449, 1996.

YAN, M., LIU, B., JIAO, X., QIN, S. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. **Food and bioproducts processing** v.92, p. 89–97, 2014.

ZHENG, J., INOBUCHI, T., SASAKI, S., MAEDA, Y., MCCARTY, M.F., FUJII, M., IKEDA, N., KOBAYASHI, K., SONODA, N., TAKAYANAGI, R. Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. **American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, p. R110–R120, 2013.



**APENDICE**

## **Microencapsulation of phycocyanin pigment by spray drying**

### **1. Introduction**

The phycocyanin is a phycobiliprotein that has this blue tint in the cyanobacterium *Spirulina platensis* which offers several advantages, including its antioxidant activity, which can help protect the food and the human body against the oxidative stress, which in turn, is associated with increased the incidence of chronic diseases.

This compound can be considered interesting because it has the ability to be used as a food color and in the pharmaceutical industry. However, the stability of the pigment can be affected by several parameters such as the storage temperature, light, pH, oxygen. This feature has urged the search for new processes and low cost to increase the shelf life and improve the stability of the pigment. Consequently, the stability of the bioactive compound may be improved by using the encapsulation technique which entraps a sensitive ingredient within a coating material (Saenz et al., 2009).

Spray drying is the most used encapsulation method for preserving bioactivity of food components, be single, economical, flexible step (Rish, 1995; Adamiec & Modrzejewska, 2005; Písecky, 2005). This results in good powder quality with low water activity, they are easy to handle and store, protecting the bioactive materials (Lamb et al., 2013).

Spray drying is a continuous, simple and rapid process involving liquid atomization in a compartment which receives a flow of hot air, and as there is rapid evaporation of water keeps the temperature of the lower particles (Souza et al., 2015) . Therefore, this method allows for drying heat sensitive products (e.g., food and pharmaceutical products), without affecting the quality (Re, 1999).

Microencapsulation of food ingredients is often accomplished with biopolymers such as maltodextrin (Gharsallaoui et al., 2007). Maltodextrin has been used to encapsulate colorants due to their physical characteristics, such as high solubility, low viscosity, even when used at high solids concentrations, have lower cost and an important substitute for gum arabic in the formation of emulsions and dispersions (Cano -Chauca et al., 2005; Krishnan, & Bhosale Singhal, 2005).

No published work reports the influence of soluble wall materials in the encapsulation and antioxidant activity of phycocyanin.

The objective of this study is to evaluate the potential of the encapsulant (maltodextrin) for the encapsulation of phycocyanin by spray drying. Encapsulation was

characterized by moisture content, density, solubility, morphology, stability and antioxidant activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Maltodextrin provided by Cargill, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) were purchased from SigmaAldrich. All other reagents were of analytical grade.

### 2.2 Preparation of feed mixture

Encapsulation in both maltodextrin 10 DE (MD10) and maltodextrin 20 DE (MD20) was prepared as follows: the carrier agent (MD) was combined with pigment (the ratio of the carrier agent to pigment was 4:1) at maximum temperature of 40 ° C for 30 minutes under magnetic agitation until dissolution. The concentration was selected in a preliminary study. After this suspension formed was stirred at Turrax machine at 10.000 rpm.

### 2.3 *Spray drying*

The *spray drying* process was performed in a laboratory-scale spray dryer (LM MSD 1.0) with a single standard nozzle (0.7 mm). The solutions were fed into the main chamber through using extract feed flow rate 0.4 l / h, 150 ° C as inlet air temperature 125 ° C and outlet air temperature and air flow entry 3.99 m<sup>3</sup> / min.

The feed mixtures were stirred occasionally to ensure feed homogeneity during spray drying. Dried powders were collected from the base of the cyclone separator of the drier.

### 2.4 Characterization of pigment microcapsules

#### 2.4.1. Encapsulation yield

Encapsulation efficiency (EE) was determined according to Bae and Lee (Bae and Lee, 2008) and Carneiro et al. (Carneiro et al., 2013) with some modifications. Briefly, fifteen

milliliters (15 mL) of hexane was added to 0,2g of powder (obtained in the spray-drying process and previously measured on analytical balance) and kept at rest for 5 min in the dark at room temperature. Suspension containing the encapsulated material was filtered using a membrane filter (porosity of 0.45µm, Millipore) and then, the retained material was dried at room temperature. The dried powder was re-dissolved in 20mL of deionized water (able to break the polymer wall and release the oil) under manual agitation during 5 min. Finally, the water was evaporated under vacuum and the resultant mass measured until observe no more changes (constant mass). Thus, EE of phycocyanin in each assay was calculated as:

$$EE = \frac{\text{mass of phycocyanin encapsulated} \times 100}{\text{mass of phycocyanin} + \text{mass of wall material}}$$

where: “mass of phycocyanin encapsulated” is the mass of phycocyanin (constant mass) obtained after evaporation; “mass of phycocyanin + mass of wall material”, is the mass of retained material on filter (containing phycocyanin + maltodextrin) after drying.

#### 2.4.2. Bulk density

Bulk density of the pigment powder was measured by weighing 2 g of sample and placing it in a 10 mL graduated cylinder (Chegini &Ghobadian, 2007; Martinez et al., 2010). This was tapped 10 times onto a rubber mat from a height of 10 cm. The volume was then recorded and the bulk density was calculated in terms of g/mL.

#### 2.4.3 Solubility

The solubility of the samples was determined according to the modified method written by Cano-Chauca et al. (2005). For the determination of 1 g of sample was added to 100 ml of distilled water, obtaining a solution which was centrifuged at 3000 rpm for 5 min., And then placed in 25 ml of the supernatant dried and empty Petri dish with known mass and which was brought to the circulating air oven at 105 ° C for 5h. Solubility was calculated based on the initial mass of the sample, and the result was expressed as a percentage.

#### 2.4.4. Water activity

The water activity was determined using Testo 650 equipment, at 25 ± 1 ° C.

#### 2.4.5 Moisture content

To determine the moisture content, was followed AOAC method 926.12 (2005), 2 g of sample were weighed in a glass capsule, previously weighed, and left for 5 hours at 105 ° C. Then the samples were cooled in a desiccator to room temperature and weighed. This procedure was repeated until the sample reached constant weight. Humidity was calculated based on the following equation:

$$\% \text{ Humidity} = \frac{(\text{weight of the initial sample}) - (\text{weight and the final sample})}{(\text{weight of the initial sample})}$$

#### 2.4.6 Particle morphology

Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained for the pigment powders encapsulated in MD10 e MD20 to examine the particle's morphology. The samples were placed on stubs and coated with gold layer, sputter (Quorum Q150R ES), and then micrografadas in electron microscope scanning (Tescan - Vega 3 LM) current of 50 mA,  $9.10^{-2}$  Pa, 10 kV, and electron beam current of 15 pA in the magnitude of 6000X.

#### 2.4.7 Particle size distribution (PSD)

The PSD was evaluated on a Master-Sizer 2000 with laser diffraction (Malvern Instrument Ltd., UK). Powdered was dispersed using deionized water as dispersing agent (SDLaInf, Refractive index = 1.582; dispersant agent = 1.330).

#### 2.4.8 Fourier transform infrared spectroscopy

The spectra for non-encapsulated pigment (FTP) and encapsulated pigment powders (microcapsules M10 e M20) were obtained with a PerkinElmer FTIR spectrometer Bx ATR (USA) using a transformation of 16 scans. The spectra were observed in the mid infrared region between 4000 and 600  $\text{cm}^{-1}$ .



#### 2.4.9 Colorimetry

The color of the samples was measured using calibrated colorimeter Color Quest II HunterLab (US) to white. To calculate the color coordinates, D65 illuminant was set, the angle of 10 degrees to the observer and the colorimetric reading scale employed was the chromaticity coordinate system based on the CIELAB L color space  $a^*$   $b^*$ , where  $L^*$  measures the light having a white variation (100) to black (0),  $a^*$  is a tone indication toward the green to be negative ( $-a^*$ ) and in the direction of red assume positive ( $+a^*$ ) and  $b^*$  is a tone indication toward the blue assume negative values ( $-b^*$ ) and in the direction of yellow assume positive ( $+b^*$ ) (Sant'Anna et al., 2013).

#### 2.4.10 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The analysis of DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japan) were performed for samples of phycocyanin, encapsulating agents and the microcapsules to evaluate possible interactions encapsulants/active agents.

The samples were divided into micro sealed aluminum crucibles with sample mass 2 mg, compared to the micro empty crucible identical to the sample used for reference. The samples were analyzed under nitrogen atmosphere  $100 \text{ ml min}^{-1}$ , using a heating rate of  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  over the temperature range  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  to  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 2.4.11 Optical microscopy coupled with hotplate (Hot-stage)

Heating microscopy tests were performed on Olympus BX41 microscope equipped with a Mettler-Toledo FP-82. Samples of pure phycocyanin and microcapsules were heated at rate of  $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$  to a total fusion, reaching the minimum temperature of  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  and a maximum of  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ . The whole process was photographed (PVR plus software).

#### 2.5 DPPH radical scavenging activity

The antioxidant capacity as the radical scavenging activity of samples was measured using the method of Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995), adapted por Mensor et al. (2001) e Xiong et al. (1996) with slight modifications.  $0,1 \text{ mL}$  of the samples (encapsulated pigment powders and non-encapsulated pigment) were mixed with  $2,9 \text{ mL}$  of ethanolic  $40 \%$

solution containing 0,1 mM DPPH. The mixture was shaken well and incubated in the dark. The absorbance was measured at 515 nm. The absorbance of the control was obtained by replacing the sample with ethanol. The DPPH radical scavenging activity was calculated according to the following equation:

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

## 2.6 ABTS radical scavenging activity

The ABTS radical scavenging activity assay was performed according to the previously described method (Campos & Lissi, 1997) adapted by Re et al. (1999).

The antioxidant activity of the samples was expressed as mg Ascorbic acid equivalents (mmol/L AAeq/ 100 g sample) through the calibration curve of Trolox with calibration equation of  $y = 0,078 x + 01,1264$  ( $R^2 = 0.9978$ ) and percentage of inhibition (%), which was calculated based on the expression:

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

## 2.7 Statistical analysis

All experiments were done in triplicate and the results were expressed as mean values. The analysis of variance ( $p < 0.05$ ) and Turkey's range test ( $p < 0.05$ ) were used to assess significant differences between the samples. The statistical analysis was carried out using SPSS statistical package (version 10.1).

## 3. Results and discussion

### 3.1 Characterization of pigment microcapsules

#### 3.1.1. Encapsulation yield

The encapsulation efficiency values varied from 80 % to 90,14 %, being the lowest value obtained for microcapsules M10. According to Barbosa et al. (2005), the more stable the

solution, the higher the encapsulation efficiency is, the lower the amount of nonencapsulated material on particles surface. Studies have shown that the reduction of solutions droplet size, which generally represents an increased stability, results in greater retention of active material (Liu et al., 2001; Soottitantawat et al., 2005; Jafari et al., 2008). The results obtained for the encapsulation efficiency in this study show different from the microcapsules so they may probably be attributed to differences in the hydrolysis of the wall material used, which show with different properties retention and film forming capabilities.

### 3.1.2. Bulk density

The bulk density values ranging from 0,285 to 0,670 g/ml as Table 1. Maltodextrin is a polysaccharide obtained by hydrolysis of starch, the more the starch hydrolyzate, the lower occupied volume and higher density, since the disrupted bonds results in smaller and light chains (Oliveira et al, 2013). We observed that the higher bulk density was obtained on the sample produced by the maltodextrin DE 20 (0.66 g / ml).

Also, the polymeric interactions between different degrees of hydrolysis of the maltodextrin with the phycocyanin resulted in different densities.

The microcapsules of phycocyanin with maltodextrin 10DE occupied bulk resulting in lower density.

The knowledge of the density is very important in industrial processes, adjustment of the storage conditions, processing, packaging and distribution. The products obtained by milling or drying are generally characterized by its apparent density, which considers the solid material volume and all enclosed or open pores into the atmosphere (Barbosa-Cánovas & Juliano, 2005).

### 3.1.3. Solubility

The phycocyanin microcapsules produced maltodextrin spray dryer at 150 ° C showed high solubility as Table 1, that because polysaccharides contain glycosyl units having an average of three hydroxyl groups, and each group has the possibility to form hydrogen bonds with a or more water molecules.

Since each sugar unit in the chain has the ability to retain water molecules, polysaccharides have a strong affinity with the water-moisturizing easily when it is available (Damodaran & Fennema, 2010).

According to Rosa et al. (2003), the solubility of the atomized product depends, among other factors, the drying air temperature. The higher the temperature, the greater the particle size, which promotes larger solubility of the powder.

Cano-Chauca et al. (2005) also observed solubility higher than 90% in the atomized mango juice with maltodextrin and gum arabic, and Moreira (2007) who studied the drying of microencapsulated extract agroindustrial waste acerola maltodextrin and cashew gum and concluded that all powders showed good solubility ranging between 90.97 and 96.92%

Properties such as moisture and water activity are essential for the stability and powders of storage, while the solubility is directly related to reconstitution, so, the high solubility of the microcapsules reveals its potential as an ingredient in food products such as beverages and preparations snapshots (Bicudo, 2014; Tosoni & Rodrigues, 2013).

#### 3.1.4. Water activity

The microcapsules produced with maltodextrin had water activity value ( $A_w$ ) below 0.45 as Table 1, and this low water activity indicates a low water availability for chemical reactions and microbial growth, which is favorable for stability dehydrated products (Quek, Chok & Swedlund, 2007).

It is noteworthy that the microcapsules M10 had the highest water activity, which can increase the molecular mobility and facilitate the physical and chemical reactions of degradation, when compared to microcapsules M20. Found values for both the microcapsules M10 and M20 are within the recommended range, lower than 0,3, to ensure best after stability (Tonon et al., 2009).

It was observed that the increase of maltodextrin hydrolysis produced a decrease in the water activity of the microcapsules. These results were consistent with those reported by other researchers (Caliskan & Durin, 2013; Vardin & Yasar, 2012; Tonon et al., 2009).

When water activity is elevated shows higher free water values for the occurrence of biochemical reactions and thus lower shelf life, therefore, this water content in the food is commonly removed in order to reduce storage costs and reduce water activity to ensure the microbiological stability of the product (Nunes, 2014).

### 3.1.5. Moisture content

The moisture values ranged from 1.78 to 8.50%, the results of the treatments studied as Table 1.

Maltodextrin is a stable, low hygroscopicity, being used to maintain low moisture levels in products in powder form (Santos, 2013).

According to Gardiner et al. (2000) and Meng et al. (2008), a residual humidity of 5% or less for long term storage is required post (Santos, 2013). Thus, the microcapsules maltodextrin 10th and 20th showed less than 5% moisture, which determines that these microcapsules may be stored for a prolonged time.

According to Tonon (2009) and Nijdam & Langrish (2006), higher drying temperatures lead to reduction of moisture in the product. The use of higher temperatures results in higher temperature difference between the sprayed product and the drying air, causing greater heat transfer and hence a higher product water evaporation, resulting in lower humidities. Furthermore, the outer surface becomes dry and hard, so that the particles do not fade when steam condenses forming within the microcapsule.

### 3.1.6. Particle morphology

The morphology of microcapsules are illustrated in Figure 1. The produced microcapsules were spherical, solid walls, tendency to form aggregates of smaller microcapsules around the larger diameter, as well as the presence of some microcapsules with slightly curled outer surface. The evidence that the atomized droplets of varying sizes produced occurred due to the high degree of agglomeration of the particles, resulting in collision and agglomeration of the particles. The presence of the concavity, or the surface shrinkage is a characteristic of the microcapsules produced by atomization with maltodextrin as wall material (Bertolini, Siani & Thick, 2001). This shrinkage of the surface occurs when the drying temperature is relatively low, causing the surface layer remains moist and flexible for longer and thus the microcapsules wither when cooled (Archeri, 1999; Trindade & Grosso 2000). The formation of microcapsule agglomerates, may promote greater core material retention in the interstices being in a common property powders produced by atomization maltodextrin (Bhandari, 1992; Trindade & Grosso, 2000). It is also observed a slight degree of agglomeration of smaller particles which tend to adhere to the particles of greater diameter. According to Peleg et al., (1973) the affinity of smaller molecules from the surface of the

larger, due, probably, to the powerexisting type of liquid bridges formed by dissolution of the outer layers of the particles. There is no evidence the occurrence of cluster particles or cracks on the outer surface, the microcapsules produced, factor considered beneficial because according to Pereira (2000), the breakdown of particles can result in significant loss of volatile components. Keogh, Murray & O'Kennedy (2003), report that the average size of the atomized droplet is related to the viscosity of the liquid, and the lower the viscosity of the feed solution, the smaller the droplets formed during atomization and therefore , smaller particles of dust obtained from the process.

### 3.1.7. Particle size distribution (PSD)

In Figure 2 the particle size distribution (PSD) of the samples are shown. According to particle size analysis, the samples dried were homogeneous and smaller in size, around 10  $\mu\text{m}$  with a quasi-modal distribution (Fig.). This result is interesting because smaller particles in solution are able to form uniform arrangements and the spaces between particles are minimal, solutions containing this particles are homogeneous and initially stable to mechanical flow.

The determination of particle size is considered important for some types of materials, particularly if they are thermosensitive, that because smaller particles have a higher mass transfer coefficient and heat and a smaller internal diffusional path compared to large particles. Consequently, these particles initially have a lower moisture content and dry faster and are therefore more likely to suffer thermal degradation (Walton & Mumford, 1999).

Moreover, the size and size distribution of the particles influence in a powder flow properties, and the factors may influence the flowability of a powder such as particle size, distribution of particle size, particle morphology, content humidity, degree of agglomeration of the particles (Walton & Mumford, 1999).

The degree of agglomeration of the particles, the small particles cling more strongly to each other than large particles, so fine powders have a greater tendency to agglomerate. The flowability of a powder increases with increasing particle size. Similar behavior is observed for properties such as dispersibility and wettability of powders (Schulbert, 1997).

Thus, it is suggested that the microcapsules produced, due to their size, they have good flow properties for use in food industry.

In addition, average diameters below or near 10  $\mu\text{m}$  characterized by being a potential application for administration orally, since their reduced diameter. The smaller the size of the

particle is more facilitated the active absorption in the gastrointestinal tract to the systemic circulation. small particles have a higher rate of dissolution due to the increased surface area (Pereira et al., 2006).

### 3.1.8. Fourier transform infrared spectroscopy

The analysis of a compound by FTIR spectrometry reveals the type of molecules that constitute the compound of interest, the infrared spectra of phycocyanin, maltodextrin and microcapsules are show in Figure 3. O espectro da ficocianina nos permite verificar bandas características da estrutura da ficocianina,  $3286,94\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a deformação axial da ligação N-H das aminas primárias e O-H,  $2876,87\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a deformação axial simétrica e assimétrica de C-H,  $1651,90\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento vibracional forte de C=O,  $1539,12\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular do grupamento N-H,  $1400\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular de C-H,  $1278,89\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento de C-N,  $1101,20\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação axial de C-O-H, e bandas nas regiões de  $991,17$  a  $841,74\text{ cm}^{-1}$  compreendem as regiões de deformação de C-H fora do plano (Silverstein, Webster & Kiemle, 2005). Os espectros das maltodextrinas 10 e 20 DE apresentaram semelhanças entre si ( $1148$ ,  $1077$  e  $1016\text{ cm}^{-1}$ ), sendo que  $1148$  e  $1077\text{ cm}^{-1}$  apresentam bandas que são atribuídas as ligações C-O, já o pico de  $1016\text{ cm}^{-1}$  presente é devido a deformação angular das ligações =CH e =CH<sub>2</sub>, todas essas ligações vindas de grupos presentes nos carboidratos. A banda em  $3300\text{ cm}^{-1}$  é atribuída aos grupos hidroxilas a partir de álcoois e fenóis. Segundo Paiva et al. (2010) essas intensas e largas bandas centradas entre  $3400$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  envolvem as ligações de hidrogênio. A banda em  $2924\text{ cm}^{-1}$  sugere a presença de compostos alifáticos. As bandas de absorção em  $1650\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento da ligação C=C de intensidade usualmente de fraca a média, típica de sistemas aromáticos. Já as bandas em  $842\text{ cm}^{-1}$  presente nos referem-se à presença de anel aromático (Paiva et al., 2010). Os espectros das maltodextrinas foram semelhantes, mas diferentes da ficocianina, sugerindo que ocorreu uma boa incorporação do encapsulado no material encapsulante. Observamos também que nenhuma nova banda de absorção apareceu entre os espectros das microcápsulas e agentes encapsulantes, que mostra que a formação das microcápsulas foi promovida por interação física (Yan et al., 2007 e Qv et al., 2011).

### 3.1.9. Colorimetry

The analysis results of color parameters of the controls and of the microcapsules produced by spray drying using maltodextrin are shown in Table 2.

The coordinates ( $L^*$ ) represents brightness therefore measures the amount of light that is reflected from a color where 0 indicates black color, turn 100 indicates white color.

We can observe that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) for the lightness ( $L^*$ ) of the encapsulant maltodextrin DE 10 and DE 20. Maltodextrin has native starches able to reflect light which gives white color.

Regarding the microcapsules phycocyanin with maltodextrin, a significant difference ( $p < 0.05$ ) for the lightness ( $L^*$ ).

The parameter  $a^*$  positive indicates staining in the red direction, while  $a^*$  negative goes toward the green. Thus, the parameter  $a^*$  presented in the microcapsules phycocyanin a tendency to green hue than for the red. The increase in the concentration of maltodextrin in the microcapsules resulted in a decrease of the parameter  $a^*$ , i.e., a reduction in red tint, also related to the dilution of color caused by the addition of this agent carrier.

In the case of parameter  $b^*$  when positive indicates the color towards the yellow, while negative will toward the blue. Thus, the lower value was observed in the microcapsule phycocyanin, which shows an intensification of the blue hue of the microencapsulated powder with this wall material. In turn, higher value  $b^*$  for the encapsulant maltodextrin, determining the expression of yellow color.

### 3.1.10 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The thermograms obtained by differential scanning calorimetry are shown in Figure 4.

When analysis was performed maltodextrin alone, he had no sharp peak, which characterizes the substance to be amorphous, that is, does not have a specific melting peak.

The phycocyanin showed an endothermic peak at 53.63 °C, this event indicates that denaturation of phycocyanin at this temperature, a result also reported by Cavalcanti et al (2010).

Thus, the peak occurred at 53.63 °C phycocyanin, as for microcapsules M10 and M20 occurred at 56.01 °C and 55.75 °C, this shift to higher temperature demonstrates that the maltodextrin used as the encapsulating polymer acted protecting phycocyanin temperature.



### 3.1.11 Optical microscopy coupled with hotplate (Hot-stage)

It can be seen in the Figure 5 that had a thermal event at 50 °C with phycocyanin, probably associated with the melt, since the temperature at which the thermal event occurred in the microcapsules was 58 °C.

Fact is, therefore, phycocyanin is trapped in the polymer matrix, making the asset becomes less exposed to degrading agent.

Furthermore, there is a higher proportion of amorphous than crystalline structure, which corroborates the results of solubility, since the amorphous state has greater solubility as compared to its crystalline form and intermolecular interactions like hydrogen bonding between active polymer (Eloy, 2012).

The improvement of the dissolution profile can be explained by particle size reduction, improving the wettability of the active hydrophilic polymer (Eloy, 2012).

According to Gomes-Pinho (1999), in addition to improved dissolution profile, active in amorphous form show plasma concentrations 3 to 4 times larger compared to the crystalline form, thus demonstrated that has greater functional bioactive bioavailability than the crystalline form.

### 3.2 DPPH radical scavenging activity

The percentage inhibition of antioxidant activity of all samples ranged from 2.72% to 43.22% inhibition (Figure 6). The encapsulated pigment Showed Significantly higher activity Compared to the non-encapsulated pigment.

As shown in the Figure, the antioxidant activity of phycocyanin showed its peak inhibition in 30 minutes, demonstrating that the active was readily available to occur reducing the initial concentration of DPPH, since the microcapsules had its peak inhibition at 150 minutes.

The microcapsules, as are produced against the asset with the encapsulating agent by it wrapped, have controlled release of the active, it will releasing its encapsulating agent gradually and thus, the active antioxidant potential, gets exposed to over time with DPPH (Menezes et al., 2012). Through this controlled release, the asset is protected from external factors such as temperature, humidity and light, leaving occur degradation of the bioactive compound.

The authors Gouin (2004) and Desai & Park (2005) state that, by controlled release properties finely adjusted, microencapsulation is no longer only a method of adding substances to a food formulation, and becomes a source of fully ingredients with new unique properties.

### 3.3 ABTSradical scavenging activity

In the Figure 7, the values can be seen antioxidant capacity determined by the ABTS sequestering method according equivalence of vitamin C (VCEAC).

As can be seen in Table 3, the encapsulated pigment showed significantly higher activity compared to the non-encapsulated pigment as in DPPH. These data show that no degradation of phycocyanin when exposed to temperature in a spray dryer, indicating that the active maltodextrin protected from degradation.

## 4. Conclusion

The microcapsules of phycocyanin were successfully prepared using the spray drying method and it is possible to produce water-soluble pigment powders.

The microcapsules showed good encapsulation yield. The FTIR spectrum of microcapsules is similar to the spectrum of maltodextrin and phycocyanin and did not show any shifts, indicating there is no structural change between the phycocyanin and microcapsules.

Antioxidant activity is higher for microcapsules in comparison to non-encapsulated pigment. According to the results, maltodextrin could be suggested as a good carrier agent for phycocyanin, which results in good antioxidant activity and better encapsulation efficiency, and the data obtained could be useful to scale up the process. This study would be helpful to promote the application of phycocyanin, which shows a remarkable potential for the food and pharma industries.

Table 1 – Characterization of pigment, carrier agent maltodextrin and microcapsules.

Samples	Bulk density (g/ml)	Solubility (%)	Water activity	Moisture content (%)
Phycocyanin	0,335±0,007 <sup>b</sup>	92,70±0,197 <sup>d</sup>	0,260 ± 0,001 <sup>c</sup>	1,78 ±0,021 <sup>a</sup>
Maltodextrin 10 DE	0,505±0,007 <sup>c</sup>	91,71±0,098 <sup>b,c</sup>	0,504 ± 0,001 <sup>e</sup>	8,50±0,028 <sup>e</sup>
Maltodextrin 20 DE	0,670±0,014 <sup>d</sup>	87,15±0,091 <sup>a</sup>	0,448 ± 0,003 <sup>d</sup>	7,59±0,028 <sup>d</sup>
Microcapsules M10	0,285 ±0,007 <sup>a</sup>	92,06±0,077 <sup>c</sup>	0,243 ± 0,002 <sup>b</sup>	4,83±0,007 <sup>c</sup>
Microcapsules M20	0,330 ±0,000 <sup>b</sup>	91,37±0,028 <sup>b</sup>	0,175 ± 0,002 <sup>a</sup>	3,11±0,007 <sup>b</sup>

Results in the same column followed by the same letter there is no significant difference at 5% Tukey test.

Table 2 – Parameters of color samples.

Samples	L*	a*	b*
Phycocyanin	41,63 ± 0,00 <sup>a</sup>	-8,6 ± 0,02 <sup>b</sup>	-13,83 ± 0,02 <sup>c</sup>
Maltodextrin 10 DE	91,31± 0,01 <sup>e</sup>	-0,32±0,01 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,02 <sup>b</sup>
Maltodextrin 20 DE	91,03± 0,02 <sup>d</sup>	-0,43±0,00 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,01 <sup>a</sup>
Microcapsules M10	56,97± 0,03 <sup>b</sup>	-10,9± 0,09 <sup>d</sup>	-16,17 ± 0,01 <sup>e</sup>
Microcapsules M20	61,37± 0,02 <sup>c</sup>	-9,89 ± 0,22 <sup>c</sup>	-14,37 ± 0,02 <sup>d</sup>

Results in the same column followed by the same letter there is no significant difference at 5% Tukey test.

Table 3 – Antioxidant activities of encapsulated and non-encapsulated pigments the method ABTS.

Samples	ABTS-VCEAC ( $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Phycocyanin	2178,17±11 <sup>a</sup>
Microcapsules M10	2396,12±6 <sup>b</sup>
Microcapsules M20	2435,38±10 <sup>c</sup>

Results in the same column followed by the same letter there is no significant difference at 5% Tukey test.

Figure 1 –Micrograph of scanning electron microscope of (a) microcapsules M10 and (b) microcapsules M20 obtained by spray drying at 150 °C, in approximation 6.000x.

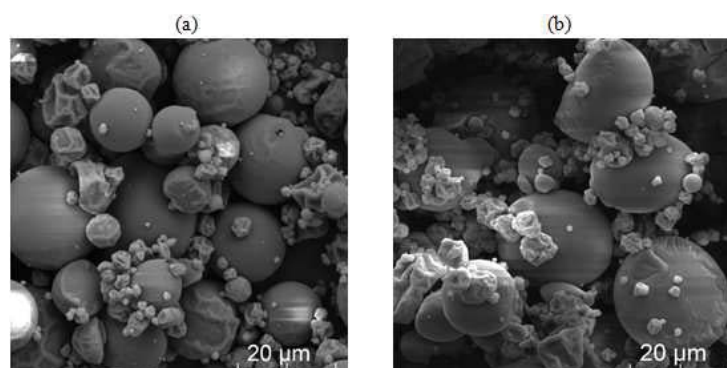


Figure 2 – Particle size of the microcapsules.

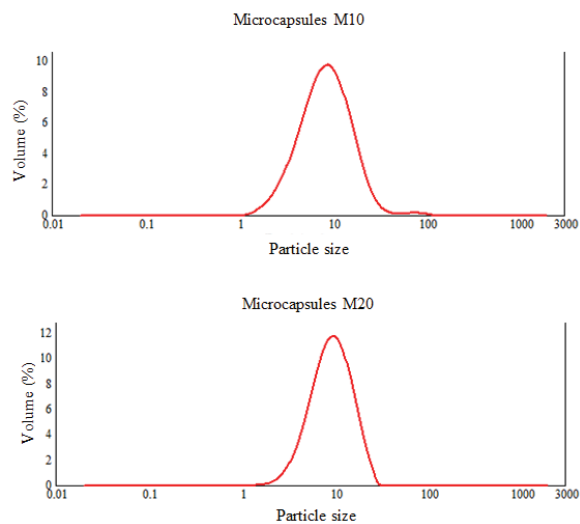


Figure 3 – Analysis of samples by fourier transform infrared spectroscopy.

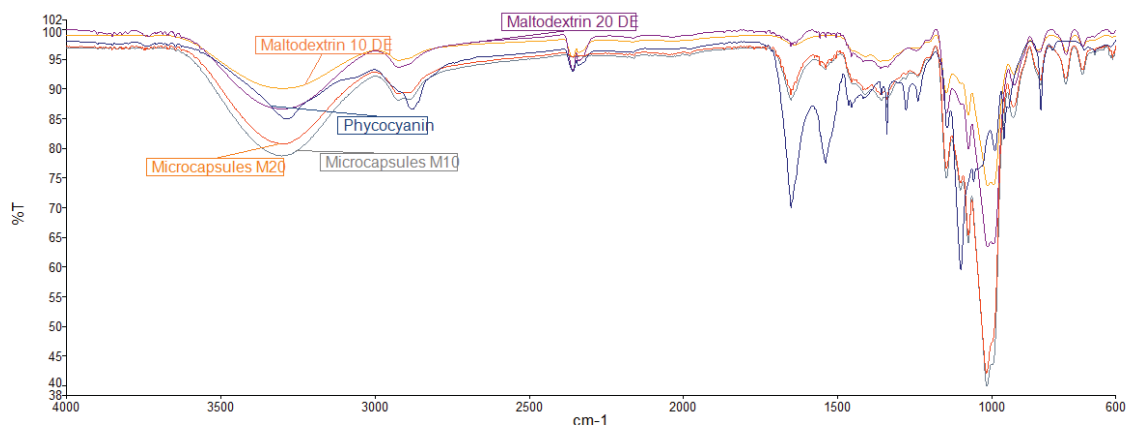


Figure 4 – Analysis of samples by Differential Scanning Calorimetry (DSC).

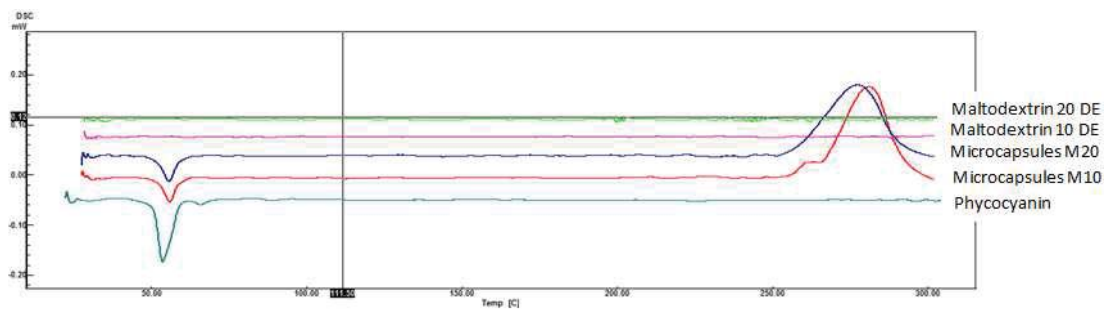


Figure 5 – Analysis of samples by Hot-stage.

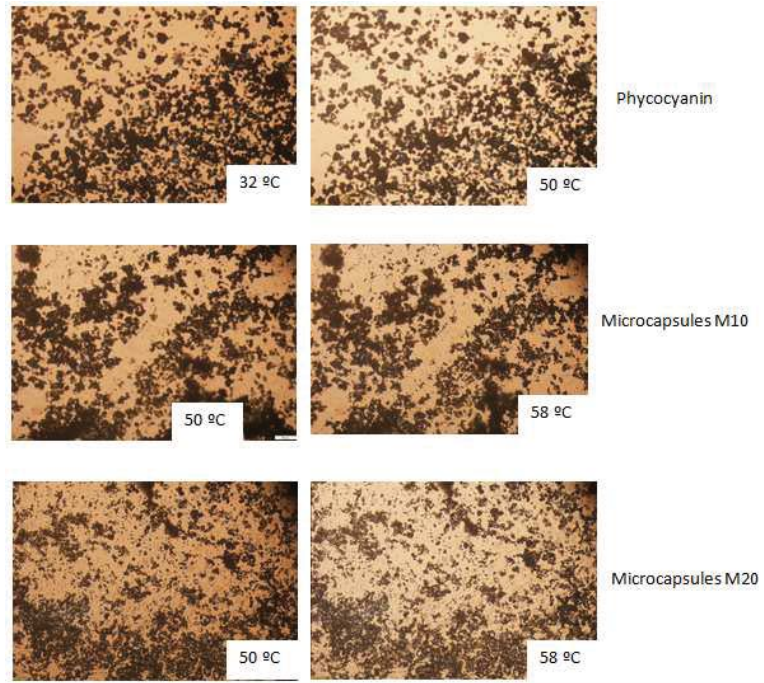


Figure 6 – Analysis of DPPH radical scavenging activity.

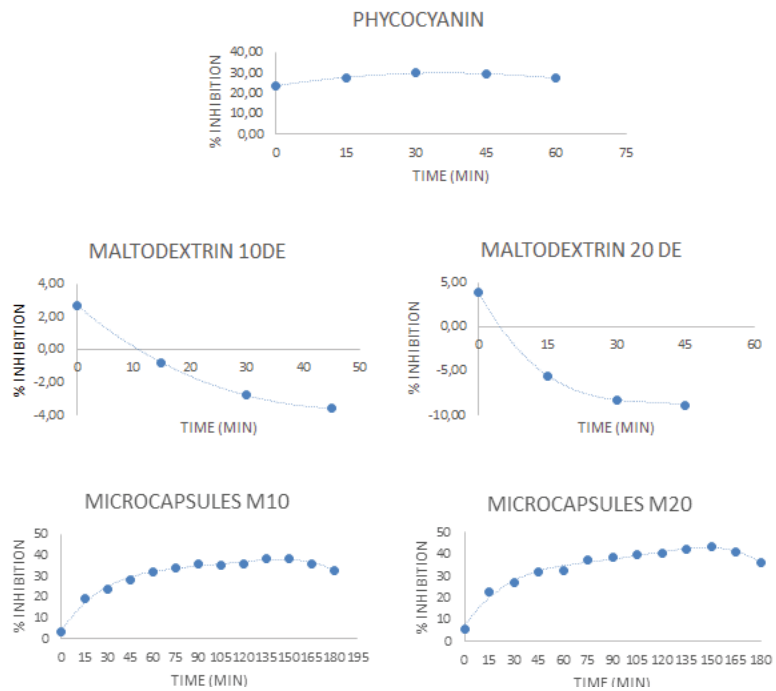
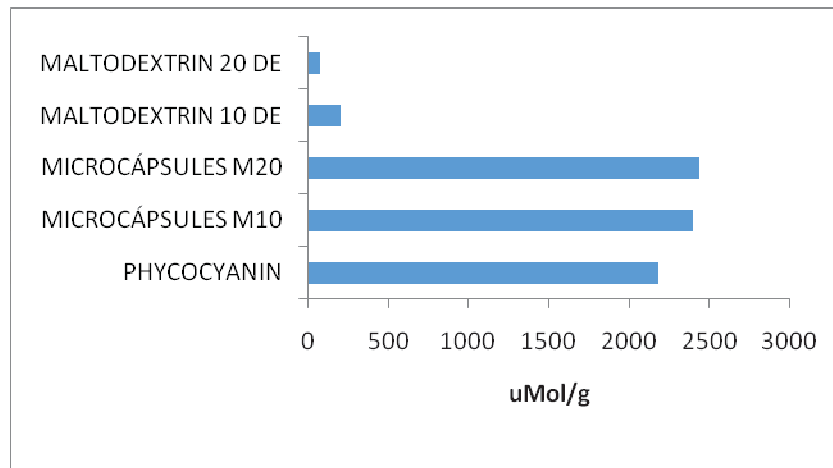


Figure 7 – Analysis of ABTS radical scavenging activity.



## References

1. Adamiec J, Modrzejewska Z. (2005). Some structural properties of spray-dried chitosan microgranules. *Dry. Technol.* 23, 8, 1601-1611.
2. Archeri, D.P.R. (1999). Estudo das características de adsorção de água e da estabilidade das microcápsulas de óleo essencial de laranja na seleção de material de parede. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19, 3, 367–373.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL INTERNATIONAL AOAC. (2005) AOAC method 926.12. 16. Gaithersburg. 1-5.
4. Barbosa, M.I.M.J., Borsarelli, C.D., Mercadante, A.Z. (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, 38 (8–9), 989–994
5. Barbosa-Cánovas GV, Ortega-Rivas E, Juliano P, Yan H. (2005) Bulk properties. In: Food power: physical properties, processing, and functionality. New York: *Kluwer Academic*; 81-8.
6. Bertolini, A. C.; Siani, A. C.; Grosso, C. R. F. (2001) Stability of monoterpenes of encapsulated in gum arabic by spraydrying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2, 780-785.
7. Bhandari, B. H. (1992) Flavor encapsulation by spray drying: application to citral and linalyl acetate. *Journal of Food Science*, 57, 1, 217–221.
8. Bicudo, M. O. P. *Composição fenólica, atividade antioxidante e microencapsulação de frutos de juçara (Euterpe edulis): aspectos de interesse para a indústria de alimentos.* (2014). Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
9. Brand Williams, W.; Cuvelier, A. E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. U.- Technol.*, 28, 25-30.
10. Caliskan, G.; Dirim, S. N. (2013) The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and Bioproducts Processing*, 91, 539-548.
11. Campos, A.M; Lissi, E.A. (1997). Kinetics of the reaction between ABTS derived radical cations and phenols. *Int J Chem Kinetics*, 29, 219-224.
12. Cano-Chauca, M.; Stringheta, P. C.; Ramos, A. M.; Cal-Vidal, J. (2005) Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Oxford, 5, 4, 420-428.
13. Carneiro H.C.F, Tonon RV, Grosso CRF, Hubinger MD.(2013) Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering* 115, 443–451.



14. Chegini, G.R., Ghobadian, B. (2007). Spray dryer parameters for fruit juice drying. *World J. Agric. Sci.*, 3, 230-236.
15. Damodaran, S.; Parkin, K.L.; Fennema, O.R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 900p.
16. Desai, K. G. H.; Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, London, 23, 7, 1361-1394.
17. Eloy, J.A. (2012). *Dispersões sólidas de ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas*. Dissertação (mestrado). Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.
18. Gardiner, G.E. et al. (2000). Comparative survival rates of humanderived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L-salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2605-2612.
19. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res. Int.* 40, 1107-1121.
20. Gomes-Pinho, J. J. R. (1999). *Desenvolvimento de comprimidos de cloridrato de metformina de liberação convencional e modificada: influência dos excipientes sobre o perfil de dissolução e avaliação termoanalítica*. 215f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo.
21. Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, London, 15, 7-8, 330-347.
22. Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B.(2008), Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26, 7, 816–835.
23. Keogh, M. K.; Murray, C. A.; O'kenedy, B. T. (2003). Effects of ultrafiltration of whole milk on some properties of spray-dried milk powders. *International Dairy Journal*, 13, 12, 995-1002.
24. Krishnan, S; Bhosale, R; Singhal, RS. (2005) Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61, 1, 95-102.
25. Liu, X.D., Atarashi, T., Furuta, T., Yoshii, H., Aishima, S., Ohkawara, M., Linko, P. (2001). Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray drying. *Drying Technology*, 19, 7, 1361–1374.
26. Martinez, F.M.L., Lagunas, L.L.M., Ramirez, J.R.(2010). Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): effects on powder properties and characterization. *Carbohydr. Poly.* 81, 864-870.



27. Meng, X.C. et al. (2008). Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106, 1406-1416.
28. Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH Free Radical Method. *Phytotherapy Research*, 15, 127-130.
29. Moreira, G. E. G. *Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola*. (2007). 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Natal, 2007.
30. Nijdam, J. J., Langrish, T. A. J. (2006). The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering*, 77, 4, 919– 925.
31. NUNES, G.L. (2014). *Microencapsulação por spray drying do extrato crioconcentrado de erva mate (Ilex paraguariensis) empregando maltodextrina como agente encapsulante*. Florianópolis, SC, 92 p.
32. Oliveira, M. I. S. et al. (2013). Estabilidade da polpa de morango atomizada utilizando diferentes agentes carreadores. *Braz. J. Food Technol*, Campinas, 16, 4, 310-318.
33. Paiva, D. L., Gary M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. (2010). *Introdução a Espectroscopia*. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning.
34. Peleg, M.; Mannheim, C.H.; Pass, N. (1973). Flow properties of some food powders. *Journal of Food Science*, 38, 6, 959–964.
35. Pereira, A. (2000). *Avaliação microestrutural de pós de suco de maracujá obtidos por spray drying*. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
36. Pereira, M.R., Cruz, L., Ré, M.I., Guterres, S.S. (2006). Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. *Acta Farm. Bonaerense*, 25, 2, 198-205.
37. Pisecky, J., (2005). Spray drying in the cheese industry. *International Dairy Journal*, 15, 531– 536.
38. Quek, S. Y.; Chok, N. K.; Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 5, 386-392.
39. Qv, X.Y., Zeng, Z.P., Jiang, J.G. (2011). Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocoll*. 25, 1596-1603.
40. Re, M.I. (1999). Microencapsulation by spray drying. *Dry. Technol*. 16, 1195-1236.
41. Rish, S. J. (1995). *Encapsulation: overview of uses and techniques*, In: Rish, S. J., Reineccius, G. A, Encapsulation and controlled release of food ingredients, Washington, DC: p. 8 – 25.

42. Rosa E. D., Tsukada M., Freitas L. A. P. (2003). *Secagem por atomização na indústria alimentícia: Fundamentos e aplicações*.
43. Saenz, C., Tapia, S., Chavez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.* 14, 616- 622.
44. Sant'anna, V.; Gurak, P.D.; Marczak, D.F.; Tessaro, I.C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. *Dyes and Pigments*, 98, 601-608.
45. Santos, M.S. (2013). Chemical characterization and evaluation of the antioxidant potential of guavira jam. *Acta Scientiarum: Agronomy*, Maringá, 35, 1, 73-82.
46. Schulbert, H. (1997). Food particle technology. *Journal of Food Engineering*, 6, 1, 1-32.
47. Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*(7 th ed). Wiley, New York, NY.
48. Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshi, H., Furuta, T., Ohkawara, M., Linko, P. (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 107–114.
49. Souza, V.B.D., Thomazini, M., Balieiro, J.C.C., Trindade, C.S.F. (2015). Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food Bioprod. Proc.* 93, 39-50.
50. Tonon, R. V.; Brabet, C.; Pallet, D.; Brat, P.; Hubinger, M. D. (2009) .Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1950–1958.
51. Tosoni, S. F., Rodrigues, V. C. *Características físico-químicas e antioxidantes de própolis microencapsulada com diferentes tipos de materiais encapsulantes*. (2013). 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão.
52. Trindade, M.A.; Grosso, C.R.F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. *Journal of Microencapsulation*, 17, 2, 169–176, 2000.
53. Trindade, C. S. F.; Pinho, S. C.; Rocha, G. A. (2008) Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11, 2, 103-112.
54. Vardin, H.; Yasar, M. (2012). Optimisation of pomegranate (*Punica Granatum* L.) juice spray drying as affected by temperature and maltodextrin content. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 167-176.
55. Walton, D. E., Mumford. C.J. (1999) Spary dried products – Characterization of particle morphology. *Chem. Eng. Res. Des.*, 77, 1, 21-38.

56. Yan, M., Liu, B., Jiao, X., Qin, S. (2014) .Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. **Food and bioproducts processing**, 92, 89–97.
57. Xiong, Q.; Kadota, S.; Tani, T.; Namba, T. (1996). Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 446-449.