

# ENCAPSULAMENTO E ESTABILIZAÇÃO DE COLORANTES MICROBIANOS UTILIZANDO MATRIZES DE MALTODEXTRINA E QUITOSANA

NVP VERÍSSIMO<sup>1,\*</sup>, KLP GALVÁN<sup>2</sup>, JBA da SILVA<sup>3,4</sup>, CO de SOUZA<sup>2</sup>, ATC BIASOTO<sup>2</sup>, VC SANTOS-EBINUMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/RENORBIO, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

<sup>3</sup> Colegiado de Engenharia Mecânica, Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia

E-mail para contato: \*nathalia.v.santos@unesp.br

*RESUMO – Os consumidores estão cada vez mais atentos à composição de seus produtos devido a preocupações com a saúde e o meio ambiente. Por isso, as indústrias estão substituindo aditivos sintéticos, como colorantes, por alternativas naturais. No entanto, colorantes naturais são mais caros e menos estáveis do que seus equivalentes sintéticos, criando problemas para suas aplicações industriais. Para encontrar formulações que aumentem a estabilidade de colorantes naturais, este trabalho avaliou os efeitos nas propriedades colorimétricas e fluorométrica de colorantes microbianos encapsulados em matrizes de quitosana e maltodextrina. Para tanto, os colorantes encapsulados foram expostos a diferentes temperaturas (25 e 65 °C), acidez (pH 2) e alcalinidade (pH 13). O extrato de *Talaromyces amestolkiae* utilizado neste estudo apresenta três cromóforos (dois amarelo-alaranjado e um vermelho). O encapsulamento com quitosana e maltodextrina diminuiu o comprimento de onda máximo do pico vermelho, mas aumentou a intensidade dos cromóforos amarelo-alaranjados. Embora os colorantes encapsulados e livres tenham mantido suas propriedades após cinco dias a 25 °C, os livres perderam a maior parte de sua absorbância para os cromóforos amarelo-alaranjado e vermelho pelo mesmo período a 65 °C. No entanto, os colorantes encapsulados perderam apenas 25% de sua absorbância no pico vermelho após cinco dias e até 35 % após 25 dias a 65 °C. O encapsulamento também preservou parcialmente a absorbância dos colorantes vermelhos em pH ácido. Por outro lado, apenas a matriz de maltodextrina melhorou sua resistência ao pH alcalino. Portanto, o encapsulamento com maltodextrina e quitosana pode preservar as propriedades colorimétricas de colorantes naturais microbianos e potencialmente ser uma alternativa para auxiliar no desenvolvimento de embalagens de alimentos funcionais e sustentáveis. Financiamento: FAPESP (2021/06686-8), PROPG-PROPe Unesp (chamada 05/2022).*

## 1 INTRODUÇÃO

A cor é um dos atributos sensoriais mais dominante para consumidores, sendo responsável por 60 a 90 % das percepções positivas ou negativas sobre produtos (Teixeira et al., 2022). Por isso, as indústrias de alimentos, cosméticos e materiais utilizam colorantes para melhorar o apelo de seus artigos e garantir uniformidade entre lotes, sendo os sintéticos os mais empregados (Amberg e Fogarassy, 2019). Contudo, os consumidores estão cada vez mais preocupados com sua saúde e com a composição de seus alimentos, medicamentos e artigos de higiene pessoal, iniciando movimentos de rejeição ao uso de colorantes sintéticos. Assim, para manter o padrão e visibilidade de suas mercadorias, setores industriais tem introduzido colorantes naturais em suas formulações para melhorar a percepção do público sobre suas marcas (Yusuf, Shabbir e Mohammad, 2017). Adicionalmente, colorantes naturais também podem apresentar vantagens em relação aos sintéticos, como presença de atividade antioxidante e antimicrobiana (Amberg e Fogarassy, 2019). Portanto, existe um mercado em expansão para produtos com colorantes naturais, particularmente nas áreas de alimentos e cosméticos.

Em embalagens, além da cor ser um elemento estético, ela também pode garantir a proteção do alimento. Por exemplo, a pigmentação de materiais de acondicionamento pode reduzir a fotodegradação de vitaminas e substâncias responsáveis pelo sabor (Lee e Khng, 2002). Adicionalmente, embalagens funcionais tem se popularizado na indústria alimentícia, pois podem interagir positivamente com os produtos orgânicos e melhorar suas propriedades sensoriais e nutricionais e auxiliar em sua preservação (de Oliveira et al., 2020a; Mellinas et al., 2016).

Apesar das vantagens, ainda existem barreiras que limitam a substituição de colorantes sintéticos por naturais, incluindo seu alto custo e menor estabilidade (Fortune Business Insights, 2023). Ainda é um desafio encontrar colorantes naturais que sejam baratos, abundantes, e não tenham problemas com sua estabilidade, cromacidade e opacidade, especialmente para colorantes de cores quentes como amarelo e vermelho (de Souza Mesquisa et al., 2021; Sigurdson, Tang e Giusti, 2017). Além disso, pode haver incompatibilidades entre o colorante e os componentes do produto, que dificultem sua adição direta durante o processamento das commodities. Por exemplo, a inserção de colorantes a biofilmes de embalagens podem prejudicar as propriedades do biofilme, como resistência mecânica, elasticidade e propriedades de barreira. Contudo, é possível desenvolver formulações que melhorem a estabilidade (Veríssimo et al., 2022) e compatibilidade de colorantes com os componentes de biofilmes (Robinson et al., 2001) e outros produtos para facilitar e expandir seus usos industriais.

Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de formulações de maltodextrina e quitosana desenvolvidas pelo grupo na estabilização de colorantes naturais fúngicos. Especificamente, determinamos o impacto das diferentes estratégias de encapsulamento nas propriedades colorimétricas e fluorométricas dos colorante frente a condições de estresse, incluindo temperaturas ambiente e elevadas (25 e 65 °C), acidez (pH 2) e alcalinidade (pH 13). A meta maior do trabalho foi desenvolver formulações para estabilização de colorantes naturais e aumento de compatibilidade dessas substâncias com componentes de biofilmes para aplicações no desenvolvimento de embalagens de alimentos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Produção e encapsulamento de produtos naturais

Os colorantes naturais foram produzidos por *Talaromyces amestolkiae* DPUA 1275 e extraídos como descrito anteriormente por Oliveira et al. (2020b). O extrato de colorantes foi liofilizado e encapsulado utilizando matrizes de maltodextrina e quitosana por método de spray-dry.

## 2.2 Efeitos da encapsulação nas propriedades e estabilidade de colorantes naturais

O efeito da encapsulação com quitosana ou maltodextrina na absorção e fluorescência de colorantes de *T. amestolkiae* em diferentes condições ambientais e períodos de tempo. A absorbância (Abs) inicial no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 500 nm [máximo  $\lambda$  do colorante vermelho (de Oliveira et al., 2020b)] para cada amostra foi de 0,2 unidades de absorbância (UA). O pH das amostras foi mantido em 5,0, exceto para os estudos de estabilidade ao pH. No primeiro conjunto de experimentos, os espectros de ultravioleta-visível (UV-Vis) e fluorescência 3D foram obtidos para amostras mantidas a 25 °C com exposição à luz ambiente e amostragem após 0, 5, 24 e 120 h de exposição. No segundo experimento, as amostras foram mantidas em uma incubadora a 65 °C sem exposição à luz e com aquisição de dados após 0, 5, 24, 120, 168, 336 e 600 h de exposição. No terceiro conjunto de experimentos, ajustamos o pH das amostras para 2,0 ou 13,0 e incubamos as amostras a 25 °C por 120 h. Após avaliar a Abs e fluorescência, alteramos o pH das soluções para 5,0 e as mantivemos a 25 °C por 24 h. Novamente, foram adquiridos os espectros de Abs e fluorescência. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas com um branco. Os espectros de absorbância UV-Vis foram realizados usando um espectrofotômetro EnSpire® Alpha Plate Reader (PerkinElmer®) de  $\lambda$  300 a 600 nm. Os espectros de fluorescência 3D foram adquiridos em um espectrofluorímetro (RF-6000 da Shimadzu®), com varreduras nos comprimentos de onda de excitação ( $\lambda_{Ex}$ ) de 220 a 600 nm e comprimentos de onda de emissão ( $\lambda_{Em}$ ) de 370 a 650 nm, com configuração do equipamento conforme dos Santos et al. (2019).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Efeito do encapsulamento na absorbância de colorantes naturais

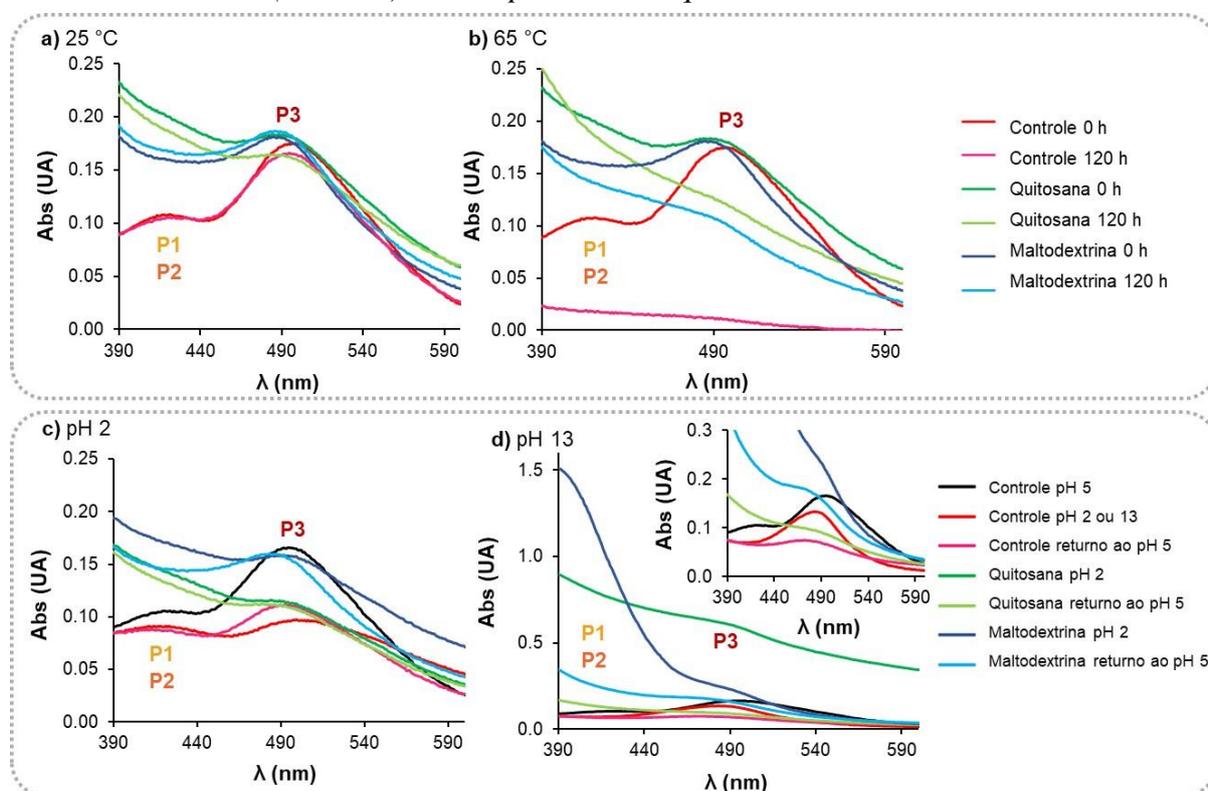
A **Figura 1** apresenta os impactos do encapsulamento do colorante em matrizes de quitosana e maltodextrina no espectro de Abs dos colorantes em diferentes tempos e condições de estresse. A **Figura 1.a** mostra as alterações na Abs dos colorantes em temperatura ambiente (25 °C) após 0 e 120 h. Já a **Figura 1.b** demonstra o efeito protetor dos processos de encapsulamento na resistência térmica (temperatura de 65 °C por 120 h) da absorbância dos colorantes naturais. Finalmente, as **Figuras 1.c** e **1.d** demonstram o impacto dos encapsulamentos na manutenção da Abs dos colorantes frente à acidez (pH 2) e alcalinidade (pH 13), respectivamente, além do impacto na restauração da Abs com o retorno do pH para 5. Nas **Figuras 1** e **2**, P1 e P2 representam os picos dos cromóforos amarelos-alaranjados (400 e 420 nm, respectivamente) e P3 do cromóforo vermelho (500 nm).

Como é possível observar na **Figura 1.a**, os encapsulamentos em matrizes de maltodextrina e quitosana levaram a uma diminuição do comprimento de onda máximos de Abs (*blueshift*) dos colorantes a 25 °C, sem causar perdas significativas em sua intensidade. Além disso, as encapsulações protegeram parcialmente a Abs dos colorantes em altas temperaturas (120 h a 65 °C, **Figura 1.b**). Por exemplo, enquanto os colorantes encapsulados e livres tenham mantido suas propriedades após 120 h a 25 °C, os livres perderam a maior parte de sua Abs para os cromóforos amarelo-alaranjado e vermelho pelo mesmo período a 65 °C. Porém, os

colorantes encapsulados perderam apenas 25% de sua Abs no pico vermelho após cinco dias e 30 a 35 % da Abs após 25 dias a 65 °C.

O encapsulamento, independente da matriz, também preservou parcialmente a absorbância dos colorantes vermelhos em pH ácido. Nessa condição (120 h em pH 2, **Figura 1.c**), os processos de encapsulamento diminuíram a supressão da Abs dos colorantes, particularmente a matriz com maltodextrina. No entanto, em ambiente alcalino (120 h em pH 13, **Figura 1.d**), a quitosana e a maltodextrina alteraram o perfil de Abs dos colorantes. Mesmo alterando o perfil de Abs, a maltodextrina melhorou o retorno do perfil de Abs do colorante em pH alcalino com a acidificação do meio.

*Figura 1: Efeito da temperatura (a – 25 °C e b – 65 °C por 0 e 120 h) e pH (c – pH 2, d – pH 13, ou pH 5 por 120 h, com retorno ao pH 5 por 24 h) na absorbância de colorantes naturais livres (controle) ou encapsulados em quitosana ou maltodextrina.*

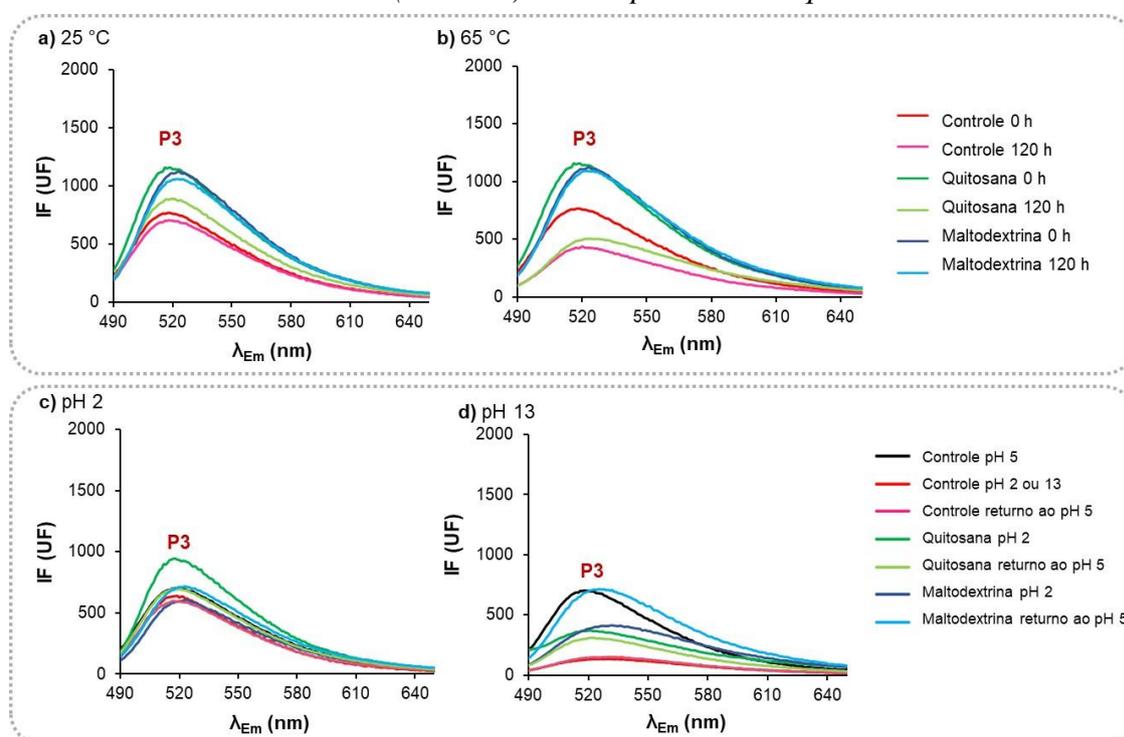


### 3.2 Efeito do encapsulamento na fluorescência de colorantes naturais

A **Figura 2** demonstra os efeitos do encapsulamento do colorante em matrizes de quitosana e maltodextrina no fluoróforo vermelho em diferentes tempos e condições de estresse. A **Figura 2.a** apresenta as alterações na intensidade de fluorescência (IF) em unidades de fluorescência (UF) dos colorantes em temperatura ambiente (25 °C) após 0 e 120 h. A **Figura 2.b** mostra o efeito de proteção das matrizes de encapsulamento na resistência térmica (temperatura de 65 °C por 120 h) da fluorescência vermelha dos colorantes naturais. Finalmente, as **Figuras 2.c** e **2.d** demonstram o impacto dos encapsulamentos na manutenção da fluorescência do cromóforo vermelho dos colorantes frente à acidez (pH 2) e alcalinidade (pH 13), respectivamente, além do efeito na restauração da fluorescência com o retorno do pH para 5.

Como apresentado na **Figura 2.a**, para a mesma Abs a 500 nm, a IF do fluoróforo vermelho P3 aumentou, com um ligeiro desvio para o vermelho (*redshift*) nos colorantes encapsulados com maltodextrina. Após 120 h a 65 °C (**Figura 2.b**), a maltodextrina protegeu completamente a IF do P3, enquanto a quitosana não. Porém, a encapsulação em quitosana não só preservou como aumentou a IF do P3 em pH ácido (**Figura 2.c**). Já em pH básico, ambas as encapsulações mantiveram parcialmente a IF do P3 do colorante (**Figura 2.d**). Particularmente, a encapsulação em maltodextrina permitiu uma recuperação completa da IF do colorante após o retorno ao pH 5.

*Figura 2: Efeito da temperatura (a – 25 °C e b – 65°C por 0 e 120 h) e pH (c – pH 2, d – pH 13 ou pH 5 por 120 h, com retorno ao pH 5 por 24 h) na fluorescência do fluoróforo vermelho de colorantes livres (controle) ou encapsulados em quitosana ou maltodextrina.*



## 4 CONCLUSÃO

O encapsulamento de colorantes fúngicos com polímeros maltodextrina e quitosana aumentam sua estabilidade térmica, mas também podem modificar suas propriedades e resistência às alterações de pH. Portanto, a funcionalidade do processo de encapsulamento em matrizes de quitosana e maltodextrina dependerá das aplicações e ambiente pretendidos para os colorantes naturais.

## 5 NOMENCLATURA

Absorbância (Abs), comprimento de onda ( $\lambda$ ), comprimentos de onda de emissão ( $\lambda_{Em}$ ), comprimentos de onda de excitação ( $\lambda_{Ex}$ ), intensidade de fluorescência (IF), pico do cromóforo vermelho (P3), picos dos cromóforos amarelos-alaranjados (P1 e P2), ultravioleta-visível (UV-Vis), unidades de absorbância (UA), unidades de fluorescência (UF).

## 6 REFERÊNCIAS

- AMBERG, N.; FOGARASSY, C. Green consumer behavior in the cosmetics market. *Resources*, v. 8, n. 3, p. 137, 2019.
- DE OLIVEIRA, F. et al. Microbial colorants production in stirred-tank bioreactor and their incorporation in an alternative food packaging biomaterial. *J. Fungi*, v. 6, n. 4, p. 264, 2020a.
- DE OLIVEIRA, F. et al. Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: Mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, v. 161, p. 107694, 2020b.
- DE SOUZA MESQUITA, L. M. et al. Insights on the use of alternative solvents and technologies to recover bio-based food pigments. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 20, n. 1, p. 787–818, 2021.
- DOS SANTOS, N. V. et al. Revealing a new fluorescence peak of the enhanced green fluorescent protein using three-dimensional fluorescence spectroscopy. *RSC Adv.*, v. 9, n. 40, p. 22853–22858, 2019.
- FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. *Natural Colorants Market Size, Share Industry & Forecast 2030*. Disponível em: <<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/natural-colorants-market-101937>>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- LEE, Y.-K.; KHNG, H.-P. Natural color additives, *Food Science and Technology*. New York, USA: Marcel Dekker, p. 501–522, 2002.
- MELLINAS, C. et al. Active edible films: Current state and future trends. *J. Appl. Pol. Sci.*, v. 133, n. 2, 2016.
- ROBINSON, A. M. et al. The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. *Colloids Surf. A*, v. 186, n. 1–2, p. 43–53, 2001.
- SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.*, v. 8, p. 261–280, 2017.
- TEIXEIRA, V. M. C. et al. Chemometric approaches to evaluate the substitution of synthetic food dyes by natural compounds: The case of nanoencapsulated curcumin, spirulina, and hibiscus extracts. *LWT*, v. 154, p. 112786, 2022.
- VERÍSSIMO, N. V. et al. Effect of amphiphilic ionic liquids on the colorimetric properties of polyketides colorants. *J. Mol. Liq.*, p. 119857, 2022.
- YUSUF, M.; SHABBIR, M.; MOHAMMAD, F. Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects. *Nat. Prod. Bioprospect.*, v. 7, n. 1, p. 123–145, 2017.