

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 25/04/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Ana María Chaux Gutiérrez

Avaliação da liofilização para produção de criogéis como material de parede e sua aplicação em encapsulação de betalaínas.

São José do Rio Preto - SP

2019

Ana María Chaux Gutiérrez

Avaliação da liofilização para produção de criogéis como material de parede e sua aplicação em encapsulação de betalaínas.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Maria Aparecida Mauro

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Diana María Granda Restrepo

São José do Rio Preto - SP

2019

C511a

Chaux-Gutiérrez, Ana María

Avaliação da liofilização para produção de criogéis como material de parede e sua aplicação em encapsulação de betalaínas / Ana María Chaux-Gutiérrez. -- São José do Rio Preto, 2019

135 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Maria Aparecida Mauro

Coorientadora: Diana María Granda-Restrepo

1. albumina. 2. pectina amidada. 3. isobetanina. 4. microestrutura. 5. beterraba. I. Título.

Ana María Chaux Gutiérrez

Avaliação da liofilização para produção de criogéis como material de parede e sua aplicação em encapsulação de betalaínas.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Mauro

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Vânia Regina Nicoletti Telis

UNESP-São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Marcia Perez dos Santos Cabrera

UNESP-São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Izabel Cristina Freitas Moraes

USP-Pirassununga

Prof^ª. Dr^ª. Carolina Castilho Garcia

UTFPR-Medianera

São José do Rio Preto – SP

25 de abril de 2019

Dedico este trabalho à Ana Emilia, ao Amado,
à Elsa María (*in memoriam*), ao Francisco, ao Juan Fernando
e ao Ezequiel pelo amor, apoio, força e acompanhamento
durante esta etapa da minha vida

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por estar sempre ao meu lado abençoando-me e ter sido minha força para continuar o caminho nas situações mais difíceis.

À minha família, por sempre ter me dado todo o amor, apoio e força em todos os momentos nesta etapa da minha vida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Mauro, pela orientação, conhecimento, confiança, dedicação, paciência e pelo apoio e ajuda incondicional em todos os momentos que precisei.

Aos professores Dra. Vânia Nicoletti Telis, Dra Maria Aparecida Mauro, Dr Vanildo Luiz Del Bianchi e Dr Valmir Fadel pelas disciplinas ministradas que foram muito importantes para minha formação.

Aos professores Dra. Vânia Nicoletti Telis, Dr José Antonio Gomes Vieira, Dra. Marcia Perez dos Santos Cabrera, Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes e Dra. Carolina Castilho Garcia, por suas valiosas sugestões.

Às minhas amigas Katieli, Ana Filippin, Laís e Liliane pela ajuda e amizade e pelas boas conversas e risadas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*, à qual agradeço.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. FAPESP 2017/02808-6) pelo apoio financeiro.

À Profa. Dr^a Vânia Nicoletti Telis pela disponibilidade na utilização do reómetro e do calorímetro diferencial de varredura.

Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À Profa. Dra. Marcia Perez dos Santos Cabrera pela ajuda no uso do equipamento Zetasizer Nano ZS.

À Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Villamaior pela ajuda na realização da análise de microscopia confocal no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia do IBILCE.

Ao Prof. Dr Mauricio Boscolo e ao Laboratorio de Sucroquímica e Química Analítica pela disponibilidade na utilização do espectro de infravermelho e o analisador de área superficial.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Torres (Universidad de Antioquia) pela auxilio e disponibilização do espectro de infravermelho.

À Prof. Dra. Diana Maria Granda Restrepo e aos integrantes do Grupo de Pesquisa BIOALI (Universidad de Antioquia), pela ajuda durante o tempo do estágio.

À Labbrands Colômbia pela disponibilização do equipamento de HPLC.

A Danisco Brasil pela doação da pectina.

À Sensient Technologies Corporation Brasil pela doação do extrato de betalaína.

A todas as pessoas que fizeram parte deste processo.

A Zequi por ser meu companheiro de lutas, por não me deixar desistir, pela ajuda incondicional, pelo amor e por todos seus conselhos.

RESUMO

Neste trabalho foi abordado o estudo da albumina de ovo (ALB) e sua mistura com pectina amidada de baixa metoxilação (PEC) como material de parede na encapsulação de betalaína. Inicialmente, foram caracterizados os géis de ALB e dos produzidos usando a mistura de albumina com diferentes proporções de PEC (1, 2, 2,5, 3 e 4 %) (ALB-PEC), a pH 8 e sem ajuste de pH. A caracterização estrutural e as interações na matriz foram feitas através das análises do potencial zeta, testes reológicos, espectroscopia de infravermelho e microscopia confocal. Resultados de ensaios oscilatórios indicaram que a estrutura formada pelos biopolímeros apresentou características de um gel fraco e foram dependentes da frequência. As interações do tipo repulsão eletrostática, observadas entre a albumina e a pectina nas concentrações 1 % e 2 %, provocaram um aumento no módulo de armazenamento (G'), no entanto, concentrações acima de 2 % ocasionaram diminuição no valor de G' e a agregação da albumina na matriz. Numa segunda etapa do estudo, foram preparados criogéis usando a betalaína como composto bioativo de interesse, sendo que o material de parede foi formulado somente com ALB e com ALB-PEC usando 1 %, 2 % e 2,5 % de PEC. Para a incorporação da betalaína foram propostas e avaliadas duas metodologias, chamadas de pré-carga e pós-carga. As interações e as características morfológicas foram analisadas por espectrofotometria UV-visível, infravermelho (FTIR), determinação de área superficial específica (BET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com os resultados, foram encontrados altos valores de eficiência de encapsulação (88-97 %) independentemente da concentração de pectina e da metodologia usada na incorporação da betalaína. Da análise dos espectros de FTIR foi estabelecida a ocorrência de interações entre a betalaína, a ALB e a PEC. O perfil de liberação da betalaína dos criogéis de ALB e ALB-PEC indicou que existe um efeito significativo da concentração de PEC e da metodologia de incorporação da betalaína na liberação a diferentes condições de pH. A análise morfológica indicou que o criogel de ALB apresentou uma estrutura mais compacta, enquanto que os criogéis de ALB-PEC apresentaram estrutura mais porosa. Finalmente, foi avaliada a estabilidade da betalaína durante o armazenamento em duas umidades relativas, 32 e 83 % nas temperaturas de 4 °C, 30 °C e 40 °C. Para essas análises, foram selecionados os criogéis de ALB e de ALB-PEC (1 % PEC) usando a metodologia de pré-carga. A retenção da betalaína (betanina + isobetanina)

e dos compostos fenólicos, assim como a atividade antioxidante foi determinada mediante cromatografia líquida (HPLC), pelo método de Folin-Ciocalteu e pela captura do radical ABTS*⁺, respectivamente e os parâmetros de cor espectrofotometricamente. O criogel de ALB permitiu manter altas retenções da betanina e isobetanina (72 % e 82 %) a 32 % UR e 4 °C, assim como tempos de meia-vida de 108 dias e 165 dias, respectivamente, e também proporcionou altas retenções de atividade antioxidante (90-93 %) e de compostos fenólicos (84-90 %) durante o armazenamento a 32 % UR, em todas as temperaturas. A retenção da betalaína foi drasticamente afetada pela umidade relativa de 83 % UR.

Palavras-chave: albumina, pectina amidada, isobetanina, cinética de degradação, microestrutura, beterraba.

ABSTRACT

The thesis explores the capacity of egg albumen (ALB) and their mixture with low methoxyl amidated pectin (PEC) as a wall material for betalain encapsulation. Initially, ALB gels and those produced using the ALB and PEC mixture were characterized, at pH 8 and without pH adjustment. The structural characterization and the interactions between each component in the matrix were performed by using, zeta potential analysis, oscillatory rheological tests, FT-IR spectrometry, and confocal microscopy. The oscillatory tests results indicated that the structure formed by the biopolymers had characteristics of a weak gel, and were frequency dependent. Results indicated that there was electrostatic repulsion between the albumin at 1 % and 2 % of pectin concentration, leading to an increase in storage modulus (G'), however, concentrations above 2 % caused a decrease in the G' value, and formation of electrostatic complexes, as well as the aggregation of albumin in the matrix. Additionally, cryogels with betalain as guest molecule were prepared using ALB and ALB-PEC mixture with 1 %, 2 % and 2.5 % of PEC. For the betalain inclusion, were proposed and evaluated two methodologies, which were called pre-loading and post-loading. The physicochemical interactions between betalain and wall material and morphological characteristics were analyzed by UV-vis spectrophotometry, FT-IR spectrophotometry, specific surface area determination (BET), and scanning electron microscopy (SEM). Also, encapsulation efficiency and their delivery profile were analyzed. Criogels showed high encapsulation efficiency (88-97%) regardless of pectin concentration and the betalain inclusion methodology. Results of FT-IR indicated that there was an interaction among ALB, PEC and betalain. The betalain delivery patterns were affected by PEC content and inclusion methodology at different pH conditions. The morphological analysis indicates that ALB cryogel has a more compact structure, whereas, ALB-PEC cryogel showed a more porous structure. Finally, betalains stability in ALB and ALB-PEC cryogels (1 % PEC), using the pre-loading methodology, was evaluated during storage at two relative humidities (32 and 83 % RH), at 4 °C, 30 °C and 40 °C. Betalains (betanin + isobetanin) and phenolic compounds retention, as well as antioxidant activity and color parameters were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), Folin-Ciocalteu method, and radical capture of

ABTS⁺. ALB cryogel had high betanin and isobetanin retention (72 % and 82 %) during the storage time at 32 % RH and 4 ° C, as well as half-lives were 108 and 165 days, respectively, and even high retention of antioxidant activity (90-93 %) and phenolic compounds content (84-90 %) were obtained at all storage temperatures at 32 % RH. The betalain retention was highly affected by the relative humidity of 83 % RH.*

Keywords: *albumin, amidated pectin, isobetanin, kinetics of degradation, microstructure, beetroot.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS CAPÍTULO I

- Figura 1.1.** Esquema da ligação peptídica.....25
- Figura 1.2.** Esquema da estrutura da ovoalbumina.....30
- Figura 1.3.** Esquema da estrutura geral de um polissacarídeo.....31
- Figura 1.4.** Modelo das zonas de junção de géis de polissacarídeos: junção tipo “egg-box” (a), junção helicoidal dupla agregada (b), associação promovida por cátions (●) de hélices duplas (c) e associação de fita alargada (d).....32
- Figura 1.5.** Esquema de um exemplo de hidrogel “ionotrópico” e um coacervado complexo.
.....36
- Figura 1.6.** Estrutura química da betacianinas (a) e Betaxantinas (b).....41

FIGURAS CAPÍTULO II

- Figure 2.1S.** Zeta potential of ALB, PEC and ALB-PEC gels (a). Phase diagram of ALB and ALB-PEC – effects of pH and PEC concentration (b) and phase diagram ALB and ALB-PEC PEC – effects of pH and PEC concentration without addition of calcium chloride (c). Open symbol represent liquid and Solid symbol represents gel.....61
- Figure 2.1.** Strain sweep (G') with the strain on ALB and ALB-PEC gels at pH 8 (a) and gels at non-adjusted pH (b) at 10 Hz..... 63
- Figure 2.2.** Frequency sweep at 25 °C for ALB and ALB-PEC gels at pH 8: G' (a), G'' (b) and $\tan \delta$ (e) and at non-adjusted pH: G' (c), G'' (d) and $\tan \delta$ (f).....64
- Figure 2.3.** Concentration dependence of G' for the ALB-PEC gels with the PEC concentration, at pH 8 (a) and non-adjusted pH (b), in different angular frequency (ω).66

Figure 2.2S. FT-IR spectra of pure PEC and pure ALB.....	69
Figure 2.4. Curve fitting spectra of amide I for ALB and ALB-PEC gels at pH 8.....	71
Figure 2.5. Curve fitting spectra of amide I for ALB gel and ALB-PEC gel at non-adjusted pH.....	72
Figure 2.6. CLSM images of ALB gels (a) and ALB-PEC gels: 1 % PEC (b), 2 % PEC (c), 2,5 % PEC (d), 3 % PEC (e), and 4 % PEC (f) at pH 8.....	75
Figure 2.7. CLSM images of ALB gels (a) and ALB-PEC gels: 1 % PEC (b), 2 % PEC (c), 2,5 % PEC (d), 3 % PEC (e), and 4 % PEC (f) at non-adjusted pH.....	76

FIGURAS CAPÍTULO III

Figura 3.1. Perfil de liberação dos criogéis ALB e ALB-PEC usando pré-carga a pH 2 (a), pH 7 (b), pH 10 (c) e criogéis ALB e ALB-PEC usando pós-carga a pH 2 (d), pH 7 (e) e pH 10 (f).....	92
Figura 3.2. Espectros de infravermelho da albumina (ALB), pectina (PEC) e a betalaína.	95
Figura 3.3. Espectros de infravermelho dos criogéis preparados usando pré-carga (a) e pós-carga (b). As letras na linha do espectro indicam ALB pura (a), betalaína (b), criogel ALB (c), criogel ALB-PEC (1 % PEC) (d), criogel ALB-PEC (2 % PEC) (e) e criogel ALB-PEC (2,5 % PEC) (f).....	96
Figura 3.4. Micrografias dos criogéis preparados usando pré-carga de ALB (a), ALB-PEC (1 % PEC) (b), ALB-PEC (2 % PEC) (c), ALB-PEC (2,5 % PEC) (d) e usando pós-carga de ALB (e), ALB-PEC (1 % PEC) (f), ALB-PEC (2 % PEC) (g), ALB-PEC (2,5 % PEC) (h).	98

FIGURAS CAPÍTULO IV

Figura 4.1. Retenção da betanina, isobetanina, compostos fenólicos e atividade antioxidante dos criogéis ALB, ALB-PEC e amostras controle depois de 45 dias de armazenamento em 32 % de umidade relativa a 4 °C (a), 30 °C (b), 40 °C (c) e 83 % de umidade relativa a 4 °C (d), 30°C (e), 40 °C (f).....	118
--	-----

Figura 4.2. Cinética de primeira ordem para a degradação da betanina e isobetanina nos criogéis armazenados a 32 % UR, nas temperaturas de 4 °C, 30 °C e 40 °C: ALB-Bet (a,c) e ALB-Bet-PEC (b,d) Cinética de primeira ordem para a degradação da betanina e isobetanina nos criogéis armazenados a 83 % UR na temperatura de 4 °C: ALB-Bet e ALB-Bet-PEC (e,f).
.....124

Figura 4.3. Imagens (câmera digital) dos criogéis ALB-Bet (a) e ALB-Bet-PEC (d) durante o período de armazenamento de 45 dias.....128

LISTA DE TABELAS

TABELAS CAPÍTULO II

Table 2.1. Quantities of ALB, PEC, CaCl ₂ solution and water in the formulation of the ALB and ALB-PEC gels.....	58
Table 2.2. Zeta potential (mV) of ALB and ALB-PEC gels at pH 8 and non-adjusted pH.	62
Table 2.3. Parameters of the power law model of the ALB and ALB-PEC gels.....	68
Table 2.4. Assignments and relative areas of amide I components of ALB and ALB-PEC gels.....	73

TABELAS CAPÍTULO III

Tabela 3.1. Eficiência de encapsulação dos criogéis de ALB e ALB-PEC usando pré-carga e pós-carga.....	90
Tabela 3.2. Parâmetros de cor dos criogéis usando pré-carga e pós-carga.	93
Tabela 3.3. Área superficial dos criogéis de ALB e ALB-PEC usando pré-carga e pós-carga.	97

TABELAS CAPÍTULO IV

Tabela 4.1. Planejamento fatorial geral e variáveis de resposta para 45 dias de armazenamento dos criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC.....	116
Tabela 4.2. Anova dos fatores (temperatura e umidade relativa) e das interações durante os 45 dias de armazenamento dos criogéis.....	117
Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos da degradação de betalaínas.....	127

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
OBJETIVO.....	22
Objetivo Geral.....	22
Objetivos Específicos	22
ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	23
CAPÍTULO I. Revisão Bibliográfica.....	24
1.1 Proteínas	25
1.1.1 Desnaturação de proteínas	27
1.1.2 Proteínas globulares e sua gelificação	27
1.1.3 Albumina	29
1.2 Polissacarídeos	30
1.2.1 Gelificação dos polissacarídeos	31
1.2.2 Pectina.....	33
1.3 Encapsulação	34
1.3.1 Hidrogéis.....	35
1.4 Betalaínas	40
1.5 Reologia.....	42
1.6 Referências	45
CAPITULO II. Rheological and structural characterization of gels from albumin and low methoxyl amidated pectin mixtures.....	54
Abstract.....	55
2.1 Introduction	56
2.2 Materials and methods.....	57

2.2.1 Preparation of ALB and ALB-PEC gels	58
2.2.2 Zeta (ζ)-potential.....	59
2.2.3 Dynamic oscillatory rheological analyses	59
2.2.4 FT-IR spectroscopy.....	59
2.2.5 Confocal laser scanning microscopy (CLSM).....	60
2.3 Results	60
2.3.1 Zeta potential	60
2.3.2 Dynamic rheological analyses	62
2.3.2.1 Strain sweep	62
2.3.2.2 Frequency Sweep	63
2.3.3 FT-IR spectroscopy.....	69
2.3.4 Confocal laser scanning microscopy (CLSM).....	74
2.4 Conclusion.....	76
2.5 Acknowledgements	77
2.6 References	77
CAPÍTULO III. Encapsulação de betalaína em criogéis de albumina e pectina de baixa metoxilação.....	81
Resumo	82
3.1 Introdução.....	83
3.2 Materiais e Métodos	85
3.2.1 Materiais	85
3.2.2 Métodos	86
3.2.2.1 Encapsulação de betalaína em criogéis de ALB e ALB-PEC.....	86
3.2.2.2 Conteúdo de betalaína (CB) e Eficiência de encapsulação (% EE).....	87
3.2.2.3 Perfil de liberação da betalaína a diferentes pH.....	87
3.2.2.4 Análises de cor	88
3.2.2.5 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR).....	88

3.2.2.6	Área superficial específica (a_s).....	88
3.2.2.7	Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	89
3.2.2.8	Análises estatística	89
3.3	Resultados e Discussão.....	89
3.3.1	Conteúdo de betalaína (BC) e Eficiência de encapsulação (% EE).....	89
3.3.2	Perfil de liberação da betalaína.	91
3.3.3	Cor	93
3.3.4	Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)	94
3.3.5	Área específica superficial (a_s).	96
3.3.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	97
3.4	Conclusão	99
3.5	Agradecimentos	99
3.6	Referências.	99
CAPÍTULO IV Estabilidade da betalaína encapsulada em criogéis de albumina e albumina-pectina de baixa metoxilação		104
	Resumo	105
4.1	Introdução	106
4.2	Materiais e Métodos	107
4.2.1	Materiais	107
4.2.2	Métodos	108
4.2.2.1	Preparação dos criogéis	108
4.2.2.2	Efeito da temperatura e da umidade relativa sobre os criogéis ALB-Bet e ALB-Bet-PEC.....	109
4.2.2.3	Conteúdo de betanina, isobetanina e porcentagem de retenção.	109
4.2.2.4	Compostos fenólicos	110
4.2.2.5	Atividade antioxidante	110
4.2.2.6	Análises de cor	111
4.2.2.7	Cinética de degradação das betalaínas	111

4.2.2.8 Planejamento Experimental.....	112
4.2.2.9 Análises Estatísticas	112
4.3 Resultados e Discussão.....	113
4.3.1 Porcentagem de retenção de betanina e isobetanina.	113
4.3.2 Retenção de compostos fenólicos	119
4.3.3 Atividade antioxidante	120
4.3.4 Parâmetros de cor.....	121
4.3.5 Cinética de degradação de betalaínas (betanina+isobetanina).....	122
4.4 Conclusões.....	129
4.5 Agradecimentos	129
4.6 Referências	129
CONCLUSÕES GERAIS	133
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	135

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os consumidores têm demonstrado crescente interesse no consumo de alimentos que, além de suprirem os requerimentos básicos de energia, melhorem a saúde. Esse interesse tem conduzido ao desenvolvimento de alimentos e aditivos funcionais, capazes de prevenir doenças ou amenizar problemas de saúde a partir de compostos bioativos tais como antioxidantes, vitaminas e probióticos (ONWULATA, 2013). No entanto, os compostos bioativos são sensíveis a fatores tais como pH, temperatura, luz e oxigênio, os quais provocam degradação e perda da atividade nutracêutica (DE SOUZA et al., 2013). A necessidade de mantê-los estáveis durante o armazenamento, o processamento ou o consumo tem levado à aplicação de metodologias como a encapsulação, a qual, ao criar uma barreira, evita as interações da molécula de interesse com seu entorno, melhorando, desta forma, sua estabilidade durante períodos prolongados de tempo (CORONEL-AGUILERA; SAN MARTÍN-GONZÁLEZ, 2015).

A secagem por atomização (*spray-dryer*) e a liofilização são metodologias de secagem comumente aplicadas ao processo de encapsulação (PASRIJA et al., 2015). A primeira tem sido usada por vários autores para a estabilização de pigmentos naturais. Robert et al. (2015) avaliaram o efeito da temperatura de entrada de ar e a relação entre a polpa de figo da Índia e a proteína isolada de soja (SPI). Os autores encontraram que a melhor relação foi 5:1 e a temperatura de entrada de 100 °C, para obter 99 % de eficiência de encapsulação das betacianinas e 98 % para as betaxantinas, assim como para melhorar a estabilidade durante o armazenamento. Pitalua et al. (2010) preparou microcápsulas com suco de beterraba e goma arábica através de *spray drying*. A atividade antioxidante foi avaliada durante o tempo de armazenamento em diferentes condições de atividade de água, sendo que os autores constataram a máxima estabilidade em $a_w < 0,521$. Na encapsulação de pigmentos de beterraba em *spray-dryer*, Janiszewska (2014) avaliou o efeito da goma arábica e da maltodextrina sobre a estabilidade das betalaínas. De acordo com os resultados, a goma arábica proporcionou estabilidade dos pigmentos por maior período de tempo do que a maltodextrina, o que foi atribuído à menor higroscopicidade dos pós preparados com a primeira. Por sua vez, na encapsulação por *spray-drying* de betalaína extraída do figo da Índia (*O. ficus-indica*), usando maltodextrina e a mistura maltodextrina-mucilagem de cacto foi

demonstrado que a adição da mucilagem de cacto melhorou a eficiência do processo de encapsulação, estendendo o período de estabilidade do pigmento (OTÁLORA et al., 2015).

Em relação à aplicação da liofilização ao processo de encapsulação, essa metodologia é considerada eficiente na manutenção de compostos bioativos, pois mantém sua atividade devido às baixas temperaturas de processo (DA ROSA et al., 2013). Pasrija et al. (2015) compararam a aplicação de liofilização e *spray drying* na encapsulação do extrato de chá verde, usando como materiais de parede maltodextrina e ciclodextrina, e encontraram que as cápsulas liofilizadas apresentaram maior eficiência de encapsulação de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante que as produzidas por *spray drying*. Da Rosa et al. (2013) avaliaram a encapsulação de ácido gálico usando quitosana, β -ciclodextrina e goma xantana, através da aplicação de liofilização. Os pesquisadores não encontraram diferenças na atividade antioxidante do ácido gálico entre as microcápsulas preparadas pelos três biopolímeros e liofilizadas, porém, a matriz quitosana apresentou melhor eficiência na encapsulação. Chranioti et al. (2015) encapsularam extratos aquosos de corantes de açafrão e beterraba usando como material de parede maltodextrina, goma arábica, amido modificado, quitosana e suas misturas. Eles reportaram que o material de parede usado afetou a proteção dos pigmentos, sendo a maltodextrina a que apresentou maior proteção, seguida da mistura de goma arábica e amido modificado.

Nos últimos anos novas tendências de encapsulação têm sido avaliadas a fim de melhorar a proteção e a liberação controlada de moléculas de interesse. Entre elas, destaca-se a preparação de hidrogéis, os quais se definem como redes poliméricas hidrofílicas com capacidade de absorver grandes quantidades de água. Além de serem considerados bons materiais de parede, apresentam grande capacidade de proteção e liberação controlada de ingredientes bioativos, como antioxidantes, vitaminas e probióticos (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2014; FARJAMI; MADADLOU; LABBAFI, 2015).

Os hidrogéis são geralmente produzidos a partir de polissacarídeos derivados de frutos do mar, de algas, de vegetais, de resíduos e excedentes agroindustriais. Entre eles destaca-se a pectina, a qual é um biopolímero natural com capacidade de formação de gel, com boas propriedades de biocompatibilidade, além de baixa toxicidade (DAFE et al., 2017). As pectinas são consideradas bons materiais de parede, devido à proteção que oferecem ao material encapsulado durante seu trânsito pelo trato gastrointestinal até o cólon, onde então é

facilmente degradada, (FATHI; JULIAN, 2014; JUNG; ARNOLD; WICKER, 2013) favorecendo a liberação de compostos bioativos (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2016).

Os hidrogéis também podem ser produzidos a partir de proteínas globulares como a albumina, as quais são consideradas de alto valor nutricional e apresentam propriedades funcionais tais como emulsificação, gelificação, capacidade espumante e de ligação de água. Além das proteínas serem amplamente utilizadas em formulações alimentícias devido ao seu valor nutritivo, sua propriedade de gelificação é especialmente interessante por permitir a formação de matrizes com a finalidade de carrear compostos bioativos (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006).

Geralmente na encapsulação com hidrogéis, o material de parede é misturado ao composto a ser encapsulado (pré-carregamento), no entanto, esse processo pode ter influência negativa sobre a gelificação e a formação de rede dos hidrocoloides. Como alternativa, tem-se utilizado como primeiro passo a formação do hidrogel, o qual é liofilizado em uma segunda etapa, e posteriormente se realiza a adsorção do material a ser encapsulado (pós-carregamento). No entanto, para garantir uma boa adsorção do produto de interesse é necessário que os hidrogéis apresentem estruturas porosas bem definidas (BETZ et al., 2012). Por essa razão, o processo de secagem é a etapa mais crítica, devido a que a eficiência da encapsulação depende da preservação dessa estrutura. Como metodologias de secagem tem-se utilizado a secagem convectiva com ar quente para a formação dos denominados xerogéis, a secagem supercrítica para a formação de aerogéis e a liofilização para produzir criogéis, sendo que a primeira não tem demonstrado sucesso devido aos danos provocados na estrutura dos xerogéis durante o processo de secagem (BETZ et al., 2012).

As pesquisas sobre os hidrogéis pós-carregamento na encapsulação de moléculas bioativas têm sido avaliadas por Ahuja (2015) que estudou a incorporação de metronidazol em hidrogéis de polissacarídeo carboximetil de semente de tamarindo e álcool polivinílico. Os hidrogéis produzidos nessas matrizes apresentaram boas taxas de adsorção e liberação do metronidazol e uma alta estabilidade térmica. Păduraru et al. (2012) avaliaram a incorporação de vanilina em hidrogéis a partir de álcool polivinílico e celulose microcristalina, e reportaram uma diminuição no tempo de liberação e aumento na capacidade de intumescimento pela presença da celulose. Rutz et al. (2013) microencapsularam suco de pitanga em goma tara, goma xantana e hidrogel de gomas tara-xantana, e reportaram que o hidrogel correspondeu à liberação de carotenoides mais adequada quando submetido ao fluido gástrico e intestinal.

As betalaínas são pigmentos hidrossolúveis presentes em frutas, vegetais e grãos (CHHIKARA et al., 2019; ESCRIBANO et al., 2017; VERGARA et al., 2014). Esses pigmentos têm sido reconhecidos, nos últimos anos, como substâncias bioativas potencialmente promissoras (ESCRIBANO et al., 2017; GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2016). A bioatividade é atribuída à sua forte capacidade de eliminar radicais livres, sendo que resultados favoráveis à sua ação na prevenção de câncer são reportados por Gandía-Herrero, Escribano, & García-Carmona (2016). As betalaínas são muito utilizadas como corantes, tanto na indústria de alimentos quanto na farmacêutica (MORENO et al., 2008). Na indústria de alimentos a betalaína tem sido usada em produtos lácteos, confeitaria e bebidas (JANISZEWSKA, 2014). No entanto, esses pigmentos podem ser afetados por fatores externos como presença de luz, pH, temperatura (CHHIKARA et al., 2019; HERBACH; STINTZING; CARLE, 2006; JANISZEWSKA, 2014). Portanto, a encapsulação de betalaínas é uma alternativa importante para ampliar seu uso e preservar sua qualidade, evitando sua degradação durante o armazenamento.

De acordo com o descrito anteriormente, não foram encontrados estudos sobre produção de hidrogéis de misturas de pectina amidada de baixo grau de metoxilação e albumina e sobre a incorporação de compostos bioativos nos mesmos. Portanto, o objetivo desta tese foi investigar o efeito das concentrações de pectina e albumina sobre as propriedades reológicas dos géis, assim como sobre a eficiência da encapsulação de betalaínas e as propriedades físico-químicas dos criogéis preparados através de pré-carregamento e pós-carregamento.

4.4 Conclusões

A umidade relativa (UR) e a temperatura afetaram a estabilidade das betalaínas, no entanto, a UR foi o parâmetro de maior importância na estabilidade durante o tempo de armazenamento. O criogel de ALB na umidade relativa de 32 % foi o que melhor protegeu a betanina e a isobetanina a 4 °C. A adição de PEC contribuiu com o aumento da estabilidade da betanina a temperaturas maiores, e melhorou a retenção dos compostos fenólicos na umidade relativa alta. Em geral, a meia-vida das betalaínas foi favorecida pela matriz de ALB, enquanto que o criogel ALB-Bet-PEC foi afetado em menor medida pela temperatura. Os criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC podem ser usados como matrizes na proteção de betalaína.

4.5 Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Proc. 2017/02808-6], ao Grupo de Investigación BIOALI da Universidad de Antioquia, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pela bolsa de estudos, ao Grupo de Pesquisa BIOALI da Universidad de Antioquia (Colômbia) à Danisco Brasil pela doação da pectina e a Sensient Technologies Corporation Brasil pela doação do suco de beterraba em pó. À Labbrands Colômbia pelo empréstimo do equipamento de HLPC.

4.6 Referências

BETZ, M. et al. Preparation of novel whey protein-based aerogels as drug carriers for life science applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 111–119, 2012.

CALÓ, Enrica; KHUTORYANSKIY, Vitaliy V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 2014.

CARMO, Eloá Lourenço Do et al. Stability of spray-dried beetroot extract using

oligosaccharides and whey proteins. **Food Chemistry**, v. 249, n. July 2017, p. 51–59, 2018.

CASTRO-MUÑOZ, Roberto; BARRAGÁN-HUERTA, Blanca E.; YÁNEZ-FERNÁNDEZ, Jorge. Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 242–248, 2015.

CEJUDO-BASTANTE, María Jesús et al. Potential use of new Colombian sources of betalains . Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. **Food Research International**, v. 64, p. 465–471, 2014.

CHEN, Lingyun; REMONDETTO, Gabriel E.; SABIRADE, Muriel. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 272-283, 2006.

CHHIKARA, Navnidhi et al. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry : A critical review. **Food Chemistry**, v. 272, p. 192–200, 2019.

DAFE, Alireza et al. Investigation of pectin / starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 536–543, 2017.

FANG, Zhongxiang; BHANDARI, Bhesh. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1139–1147, 2011.

GONÇALVES, Rui; MATEUS, Nuno; DE FREITAS, Victor. Influence of Carbohydrates on the Interaction of Procyanidin B3 with Trypsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11794–11802, 2011.

GÜNEŞER, Onur. Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 196, p. 220–227, 2016.

HERBACH, Kirsten; STINTZING, Florian; CARLE, Reinhold. Impact of Thermal Treatment on Color and Pigment Pattern of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Preparations. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 6, p. C491–C498, 2004.

HERBACH, K.; STINTZING, Florian; CARLE, Reinhold. Betalain Stability and Degradation-Structural and Chromatic Aspects. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 4, p. 41–50, 2006.

JAKOBEK, Lidija. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556–567, 2015.

JANISZEWSKA, Emilia. Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. **Powder Technology**, v. 264, p. 190–196, 2014.

LAZARIDOU, Athina; KRITIKOPOULOU, K ; BILIADERIS, Costas G. Barley β -glucan cryogels as encapsulation carriers of proteins: Impact of molecular size on thermo-mechanical and release properties. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 2, p. 99–108, 2015.

MANCHALI, Shivapriya et al. Stability of Betalain Pigments of Red Beet. In: NEELWARNE, B. (Ed.). **Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications**. New York: Springer New York, 2013. p. 55–74.

MOURA, Sílvia C. S. R. De et al. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v. 241, p. 317–327, 2018.

OTÁLORA, María Carolina et al. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 187, p. 174–181, 2015.

OTÁLORA, María Carolina et al. Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation : Pigment chemical stability during storage of beads. **Food Chemistry**, v. 202, p. 373–382, 2016.

OZDAL, Tugba et al. Polyphenol-Protein Interactions and Changes in Functional Properties and Digestibility. In: MELTON, Laurence; SHAHIDI, Fereidoon; VARELIS, Peter (Eds.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2019. v. 2p. 566–577.

PITALUA, E. et al. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2–3, p. 253–258, 2010.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

ROBERT, Paz et al. The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. **LWT - Food Science and**

Technology, v. 60, n. 2, p. 1039–1045, 2015.

ROCHA-PARRA, Diego Fernando et al. Influence of storage conditions on phenolic compounds stability , antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine”.

LWT - Food Science and Technology, v. 70, p. 162–170, 2016.

RUTZ, Josiane K. et al. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1256–1265, 2013.

SCHWARTZ, Steven J.; ELBE, Joachim H. Identification of Betanin Degradation Products. **European Food Research and Technology**, v. 176, n. 6, p. 448–453, 1983.

SERRIS, George S.; BILIADERIS, Costas G. Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 8, p. 691–700, 2001.

SHAARUDDIN, Safura et al. Stability of betanin in pitaya powder and confection as affected by resistant maltodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 129–134, 2017.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SPÓRNA-KUCAB, Aneta et al. New solvent systems for gradient counter-current chromatography in separation of betanin and its derivatives from processed *Beta vulgaris* L. juice. **Journal of Chromatography A**, v. 1380, p. 29–37, 2015.

TSALI, Alexandra; GOULA, Athanasia M. Valorization of grape pomace : Encapsulation and storage stability of its phenolic extract. **Powder Technology**, v. 340, p. 194–207, 2018.

CONCLUSÕES GERAIS

A mistura de albumina de ovo com pectina amidada de baixa metoxilação produz estruturas do tipo gel, os quais são fracos sob ação de esforços de corte, independentemente do pH. Esses géis têm propriedades bem interessantes, uma vez que a elasticidade da sua estrutura pode ser afetada pela interação eletrostática entre as cadeias do polissacarídeo e da proteína, ainda mais que é possível a formação de complexos eletrostáticos, que levam a mudanças no módulo de armazenamento. Além do processo de gelificação típico da proteína, foi demonstrado o efeito da pectina amidada na estrutura secundária da albumina, aumentando as estruturas do tipo β -folha, levando a sua agregação dentro da matriz do gel.

Em relação à encapsulação da betalaína de beterraba (*Beta vulgaris*) usando como material de parede criogéis produzidos a partir de albumina e pectina amidada de baixa metoxilação, concluiu-se que os dois procedimentos de incorporação do material bioativo na matriz, chamados de pré-carga e pós-carga são capazes de proporcionar alta eficiência de encapsulação, sendo recomendável o uso da pré-carga devido ao menor número de etapas no processo de encapsulação. Ainda que as duas metodologias sejam capazes de encapsular a betalaína satisfatoriamente, a taxa de liberação de betalaínas é maior para o pós-carregamento. A pectina amidada se apresenta como um elemento importante dentro da matriz, devido à sua capacidade de aumentar a eficiência de encapsulação e a porcentagem de liberação, dependendo do pH do meio.

Ainda que as betalaínas (isobetanina + betaninas) sejam fortemente afetadas pela ação das variações de temperatura e de umidade relativa, a encapsulação das mesmas em criogéis de albumina e de sua mistura com pectina amidada apresenta-se como uma boa alternativa de proteção, melhorando sensivelmente a retenção da isobetanina e dos compostos fenólicos. No entanto, a capacidade de proteção do material de parede frente a condições de armazenamento é determinada pela composição do gel. De modo geral, o criogel só de albumina apresenta melhores propriedades de proteção de betalaínas e compostos fenólicos à baixa umidade relativa enquanto que à alta umidade, o uso da pectina amidada no criogel é vantajoso na proteção dos polifenóis.

As propriedades já conhecidas de biodegradabilidade e biocompatibilidade das proteínas e dos polissacarídeos como os usados neste estudo, somadas às possibilidades oferecidas pelas interações entre os mesmos e correspondentes efeitos sobre as estruturas e

características dos géis, assim como sobre as características dos criogéis como material de parede, abrem novas oportunidades de formulações de compostos bioativos estáveis preparados a partir de processos de encapsulação alternativos ao *spray drying*.