



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.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Avaliar o processo de liofilização como metodologia para obtenção de criogéis para a encapsulação de betalaínas.

Objetivos Específicos

Avaliar e caracterizar física e reologicamente os hidrogéis de albumina-pectina amidada de baixa metoxilação em diferentes concentrações e pH.

Avaliar o efeito da concentração da albumina e da pectina amidada de baixa metoxilação dos criogéis pré-carregados com betalaínas sobre eficiência de encapsulação, capacidade de liberação dos criogéis e suas propriedades físico-químicas e morfológicas.

Avaliar o efeito da concentração da albumina e da pectina amidada de baixa metoxilação dos criogéis pós-carregados com betalaínas sobre capacidade de carga, eficiência da encapsulação, capacidade de liberação e suas propriedades físico-químicas e morfológicas.

Avaliar a estabilidade dos criogéis submetidos a diferentes condições ambientais durante o armazenamento.

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

A tese foi organizada em 4 capítulos, como descrito a seguir:

Capítulo I: Esse capítulo é constituído por uma revisão bibliográfica que aborda biopolímeros, com ênfase em proteínas e polissacarídeos usados na produção de hidrogéis, assim como na encapsulação de compostos bioativos. Também inclui uma descrição da formação de materiais de parede como os criogéis, para a encapsulação de compostos bioativos. Além, do uso da reologia na caracterização de géis.

Capítulo II: Esse capítulo apresenta o estudo do efeito da concentração de pectina amidada de baixa metoxilação e do pH nos géis produzidos a partir de albumina. As interações entre a albumina e a pectina foram investigadas com base em propriedades reológicas, potencial zeta, espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e microscopia confocal.

Capítulo III: Nesse capítulo o efeito de concentração de pectina no criogel de ALB e a forma de preparação do criogel na encapsulação da betalaína foram estudados. Foi determinada a retenção da betalaína, o perfil de liberação da betalaína e, além disso, foram caracterizados os criogéis usando cor, espectroscopia de infravermelho (FT-IR), área superficial e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Capítulo IV: Nesse capítulo, a estabilidade de betalaína encapsulada em criogéis de albumina e albumina-pectina de baixa metoxilação foi estudada. O capítulo reporta resultados quanto aos efeitos da umidade relativa e da temperatura sobre a estabilidade das betalaínas (betanina + isobetanina), dos compostos fenólicos, da atividade antioxidante e dos parâmetros de cor. O capítulo também apresenta a cinética de degradação das betalaínas durante o tempo de armazenamento.

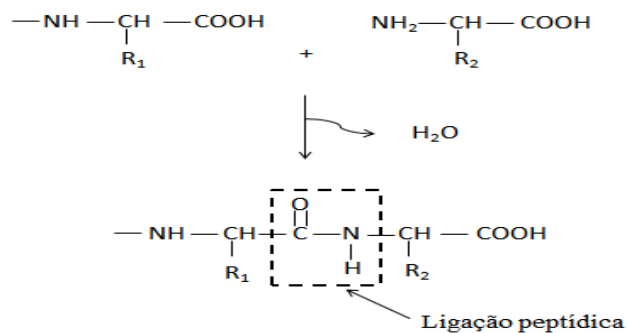
CAPÍTULO I. Revisão Bibliográfica

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1 Proteínas

As proteínas são importantes nos sistemas biológicos por serem fontes de aminoácidos, os quais são fundamentais para a saúde física e mental. Além disso, as proteínas podem funcionar como enzimas ou componentes estruturais das células e dos organismos complexos. Elas são biopolímeros de alta massa molecular, formadas por 21 aminoácidos diferentes, os quais estão ligados entre si por ligações peptídicas, resultando no grupo funcional amida monossubstituída. A ligação peptídica consiste na condensação do grupo α -carboxílico de um aminoácido e o grupo α -amino de outro aminoácido com liberação de uma molécula de água, cuja reação é apresentada na Figura 1.1 (DOMODARAN, 2010; POMERANZ, 1985).

Figura 1.1. Esquema da ligação peptídica.



Fonte: (DOMODARAN, 2010)

As proteínas podem apresentar estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. A estrutura primária consiste na ordem sequencial linear de aminoácidos unidos por ligações covalentes do tipo ligações peptídicas, sem levar em consideração outros tipos de ligação.

Em relação à estrutura secundária, esta é definida como uma configuração espacial entre os resíduos de aminoácidos em alguns segmentos da cadeia de polipeptídeo a qual é estabilizada por ligações de hidrogênio (DOMODARAN, 2010; POMERANZ, 1985). Dois tipos de estruturas secundárias periódicas são encontrados nas proteínas, que são a α -hélice e a folha β , também referida como configuração β ou β -pregueada. A primeira é uma estrutura estabilizada por ligações de hidrogênio intramoleculares, na qual o grupo carbonila (C=O) de cada resíduo é ligado ao grupo amida (N-H) do resíduo. A estrutura α -hélice apresenta um caráter anfifílico, ou seja, a metade da superfície das hélices é composta por resíduos hidrofóbicos e a outra por resíduos hidrofílicos (DOMODARAN, 2010). No caso da estrutura folha β , cuja organização é descrita como uma estrutura zigzag, ela é estabilizada por ligações de hidrogênio entre segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica. Assim, os grupos C=O e N-H são orientados perpendicularmente na direção da cadeia, sendo que as ligações de hidrogênio ocorrem apenas entre segmentos distendidos adjacentes de cadeia (intersegmentos). Esta estrutura é mais estável que a α -hélice. Por essa razão, proteínas que têm maiores conteúdos de estrutura de folha- β estendida apresentam maiores temperaturas de desnaturação (POMERANZ, 1985; SCHWENKE, 1998).

A estrutura terciária é uma organização tridimensional de cadeia linear da proteína com segmentos da estrutura secundária. Para a formação de estruturas terciárias, interações hidrofóbicas, eletrostáticas, interações de van der Waals e ligações de hidrogênio devem estar envolvidas. Existem dois tipos de estruturas terciárias, as proteínas fibrosas e as globulares (DOMODARAN, 2010). As fibrosas apresentam resíduos hidrofílicos que estão distribuídos uniformemente em uma sequência do tipo bastonete, adquirindo forma alongada, enquanto que as globulares contêm um grande número de resíduos hidrofóbicos, obtendo uma forma globular.

A estrutura quaternária é uma configuração espacial resultante da interação entre proteínas, levando a complexos proteicos de uma proteína que contém mais de uma cadeia polipeptídica. A formação de oligômeros é devido às interações específicas entre proteína-proteína, e são compostas por interações não covalentes (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas) (DOMODARAN, 2010; SCHWENKE, 1998).

1.1.1 Desnaturação de proteínas

Desnaturação proteica é o termo utilizado para definir as modificações das estruturas secundárias, terciárias ou quaternárias que decorrem do rompimento das ligações que estabilizam essas estruturas, sem, no entanto, haver clivagem das ligações peptídicas da cadeia principal (DOMODARAN, 2010). A desnaturação das proteínas provoca mudanças nas propriedades físico-químicas e funcionais (POMERANZ, 1985), as quais podem ser negativas, já que muitas proteínas, após desnaturação, perdem sua atividade biológica e sua solubilidade diminui. Porém, também pode apresentar vantagens tais como melhora das propriedades emulsificantes e de formação de espumas; além disso, em relação ao aspecto nutricional, a desnaturação melhora a digestibilidade da proteína das leguminosas, devido à inativação dos inibidores da tripsina. A desnaturação das proteínas pode ser obtida pelo uso de agentes físicos e químicos. Entre os agentes físicos encontram-se temperatura, pressão hidrostática e cisalhamento, e entre os agentes químicos estão o pH, solventes orgânicos, aditivos de baixa massa molecular, solutos orgânicos e detergentes (DOMODARAN, 2010).

1.1.2 Proteínas globulares e sua gelificação

As proteínas globulares podem ser estudadas dentro de três classes, a saber: proteínas α , as quais apenas contêm estruturas do tipo α -hélice, proteínas β , as quais apresentam somente estruturas do tipo folha β e proteínas $\alpha\beta$ que contêm uma combinação desses dois tipos de estruturas secundárias (DE JONGH, 2003). As proteínas com estruturas α possuem vários domínios helicoidais que têm uma conformação antiparalela e as hélices são conectadas através de *loops*. Um exemplo deste tipo de proteína é a mioglobina. Por outro lado, no tipo β , as estruturas folha β organizam-se tanto em forma antiparalela quanto paralela. Na forma antiparalela, que é a estrutura mais estável, as cadeias de polipeptídeos estendem-se em sentidos opostos, enquanto que na paralela, elas se estendem no mesmo sentido. Como exemplo de proteína β , cuja organização da estrutura de cadeias polipeptídicas segue orientação antiparalela, pode-se citar o retinol. As proteínas que têm a combinação de domínios α -hélices e folhas β apresentam arranjos antiparalelos, mas também podem ser encontradas as estruturas folhas β organizadas paralelamente. A ovoalbumina e a β -lactoglobulina encontram-se dentro desse grupo (DE JONGH, 2003).

As proteínas globulares podem formar uma rede tridimensional, através da associação de polipeptídeos, na qual a água fica presa, constituindo assim os géis de proteína, os quais apresentam alta viscosidade, plasticidade e elasticidade (POMERANZ, 1985). A formação de géis de proteína ocorre em duas etapas. A primeira está relacionada com a mudança na conformação da proteína, o que é usualmente obtido pela indução térmica ou desnaturação (PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994). Durante a desnaturação a proteína nativa é convertida em polipeptídeos desdobrados, causando a exposição de regiões internas reativas e de grupos sulfidrilas (IKEDA; FOEGEDING, 1999; POMERANZ, 1985). Além disso, a viscosidade da dispersão aumenta devido ao incremento das dimensões moleculares da proteína, quando desdobrada. Na segunda etapa, os peptídeos desdobrados associam-se para formar a rede, cuja formação pode estar relacionada com ligações covalentes e não covalentes como ligações dissulfeto, ligações de hidrogênio, atração iônica e associações hidrofóbicas. Os agregados formados nessa segunda etapa mostram características de um sólido elástico e, como resultado, o módulo de armazenamento (G') se incrementa (PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994; POMERANZ, 1985).

Cabe ressaltar que, tanto a desnaturação como a agregação, dependem das forças intramoleculares e intermoleculares e das forças atrativas e repulsivas, as quais são influenciadas pela temperatura de aquecimento, pH e força iônica (DONATO et al., 2009). Por essa razão, diversas pesquisas têm avaliado a influência de fatores tais como temperatura, pH e força iônica sobre propriedades de gelificação nas proteínas globulares. Géis de β -lactoglobulina produzidos em pH 4-6 apresentam uma aparência opaca e são heterogêneos ou agregados, enquanto que os géis produzidos acima ou abaixo desses valores de pH são transparentes e homogêneos (STADING; HERMANSSON, 1990). Por outro lado, Donato et al. (2009) avaliaram a formação de agregados a diferentes condições de pH e temperatura e reportaram que em pH 5,9 e 70 °C o processo de agregação foi desfavorável, enquanto que em pH 5,7 e 70 °C os agregados formados foram maiores, indicando assim uma melhora no processo da agregação. Croguennec et al. (2002) investigaram géis de albumina de soro bovino e β -lactoglobulina produzidos pela adição de Ca^{2+} e Na^+ e observaram que a adição de sódio ou de cálcio aumentou a força dos géis produzidos com as duas proteínas, como consequência da diminuição da repulsão eletrostática. Porém, quando os íons foram adicionados simultaneamente, o gel de β -lactoglobulina teve sua estrutura enfraquecida, enquanto que o gel de albumina de soro bovino teve sua estrutura reforçada. Além disso, a

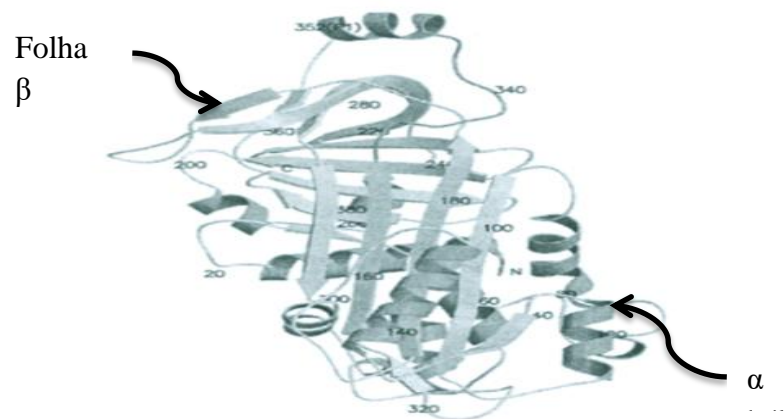
presença de Ca^{2+} em géis de albumina provocou a formação de um gel heterogêneo com partículas agregadas e exerceu efeitos negativos sobre as propriedades visco-elásticas do gel.

1.1.3 Albumina

A albumina é um ingrediente de grande importância na indústria de alimentos, devido às suas propriedades funcionais como capacidade de gelificação, de retenção de água, de formação de espuma e de emulsificação (HANDA et al., 1998; SAVOIE; ARNTFIELD, 1996). A albumina é composta por várias proteínas tais como a ovalbumina, a ovotransferrina, a ovomucóide, a lisozima, a ovomucina, a globulina G2, a globulina G3 e a avidina. A ovoalbumina representa mais da metade das proteínas da albumina, com uma porcentagem de 54 %. Esta possui uma cadeia de um único peptídeo com 385 resíduos de aminoácidos, a qual apresenta uma estrutura globular tridimensional composta por domínios de α -hélices e estruturas folha- β (Figura 1.2) (DE JONGH, 2003). Esta proteína é a única que contém grupos sulfidríla livres, sendo que esses apresentam um papel importante na formação de géis por indução de calor (CROGUENNEC; NAU; BRULÉ, 2002; MINE, 1995). A ovotransferrina contém 686 resíduos de aminoácidos, 15 ligações dissulfeto, e é glicosilada, contendo uma cadeia de glucano simples no domínio C-terminal (MINE, 1995). A albumina é facilmente desnaturada pelo efeito do calor e tanto a ovoalbumina como a ovotransferrina estão predominantemente envolvidas nas propriedades de gelificação (CROGUENNEC; NAU; BRULÉ, 2002).

A gelificação da ovalbumina é obtida geralmente pela sua desnaturação a temperaturas de 82 °C ou superiores. Durante o aquecimento, os grupos hidrofóbicos e sulfidríla são expostos, o que leva à formação de agregados solúveis de alta massa molecular através de interações covalentes (ligações dissulfeto) e não covalentes (interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou ligações de hidrogênio) (DONATO et al., 2009; ESTÉVEZ et al., 2016; IKEDA; FOEGEDING; HAGIWARA, 1999; TANG; MCCARTHY; MUNRO, 1994). No entanto, a gelificação também pode ser obtida pela indução alcalina, como demonstrado por Zhao et al. (2016), na qual a formação do gel foi atribuída principalmente às ligações iônicas (~85%), a um pequeno número de ligações dissulfeto (~5%) e pouquíssimas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Durante a formação do gel a estrutura da proteína passou de uma forma espiralada a uma estrutura folha- β .

Figura 1.2. Esquema da estrutura da ovoalbumina



Fonte: (DE JONGH, 2003)

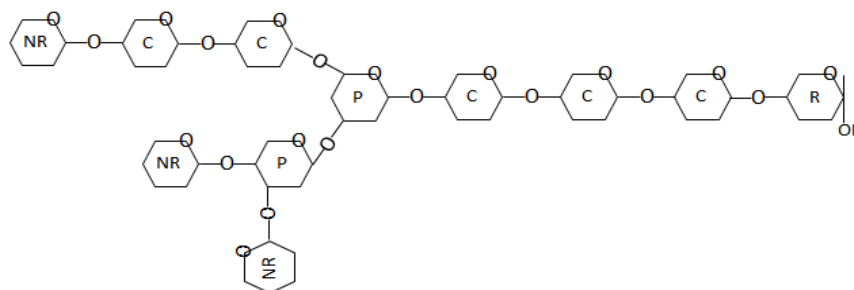
1.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são biopolímeros obtidos principalmente das plantas. Eles são compostos por unidades de monossacarídeos unidos por ligações O-glicosídicas (IZYDORCZYK, 2005). Os polissacarídeos podem ter cadeias lineares ou ramificadas, sendo que à medida que aumenta o grau de ramificações, podem ocorrer mudanças em propriedades funcionais tais como solubilidade em água, viscosidade e capacidade de gelificação (STEPHEN; CHURMS, 2006). Um esquema da estrutura geral de um polissacarídeo é apresentado na Figura 1.3, na qual 'NR' indica extremidade não redutora, R, extremidade reduzida, C, indica unidade de cadeias e P, pontos de ramificação.

Os polissacarídeos podem ser classificados de acordo com o tipo de monômero, sendo homoglicanos aqueles que apresentam apenas um tipo de monossacarídeo e heteroglicanos, os que apresentam dois ou mais tipos de monossacarídeos. Por sua vez, ambos ainda podem ser divididos de acordo o tipo de ligação glicosídica, em α ou β , o que depende da configuração do carbono envolvido na ligação. Os polissacarídeos também podem ser classificados como neutros, os quais são compostos apenas por unidades de açúcares, como por exemplo, a amilose, a amilopectina e a celulose. Os polissacarídeos aniônicos contêm ácidos de açúcar

dentro da sua estrutura, cujos grupos carboxilas lhes conferem carga negativa. Têm-se, como exemplo, as pectinas, as quais são constituídas por resíduos de ácido galacturônico. Os polissacarídeos ainda podem ser catiônicos, como, por exemplo, a quitosana, a qual é obtida pela modificação do polissacarídeo natural quitina, e cuja densidade de carga decorre de seus grupos amino livres (IZYDORCZYK, 2005).

Figura 1.3. Esquema da estrutura geral de um polissacarídeo.



NR: extremidade não redutora, R: extremidade reduzida, C: unidades de cadeia e P: pontos de ramificação.

Fonte: (IZYDORCZYK, 2005)

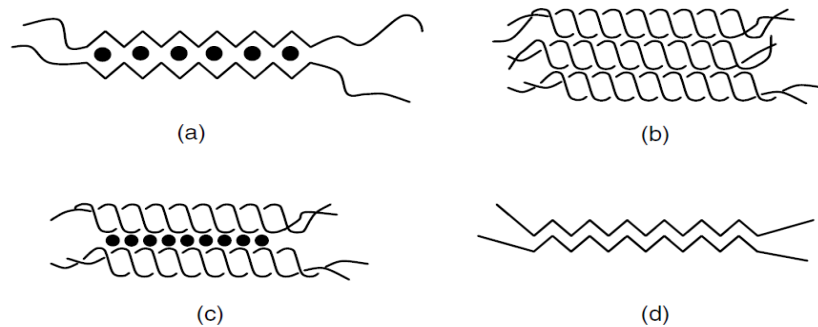
Outra classificação que é comumente utilizada baseia-se na origem do polissacarídeo. Dentre os obtidos a partir de algas, encontram-se alginatos, carragenas e ágar; a partir de plantas, destacam-se celulose e derivados, hemiceluloses, pectinas e gomas exsudadas; a partir de origem microbiana tem-se a goma xantana, a pululana e a goma gelana e a partir de origem animal, encontram-se a quitina e a quitosana (IZYDORCZYK, 2005; IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005).

1.2.1 Gelificação dos polissacarídeos

Para a formação de géis à base de polissacarídeos é necessária diminuição das interações intramoleculares e aumento das interações intermoleculares tais como ligações de hidrogênio, ligações iônicas ou íon-dipolo, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas

(WANG; CUI, 2005). Essas interações são favorecidas pela modificação da temperatura, adição de cátions ou cossolutos, ou mudanças de pH (WANG; CUI, 2005). Durante a gelificação, as cadeias dos polissacarídeos se ligam e formam as denominadas zonas de junção, as quais são a base para a formação da estrutura tridimensional do gel (BUREY et al., 2008; WANG; CUI, 2005). Os polissacarídeos podem apresentar diversas zonas de junção, as quais dependem de fatores como a temperatura, a presença de íons e a estrutura do polissacarídeo, como exemplificado na Figura 1.4.

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).



Fonte: (WANG; CUI, 2005).

A gelificação dos polissacarídeos é afetada por fatores como a estrutura e a conformação molecular dos polissacarídeos, pois são elas que determinam as propriedades do gel e os mecanismos de gelificação. Também pode ser afetada pelo tipo e concentração dos cátions, sendo que, geralmente, a baixas concentrações eles melhoram o processo de gelificação, porém, em concentrações elevadas, os cátions provocam uma diminuição na força do gel, o que pode causar sinérese (WANG; CUI, 2005). Por outro lado, as mudanças no pH provocam alteração nas forças atrativas e repulsivas entre as moléculas do polissacarídeo e/ou entre o solvente, modificando as propriedades de hidratação (BANERJEE; BATTACHARYA, 2012). O efeito de cossolutos de baixa massa molecular, como os açúcares, pode melhorar a gelificação, uma vez que eles competem pela água disponível, o que promove um aumento de interações entre as moléculas do polissacarídeo (WANG; CUI, 2005).

1.2.2 Pectina

A pectina é o componente majoritário da parede celular da planta, sendo encontrada principalmente em frutas e vegetais. As pectinas são compostas por uma sequência linear com ligações 1,4- α -D-galactopiranosilurônico separadas por resíduos de α -L-ramnopiranosil (LAPASIN; PRICL, 1995). Os grupos ácidos carboxílicos nos galacturonanos podem ser esterificados com metila, provocando mudanças na conformação e nas propriedades das pectinas. Além disso, de acordo com o grau de esterificação, as pectinas podem ser subdivididas em pectinas de alta metoxilação, as quais contêm mais de 50 % de ésteres de metila, em pectinas de baixa metoxilação, que contêm menos de 50 % de ésteres de metila, além de pectinas amidadas de baixa metoxilação, nas quais alguns dos grupos metil éster são substituídos por grupos amida (IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005; LAPASIN; PRICL, 1995). O grau de esterificação apresenta um papel fundamental no mecanismo de gelificação das pectinas. Nas pectinas de alta metoxilação a formação de géis é determinada pelas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Além disso, é necessária uma diminuição do pH, a fim de reduzir a repulsão eletrostática, e a presença de açúcar ou cossolutos similares em concentrações acima de 55 %, para evitar as interações entre a água e o polissacarídeo, o que favorece as interações hidrofóbicas entre os grupos metil éster e, conseqüentemente, estabiliza as zonas de junção (IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005; SATO; OLIVEIRA; CUNHA, 2008). Por outro lado, as pectinas de baixa metoxilação requerem a presença de cálcio ou de cátions divalentes para a formação de gel. No entanto, elas conseguem gelificar em uma ampla faixa de pH, com ou sem cossolutos, pelo mecanismo de “egg-box”. Neste mecanismo, duas seções das cadeias pécticas com grupos ésteres livres são mantidas unidas pelos íons de cálcio. Para as pectinas de baixa metoxilação amidada a gelificação ocorre pelo mecanismo de “egg-box” e também através de ligações de hidrogênio do grupo amida, as quais estabilizam as zonas de junção entre as diferentes moléculas de pectina (SATO; OLIVEIRA; CUNHA, 2008; WANG; CUI, 2005).

1.3 Encapsulação

A encapsulação é uma técnica que evoluiu rapidamente nos últimos anos cujos avanços têm estimulado sua aplicação em áreas relevantes como farmacêutica, alimentar, cosmética e agrícola (DEVI et al., 2017). Essa técnica consiste no recobrimento de compostos ativos por um ou mais materiais poliméricos, denominados materiais de parede. Ela tem como objetivo proteger substâncias ativas de condições externas que podem lhes causar danos, como luz, oxigênio, umidade, calor e radicais livres, e assim, melhorar sua estabilidade, prolongando a viabilidade (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014; DEVI et al., 2017; RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016). Além disso, a encapsulação é considerada uma metodologia que modula a liberação do composto bioativo, permitindo que sua liberação seja local e a uma taxa específica, dependendo da aplicação final desejada (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; DEVI et al., 2017).

Entre as diferentes técnicas de encapsulação baseadas em métodos físicos, destacam-se *spray drying*, liofilização, fluidos supercríticos e revestimento em leito fluidizado. *Spray drying* é a metodologia de encapsulação mais antiga e amplamente utilizada na indústria de alimentos, por ser um processo contínuo e uma técnica relativamente econômica (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016). Boas propriedades de proteção, estabilização, solubilidade e liberação controlada de compostos bioativos encapsulados podem ser obtidas por *spray drying*. Por outro lado, a liofilização é uma técnica usada principalmente com materiais termo-sensíveis, já que as baixas temperaturas de processamento conseguem manter as propriedades de aparência, cor, sabor, textura e atividade biológica do material. Porém, em relação à eficiência de proteção e ao controle de liberação do composto bioativo, estes dependerão principalmente da composição e da estrutura do material de parede (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

Entre os métodos físico-químicos, destacam-se a coacervação complexa, a produção de micelas, as emulsões, a gelificação iônica, os complexos de inclusão e os géis de biopolímeros (hidrogéis) (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014; EINHORN-STOLL; DRUSCH, 2015; OKURO et al., 2015). A encapsulação de compostos bioativos em hidrogéis tem se tornado uma alternativa de interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais assim como para aplicações

farmacêuticas (EINHORN-STOLL; DRUSCH, 2015). Os hidrogéis usados na encapsulação devem proteger o composto bioativo contra fatores como pH, alterações químicas e, sobretudo, permitir a liberação específica. Além disso, os hidrogéis à base de biopolímeros têm como principal vantagem o uso de ingredientes naturais tais como proteínas e polissacarídeos (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014).

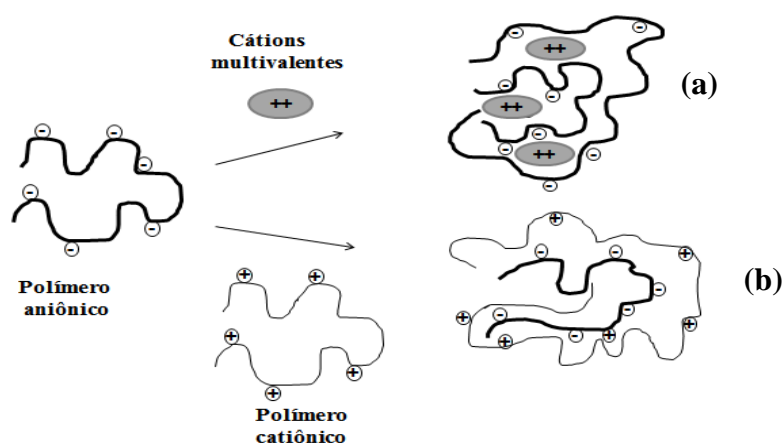
1.3.1 Hidrogéis

Os hidrogéis são estruturas tridimensionais formadas por redes de biopolímeros que têm a capacidade de absorver e reter grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2014; SIVASHANMUGAM et al., 2015). Os hidrogéis podem ser chamados géis físicos quando forças iônicas, de ligações de hidrogênio ou hidrofóbicas estão envolvidas na formação da rede (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2014; HOFFMAN, 2002). Entre os géis físicos encontram-se os hidrogéis ionotrópicos e os coacervados complexos (Figura 1.5). Os primeiros são o resultado da combinação de um polieletrólito com um íon multivalente de carga oposta, como por exemplo, o alginato de sódio com íons Ca^{2+} . Os coacervados complexos são formados a partir da mistura de polieletrólitos de cargas opostas. Além destes, têm-se também os hidrogéis denominados géis permanentes ou químicos, nos quais a formação da rede ocorre através de ligações covalentes (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2014; HOFFMAN, 2002).

Os hidrogéis têm sido estudados amplamente em aplicações médicas e farmacêuticas devido à sua capacidade de proteger os fármacos das condições ambientais adversas, assim como liberá-los em condições de pH e temperatura adequadas (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015; CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006). Na área médica, os hidrogéis têm sido usados no desenvolvimento de lentes de contato, lentes intraoculares, curativos para feridas, adesivos transdérmicos, engenharia de tecidos cirúrgicos, dentre outros (LEE; KWON; PARK, 2013; PARK et al., 2017). Por outro lado, aplicações na área de alimentos têm aumentado nos últimos anos, na encapsulação de sabores e aromas, desenvolvimento de produtos nutracêuticos, criação de novas estruturas ou ainda de texturas que facilitam a deglutição de pessoas com problemas de disfagia. Essas aplicações podem ser alcançadas através do aproveitamento das características dos diferentes hidrogéis, tais como porosidade,

tamanho de poro, textura e propriedades de transferência de massa (CUADROS; AGUILERA, 2015).

Figura 1.5. Esquema de um exemplo de hidrogel “ionotrópico” (a) e um coacervado complexo (b).



Fonte: (HOFFMAN, 2002)

Os hidrogéis usados na encapsulação e posterior liberação de compostos bioativos podem ser produzidos a partir de polissacarídeos, proteínas e misturas polissacarídeo-proteína. A formação de hidrogéis para a encapsulação pode ser realizada de duas formas. A primeira consiste na mistura da substância de interesse com a dispersão do biopolímero, antes da gelificação, sendo este processo denominado como pré-carregamento. A segunda consiste na encapsulação da substância de interesse após a gelificação, sendo este processo denominado pós-carregamento (BETZ et al., 2012).

Geralmente o pré-carregamento dos hidrogéis é a metodologia mais usada para a encapsulação de compostos bioativos de interesse na área de alimentos. A encapsulação de compostos hidrossolúveis em hidrogel tem sido investigada por Belščak-Cvitanović et al. (2015) que estudaram a encapsulação e liberação de cafeína em hidrogéis de alginato em misturas com pectina, carragena, quitosana ou *psyllium*. Eles encontraram que os hidrogéis de alginato e *psyllium* apresentaram a maior eficiência de encapsulação, atingindo uma porcentagem de 83 %, e a menor liberação da cafeína em água correspondeu aos hidrogéis de alginato e quitosana. Betz e Kulozik (2011) pré-incorporaram extrato de mirtilo em hidrogéis

de proteína isolada de soro de leite, e constataram que a taxa de liberação de antocianinas foi influenciada pelas concentrações da proteína e do extrato de mirtilo. Além disso, observaram uma dependência das interações entre a proteína e os constituintes do extrato do mirtilo com o pH, o que ocasionou um efeito negativo sobre gelificação, estabilidade e características de liberação do gel em pH 3, enquanto que em pH 1,5 foi encontrada uma maior estabilidade do gel. Čujić et al. (2016) encapsularam extrato de arônia em esferas de alginato e alginato-inulina, e constataram que as esferas de alginato-inulina apresentaram a melhor eficiência de encapsulação cujo maior conteúdo de polifenóis foi atribuído pelos autores à interação entre grupos hidroxila da inulina e partes polares das moléculas de polifenóis. Betalaína extraída do figo da índia também foi pré-incorporada em hidrogéis de alginato de cálcio e de uma mistura de alginato de cálcio e albumina de soro bovino, sendo que a adição da albumina de soro bovino não afetou a estabilidade do pigmento, o que levou à conclusão que betalaínas encapsuladas nesses hidrogéis podem ser usadas como um corante funcional para a indústria de alimentos (OTÁLORA et al., 2016).

Em relação aos compostos lipossolúveis encapsulados em hidrogéis, têm sido reportados estudos com cúrcuma em fase oleosa, a qual foi encapsulada em hidrogel de quitosana, κ -carragena e carboximetilcelulose de sódio, apresentando um rendimento de encapsulação entre 89-99 % e sensibilidade ao pH, o que foi considerado interessante para sistemas de liberação controlada (NAKAGAWA; SOWASOD; TANTHAPANICHAKOON, 2013). Encapsulação de óleo de eucalipto por gelificação iônica de alginato, como material de parede, também demonstrou ser viável, com eficiência de encapsulação de 88 % e uma liberação que se estendeu por 10 dias (NOPPAKUNDILOGRAT et al., 2015).

O pré-carregamento também foi investigado na encapsulação de probióticos em hidrogéis. Dafe et al. (2017) que encapsularam *Lactobacillus plantarum* ATCC:13643 em hidrogéis de pectina e amido, encontraram maior viabilidade das bactérias em fluido gástrico (SGF) e em solução de sais biliares em comparação com as células que não foram encapsuladas. Também encontraram que a adição de amido à pectina provocou uma melhora na proteção contra as condições adversas no trato gástrico e concluíram que os hidrogéis de pectina-amido são adequados para a liberação de bactérias probióticas. Nessa mesma linha, Song et al. (2013) encapsularam levedura Y 235 em microcápsulas de alginato e quitosana aplicando duas técnicas diferentes, uma delas com incorporação de probióticos no nível desejado e outra, com baixa densidade de probióticos porém, com posterior incubação de 48

horas, durante a qual as células cresceram a níveis similares à carga convencional. As cápsulas foram liofilizadas e a viabilidade analisada durante seu armazenamento. Os autores reportaram que nas condições gastrointestinais simuladas foi obtida uma viabilidade celular de 80 % após 6 meses de armazenamento, demonstrando que a técnica de encapsulação com incubação obteve sucesso.

Todas as pesquisas descritas anteriormente tiveram como alvo a encapsulação de apenas um composto bioativo, porém, autores como Belščak-Cvitanović et al. (2016) avaliaram os hidrogéis de alginato e pectina reforçados com proteína de soro de leite ou hidroxipropilmetilcelulose pela técnica de emulsão e gelificação interna para a liberação simultânea de compostos fenólicos extraídos de dente de leão (composto hidrofílico) e β -caroteno (composto hidrofóbico). Os resultados reportados indicaram que a adição de proteína de soro de leite e a hidroxipropilmetilcelulose aumentaram a eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos e do β -caroteno. De acordo com os autores, esses resultados podem ser atribuídos ao fato de que tanto a proteína de soro de leite como a hidroxipropilmetilcelulose reduziram a difusividade efetiva dos compostos fenólicos e do β -caroteno no hidrogel de alginato ou pectina. Além disso, concluíram que os hidrogéis à base de alginato, isto é, alginato-proteína de soro de leite ou alginato-hidroxipropilmetilcelulose, apresentaram melhor perfil de liberação e maior eficiência de encapsulação que os hidrogéis à base de pectina.

Encapsulação em hidrogéis pós-carregamento geralmente tem sido usada na área de farmácia para a liberação de medicamentos. Por exemplo, o ibuprofeno tem sido encapsulado em alginato de sódio e surfactantes catiônicos brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e brometo de dimetilcetilamônio (16-4-16). Foi encontrado que o hidrogel com brometo de dimetilcetilamônio apresentou uma melhor encapsulação e uma rápida liberação em comparação com o hidrogel que continha CTAB, o que foi atribuído a uma maior porosidade do primeiro (JABEEN et al., 2015). Por outro lado, Ahuja (2015) avaliou o efeito da composição de hidrogéis formados por álcool polivinílico e polissacarídeo carboximetil de semente de tamarindo sobre a liberação de metronidazol. Eles reportaram que as concentrações dos dois materiais de parede tiveram efeito sobre o comportamento de liberação do metronidazol e estabeleceram como concentrações ótimas 8,53 % (m/v) de álcool polivinílico e 6,0 % (m/v) de polissacarídeo carboximetil de semente de tamarindo. Nessa condição foi obtida uma liberação de 75,8 % em um período de 6 horas. Hidrogel de carboximetilcelulose (CMC) reticulada com poli (etileno glicol) diglicidil éter (PEGDE) foi

testado como carreador em sistemas de administração de medicamentos à base de proteína com o objetivo de avaliar sua eficiência e biodegradabilidade. Foi encontrado que o hidrogel apresentava características biodegradáveis em menores graus de reticulação, assim como boas características de adsorção de proteínas como a lisozima e a albumina de soro bovino, o que indicaria que essa matriz poderia ser usada para a encapsulação e liberação de medicamentos à base de proteína (KONO, 2014).

Na área de alimentos, o uso de encapsulação usando o pós-carregamento é incipiente. Entretanto, algumas pesquisas têm sido reportadas, como, por exemplo, o estudo de Rutz et al. (2013), que avaliaram a encapsulação de suco de pitanga usando como biopolímeros para a formação do hidrogel goma xantana, goma tara e sua mistura. Os autores encontraram maior eficiência de encapsulação no hidrogel de goma xantana e a liberação dos carotenoides foi gradual no fluido gástrico e no fluido intestinal. Porém, não foi obtida liberação gradual dos compostos fenólicos com nenhum dos materiais de parede utilizados. Da Rosa et al. (2013), por sua vez, encapsulou extrato fenólico de amoras em hidrogel de goma xantana e quitosana, obtendo uma retenção de 66 % de ácido gálico e de 41 % de epicatequina. Nos testes de liberação foi encontrado que em água a liberação foi gradual, no entanto em solução tampão em pH 4,5 a liberação foi maior que em água, enquanto que em solução tampão em pH 7,4 a liberação foi mais baixa e gradual, quando comparada com a liberação em água ou em pH 4,5.

Os hidrogéis secos recebem denominações dependendo do método de secagem aplicado, sendo denominados xerogéis aqueles desidratados através de ar aquecido, criogéis os obtidos por liofilização e aerogéis os que são submetidos a secagem com fluidos supercríticos (BETZ et al., 2012; HORVAT et al., 2017). Nos xerogéis o processo de secagem provoca tensão superficial da água dentro dos poros, gerando um gradiente de pressão capilar nas paredes do poro que causa encolhimento e fissuras na estrutura (BETZ et al., 2012; MIKKONEN et al., 2013). A liofilização é considerada uma metodologia de secagem que poderia manter a estrutura porosa e as características desejadas do hidrogel úmido, porém, tem sido reportado que durante o processo podem ocorrer fissuras na estrutura (GARCÍA-GONZÁLEZ; ALNAIEF; SMIRNOVA, 2012; MIKKONEN et al., 2013). Por outro lado, na produção dos aerogéis é comum o uso de CO₂ supercrítico, por este ser considerado como GRAS (geralmente reconhecido como seguro). Como as temperaturas usadas são baixas, isso diminui as mudanças na conformação e interação das cadeias da rede do hidrogel seco, provocando menor encolhimento e deformação dos poros (BETZ et al., 2012; MIKKONEN et

al., 2013). Porém, esta metodologia é considerada de alto custo, já que requer equipamentos com resistência às altas pressões (GAUTHIER et al., 2004). Os criogéis e aerogéis têm ganhado interesse da indústria de alimentos e farmacêutica como uma ferramenta para encapsulação de compostos bioativos (BETZ et al., 2012; RUTZ et al., 2013). A utilização de aerogéis em sistemas de liberação de medicamentos tem sido demonstrada com sucesso. Aerogéis à base de proteína de soro de leite foram aplicados como sistemas de liberação do cetroprofeno, com 9,5 % de capacidade de carga, e apresentaram boa liberação em condições simuladas de fluido gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8) (BETZ et al., 2012). Esferas de alginato e amido, secadas por fluidos supercríticos foram usadas como carreadores para a encapsulação de ibuprofeno e paracetamol, sendo que a quantidade de material carregado e a liberação do medicamento mostrou uma dependência com a estrutura e a composição do aerogel (MEHLING et al., 2009). Por outro lado, os criogéis têm sido usados amplamente na encapsulação e liberação de medicamentos tais como, metronidazol, ibuprofeno e medicamentos à base de proteína (AHUJA, 2015; JABEEN et al., 2015; KONO, 2014). Em relação ao uso dos criogéis na encapsulação para aplicação em alimentos, compostos bioativos têm sido encapsulados com sucesso, tais como cafeína (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015), antocianinas (BETZ; KULOZIK, 2011), polifenóis de dente de leão, β -caroteno (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2016) e cúrcuma (ZHANG et al., 2016).

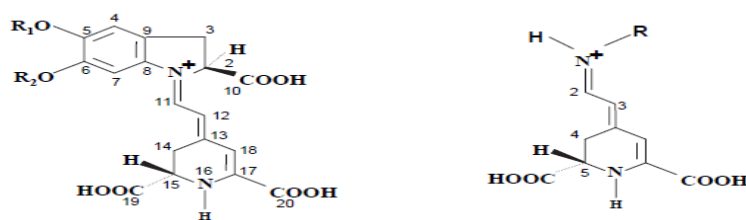
1.4 Betalaínas

As betalaínas são pigmentos hidrossolúveis presentes na maioria das plantas da ordem *Caryophyllales* (GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2016). De acordo com a sua estrutura química, as betalaínas podem ser classificadas como betacianinas ou betaxantinas. Betacianinas são conjugados do ácido betalâmico com um resíduo ciclo-Dopa (ciclo-3,4-diidroxifenilalanina), as quais exibem uma coloração vermelho-púrpura. As betaxantinas, por sua vez, formam o conjugado entre o ácido betalâmico e compostos amino, como aminoácidos ou cadeias laterais de aminas, e apresentam uma coloração amarela (Figura 1.6) (GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2009; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Dentro das betacianinas encontram-se principalmente a betanina, prebetanina, isobetanina e neobetanina. Enquanto que, nas betaxantinas são

predominantes a vulgaxantina I e a vulgaxantina II (CHHIKARA et al., 2019; HERBACH; STINTZING; CARLE, 2004).

As betalaínas vêm sendo consideradas promissoras como substâncias bioativas devido à sua alta capacidade de eliminação de radicais livres, o que lhes confere atividade anti-inflamatória e também elevado potencial como substância quimiopreventiva do câncer (GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Além da importância em termos nutricionais, as betalaínas destacam-se pela importância econômica devido a seu uso como corante alimentar, bastante amplo na indústria de bebidas, de laticínios e confeitarias, assim como na indústria farmacêutica (CHRANIOTI; NIKOLOUDAKI; TZIA, 2015; GÜNEŞER, 2016; MORENO et al., 2008; VERGARA et al., 2014). Porém, o aproveitamento do potencial das betalaínas na indústria de alimentos e farmacêutica é limitado devido a sua baixa estabilidade quando expostas a fatores externos como atividade de água, pH, altas temperaturas, íons metálicos, luz e enzimas. A exposição das betalaínas a pH abaixo de 3 e acima de 7 causa uma maior degradação, porém, esta depende também de outros fatores como a temperatura, a presença ou a ausência de oxigênio. Temperatura e atividade de água altas favorecem as reações hidrolíticas, causando o rompimento da ligação aldimina da betalaína (HERBACH; STINTZING; CARLE, 2006).

Figura 1.6. Estrutura química da betacianinas (a) e Betaxantinas (b).



R₁: glicosil ou derivados

R₂: glicosil, glucuronil,
derivados

R: aminoácido, aminas ou
derivados

Fonte: (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018)

1.5 Reologia

A reologia estuda a relação que existe entre as quantidades físicas, tensão e deformação nos materiais, e permite obter informação sobre o comportamento de escoamento de líquidos, e da deformação de materiais viscoelásticos (RAO, 1999). A reologia tem como objetivo quantificar a relação entre a deformação ou tensão, sobre as propriedades reológicas tais como viscosidade, elasticidade ou viscoelasticidade (FISCHER; WINDHAB, 2011; RAO, 1999). Na área da engenharia de alimentos o uso da reologia tem-se tornado interessante como uma ferramenta importante no dimensionamento de equipamentos, tais como bombas, extrusoras, trocadores de calor, caldeiras, homogeneizadores, entres outros. Também tem sido usada no desenvolvimento de produtos, no controle de qualidade, na avaliação da vida de prateleira dos alimentos e como ferramenta na correlação das propriedades de textura dos alimentos com suas características sensoriais. Muitas das características sensoriais conhecidas estão diretamente relacionadas com alguma propriedade reológica, tais como a cremosidade, viscosidade, espalhabilidade, fluidez, entre outras (BUFFO; REINECCIUS, 2002; STEFFE, 1996).

Os alimentos podem apresentar um comportamento de líquido, ou de sólido, ou ter características tanto de líquido como de sólido, também chamado de comportamento viscoelástico, dependendo da sua composição ou de sua estrutura (FISCHER; WINDHAB, 2011; RAO, 1999). As propriedades reológicas dos alimentos viscoelásticos podem ser determinadas através de testes dinâmicos oscilatórios, nos quais as amostras são submetidas a variações senoidais de deformação ou tensão (STEFFE, 1996). Os testes oscilatórios permitem determinar o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G''), os quais representam a natureza elástica e viscosa do material viscoelástico, respectivamente (LOPES DA SILVA; RAO, 1999). Dentre os testes oscilatórios, têm-se:

- O teste de varredura de deformação ou de tensão, o qual é realizado a uma frequência constante, com o objetivo de determinar a faixa na qual a estrutura do material não experimenta mudanças irreversíveis, conhecida como região de viscoelasticidade linear (RVL). Também é possível determinar a deformação crítica γ_c^0 , a qual é o limite da região de viscoelasticidade linear (RVL) (STEFFE, 1996).
- O teste de varredura de frequência, no qual G' e G'' são determinados como uma função da frequência, na região de viscoelasticidade linear. Este teste permite determinar se o

comportamento é viscoso ou elástico. É útil na avaliação de formulações de alimentos através da análise dos efeitos da adição de aditivos ou de mudanças no processo sobre a viscoelasticidade (LOPES DA SILVA; RAO, 1999; STEFFE, 1996).

- O teste de rampa de temperatura, na qual são avaliados G' e G'' na região de viscoelasticidade linear como uma função da temperatura, sendo usado no estudo de processos de cura e de transições nos alimentos (LOPES DA SILVA; RAO, 1999)
- O teste de varredura de tempo, o qual determina a variação de G' e G'' como uma função do tempo, a frequência e temperatura constantes. Este tipo de teste é usado nas análises de mudanças estruturais dependentes do tempo. Um exemplo aplicação é o estudo da gelificação de pectina (LOPES DA SILVA; RAO, 1999; STEFFE, 1996).

As seguintes relações descrevem o comportamento de um material sob os testes dinâmicos oscilatórios:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \times \text{sen}(\omega t) \quad (1)$$

$$\dot{\gamma} = \omega \times \gamma_0 \times \text{cos}(\omega t) \quad (2)$$

$$\tau(t) = \gamma_0 [G' \times \text{sen}(\omega t) + G'' \times \text{cos}(\omega t)] \quad (3)$$

sendo γ é a deformação no tempo (t), γ_0 é a magnitude da deformação senoidal, ω é a frequência oscilatória, $\dot{\gamma}$ é a taxa da deformação, G' é o componente, em fase, denominado componente de armazenamento ou módulo elástico; e G'' é o componente fora de fase, denominado componente de perda ou módulo viscoso.

Definindo um ângulo de fase δ como o parâmetro relacionado com a energia perdida por ciclo, dividido pela energia armazenada; a tensão em forma senoidal é dada a seguir:

$$\tau(t) = \tau_0 \times \text{sen}(\omega t + \delta) \quad (4)$$

G' e G'' estão correlacionados pela Equação (5). Define-se um módulo complexo (G^*) segundo a Equação (6):

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (5)$$

$$G^* = G' + iG'' \quad (6)$$

A magnitude de G^* é dada pela Equação (7) (ZHONG; DAUBERT, 2007).

$$G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0} = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (7)$$

O uso dos testes oscilatórios em géis tem sido reportado por Anvari e Chung (2016). Eles caracterizaram géis à base de goma de sementes de *Alyssum homolocarpum*, através de testes de varredura, de deformação e de frequência, e determinaram que os géis apresentam um comportamento viscoelástico, e uma estrutura fraca. Da mesma forma, Razmkhah et al. (2017) determinaram que as dispersões de goma de semente de agrião apresentam um comportamento viscoelástico e formam géis fracos. Por outro lado, Estévez et al. (2016), usando o teste de rampa de temperatura, determinaram que a transição de sol-gel de soluções de β -lactoglobulina a 7,5 % ocorre a 68,3 °C, onde G' e G'' se cruzam. Em relação ao emprego da reologia na caracterização de hidrogéis usados como matrizes na microencapsulação de compostos bioativos, Betz e Kulozik (2011) avaliaram o efeito da adição de extrato de mirtilo sobre a gelificação térmica de proteína isolada de soro de leite (20 % m/m, proteína) em pH 1,5. Eles encontraram que o tempo de gelificação foi de 2,3 minutos a uma temperatura de 70 °C, enquanto que, sem adição do extrato, foi de 3 minutos, concluindo assim que o tempo de gelificação foi alterado pela adição do extrato de mirtilo.

Testes reológicos também permitem avaliar as interações que ocorrem quando são misturados proteínas e polissacarídeos, e se ocorre um efeito sinérgico ou antagônico entre eles. A ocorrência do sinergismo é definida como o aumento do módulo do armazenamento (G') em comparação ao biopolímero isolado, enquanto que o antagonismo ocorre quando se apresenta uma diminuição no valor do módulo de armazenamento (G') (TOLSTOGUZOV, 1995). O sinergismo entre biopolímeros tem sido reportado entre gelatina B e goma xantana em pH acima do ponto isoelétrico (WANG et al., 2016), assim como entre goma alfarroba e

proteína isolada de soja (CHANG et al., 2014), enquanto que o antagonismo tem sido reportado entre goma xantana e goma alfarroba (MANNION et al., 1992).

1.6 Referências

AHUJA, Munish. Metronidazole loaded carboxymethyl tamarind kernel polysaccharide-polyvinyl alcohol cryogels: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 931–938, 2015.

ANVARI, Mohammad; CHUNG, Donghwa. Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin - Gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 516–524, 2016.

BANERJEE, Soumya; BATTACHARYA, Suwendu. Food Gels: Gelling Process and New Applications. **Advances in Food Rheology and Its Applications**, v. 52, n. 4, p. 334–346, 2012.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, Ana et al. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. **Food Chemistry**, v. 167, p. 378–386, 2015.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, Ana et al. Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and b-carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 139–152, 2016.

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.

BETZ, Michael; KULOZIK, Ulrich. Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 9, p. 703–710, 2011.

BUFFO, Roberto A.; REINECCIUS, Gary A. Modeling the rheology of concentrated beverage emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 51, n. 4, p. 267–272, 2002.

BUREY, P. et al. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 5, p. 361–77, 2008.

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.

CHANG, Yuan-yuan et al. Effect of gums on the rheological characteristics and microstructure of acid-induced SPI-gum mixed gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 183–191, 2014.

CHEN, Lingyun; REMONDETTO, Gabriel E.; SUBIRADE, Muriel. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and 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.

CHRANIOTI, Charikleia; NIKOLOUDAKI, Aspasia; TZIA, Constantina. Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: Incorporation in a chewing gum system. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 252–263, 2015.

COMUNIAN, Talita A.; FAVARO-TRINDADE, Carmen S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids : A review. **Food hydrocolloids**, v. 61, p. 442–457, 2016.

CORONEL-AGUILERA, Claudia P.; SAN MARTÍN-GONZÁLEZ, M. Fernanda. Encapsulation of spray dried β -carotene emulsion by fluidized bed coating technology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 187–193, 2015.

CROGUENNEC, T.; NAU, F.; BRULÉ, G. Influence of pH and Salts on Egg White Gelation. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 608–614, 2002.

CUADROS, Teresa R.; AGUILERA, José M. Gels as Precursors of Porous Matrices for Use in Foods : a Review. **Food Biophysics**, v. 10, n. 4, p. 487–499, 2015.

ĆUJIĆ, Nada et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L .) extract loaded in alginate and alginate / inulin system. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 120–131, 2016.

DA ROSA, Cleonice Gonçalves et al. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 138–146, 2013.

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.

DAVIDOV-PARDO, Gabriel; MCCLEMENTS, David Julian. Resveratrol encapsulation : Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 2, p. 88–103, 2014.

DE JONGH, H. H. Globular proteins. In: **Progress in Biochemistry**. Elsevier Science B.V, 2003. p. 35–86.

DE SOUZA, Volnei Brito et al. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification by products of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 39–50, 2013.

DEVI, Nirmala et al. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136–145, 2017.

DOMODARAN, Srinivasan. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. In: DOMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk; FENNEMA, Owen R. (Eds.). **Química de Alimento de Fennema**. 4. ed. Santana: Artmed, 2010. p. 180–260.

DONATO, Laurence. et al. Mechanism of formation of stable heat-induced b-lactoglobulin microgels. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 5, p. 295–306, 2009.

EINHORN-STOLL, Ulrike; DRUSCH, Stephan. Methods for investigation of diffusion processes and biopolymer physics in food gels. **Current Opinion in Food Science**, v. 3, p. 118–124, 2015.

ESCRIBANO, Josefa et al. Characterization of betalains , saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. **Food Chemistry**, v. 234, p. 285–294, 2017.

ESTÉVEZ, Natalia et al. Structural and thermo-rheological analysis of solutions and gels of a β -lactoglobulin fraction isolated from bovine whey. **Food Chemistry**, v. 198, p. 45–53, 2016.

FARJAMI, Toktam; MADADLOU, Ashkan; LABBAFI, Mohsen. Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels. **Food Hydrocolloids**, v. 50, p. 159–165, 2015.

FATHI, Milad; JULIAN, David. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, n. 1, p. 18–39, 2014.

FISCHER, Peter; WINDHAB, Erich J. Rheology of food materials. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 16, n. 1, p. 36–40, 2011.

GANDÍA-HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa; GARCÍA-CARMONA, Francisco. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 6, p. 1142–1146, 2009.

GANDÍA-HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa; GARCÍA-CARMONA, Francisco. Biological Activities of Plant Pigments Betalains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 937–945, 2016.

GARCÍA-GONZÁLEZ, Carlos A.; ALNAIEF, Mohammad.; SMIRNOVA, Irina. Preparation of tailor-made starch-based aerogel microspheres by the emulsion-gelation method. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1378–1386, 2012.

GAUTHIER, Ben M. et al. A fast supercritical extraction technique for aerogel fabrication. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 350, p. 238–243, 2004.

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

HANDA, Akihiro et al. Heat-induced Egg White Gels as affect by pH. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 403–407, 1998.

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

HOFFMAN, Allan S. Hydrogels for biomedical applications. **Advances Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 3–12, 2002.

HORVAT, Gabrijela et al. Novel ethanol-induced pectin-xanthan aerogel coatings for

orthopedic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 365–376, 2017.

IKEDA, Shinya; FOEGEDING, E. Allen. Dynamic viscoelastic properties of thermally induced whey protein isolate gels with added lecithin. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 3, p. 245–254, 1999.

IKEDA, Shinya; FOEGEDING, E. Allen; HAGIWARA, Tomoaki. Rheological Study on the Fractal Nature of the Protein Gel Structure. **Langmuir**, v. 15, n. 25, p. 8584–8589, 1999.

IZYDORCZYK, Marta. Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. In: CUI, Steve W. (Ed.). **Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

IZYDORCZYK, Marta; CUI, Steve W.; WANG, Qi. Polysaccharide Gums: Structures, Functional Properties, and Applications. In: CUI, Steve W. (Ed.). **Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

JABEEN, Suraya et al. Hydrogels of sodium alginate in cationic surfactants : Surfactant dependent modulation of encapsulation / release toward Ibuprofen. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 144–153, 2015.

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

JUNG, Jiyoun; ARNOLD, Robert D.; WICKER, Louise. Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon-targeted drug delivery carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 116–121, 2013.

KONO, Hiroyuki. Characterization and properties of carboxymethyl cellulose hydrogels crosslinked by polyethylene glycol. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 84–93, 2014.

LAPASIN, Romano; PRICL, Sabrina. **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. 1. ed. Padstow: Blackie Academic & Professional, 1995.

LEE, Sang Cheon; KWON, Il Keun; PARK, Kinam. Hydrogels for delivery of bioactive agents : A historical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 17–20, 2013.

LOPES DA SILVA, Jose Antonio; RAO, Anandha. Rheological Behavior of Food Gel

Systems. In: RAO, Anandha M. (Ed.). **Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Application**. First edit ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc., 1999. p. 320.

MANNION, Richard O. et al. Xanthan Locust Bean Gum Interactions at Room-Temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, n. 2, p. 91–97, 1992.

MEHLING, Tanja et al. Polysaccharide-based aerogels as drug carriers. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 355, n. 50–51, p. 2472–2479, 2009.

MIKKONEN, Kirsi S. et al. Prospects of polysaccharide aerogels as modern advanced food materials. **Trends in Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 124–136, 2013.

MINE, Yoshinod. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 7, p. 225–232, 1995.

MORENO, Diego A. et al. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 261–280, 2008.

NAKAGAWA, Kyuya; SOWASOD, Nataporn; TANTHAPANICHAKOON, Wiwut. Hydrogel based oil encapsulation for controlled release of curcumin by using a ternary system of chitosan, kappa- carrageenan, and carboxymethylcellulose sodium salt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 600–605, 2013.

NOPPAKUNDILOGRAT, Supaporn et al. Encapsulated eucalyptus oil in ionically cross-linked alginate microcapsules and its controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 23–33, 2015.

OKURO, Paula K. et al. Structures design for protection and vehiculation of bioactives. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 67–75, 2015.

ONWULATA, Charles I. Microencapsulation and functional bioactive foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 5, p. 510–532, 2013.

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.

PĂDURARU, Oana Maria et al. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/cellulose cryogels and their testing as carriers for a bioactive component. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 8, p. 2508–2515, 2012.

PARK, Sung-bin et al. Progress in Polymer Science Biopolymer-based functional composites for medical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 68, p. 77–105, 2017.

PASRIJA, Divya et al. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 289–296, 2015.

PHILLIPS, Lance G.; WHITEHEAD, Dana M.; KINSELLA, John. **Structure-Function Properties of Food Proteins**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1994.

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

POMERANZ, Yeshajahu. **Functional Properties of Food Components**. 1. ed. Pullman: Academic Press, 1985.

RAO, M. Anandha. Introduction. In: RAO, M. Anandha (Ed.). **Rheology of Food and Semisolid Food**. 1. ed. Gaithersburg: Aspen Publication, 1999. p. 1–22.

RAY, Sohini; RAYCHAUDHURI, Utpal; CHAKRABORTY, Runu. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016.

RAZMKHAH, Somayeh; RAZAVI, Seyed Mohammad Ali; MOHAMMADIFAR, Mohammad Amin. Dilute solution, flow behavior, thixotropy and viscoelastic characterization of cress seed (*Lepidium sativum*) gum fractions. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 404–413, 2017.

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.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Betalains. In: MELTON, Laurence; SHAHIDI, Fereidoon;

VERELIS, Peter (Eds.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 35–39.

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.

SATO, Ana C. K.; OLIVEIRA, Pablo R.; CUNHA, Rosiane L. Rheology of Mixed Pectin Solutions. **Food Biophysics**, v. 3, p. 100–109, 2008.

SAVOIE, V. J.; ARNTFIELD, Susan D. Effect of pH and cations on the thermally induced gelation of ovalbumin. **Journal of Texture Studies**, v. 27, n. 3, p. 287–306, 1996.

SCHWENKE, Klaus Dieter. Proteins: Some principles of classification and structure. In: MÖBIUS, D.; MILLER, R. (Eds.). **Proteins at Liquid Interfaces**. Elsevier Science B.V, 1998. p. 1–50.

SIVASHANMUGAM, Amirthalingam et al. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 543–565, 2015.

SONG, Huiyi et al. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 181–189, 2013.

STADING, Mats; HERMANSSON, Anne-Marie. Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 2, p. 121–135, 1990.

STEFFE, James F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. East Lansing: Freeman Press, 1996.

STEPHEN, Alistair M.; CHURMS, Shirley C. Introduction. In: STEPHEN, Alistair M.; PHILLIPS, Glyn O.; WILLIAMS, Peter A. (Eds.). **Food Polysaccharides and Their Applications**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 1–24.

TANG, Qingnong; MCCARTHY, Owen J.; MUNRO, Peter A. Oscillatory Rheological Comparison of the Gelling Characteristics of Egg White, Whey Protein Concentrates, Whey Protein Isolate, and b-Lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 2126–2130, 1994.

TOLSTOGUZOV, Vladimir B. Some physico-chemical aspects of protein processing in

foods. Multicomponent gels. **Topics in Catalysis**, v. 9, n. 4, p. 317–332, 1995.

VERGARA, Cristina et al. Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. **Food Chemistry**, v. 157, p. 246–251, 2014.

WANG, Chang Sheng et al. Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 374–383, 2016.

WANG, Qi; CUI, Steve W. Understanding the Physical Properties of Food Polysaccharides. In: CUI, Steve W. (Ed.). **Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

ZHANG, Zipei et al. Encapsulation of curcumin in polysaccharide-based hydrogel beads: Impact of bead type on lipid digestion and curcumin bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 160–170, 2016.

ZHONG, Qixin; DAUBERT, Christopher R. Food Rheology. In: KUTZ, Myer (Ed.). **Handbook of Farm, Dairy, and Food Machinery**. Norwich: William Andrew, 2007. p. 391–414.

**CAPITULO II. Rheological and structural characterization of gels from albumin
and low methoxyl amidated pectin mixtures**

Artigo publicado na Food Hydrocolloids doi: [10.1016/j.foodhyd.2019.01.025](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.025)

Rheological and structural characterization of gels from albumin and low methoxyl amidated pectin mixtures

Ana María Chaux-Gutiérrez^{1*}, Ezequiel José Pérez-Monterroza¹, Maria Aparecida Mauro¹

Affiliation:

¹ Department of Food Engineering and Technology; São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), São José do Rio Preto; Rua Cristovão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Corresponding author: anachauxg@gmail.com, ana.chaux@unesp.br

Abstract

The rheological behavior of gels prepared from albumin (ALB) and a mixture of ALB and low methoxyl amidated pectin (PEC) with different proportions were studied using oscillatory rheological tests, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR spectroscopy), zeta potential measurements and confocal microscopy. The mixture was always 5 % of the total solute. Assays were performed in two series, one in which all mixtures were adjusted to pH = 8 and another one without pH adjustment. The zeta potential values indicated the presence of a negative net charge on ALB-PEC gels. The rheological tests indicated a frequency dependence of the storage (G') and loss (G'') moduli, with $G' > G''$. The presence of 1 % and 2 % of pectin in the mixture caused an increase in G' . However, a PEC concentration above 2 % led to a decrease in G' , regardless of the pH or frequency. FT-IR spectroscopy indicated that as the PEC content increased, a higher proportion of β -sheet structures was found. Confocal microscopy also confirmed aggregation of ALB particles due to the PEC concentration.

Keywords: rheology; confocal microscopy; gelation; protein; polysaccharides; biopolymers.

2.1 Introduction

Globular proteins and polysaccharides are biopolymers of great interest in industry due to their gelation properties (Clark 1996; DONATO et al., 2005). Albumin is a globular protein with useful functional properties, such as foaming, emulsifying and gelling, and it possesses water-binding capacity and high nutritional value. Of particular interest is the gelling ability because it allows the modification of the structure and texture of foods (IKEDA; NISHINARI, 2001; KALKANI; PARASKEVOPOULOU; KIOSSEOGLU, 2007; LIANG; KRISTINSSON, 2007). Albumin denaturation occurs at a temperature above 80 °C, producing changes in the quaternary, tertiary and secondary structures, which in turn induce the formation of aggregates with high molecular weight through disulfide and thiol-disulfide or by hydrogen bonding, hydrophobic and electrostatic interaction. Subsequently, the aggregates increase the system viscosity until a gel network is finally formed (CROGUENNEC; NAU; BRULÉ, 2002; FOEGEDING; LI; BOTTCHEER, 1998).

On the other hand, polysaccharides obtained from plant tissues and fruits such as pectins have gelling ability at different pH levels in the presence of calcium ions and sugar (Donato et al., 2005; SATO; OLIVEIRA; CUNHA, 2008). Pectins have a linear 1,4- α -D-galactopyranosyluronic acid chain separated by α -L-rhamnopyranosyl residues. Nevertheless, ferulic acid may also be a substituent of the main chain (LAPASIN; PRICL, 1995). The pectin structures define their functional properties. For instance, the gelling ability is affected by the distribution of rhamnopyranoses and the methylation degree (CROS et al., 1992). The carboxyl groups of pectin can be methylesterified at different degrees, generating high (≥ 50 % DE) or low (< 50 % DE) methoxyl pectins (DICKINSON, 2003). Pectins esterified with an amide group are known as low methoxyl amidated pectins. Pectin with a low degree of methylation forms gels in the presence of Ca^{2+} ions in a wide pH range. This process involves electrostatic interactions between the cation and the residues of galacturonic acid through the 'egg-box' gelling mechanism (ALONSO-MOUGÁN et al., 2002; SATO; OLIVEIRA; CUNHA, 2008).

The mechanical properties of gels produced only from proteins and only from polysaccharides can be modified when the biopolymers are mixed compared to when used individually (CHANG et al., 2014; ROCHA et al., 2009). The electrostatic forces of attraction or repulsion between proteins and polysaccharides change the rheological properties

(increasing or decreasing G'), the gel structure and their physicochemical properties (BI et al., 2013). These interactions depend on the pH, ionic strength and protein/polysaccharide ratio (BERTRAND; TURGEON, 2007; WANG et al., 2016). In simultaneous gelation of polysaccharides mixed with proteins, several authors have reported an increase in G' due to the addition of polysaccharide as result of a synergistic effect between the biopolymers (CHANG et al., 2014; SITTIKIYOTHIN; SAMPAIO; GONÇALVES, 2007; WANG et al., 2016). However, when the concentration of polysaccharide increases above a critical condition or there are changes in the pH, a decrease in G' is observed. This behavior has been attributed to an antagonistic effect between protein and polysaccharide. For instance, Sanchez et al. (1997) reported an antagonistic effect in mixtures between whey protein isolate (WPI) and xanthan in the pH range between 5.5 and 7.5 and at concentrations between 0.2 % and 0.5 % w/w. Moreover, the addition of 0.01 to 0.06 % of xanthan gum at pH 6.0 increased the gel strength, and a decrease in pH to 5.5 caused a decrease in G' (BERTRAND; TURGEON, 2007). The study of interactions between proteins and polysaccharides and the effect on the rheological properties of their gels is of great interest to the food industry due to the manner in which these gels can be used as wall materials in the microencapsulation and release of bioactive compounds (SCHMITT; ABERKANE; SANCHEZ, 2009; TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007). Studies concerning gels prepared from a mixture of albumin (ALB) and low methoxyl amidated pectin (PEC) have not been reported in the literature. For this reason, the objective of this study was to evaluate the effect of PEC and pH on the rheological and structural properties of gels based on albumin.

2.2 Materials and methods

Commercial albumin powder from chicken egg white (ALB) was obtained from Naturovos Ltda. (Salvador do Sul, RS, Brazil, 90 % protein, 4.98 % ash, 0.06 % lipids). Low methoxyl amidated pectin (PEC) was obtained from Danisco Ltda. (GRINDSTED[®] LA 210, Sao Paulo, SP, Brazil, degree of esterification (DE) 34 %, degree of amidation (DA) 17 % and sugar content 32 %). Sodium hydroxide, calcium chloride, and hydrochloric acid were supplied by Synth (Diadema, SP, Brazil). All chemicals were of analytical grade. The gels were prepared using deionized water.

2.2.1 Preparation of ALB and ALB-PEC gels

Albumin and pectin dispersions were prepared separately at 25 °C under constant stirring for 3 h. The gels were prepared as detailed in Table 2.1. The ALB dispersion was heated at 85 °C under magnetic stirring for 15 min and then cooled to 40 °C. After cooling, the PEC dispersion and calcium chloride solution (2 % m/v) were added, stirred (700 rpm ~ 10 min) and, then, placed in petri dishes (60 mm × 15 mm) until gels formed. Then, the gels were kept at 4 °C until use. The effect of the pH on the rheological properties was evaluated by adjusting the pH (HCl (0.1 M)/NaOH (0.1 M)) of all samples to 8 following the same formulation detailed in Table 2.1.

Table 2.1. Quantities of ALB, PEC, CaCl₂ solution and water in the formulation of the ALB and ALB-PEC gels and corresponding pH.

Gel	ALB (g)	PEC (g)	CaCl ₂ Solution (g)	Water (g)	pH
ALB 5 %	10	-	-	190	8.0
ALB-PEC (PEC 1 %)	8	2	2	188	8.0
ALB-PEC (PEC 2 %)	6	4	4	186	6.9
ALB-PEC (PEC 2.5 %)	5	5	5	185	5.7
ALB-PEC (PEC 3 %)	4	6	6	184	5.1
ALB-PEC (PEC 4 %)	2	8	8	182	4.7

2.2.2 Zeta (ζ)-potential

ζ -potential measurement was performed with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K) according to the methodology proposed by Huan et al. (2016) with slight modifications. The gels were diluted with distilled water to a concentration of 0.5 %. The analyses were performed in triplicate.

2.2.3 Dynamic oscillatory rheological analyses

Oscillatory rheological tests were performed using an AR-2000EX rheometer (TA Instruments, Delaware, USA) with a geometry of serrated parallel plates (40 mm of diameter) and a gap of 700 μm . The rheological test was performed in the linear viscoelastic region (LVR), which was determined previously for all samples through of a stress sweep test at 10 Hz. Frequency sweep tests were performed at 25 °C in the range from 0.1 to 10 Hz. The prepared gels were carefully placed on the rheometer plate using a spatula and left at rest for 5 min before measurements. The effects of pH and PEC added on the dynamic rheological properties were studied via measurements of the storage (G') and loss (G'') moduli in samples with or without adjustment of pH. The analyses were performed in duplicate.

2.2.4 FT-IR spectroscopy

FT-IR spectra were recorded using a Spectrum One Spectrum (Perkin-Elmer Corp, Shelton, CT, USA) with attenuated total reflectance accessory with a ZnSe crystal. Samples were analyzed directly after pressing them on the crystal (80 psi). The scanning was conducted from 4000 to 400 cm^{-1} using 20 scans, with a resolution of 4 cm^{-1} . The analyses were performed in duplicate.

2.2.5 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

ALB dispersion was stained using rhodamine isothiocyanate B ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min prior to gelation. Then, preparation of the gels was performed as described above. CLSM was recorded using a Zeiss LSM 710 confocal laser microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). ALB observation was made via excitation of the rhodamine isothiocyanate B at 543 nm, and the emission was recorded in the wavelength range from 548-685 nm.

2.3 Results

2.3.1 Zeta potential

Figure 2.1S (supplementary material) shows the ζ - potential and phase diagram of the ALB and ALB-PEC gels in the pH range between 4 and 8. The results suggest that isoelectric point (pI) of ALB gel is near the point of charge reversal, pH 3.6, which is a value lower than that the pH values achieved for ALB-PEC gels without adjustment of pH; this result indicates that there is no formation of coacervated between ALB and PEC. The ζ -potential of ALB gel decreased with increased pH and remained negative. In contrast, the PEC gel exhibited a slight decrease in the negative ζ -potential compared with the ALB gel (Figure 2.1Sa). In turn, the ALB-PEC gels had ζ -potential values between these exhibited by the ALB and PEC gels (Figure 2.1Sa). This behavior indicates changes in the electrostatic patterns due to the interaction of biopolymers chains, even though the net charges of the gels remained negative in the entire pH range studied. The ζ -potential decreased with an increase in the PEC concentration (Table 2.2) at pH 8.0 and at the non-adjusted pH, except when the PEC concentration was 2.5 and 3 % at pH 8.0 or when it was 2.5 % at the non-adjusted pH.

Overall, the surface charge density of the gels became more negative than the protein charge because of the presence of anionic group of the polysaccharide. Conversely, the increase in the ζ -potential suggests that the sites positively charged in the ALB have a greater interaction with the sites negatively charged along the neighborhood of ALB or PEC chains (ZHANG; HSIEH; VARDHANABHUTI, 2014).

Figure 2.1 S. Zeta potential of ALB, PEC and ALB-PEC gels (a). Phase diagram of ALB and ALB-PEC – effects of pH and PEC concentration with addition of calcium chloride (b). Phase diagram ALB and ALB-PEC PEC – effects of pH and PEC concentration without addition of calcium chloride (c).

Open symbol represents liquid and Solid symbol represents gel.

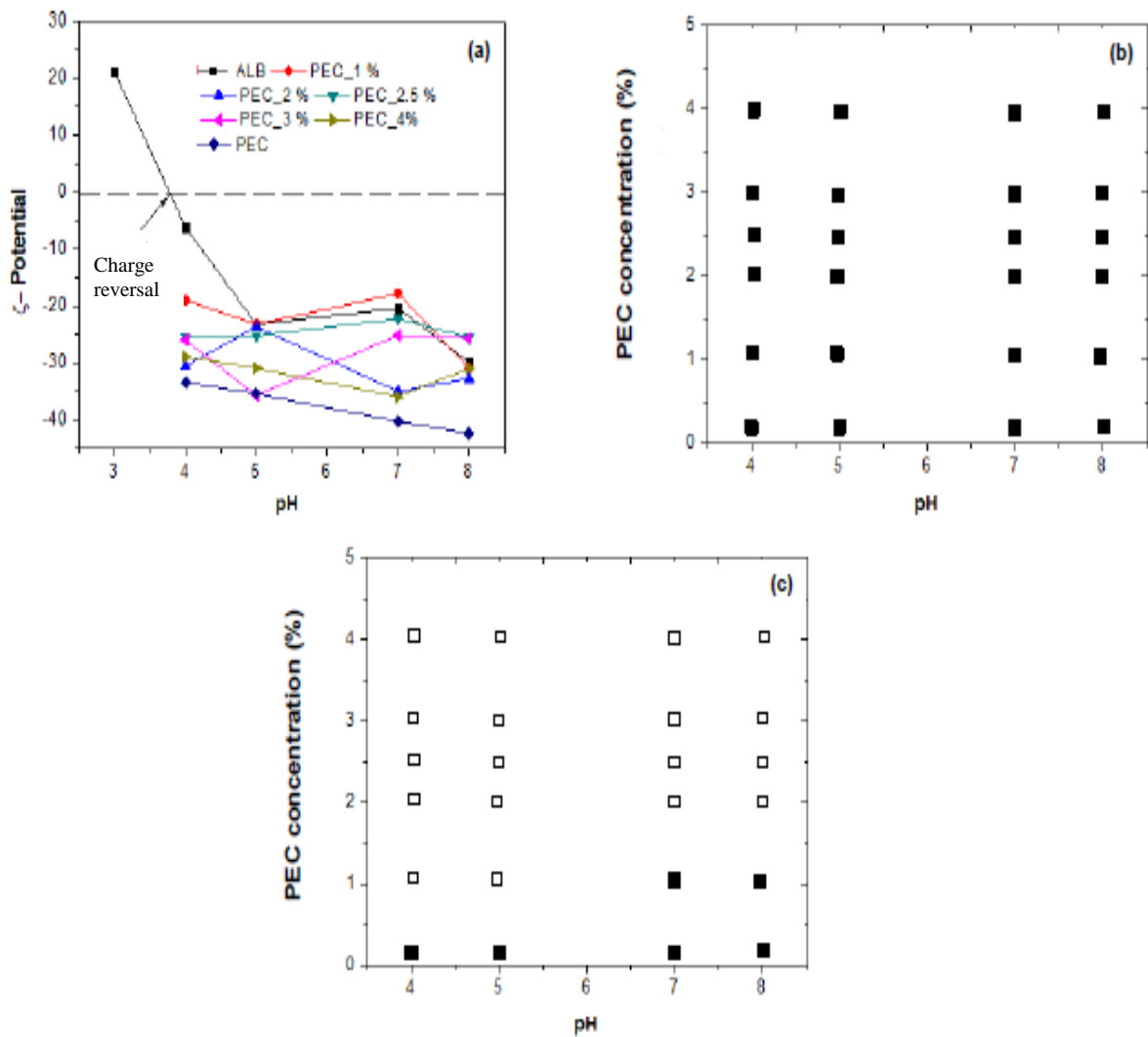


Table 2.2. Zeta potential (mV) of ALB and ALB-PEC gels at pH 8 and non-adjusted pH.

Sample	pH 8	non-adjusted pH
ALB 5 %	-29.90 ± 2.27^{bcd}	-29.90 ± 2.27^{bcd} (pH 8)
ALB-PEC (PEC 1 %)	-30.93 ± 3.17^{cd}	-30.93 ± 3.17^{cd} (pH 8.0)
ALB-PEC (PEC 2 %)	-32.73 ± 3.03^{ed}	-35.23 ± 2.28^c (pH 6.9)
ALB-PEC (PEC 2.5 %)	-25.55 ± 1.43^a	-26.72 ± 1.74^{abc} (pH 5.7)
ALB-PEC (PEC 3 %)	-25.70 ± 1.46^{ab}	-35.70 ± 2.17^c (pH 5.1)
ALB-PEC (PEC 4 %)	-30.92 ± 2.55^{cd}	-30.90 ± 1.56^{cd} (pH 4.7)

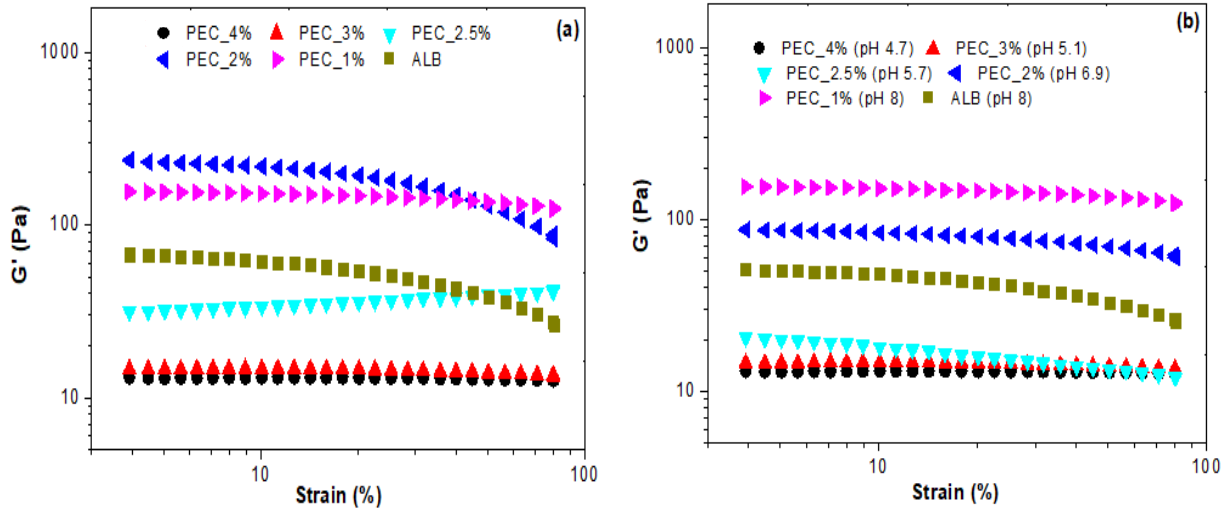
All of the values are the mean \pm standard deviations. Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.3.2 Dynamic rheological analyses

2.3.2.1 Strain sweep

Figure 2.1 shows the dependence of G' on the strain. Two regions are important in the mechanical spectra of Figure 2.1. The first one corresponds to the linear viscoelasticity region (LVR) in which G' is constant, and the second one corresponds to the point known as critical deformation (γ_c^0). Critical deformation represents the limit of linear viscoelasticity regime. The addition of 2 % of PEC (pH 8) led to a decrease in the γ_c^0 (Figure 2.1a). Regarding the samples prepared at non-adjusted pH, the addition of 2.5 % PEC (pH 5.7) led to a significant decrease in the γ_c^0 (Figure 2.1b). A decrease in the γ_c^0 , in turn, indicates a decrease in the permanent deformation, caused by the modification in the junction zones, in addition to an increase in the heterogeneity of the gel network (STADING; HERMANSSON, 1990). According to the results, 5 % strain was selected for the frequency sweep tests.

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.

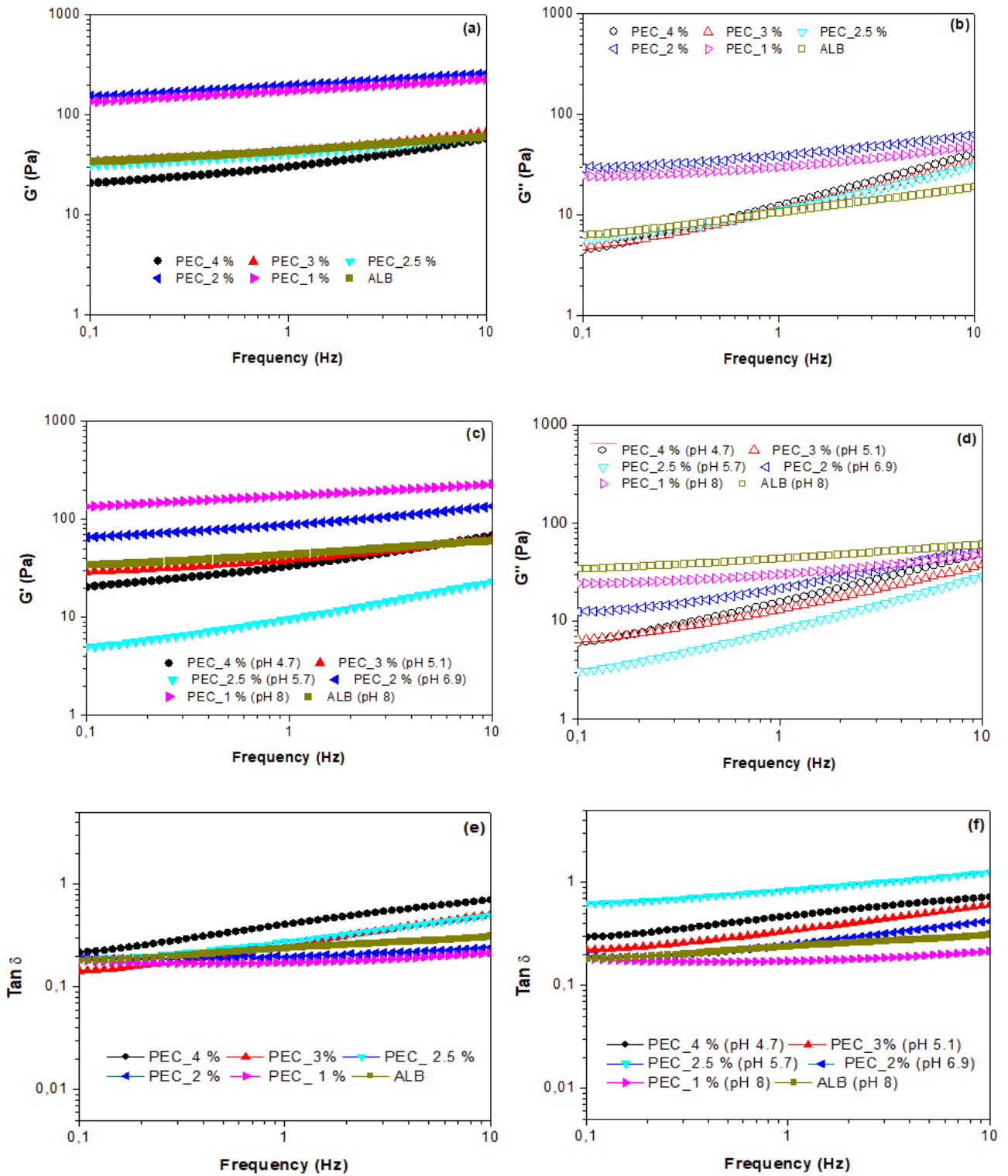


2.3.2.2 Frequency Sweep

Figure 2.2 shows the frequency sweep tests of gels from ALB and ALB-PEC at pH 8. The frequency sweep tests showed a greater G' than G'' without crossover, in the range between 0.1 and 10 Hz ($0.6283 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ and $62.83 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$), indicating an elastic and gel-like behavior. Gels with 1 % and 2 % PEC exhibited increases in G' (Figure 2.2a), whereas gels with 2.5 and 3 % PEC exhibited behavior similar to that of the ALB gel. Conversely, the addition of 4 % PEC led to a slight decrease in G' in comparison to the ALB gel (Figure 2.2a).

All samples exhibited a gel-like behavior with $G' > G''$. Additionally, a frequency dependence of G' was observed. The addition of 1 % (pH 8) and 2 % (pH 6.9) PEC led to an increase in G' , whereas in the gel with 3 % PEC (pH 5.1), G' had a behavior similar to that observed in the gel of ALB. However, the presence of 2.5 % (pH 5.7) and 4 % (4.7) PEC led to a decrease in G' (Figure 2.2c).

Figure 2.2. Frequency sweep at 25 °C for ALB and ALB-PEC gels at pH 8: G' (a), G'' (b) and $\text{Tan } \delta$ (e) and at non-adjusted pH: G' (c), G'' (d) and $\text{Tan } \delta$ (f).

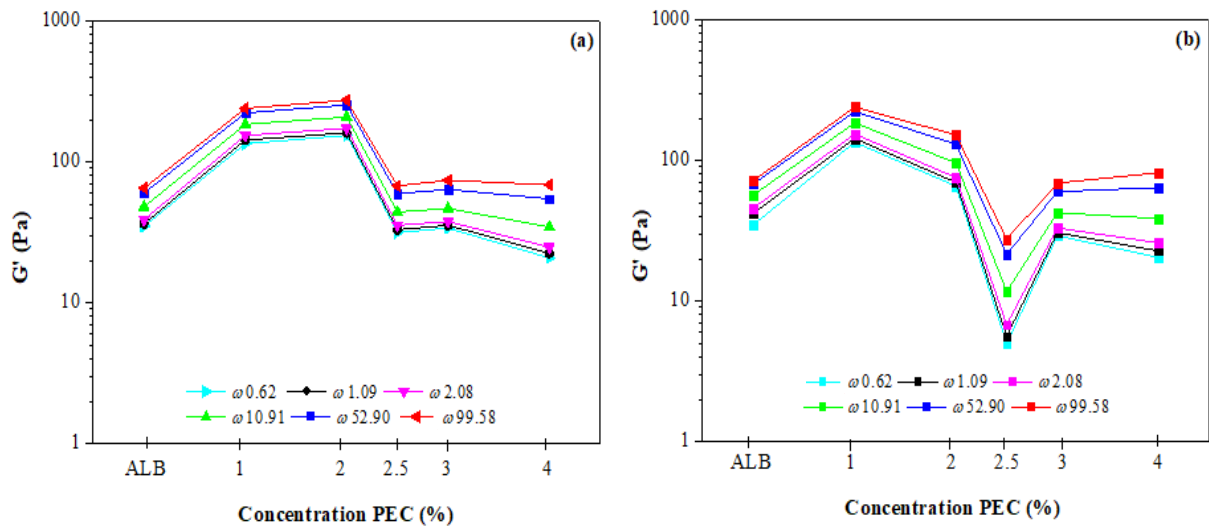


The increase in G' was associated with the synergism between the biopolymers. The synergistic effect between two biopolymers, as suggested by Tolstoguzov (1995), is produced by the excluded volume effect. The excluded volume model suggests that each biopolymer can only occupy a part of the volume in the mixture, resulting in the increase of the local concentration of each one of them, without separation of phases (SANCHEZ et al., 1997; Wang et al., 2016). On the other hand, it is known that calcium ions can affect the interaction between low methoxyl pectin and proteins such as bovine serum albumin (Donato et al. 2005). In our study, all samples were prepared using PEC/ CaCl_2 solution at a ratio of 1:1 (w/w). In the ALB-PEC gels at pH 8 and without adjustment of the pH, the addition of PEC (1 and 2 %) affected the ALB gel network junction zone, leading to an increase in G' , which indicates a synergistic effect between the biopolymers. At these two concentrations, the calcium ions seem to not have a high degree of interaction with ALB chains, maintaining the electrostatic repulsion between ALB and PEC, as suggested by the ζ -potential results (Table 2.2).

In the rheological study of gels from locust bean gum (0.1 and 0.3 %) and xanthan gum (0.02 to 0.2 %) with whey protein and soy protein isolate, an increase in G' was observed, due to the synergism achieved by the biopolymers (CHANG et al., 2014; ROCHA et al., 2009). Indeed, the behavior of G' depends on the concentrations of biopolymers used in the gel preparation. For example, in gels from locust bean gum and xanthan gum, the maximum G' is observed at a ratio (1:1) (w/w), where the maximum synergism is reached, and an increase in the locust bean concentration led to a decrease in G' (MANNION et al., 1992).

The frequency sweep test showed that 2 % PEC is the critical concentration of the ALB-PEC mixture. The addition of PEC above the critical concentration led to a decrease in G' (Figure 2.3a, b). When 2.5 % PEC was added with and without adjustment of the pH, it seemed to favor interactions among PEC, calcium ions and ALB, even though the net charge of the system remained negative (Table 2.2). These interactions could lead to the formation of electrostatics complexes among ALB, calcium ions and PEC and a decrease in G' . The possibility of complexes formation was previously reported by Wang et al. (2016) in the gelatin B and xanthan gum system. Nevertheless, the increase in the PEC concentration at 3 and 4 % at pH 5.1 and 4.7, respectively, caused again increases in G' , but less than those observed at 1 % and 2 % PEC.

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).



It should be noted that for all gels (with and without adjustment of pH), G' and G'' increase with an increase in the frequency, indicating frequency dependence (Figure 2.2). Gels can be classified into two types: true-gels in which G' and G'' are independent of the frequency and $G' > G''$. Weak-gels have a G' and G'' dependence on the frequency and $G' > G''$ (CHAMBERLAIN; RAO, 2000). According to this classification, the gels of ALB and ALB-PEC, regardless of pH, can be considered as weak-gels. The coacervate gel of fish gelatin and gum arabic is also considered weak-gels, as are those from soybean glycinin, κ -carrageenan, potato starch-inulin and β -lactoglobulin (ANVARI; CHUNG, 2016; KRYSZYJAN et al., 2015; STADING; HERMANSSON, 1990; ZHU et al., 2008).

A power-law model was used to describe the frequency dependence of G' and G'' according to equations 1 and 2.

$$G' = A' \omega^{n'} \quad (1)$$

$$G'' = A'' \omega^{n''} \quad (2)$$

where A is a constant related to gel strength, n is the relaxation exponent, and ω is the angular frequency. The values of n' and n'' represent a measure of frequency dependence of the

storage and loss moduli and provide information about the viscoelastic nature of the material. An n value near zero indicates that the gels exhibit a slight frequency dependence.

Table 2.3 reports the parameters A , n and the coefficient of determination of gels with and without adjustment of pH, respectively. The power law model exhibited high coefficients of determination ($R^2 > 0.95$) and can be used to represent the behavior of G' and G'' with the frequency. Gels with 1 % and 2 % PEC at pH 8 and non-adjusted pH had a less frequency dependence. Nevertheless, gels with 2.5 %, 3 % and 4 % PEC were strongly affected by frequency (Table 2.3).

A weak frequency dependence is due to an increase in the interaction between ALB-ALB and PEC-PEC chains caused by the excluded volume effect, which increases the local concentration of each one of the biopolymers and leads to a decrease in n' and an increase in gel strength (Tables 2.3 and 2.4). The values of n' and $n'' > 0$ suggest that there was noncovalent physical crosslinking of the gel network (RAZMKHAH; RAZAVI; MOHAMMADIFAR, 2017). The parameter n'' increases with the increase in PEC concentration, regardless of pH. Nevertheless, n' did not exhibit this behavior. The values of n' ranged from 0.11-0.37 (pH 8) and 0.11-0.29 (non-adjusted pH), and for n'' , the values ranged from 0.18-0.52 (pH 8) and 0.18-0.56 (non-adjusted pH). The parameters n' and n'' are higher than those reported for protein-based gels isolated from whey and lecithin ranging from 0.027 to 0.054 (IKEDA; FOEGEDING, 1999). They are similar to those of gels prepared from a mixture of xanthan gum (0.02 %) and isolated soy protein (4 %), with n' and n'' of 0.12 and 0.16 (CHANG et al., 2014).

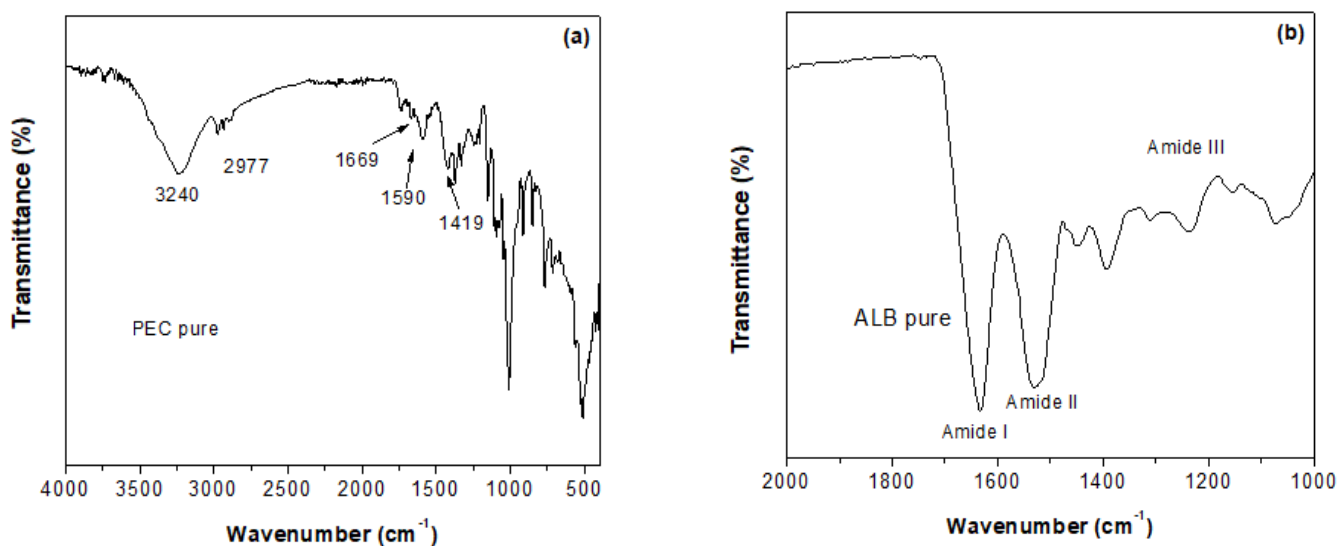
Table 2.3. Parameters of the power law model of the ALB and ALB-PEC gels.

Gel Sample	A'	n'	R^2	A''	n''	R^2
pH 8						
ALB 5 %	35.42	0.13	0.99	6.76	0.26	0.99
ALB-PEC (PEC 1 %)	141.38	0.11	0.99	22.50	0.18	0.97
ALB-PEC (PEC 2 %)	159.17	0.11	0.99	28.41	0.19	0.99
ALB-PEC (PEC 2.5 %)	31.09	0.16	0.99	5.10	0.44	0.99
ALB-PEC (PEC 3 %)	16.76	0.37	0.98	5.81	0.44	0.99
ALB-PEC (PEC 4 %)	19.77	0.25	0.99	4.81	0.52	0.99
non-adjusted pH.						
ALB 5 % (pH 8)	35.42	0.13	0.99	6.76	0.26	0.99
ALB-PEC (PEC 1 %) (pH 8.0)	141.38	0.11	0.99	22.50	0.18	0.97
ALB-PEC (PEC 2 %) (pH 6.9)	65.70	0.17	0.99	10.80	0.40	0.99
ALB-PEC (PEC 2.5 %) (pH 5.7)	5.03	0.37	0.99	2.90	0.56	0.99
ALB-PEC (PEC 3 %) (pH 5.1)	28.53	0.18	0.99	5.88	0.45	0.99
ALB-PEC (PEC 4 %) (pH 4.7)	19.99	0.29	0.99	6.35	0.50	0.99

2.3.3 FT-IR spectroscopy

Figure 2.2S shows the FT-IR spectra of pure ALB and PEC. Pure PEC exhibited a band between 3600 to 2500 cm^{-1} , associated with the stretching of O-H groups from the carboxylic acid. The bands at 2977 and 1669 cm^{-1} represent the stretching vibration from C-H and deformation from N-H. The bands at 1590 and 1419 cm^{-1} correspond to asymmetric stretching from N-O and C-N, respectively (BURAPAPADH; TAKEUCHI; SRIAMORNSAK, 2015). The FT-IR spectrum of pure ALB exhibited three characteristic bands, so-called Amide I, II and III. Pure ALB displayed bands between 1600 and 1700 cm^{-1} (Amide I) and between 1500 and 1600 cm^{-1} (Amide II), associated with -C=O and C-N weak stretching and strongly coupled with N-H bending, respectively, in addition to a band between 1200 and 1350 cm^{-1} (Amide III), which corresponds to twisting of N-H in the plane, coupled with N-N stretching and C-H and N-H deformation vibrations (SINGH, 2000).

Figure 2.2S. FT-IR spectra of pure PEC and pure ALB.



The FT-IR spectra of ALB and ALB-PEC gels exhibited a band at 1635 cm^{-1} associated with amide I. The amide II band, initially found in the pure ALB spectrum, disappeared. To resolve the overlapping of the bands that belong to the secondary structures of protein at the amide I region ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), the analysis of second derivative was carried out according to Yang et al. (2015). The amide I region is sensitive to conformational changes in the secondary structure of proteins, which are due mainly to -C=O stretch vibrations of peptides linkages (Wang et al., 2017). After the curve fitting of the second derivative, the area of each peak was used to evaluate the effect of PEC on the secondary structures of ALB in the ALB-PEC gels. Figures 2.4 and 2.5 show the second derivative of the IR spectrum from ALB and ALB-PEC gels with and without pH adjustment, respectively. The band assignments were performed according to the previous data reported by Yang et al. (2015) and Carbonaro and Nucara (2010) for proteins in aqueous solution. Gels prepared with PEC showed the characteristic bands attributed to β -sheet, α -helices, antiparallel β -sheet and parallel β -sheet (Table 2.4). In the ALB gel, structural changes were observed, caused by the gelation process and changes in the pH (Table 2.4).

Figure 2.4. Curve fitting spectra of amide I for ALB and ALB-PEC gels at pH 8.

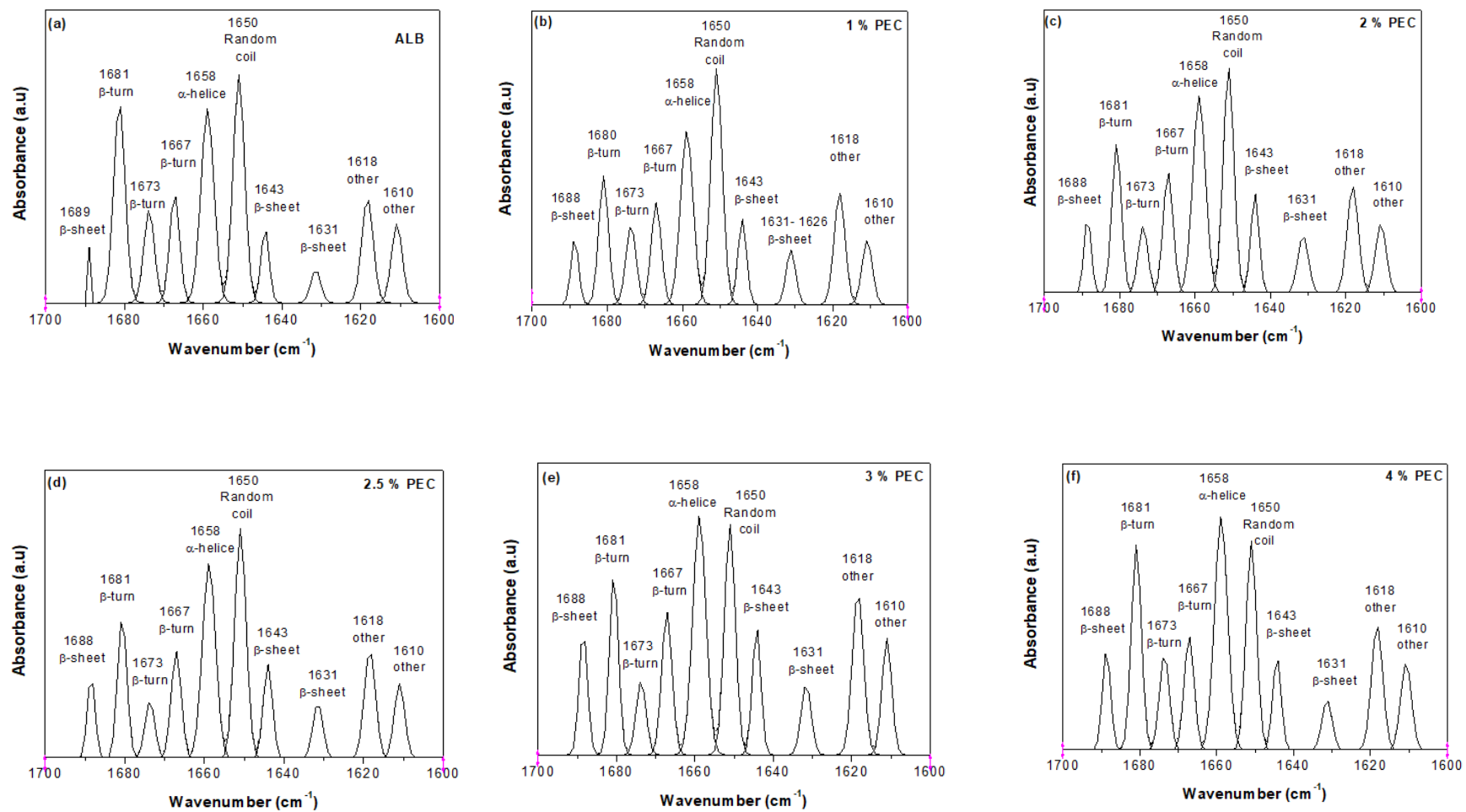


Figure 2.5. Curve fitting spectra of amide I for ALB gel and ALB-PEC gel at non-adjusted pH.

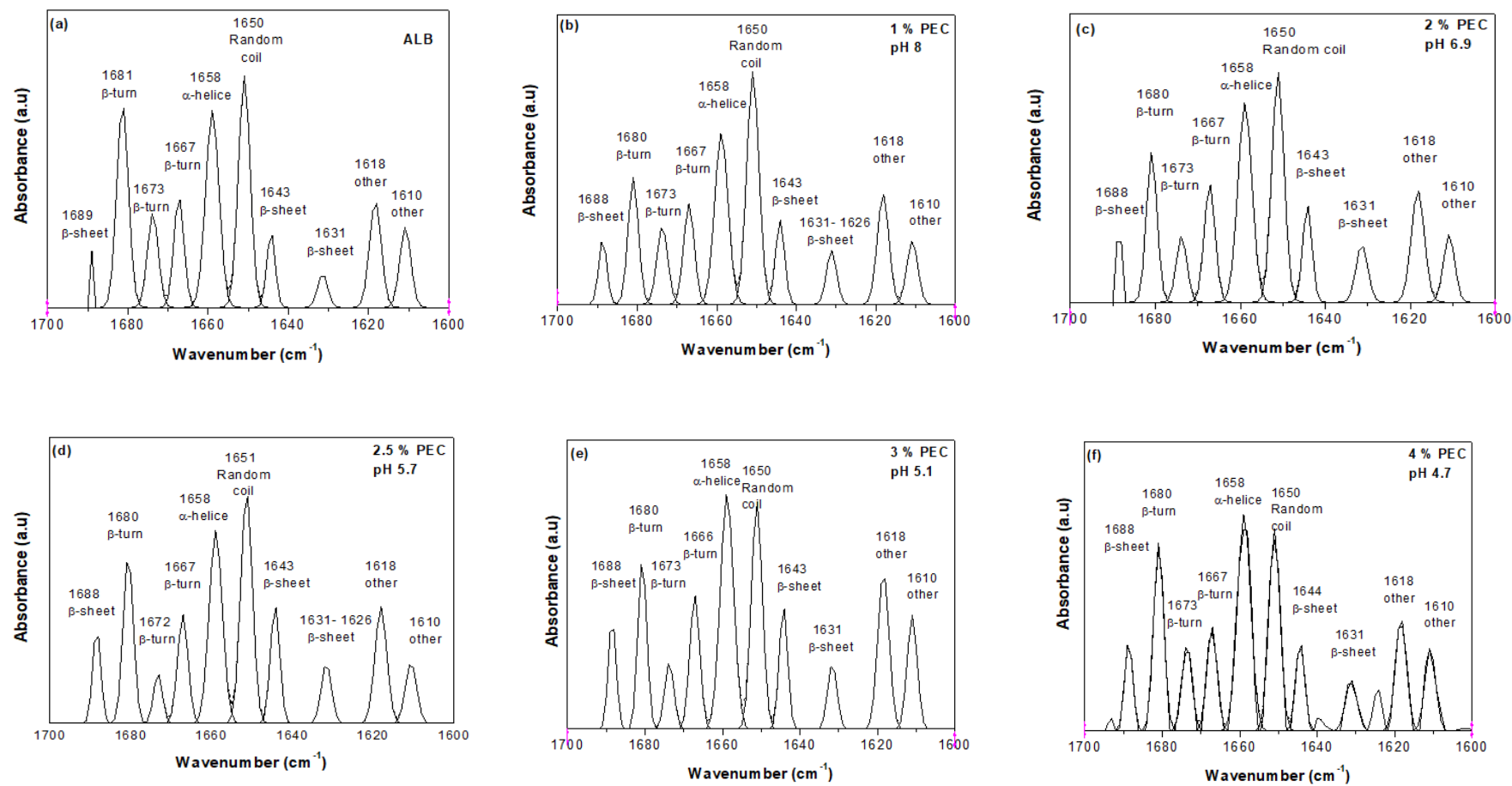


Table 2.4. Assignments and relative areas of amide I components of ALB and ALB-PEC gels.

Secondary structure	Concentration of PEC (%)					
	0	1	2	2.5	3	4
pH 8						
α -helice (1658)	19.15 \pm 0.03	18.47 \pm 0.40	20.69 \pm 0.71	20.87 \pm 0.04	20.56 \pm 0.86	21.89 \pm 0.16
β -sheet (1689,1643, 1631)	12.31 \pm 0.07	14.60 \pm 0.11	16.49 \pm 1.56	16.99 \pm 0.10	18.58 \pm 0.07	15.42 \pm 0.09
β -turn (1681, 1673, 1667)	32.97 \pm 0.09	27.14 \pm 0.03	26.88 \pm 0.04	24.30 \pm 0.06	25.03 \pm 0.01	29.77 \pm 0.07
Random coil (1650)	19.95 \pm 0.04	23.40 \pm 0.03	19.91 \pm 0.06	21.43 \pm 0.04	16.41 \pm 0.02	15.88 \pm 0.03
χ^2	0.0029	0.0022	0.0027	0.0023	0.0043	0.0030
R^2	0.96	0.96	0.96	0.97	0.95	0.97
Non-adjusted pH						
α -helice (1658)	19.15 \pm 0.03	18.83 \pm 0.40	19.57 \pm 0.04	19.33 \pm 0.03	21.47 \pm 0.04	21.93 \pm 0.06
β -sheet (1689,1643, 1631)	12.31 \pm 0.07	15.07 \pm 0.06	20.40 \pm 0.07	19.02 \pm 0.03	17.41 \pm 0.06	16.01 \pm 0.04
β -turn (1681, 1673, 1667)	32.97 \pm 0.09	27.14 \pm 0.03	24.93 \pm 0.04	25.13 \pm 0.07	23.85 \pm 0.10	28.85 \pm 0.03
Random coil (1650)	19.95 \pm 0.04	23.40 \pm 0.03	19.55 \pm 0.06	20.63 \pm 0.06	17.22 \pm 0.08	16.97 \pm 0.11
χ^2	0.0029	0.0022	0.0032	0.0024	0.0043	0.0031
R^2	0.96	0.96	0.96	0.97	0.95	0.96

Regarding the ALB-PEC gels, both with and without pH adjustment, a slight trend of increase in the relative area of the α -helices and β -sheet bands was observed when the PEC content increased, compared with the ALB gel (Table 2.4). It should be noted that the increase in the relative area of the β -sheet was higher than the α -helices band, which is due to a higher protein aggregation (Clark, Saunderson, & Suggett, 1981; VAHEDIFAR; MADADLOU; SALAMI, 2018). The gelation process of ALB-PEC blends seems to be related to an increase in the number of β -sheet structures, as was also reported for microgels of whey protein isolate (VAHEDIFAR; MADADLOU; SALAMI, 2018). Additionally, the relative area of the β -turn structure decreases when pectin was added. Meanwhile, the random coil structure did not exhibit a clear dependence on the PEC concentration. The above results indicate that besides the thermal process, the addition of PEC also had an influence on the secondary conformational structure of ALB in the ALB-PEC gel, which is suggested to lead to the appearance of different molecular conformations. The increase or decrease in the relative area of secondary structure showed a dependence on both the PEC ratio and the pH of the system. The effect of PEC on protein aggregation was also observed in the confocal analysis.

2.3.4 Confocal laser scanning microscopy (CLSM).

Figures 2.6 and 2.7 show the CLSM images of ALB and ALB-PEC gels with and without adjustment of the pH, respectively. The bright red and black regions indicate the presence of ALB and PEC, respectively. The ALB gel presented globular particles homogeneously arranged throughout the gel matrix (Figure 2.6a). The increase of PEC concentration led to ALB aggregation in the samples at pH 8. Gels prepared with 2.5, 3 and 4 % of PEC exhibited a similar globular shape. Regarding gels prepared with non-adjusted pH, the addition of 1 and 2 % PEC (Figure 2.7b, c) did not seem to cause noticeable changes in the globular particles of ALB clusters. The addition of PEC above 2 % led to an increase of spacing between ALB aggregates, loss of their globular particles form (Figure 2.7d, e, f). The CLSM images suggest that there was a local increase in the concentrations of each one of the biopolymers as the PEC concentration increased, which resulted in changes in the rheological parameters. The synergism of the biopolymers at 1 % and 2 % PEC was verified by the smaller changes in protein clusters (Figure 2.6 b,c, Figure 2.7 b,c). A greater segregation of

ALB cluster was more evident at 2.5 %, in accordance with the high β -sheet relative areas and a decrease G' . Rocha et al. (2009) reported that G' of gels from whey protein concentrate (WPC) and locust bean gum (LGB) depends on the concentration of the polysaccharide, which alters the microstructure of the WPC gel because it affects the balance between aggregation and segregation. WPC (10 %) gel with 0.1 % of LGB exhibited a bicontinuous structure, due to an increase of WPC local concentration leading to the increase of the elasticity of the gel network.

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.

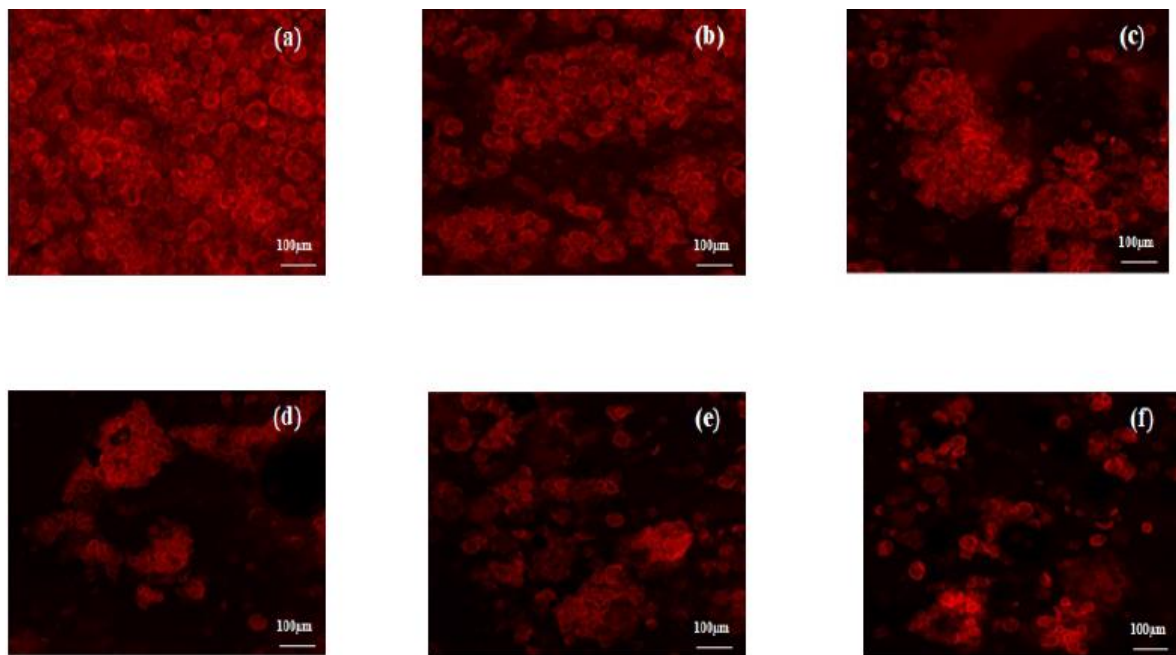
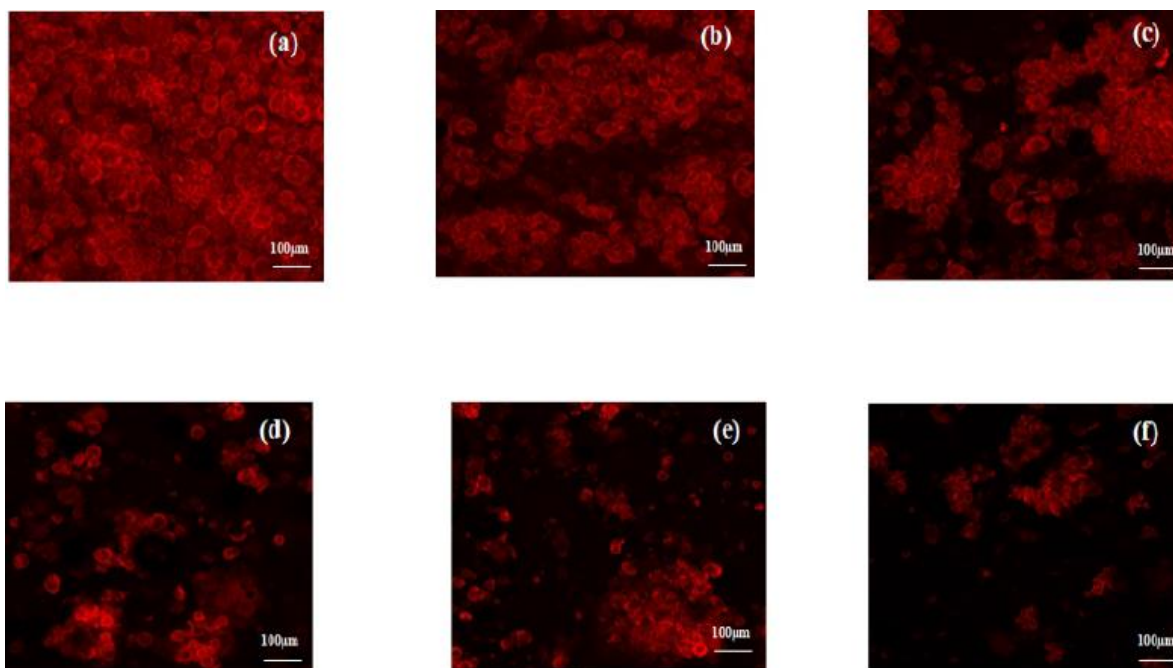


Figure 2.7. CLSM images of ALB gels (a) and ALB-PEC gels: 1 % PEC (b), 2 % PEC (c), 2.5 % PEC (d), 3 % PEC (e), and 4 % PEC (f) at non-adjusted pH.



2.4 Conclusion

Gels from ALB-PEC are weak regardless of pH. The behavior of the parameters G' or G'' is dependent on the PEC concentration and the applied frequency. In the system of ALB-PEC, the increase of G' is caused by electrostatic interaction in the ALB-PEC gels. Nevertheless, in the gels formed, there is a critical concentration of PEC, above which a decrease in G' is observed due to possible electrostatic complex formation. Additionally, the PEC can affect the secondary structure of the ALB in the ALB-PEC, which is the cause for the aggregation of the ALB. The effect of PEC addition on the rheological behavior of ALB-PEC gels allows considering this mixture as an alternative to formulate gels with specific rheological and structural characteristics. Further studies to evaluate the rheological properties of ALB-PEC gels below the isoelectric point of the protein are desirable.

2.5 Acknowledgements

The authors are grateful to the State of São Paulo Research Foundation (Proc. FAPESP 2017/02808-6) for their financial support, the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for a scholarship, the Physical Properties Laboratory (IBILCE-UNESP) for allowing the authors to use the rheometer, the LMA-IQ for FEG-SEM facilities (IBILCE-UNESP), Dr. Marcia Perez dos Santos Cabrera for her assistance in using the Zetasizer Nano ZS (Proc. FAPESP 2012/24259-0), the Multiuser Center for Microscopy and Microanalysis (IBILCE-UNESP) for allowing the authors to use the confocal microscope, the Suchochemistry and Analytical Chemistry (IBILCE-UNESP) for allowing the authors to use the Spectrum One Spectrum and Danisco Brazil for the donation of pectin.

2.6 References

- ALONSO-MOUGÁN, Manuel et al. Rheological behaviour of an amide pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 2, p. 123–129, 2002.
- ANVARI, Mohammad; CHUNG, Donghwa. Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin - Gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 516–524, 2016.
- BERTRAND, Marie Eve; TURGEON, Sylvie L. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 2, p. 159–166, 2007.
- BI, Chong-Hao et al. Characterization of non-linear rheological behavior of SPI – FG dispersions using LAOS tests and FT rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1151–1158, 2013.
- BURAPAPADH, Kanokporn; TAKEUCHI, Hirofumi; SRIAMORNSAK, Pornsak. Development of pectin nanoparticles through mechanical homogenization for dissolution enhancement of itraconazole. **Asian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 365–375, 2015.
- CARBONARO, M.; NUCARA, A. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. **Amino Acids**, v. 38, n. 3, p. 679–690, 2010.

CHAMBERLAIN, E. K.; RAO, M. A. Effect of concentration on rheological properties of acid-hydrolyzed amylopectin solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 2, p. 163–171, 2000.

CHANG, Yuan-Yuan et al. Effect of gums on the rheological characteristics and microstructure of acid-induced SPI-gum mixed gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 183–191, 2014.

CLARK, A. H.; SAUNDERSON, D. H. ..; SUGGETT, A. Infrared and laser-raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels. **Internacional Journal of Peptide and Protein Research**, v. 17, n. 3, p. 353–364, 1981.

CLARK, Allan H. Biopolymer gels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, n. 6, p. 712–717, 1996.

CROGUENNEC, T.; NAU, F.; BRULÉ, G. Influence of pH and Salts on Egg White Gelation. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 608–614, 2002.

CROS, Soizic et al. Solution conformation of a pectin fragment disaccharide using molecular modelling and nuclear magnetic resonance. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 14, n. 6, p. 313–320, 1992.

DICKINSON, Eric. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25–39, 2003.

DONATO, L. et al. Gelation of globular protein in presence of low methoxyl pectin: effect of Na^+ and/or Ca^{2+} ions on rheology and microstructure of the systems. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 3, p. 549–556, 2005.

FOEGEDING, E. Allen; LI, Hong; BOTTCHEER, Sharon. Gelation of Globular Proteins. In: RAO, M. .. (Ed.). **Phase/State Transition in Foods Chemical, Structural and Rheological Changes**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 253–260.

IKEDA, S.; FOEGEDING, E. A. Dynamic viscoelastic properties of thermally induced whey protein isolate gels with added lecithin. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 3, p. 245–254, 1999.

IKEDA, S.; NISHINARI, K. On solid-like rheological behaviors of globular protein solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4–6, p. 401–406, 2001.

KALKANI, A.; PARASKEVOPOULOU, A.; KIOSSEOGLOU, V. Protein interactions and

filler effects in heat-set gels based on egg. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 2, p. 191–197, 2007.

KRYSTYJAN, Magdalena et al. Structure, rheological, textural and thermal properties of potato starch -Inulin gels. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 131–136, 2015.

LAPASIN, Romano; PRICL, Sabrina. **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. 1. ed. Padstow: Blackie Academic & Professional, 1995.

LIANG, Yong; KRISTINSSON, Hordur G. Structural and foaming properties of egg albumen subjected to different pH-treatments in the presence of calcium ions. **Food Research International**, v. 40, n. 6, p. 668–678, 2007.

MANNION, R. O. et al. Xanthan Locust Bean Gum Interactions at Room-Temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, n. 2, p. 91–97, 1992.

RAZMKHAH, Somayeh; RAZAVI, Seyed Mohammad Ali; MOHAMMADIFAR, Mohammad Amin. Dilute solution, flow behavior, thixotropy and viscoelastic characterization of cress seed (*Lepidium sativum*) gum fractions. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 404–413, 2017.

ROCHA, C. et al. Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1734–1745, 2009.

SANCHEZ, C. et al. Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration. **Nahrung**, v. 41, n. 6, p. 336–343, 1997.

SATO, Ana C. K.; OLIVEIRA, Pablo R.; CUNHA, Rosiane L. Rheology of Mixed Pectin Solutions. **Food Biophysics**, v. 3, p. 100–109, 2008.

SCHMITT, C.; ABERKANE, L.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complex and coacervates. In: PHILIPS, G. ...; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Handbook of Hydrocolloids**. Boca Raton, FL: Woodhead Publishing Limited, CRC Press, 2009. p. 421–476.

SINGH, Bal Ram. Basic Aspects of the Technique and Applications of Infrared Spectroscopy of Peptides and Proteins. In: SING, Bal Ram (Ed.). **Infrared Analysis of Peptides and proteins: principles and application**. Washington, D.C: ACS symposium serie, 2000. p. 190.

SITTIKIYOTHIN, W.; SAMPAIO, P.; GONÇALVES, M. .. Heat-induced gelation of β -lactoglobulin at varying pH: Effect of tara. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1046–1055, 2007.

STADING, Mats; HERMANSSON, Anne-Marie. Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 2, p. 121–135, 1990.

TOLSTOGUZOV, V. B. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. **Topics in Catalysis**, v. 9, n. 4, p. 317–332, 1995.

TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, n. 4–5, p. 166–178, 2007.

VAHEDIFAR, Amir; MADADLOU, Ashkan; SALAMI, Maryam. Influence of seeding and stirring on the structural properties and formation yield of whey protein microgels. **International Dairy Journal**, v. 79, p. 43–51, 2018.

WANG, Chang Sheng et al. Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 374–383, 2016.

WANG, Kai-qiang et al. Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation. **Food Chemistry**, v. 214, p. 393–399, 2017.

YANG, Huayan et al. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. **Nature Protocols**, v. 10, n. 3, p. 382–396, 2015.

ZHANG, Sha; HSIEH, Fu-Hung; VARDHANABHUTI, Bongkosh. Acid-induced gelation properties of heated whey protein-pectin soluble complex (part I): Effect of charge density of pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 95–103, 2014.

ZHU, Jian-hua et al. Rheological properties of k -carrageenan and soybean glycinin mixed gels. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 219–228, 2008.

CAPÍTULO III. Encapsulação de betalaína em criogéis de albumina e pectina de baixa metoxilação

Encapsulação de betalaína em criogéis de albumina e pectina de baixa metoxilação

Ana María Chaux-Gutiérrez^{1*}, Ezequiel José Pérez-Monterroza¹, Diana María Granda-Restrepo², Maria Aparecida Mauro¹

¹ Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista (Unesp) Rua Cristovão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Grupo de Investigación BIOALI, Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia

E-mail de correspondência: anachauxg@gmail.com, ana.chaux@unesp.br.

Resumo

Foi avaliada a encapsulação de betalaína em criogéis, utilizando como material de parede albumina (ALB) e mistura de albumina e pectina amidada de baixa metoxilação (ALB-PEC). Características de cor, eficiência de encapsulação, perfil de liberação, interações e características morfológicas foram analisadas por meio de espectrofotometria UV-visível, espectrofotometria de infravermelho (FTIR), Método de BET e microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos criogéis pré-carregados e pós-carregados com betalaína. Os criogéis de ALB e ALB-PEC apresentaram eficiências de encapsulação com valores entre 88 e 97 %. Os resultados obtidos do FTIR indicaram que existem interações entre a betalaína e a ALB e PEC. A concentração de PEC usada, assim como o modo de incorporar a betalaína à matriz usando pré-carga ou pós-carga afetaram o perfil de liberação. A morfologia dos criogéis de ALB mostrou estruturas compactas, enquanto que, a adição de PEC provocou a formação de estruturas mais porosas.

Palavras-chave: Beterraba, liberação, pigmento, infravermelho, área superficial.

3.1 Introdução

A encapsulação é uma técnica que tem sido amplamente utilizada na área de alimentos com o objetivo de proteger compostos bioativos através da formação de estruturas ou recobrimentos constituído por um ou mais materiais poliméricos, os quais são denominados materiais de parede (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016). Essa tecnologia diminui os efeitos causados por fatores externos tais como pH, temperatura, luz, oxigênio e atividade de água, facilitando o manuseio, a aplicação industrial e o armazenamento das substâncias encapsuladas (CHHIKARA et al., 2019; COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; JANISZEWSKA, 2014). A secagem por *spray drying* tem sido umas das tecnologias mais utilizadas na encapsulação de compostos bioativos (PASRIJA et al., 2015), incluindo a estabilização de betalaína extraída da beterraba (*Beta vulgaris*) (CARMO et al., 2018; JANISZEWSKA, 2014; PITALUA et al., 2010) e do figo da índia (*Opuntia ficus-indica*) (OBÓN et al., 2009; OTÁLORA et al., 2015; ROBERT et al., 2015). No entanto, novas tecnologias de encapsulação, como por exemplo, pela preparação de hidrogéis, vêm ganhando interesse nos anos mais recentes (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015; CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2014; FARJAMI; MADADLOU; LABBAFI, 2015).

Os hidrogéis são definidos como uma rede polimérica composta de cadeias hidrofílicas, cujas matrizes possuem capacidade de absorver grande quantidade de água, são flexíveis e biocompatíveis (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2014). Os hidrogéis podem ser produzidos a partir de polissacarídeos ou proteínas. Entre os polissacarídeos mais usados destaca-se a pectina, devido à sua boa capacidade para a formação de gel e por não apresentar toxicidade (DAFE et al., 2017). Apesar de ser solúvel em água, a pectina de baixa metoxilação gelificada por íons Ca^{2+} é considerada um bom material de parede pelo seu potencial uso como carreador de substâncias bioativas, uma vez que oferece proteção durante o trânsito pelo trato gastrointestinal, além de ser degradada no cólon (FATHI; JULIAN, 2014; JUNG; ARNOLD; WICKER, 2013). No caso das proteínas, destaca-se a albumina, a qual possui um alto valor nutricional e boas propriedades funcionais, tais como sua capacidade de emulsificação, gelificação, boa capacidade espumante e facilidade para ligar água. Os hidrogéis preparados a partir de proteína de ovo apresentam interessantes propriedades mecânicas e microestruturais, que permitem a liberação controlada de compostos bioativos quando há mudanças no pH do sistema, tornando-se matrizes muito atrativas para este tipo de encapsulação (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006).

A encapsulação usando hidrogéis como material de parede pode ser realizada através de duas formas: na primeira, denominada pré-carga, mescla-se o polissacarídeo ou a proteína com o composto bioativo de interesse antes da gelificação e, posteriormente realiza-se um processo de secagem. A segunda forma, chamada pós-carga, consiste na incorporação do composto de interesse depois do processo de secagem do hidrogel (BETZ et al., 2012). O processo de secagem pode ser realizado por ar quente, produzindo os denominados xerogéis, ou através de secagem supercrítica, formando os chamados aerogéis, e ainda através da liofilização, com a formação dos denominados criogéis (BETZ et al., 2012).

A encapsulação utilizando criogéis pré-carregados tem sido usada para a proteção de cúrcuma, a partir de um sistema terciário de quitosana, κ -carragena e sal sódico de carboximetilcelulose, alcançando eficiências de encapsulação entre 89 e 99 % (NAKAGAWA; SOWASOD; TANTHAPANICHAKOON, 2013). Matrizes de alginato-quitosana (2 % m/v) e misturas alginato-pectina (80:20) têm sido usadas para a encapsulação de cafeína, com eficiências de encapsulação de 68 % e 79 %, respectivamente (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015).

Por outro lado, o uso de criogéis pós-carregados, cuja prospecção vinha se destacando na área farmacêutica (BETZ et al., 2012), também está despertando interesse na área de alimentos. Estudos reportados sobre a encapsulação de compostos fenólicos extraídos da amora (*Rubus fruticosus*) em matrizes de quitosana-goma xantana, apresentaram eficiências de encapsulação de 66 % e tempos de liberação, em pH de 4,5, de 8,2 horas, e em pH de 7,4, de 1,6 horas (DA ROSA et al., 2014). O pós-carregamento de compostos fenólicos e carotenoides da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) em criogéis de goma tara-goma xantana, cujas eficiências de encapsulação foram de 70 % e 74 % para os carotenoides e os fenólicos, respectivamente, demonstrou adequação da matriz à liberação de carotenoides em fluidos gástricos e intestinais simulados (RUTZ et al., 2013).

A beterraba (*Beta vulgaris*) possui pigmentos hidrossolúveis de grande importância tecnológica e econômica, devido a seu amplo uso como corantes em produtos de confeitaria, sorvetes, bebidas e produtos lácteos (VERGARA et al., 2014). Também têm capacidade antioxidante e atividade anticarcinogênica, e, inclusive, conseguem inibir tumores em ratos, convertendo-se numa excelente alternativa para a preparação de novas formulações (ESCRIBANO et al., 2017; GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2016). As betalainas são compostos catiônicos, com um nitrogênio carregado positivamente na estrutura poliênica (MORENO et al., 2008). As betacianinas e as betaxantinas presentes na

beterraba são formadas a partir da condensação do ácido betalâmico com o *ciclo* Dopa (ciclo-3,4 dihidroxifenilalanina) e de compostos amino, respectivamente (GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMO, 2013).

Considerando que estudos sobre encapsulação de betalaína de beterraba (*Beta vulgaris*) em criogéis formados pela combinação de proteínas e polissacarídeos como material de parede são escassos (CASTRO-MUÑOZ; BARRAGÁN-HUERTA; YÁNEZ-FERNÁNDEZ, 2015; OTÁLORA et al., 2016; ROBERT et al., 2015), e que a albumina e a pectina possuem vantagens de biodegradabilidade, esse estudo avaliou a encapsulação de betalaína em criogéis pré-carregados e pós-carregados constituídos por albumina de ovo (ALB) e por combinações de ALB em diferentes concentrações de pectina amidada de baixa metoxilação (PEC).

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Materiais

Extrato de betalaína em pó (Suco de beterraba (*Beta vulgaris*), maltodextrina, ácido cítrico e ácido ascórbico) foi doado pela Sensient® Technologies Corporation (Jundiaí, São Paulo, Brasil). Albumina de ovo em pó (ALB) foi fornecida pela Naturovos Ltda. (Salvador do Sul, RS, Brasil, 90 % proteína, 4,98 % cinzas, 0,06 % lipídeos). Pectina amidada de baixa metoxilação amidada (PEC) foi doada pela Danisco Ltda. (GRINDSTED® LA 210, São Paulo, SP, Brasil, grau de esterificação (GE) 34 %, grau de amidação (GA) 17 % e conteúdo de açúcar 32 %). Hidróxido de sódio, cloreto de cálcio e ácido clorídrico foram fornecidos pela Panreac (Castellar del Vallès, Barcelona, Espanha). Todos os produtos químicos tinham grau analítico. O padrão da betanina foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Encapsulação de betalaína em criogéis de ALB e ALB-PEC

A encapsulação da betalaína nos criogéis foi realizada utilizando a metodologia de pré-carga e pós-carga de acordo com Betz et al. (2011) e Rutz et al. (2013), com modificações. A pré-carga foi realizada da seguinte maneira: Foram preparadas dispersões de ALB (5 g) e PEC (5 g) em água (95 g) a 25 °C, separadamente, e submetidas a agitação constante por 3 horas. O pH das dispersões foi ajustado a 8 usando HCl (0,1 M) ou NaOH (0,1 M). A dispersão da ALB foi aquecida a 85 °C, sob agitação constante por 15 minutos, e então, resfriada até 40 °C. A seguir, foi adicionado à dispersão, o extrato de betalaína (2 % m/m, baseado na massa total da dispersão de ALB) e, em ausência de luz, a agitação foi mantida por 20 minutos. A mistura foi despejada em placas de Petri (60 mm × 15 mm) até a formação do gel. Para as formulações de ALB-PEC, após o ajuste do pH da dispersão de ALB, esta foi aquecida a 85 °C mantendo agitação constante por 15 minutos, e a seguir, resfriada até 40 °C. A dispersão de PEC foi, então, adicionada em diferentes concentrações (1 %, 2 % e 2,5 % m/m), sendo que para todas as formulações, as soluções coloidais continham 5 % (m/m) de material de parede. A seguir, foi adicionado o extrato de betalaína (2 % m/m, com base na massa da dispersão de ALB-PEC), a mistura foi agitada por 20 minutos em ausência de luz e, então, uma solução de cloreto de cálcio (2 % m/v) foi adicionada, correspondente a 1 % (m/m) da massa da dispersão de PEC utilizada em cada formulação. A mistura foi despejada em placas de Petri (60 mm × 15 mm) e deixada a 4 °C até a formação do gel. Finalmente, os géis foram congelados a -18 °C por 24 horas e posteriormente liofilizados em um liofilizador (LIOBRAS, São Carlos, SP, Brasil) com pressão interna de 50 mbar e uma temperatura no coletor de -42 °C para a formação do criogel. A pós-carga foi realizada com os mesmos géis de ALB e ALB-PEC preparados de acordo com a descrição anterior. A incorporação da betalaína foi realizada misturando uma solução aquosa do extrato de betalaína (2 % m/m) com aos géis liofilizados, em uma relação 10:1 (solução: criogel), m/m. A mistura foi agitada por 3 horas a 700 rpm, depois congelada a -18 °C por 24 horas e, finalmente, liofilizada. As amostras liofilizadas foram maceradas manualmente usando almofariz até a obtenção de um pó.

3.2.2.2 Conteúdo de betalaína (CB) e Eficiência de encapsulação (% EE)

O conteúdo de betalaína total e a quantidade que está presente na superfície dos criogéis pré-carregados e pós-carregados, foram determinados de acordo com Vergara et al. (2014) e Otálora et al. (2016), com algumas modificações. O conteúdo de betalaína na superfície foi determinado mediante lavagem de 100 mg de criogel com 4 mL de solução de metanol: etanol (1:1). Para tanto, a mistura foi agitada em vortex por 2 minutos, centrifugada a 5500 rpm por 20 minutos e o conteúdo de betalaína no sobrenadante foi determinado por leitura em espectrofotômetro de UV/Vis (UV 3000, Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd, Shanghai, China) a 536 nm. O conteúdo total de betalaína dos criogéis foi determinado mediante dispersão de 120 mg do criogel em 15 mL de uma solução de metanol: água (1:1), agitada por 1 hora a 300 rpm em agitador orbital (Heidolph Instrument GmbH Unimax 1010, Schwabach, Alemanha) a temperatura ambiente (25 °C) e, em seguida, centrifugada a 5500 rpm por 20 minutos. A betalaína foi quantificada usando uma curva de calibração de betanina (1-6 mg·mL⁻¹). As análises foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo a Equação 1.

$$EE(\%) = \frac{CB_{Total} - CB_{Superfície}}{CB_{Total}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.2.3 Perfil de liberação da betalaína a diferentes pH.

O perfil de liberação da betalaína foi realizado em soluções aquosas a pH = 2 (10 mM de HCl), pH = 7 (água destilada) e pH = 10 (0,1 mM de NaOH). Para as análises foram pesados aproximadamente 120 mg da amostra, os quais foram suspensos em 15 mL da solução selecionada, e as amostras foram mantidas sob agitação constante a 200 rpm em um agitador orbital (Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & C, Walpersdorfer, Schwabach, Alemanha). Foram tomadas alíquotas de 1 mL da dispersão em intervalos de tempo predeterminados (30, 60, 120, 180 e 240 min), para determinar o conteúdo de betalaína conforme descrito na secção 3.2.2.2. A cada amostragem, o volume de cada alíquota tomada para a análise foi imediatamente repostado com solução fresca. As análises foram realizadas em duplicata.

3.2.2.4 Análises de cor

Os parâmetros de cor foram medidos usando um espectrofotômetro X-Rite 939 (X-Rite, Inc, Michigan, USA). Os resultados foram expressos de acordo com o sistema de cor CIELAB (L^* , a^* , b^*) e também pelos parâmetros croma (C^*) e ângulo hue (h^*), calculados pelas Equações 2 e 3, respectivamente:

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

$$h^* = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3)$$

3.2.2.5 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos usando um espectrofotômetro IRAffinity 1 Shimadzu (Shimadzu, Kioto, Japão). As amostras foram misturadas com KBr e prensadas para a formação de uma pastilha. As pastilhas foram analisadas na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} usando 16 scans, com uma resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas em duplicata.

3.2.2.6 Área superficial específica (a_s)

A área superficial dos criogéis de betalaína foi determinada usando o método de BET (Brunauer-Emmet-Teller) por meio de um analisador de área superficial (Gemini V2.00, Micromeritics Instrument Corp, Norcross, GA, USA).

3.2.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Para as análises morfológicas, os criogéis foram recobertos com ouro usando um metalizador (DENTON VACUUM Desk IV) em condições de vácuo por 3 minutos. As imagens foram analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura (JSM 6490 LV, JEOL, Alemanha).

3.2.2.8 Análises estatística

As análises estatísticas foram realizadas através de análise de variância de um fator (ANOVA) ($p < 0,05$) usando Minitab 16®, (Minitab, State College, EUA). O teste de Tukey foi utilizado para comparar as diferenças entre valores médios das amostras.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Conteúdo de betalaína (BC) e Eficiência de encapsulação (% EE).

A eficiência de encapsulação dos criogéis pré-carregados apresentou valores entre 94 % e 97 %, como mostra a Tabela 3.1, na qual se constata que, no criogel ALB-PEC o aumento de 2 % e 2,5 % de PEC, aumentou a eficiência de encapsulação. Nos criogéis pós-carregados, a eficiência de encapsulação variou entre 88 e 97 %. Observou-se que a eficiência de encapsulação aumentou com a adição de PEC, indo de 92 % (1 % de PEC) até 97 % (2,5 % de PEC). A máxima eficiência de encapsulação, de 97%, correspondeu às formulações com 2,5 % de PEC, tanto de criogéis pré-carregados quanto de pós-carregados.

Em geral, a pré-carga e pós-carga foram boas metodologias para a encapsulação da betalaína, com eficiência maior que 90%, à exceção do criogel de ALB pós-carregado, cuja eficiência foi de 88%. Robert et al. (2015), encapsulando suco de figo da Índia por *spray drying*, reportaram altas eficiências de encapsulação de 99,9 % em matrizes de proteína isolada de soja (SPI) e SPI-Maltodextrina. Os altos valores, de acordo com esses autores, se devem provavelmente à ocorrência de interações eletrostáticas da betalaína com a matriz de

proteína e polissacarídeo. De trabalhos prévios, sabe-se que o gel de ALB atinge uma carga líquida negativa de -29,9 mV e os géis de ALB-PEC, -30,9, -32,7 e -25,5 mV para as concentrações de 1, 2 e 2,5 % de PEC em pH 8, respectivamente (CHAUX-GUTIÉRREZ; PÉREZ-MONTERROZA; MAURO, 2019). Essas densidades de cargas negativas permitem maiores interações de atração eletrostática com a betalína, que possui uma carga líquida positiva (MORENO et al., 2008).

Os criogéis de ALB e ALB-PEC apresentaram eficiências de encapsulação maiores que as reportadas para outros tipos de compostos bioativos, como encapsulação de compostos fenólicos e carotenoides presentes no suco pitanga (*Eugenia Uniflora* L.), com valores de eficiências de encapsulação de 70 % e 74 %, respectivamente, usando goma tara e goma xantana como materiais de parede. Os autores atribuíram a alta eficiência de encapsulação a prováveis interações do tipo ligações de hidrogênio, devido aos grupos hidroxila presentes nos compostos fenólicos e nas gomas, enquanto que no caso dos carotenoides, às interações dipolo-dipolo entre os grupos metila da sua molécula e os presentes nos polímeros.

Os resultados indicam que a ALB e ALB-PEC são alternativas promissoras como materiais de parede para a encapsulação da betalína. Não se observaram diferenças significativas na eficiência de encapsulação usando a pré-carga ou pós-carga. Sob esse ponto de vista, recomenda-se, portanto, a pré-carga, que apresenta menor número de etapas de processamento.

Tabela 3.1. Eficiência de encapsulação dos criogéis de ALB e ALB-PEC usando pré-carga e pós-carga.

Amostra	Pré-carga	Pós-carga
	EE (%)	EE (%)
ALB	96,20 ± 0,26 ^b	88,44 ± 4,03 ^b
ALB-PEC (1% PEC)	94,15 ± 0,31 ^c	92,04 ± 4,05 ^{ab}
ALB-PEC (2% PEC)	97,75 ± 0,45 ^a	94,90 ± 0,75 ^{ab}
ALB-PEC (2,5% PEC)	97,37 ± 0,24 ^a	97,26 ± 1,10 ^a

Média de duas repetições ± desvio padrão. Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

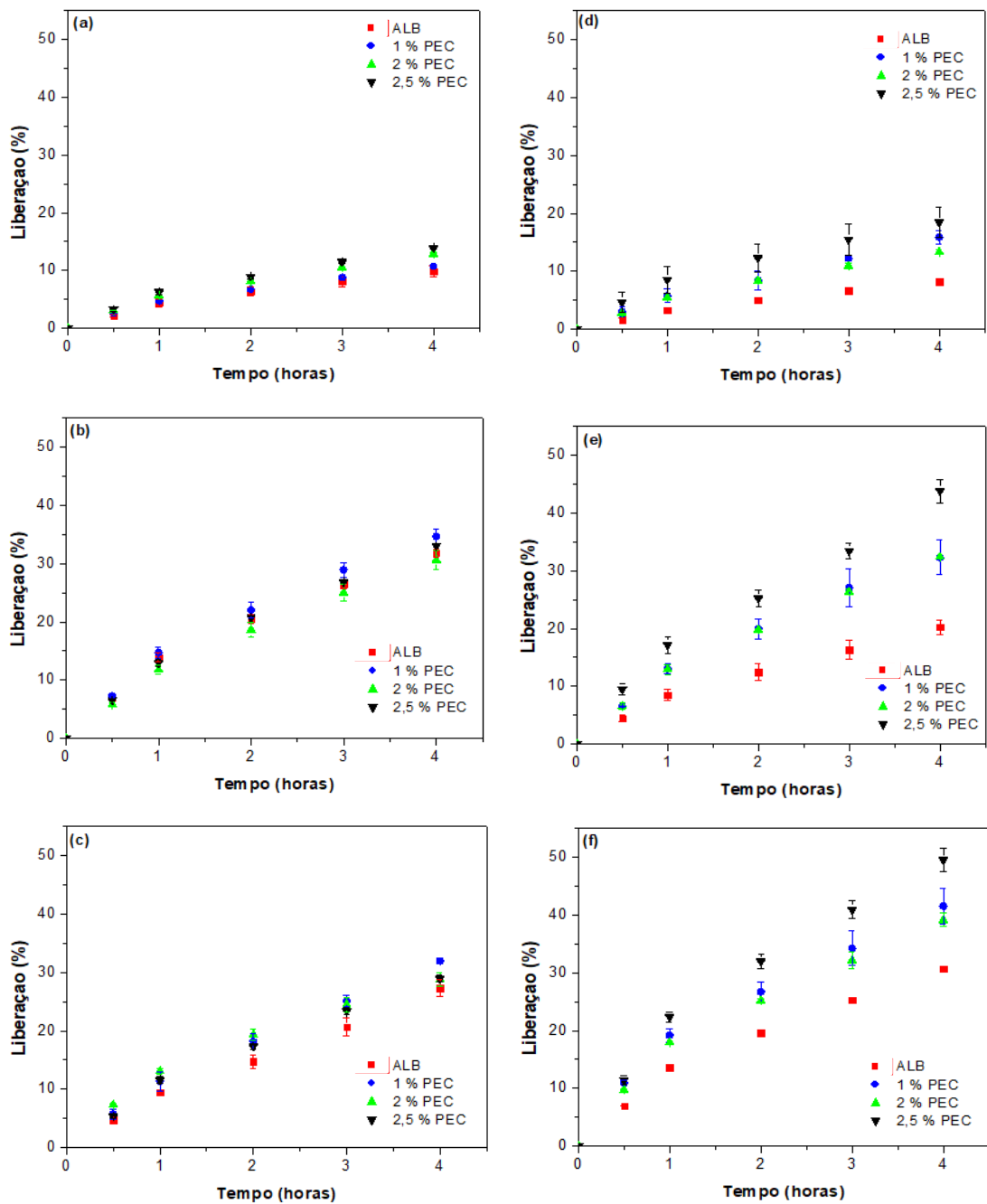
3.3.2 Perfil de liberação da betalaína.

A fim de avaliar o comportamento da betalaína em relação à liberação e à sua estabilidade em diferentes condições de pH, perfis de liberação em meios com pH ácido, neutro e alcalino foram estudados, os quais são apresentados na Figura 3.1. O aumento na concentração de PEC provocou um aumento na porcentagem de liberação da betalaína. Os criogéis pré-carregados submetidos a pH 2, apresentaram porcentagens crescentes de liberação até 4 horas, em função da adição de PEC, de 9 % para o criogel ALB até 13,5 % (2,5% PEC). Por sua vez, em pH 7 e pH 10, a liberação atingiu valores maiores durante o mesmo período, com porcentagens entre 29,7% e 33 % e entre 27 e 31 %, respectivamente. Em relação aos criogéis pós-carregados em pH 2, observaram-se porcentagens de liberação aumentando com incrementos na concentração de PEC, com valores entre 8 % (criogel ALB) até 17 % (criogel ALB-PEC 2,5 %). Esse comportamento também foi observado em pH 7, cujos valores de liberação mantiveram-se na faixa entre 20 % a 43 %, assim como em pH 10, cuja faixa variou de 30 % a 49 %.

Os menores valores nas porcentagens de liberação observados em pH 2, poderiam estar relacionados ao seu efeito sobre a estrutura do gel, que permaneceria mais compacta e resistente à absorção do solvente. Fang & Cathala (2011) reportaram efeitos do pH sobre a expansão de micropartículas de biopolímeros em meios fluidos, sendo que em pH baixo, atribuíram o menor grau de inchamento de géis de alginato e carboximetilcelulose à diminuição da repulsão eletrostática entre os grupos ionizáveis desses dois biopolímeros, o que levou a uma absorção mínima do solvente. Portanto, acredita-se que no presente estudo o baixo pH tenha inibido a expansão dos criogéis e, conseqüentemente, a difusão da betalaína para fora do material de parede. A diminuição na liberação por efeito do pH também foi reportada em microcápsulas de alginato de sódio usadas na encapsulação de hesperidina, as quais, em pH 2, apresentaram estruturas compactas devido à diminuição da repulsão eletrostática, o que diminuiu a liberação da hesperidina (TSIRIGOTIS-MANIECKA et al., 2017). Os resultados deste estudo indicam que a metodologia de encapsulação (pré-carga ou pós-carga) afeta o perfil de liberação. No processo pós-carga, a adição de PEC provocou um aumento nas porcentagens de liberação, provavelmente por gerar uma matriz com porosidade maior, o que aumenta a difusão da betalaína ao meio. O perfil de liberação dos criogéis pós-carregados foi afetado em maior grau no pH 10, cuja liberação, em 4 horas foi de apenas 50

%, indicando uma liberação lenta da betalaína, que pode ser de interesse para usos específicos de liberação modulada.

Figura 3.1. Perfil de liberação da betalaína 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).



3.3.3 Cor

Os parâmetros de cor dos criogéis usando pré-carga e pós-carga com betalaína são apresentados na Tabela 3.2. Os resultados mostraram que a claridade (L^*) de todos os criogéis foi maior que a do Controle (extrato de betalaína não encapsulado ($L^*= 15$)), com valores entre 18 e 26. No entanto, os criogéis de ALB-PEC com maior concentração de PEC (2 e 2,5%) foram ligeiramente mais escuros (L^* menor) que os demais. Em relação ao parâmetro a^* , observou-se que os criogéis pós-carregados apresentaram uma intensidade de cor vermelha (a^*) ligeiramente mais alta que os criogéis pré-carregados, enquanto que o parâmetro (b^*), que representa a tonalidade azul tendeu ligeiramente a perder intensidade com a adição de PEC. Os criogéis apresentaram valores de C^* menores que o Controle, o que indica diminuição de saturação e cores menos vivas, sendo que os criogés pós-carregados mostraram vivacidade ligeiramente superior aos pré-carregados. A tonalidade (h^*) de todos os criogéis foi vermelha-púrpura, com uma ligeira tendência de aumento com a adição da PEC. Em geral, não foi observada nenhuma diferença relevante entre os parâmetros de cor da betalaína encapsulada mediante pré-carga ou pós-carga ou ainda pelo efeito da adição de pectina.

Tabela 3.2. Parâmetros de cor dos criogéis usando pré-carga e pós-carga.

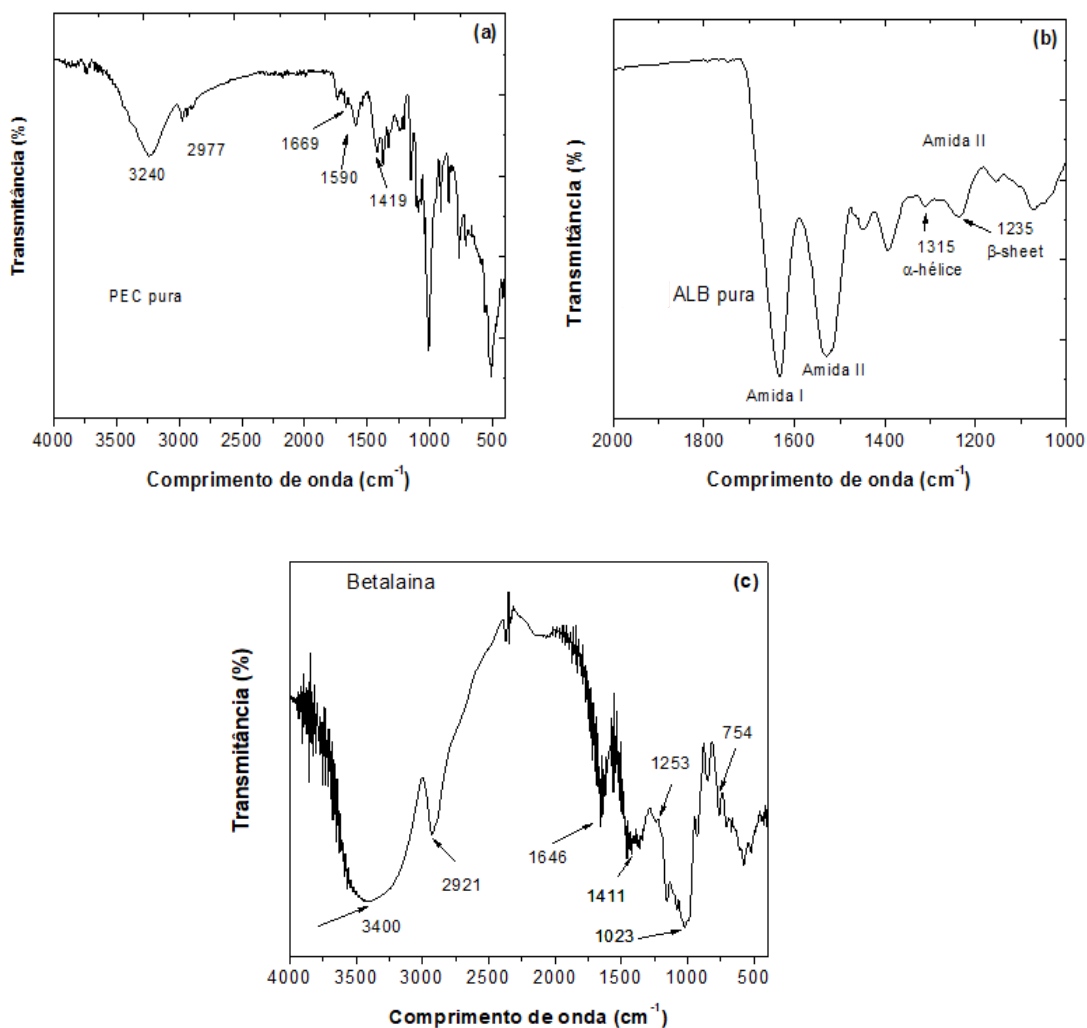
Amostra	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*
Controle	15,34 ± 0,13 ^e	24,41 ± 0,04 ^a	-5,57 ± 0,04 ^a	25,03 ± 0,03 ^a	347,15 ± 0,07 ^a
Pré-carga					
ALB	24,33 ± 2,02 ^{ab}	16,81 ± 0,69 ^e	-9,51 ± 0,30 ^{cd}	19,31 ± 0,73 ^e	330,50 ± 0,44 ^f
ALB-PEC (1%)	22,10 ± 1,52 ^{bc}	18,38 ± 0,78 ^{cde}	-9,19 ± 0,28 ^c	20,55 ± 0,81 ^{cde}	333,43 ± 0,13 ^{cd}
ALB-PEC (2%)	19,49 ± 1,02 ^{cd}	18,03 ± 0,34 ^{de}	-8,85 ± 0,13 ^{bc}	20,09 ± 0,27 ^{de}	333,83 ± 0,75 ^{cd}
ALB-PEC (2,5%)	18,53 ± 1,25 ^{de}	17,57 ± 0,61 ^e	-8,30 ± 0,23 ^b	19,43 ± 0,62 ^{de}	334,67 ± 0,58 ^{bc}
Pós-carga					
ALB	25,28 ± 1,36 ^{ab}	20,07 ± 0,59 ^{bc}	-10,08 ± 0,13 ^{de}	22,46 ± 0,58 ^b	333,33 ± 0,42 ^{de}
ALB-PEC (1%)	26,16 ± 0,28 ^a	20,41 ± 0,778 ^b	-10,79 ± 0,24 ^e	23,09 ± 0,51 ^b	332,10 ± 0,17 ^e
ALB-PEC (2%)	20,50 ± 0,74 ^{cd}	19,37 ± 0,20 ^{bcd}	-8,91 ± 0,18 ^{bc}	21,33 ± 0,21 ^{bcd}	335,30 ± 0,44 ^b
ALB-PEC (2,5%)	24,29 ± 0,79 ^{ab}	20,31 ± 1,14 ^b	-9,29 ± 0,62 ^{cd}	22,34 ± 1,28 ^{bc}	335,43 ± 0,55 ^b

Média de três repetições ± desvio padrão. Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

3.3.4 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

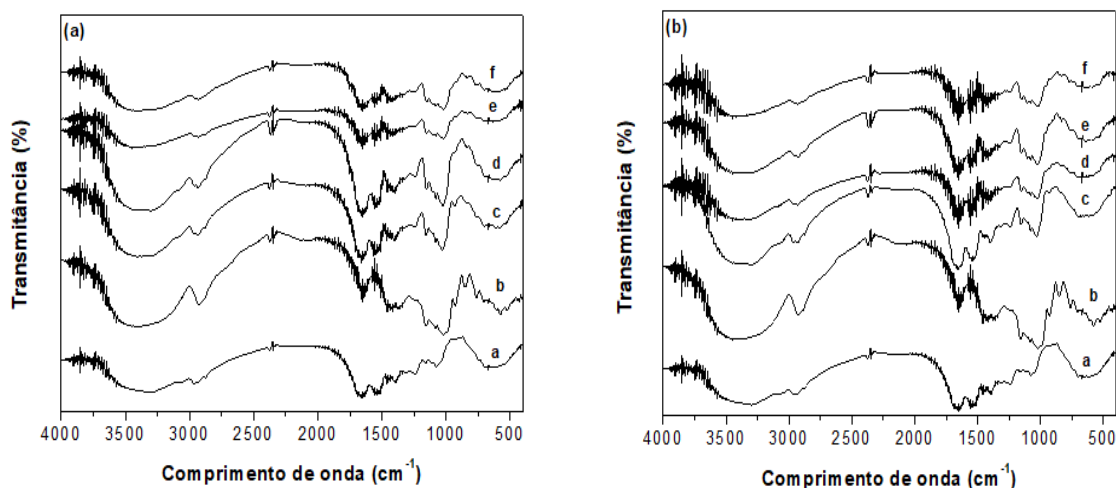
Os espectros de infravermelho da PEC, ALB e betalaína são apresentados na Figura 3.2. A PEC (Figura 3.2a) apresentou uma banda larga entre 3600 e 2500 cm^{-1} , a qual foi associada com o estiramento do O-H do ácido carboxílico. Foi observada uma banda em 2977 cm^{-1} associada com o estiramento das vibrações do C-H. A PEC, que é amidada, ainda apresentou três bandas, uma em 1669 cm^{-1} , a qual foi associada com a deformação do N-H, e duas em 1590 e 1419 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento assimétrico do N-O e C-N, respectivamente (BURAPAPADH; TAKEUCHI; SRIAMORNSAK, 2015). A ALB (Figura 3.2b) apresentou três bandas características, a amida I, compreendida entre 1600 a 1700 cm^{-1} , correspondente ao estiramento débil do -C=O acoplado ao estiramento do C-N e à deformação do N-H. Há uma segunda banda denominada amida II, compreendida entre 1500 e 1600 cm^{-1} , que representa o estiramento forte do C-N acoplado à deformação do N-H. Finalmente, há uma banda entre 1200-1350 cm^{-1} , correspondente à amida III, a qual representa a deformação no plano do N-H, acoplado ao estiramento do C-N, assim como às vibrações e deformações do C-H e N-H (SINGH, 2000). Na região da amida III destacam-se duas bandas em 1315 e 1235 cm^{-1} , as quais foram associadas com as estruturas α -hélice e β -pregueada, respectivamente (SINGH, 2000). A betalaína (Figura 3.2c) apresentou uma banda em 3400 cm^{-1} que corresponde ao estiramento do O-H, e em 2921 cm^{-1} associada ao estiramento simétrico do C-H. Também foram observadas três bandas em 1646 cm^{-1} , 1411 cm^{-1} e 1253 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento assimétrico do C=O, C-O e C-O do ácido, respectivamente. A banda em 1023 cm^{-1} corresponde ao estiramento do C-N e a banda em 754 cm^{-1} corresponde à presença do grupo amida (N-H) (SUTARIYA; SARAF, 2017).

Figura 3.2. Espectros de infravermelho da albumina (ALB) (a), pectina (PEC) e a betalaína (c).



Na Figura 3.3 são apresentados os espectros de infravermelho dos criogéis usando pré-carga e pós-carga. Ao comparar o espectro da betalaína com os espectros dos criogéis usando pré-carga e pós-carga (Figura 3.3 a,b) observou-se uma diminuição na intensidade das bandas do N-O (1590 cm^{-1}) e do C-N (1023 cm^{-1}), enquanto que, as bandas em 1411 cm^{-1} (C-O) e 754 cm^{-1} (grupo amida), que estavam presentes na betalaína, desapareceram nos criogéis (Figura 3.2). Isto sugere uma diminuição na mobilidade dos grupos funcionais e o favorecimento da encapsulação da betalaína na matriz de ALB e ALB-PEC. Além disso, foram observadas mudanças na banda do OH (3300 cm^{-1}), o que poderia estar relacionado com a interação do tipo ligações de hidrogênio entre os grupos da betalaína e os da ALB e da PEC.

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).



3.3.5 Área superficial específica (a_s).

A área superficial dos criogéis pré-carregados e pós-carregados com betalaína apresentaram valores entre $1,5$ a $2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e $1,1$ a $3,58 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3.3). Nos criogéis preparados usando pré-carga não se observaram mudanças significativas na a_s quando a PEC foi adicionada, enquanto que, nos criogéis preparados usando pós-carga, a adição de 1 % de PEC duplicou o valor da área superficial, em relação à do criogel apenas com ALB (Tabela 3.3). Os criogéis preparados com betalaína na matriz de ALB ou ALB-PEC, independentemente do método de carga, apresentaram uma área superficial menor, em comparação com as reportadas para aerogéis produzidos usando como material de parede proteína de soro de leite, o qual apresentou valores próximos a $310 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (BETZ et al., 2012). Porém, os resultados foram muito similares aos reportados por Betz et al. (2012) em criogéis de proteína de soro de leite, com valores próximos a $5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Tais diferenças devem-se ao processo de produção e secagem entre criogéis e aerogéis, no congelamento o tamanho dos cristais de gelo poderia ter influência sobre a área superficial (BETZ et al. 2012), além disso, durante a liofilização o hidrogel encolhe quando a água é extraída (GARCÍA-GONZÁLEZ; ALNAIEF; SMIRNOVA, 2012). No entanto, os valores baixos da a_s podem ser

vantajosos na encapsulação de bioativos, na medida em que uma menor área exposta minimizaria a área de transferência do oxigênio e do vapor de água.

Tabela 3.3. Área superficial dos criogéis de ALB e ALB-PEC usando pré-carga e pós-carga.

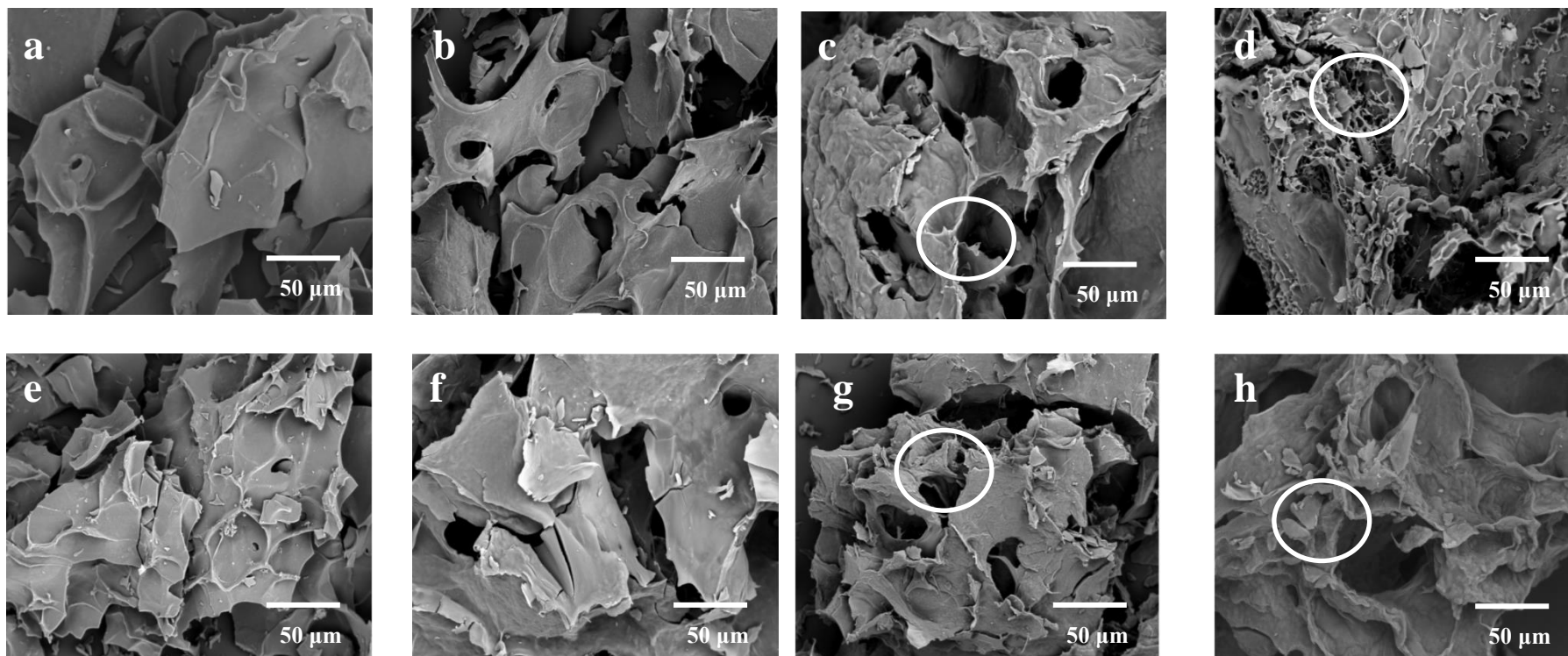
Amostra	Pré-carga	Pós-carga
	$a_s (\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1})$	$a_s (\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1})$
ALB	$2,060 \pm 0,072^b$	$1,542 \pm 0,133^{bc}$
ALB-PEC (1%)	$1,504 \pm 0,118^{bc}$	$3,586 \pm 0,351^a$
ALB-PEC (2%)	$1,716 \pm 0,317^{bc}$	$1,379 \pm 0,088^{bc}$
ALB-PEC (2,5%)	$1,594 \pm 0,157^{bc}$	$1,115 \pm 0,050^c$

Média de três repetições \pm desvio padrão. Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

3.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 3.4 mostra as superfícies dos criogéis de ALB e ALB-PEC, usando a metodologia de encapsulação pré-carga e pós-carga. Em geral os criogéis de ALB apresentaram partículas com um aspecto compacto e denso (Figura 3.4 a,e), enquanto que, os criogéis de ALB-PEC apresentaram estruturas mais porosas que os criogéis apenas com ALB (Figura 3.4 c,d,g,h). O aumento na concentração de PEC levou a um aumento da porosidade, pois devido ao grau de esterificação baixo da PEC são favorecidas as interações entre os resíduos contíguos do ácido galacturônico não metilesterificados com o cálcio o que promove a formação de uma rede fibrosa entrelaçada como foi sugerido por Kyomugasho et al. (2016), isto pode ser observado no destaque Figura 3.4 c,d,g,h. O aumento da porcentagem de liberação com a adição de PEC, como discutido anteriormente, também está associado ao aumento da porosidade, como pode ser observado na Figura (3.4 c,d g,h).

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). Magnificação 300 ×. Os círculos representam detalhes da porosidade.



3.4 Conclusão

A betalaína de beterraba (*Beta vulgaris*) foi encapsulada em criogéis de ALB e ALB-PEC através de duas metodologias de incorporação, a pré-carga e a pós-carga. A presença de PEC no material de parede aumentou a eficiência de encapsulação e afetou o perfil de liberação da betalaína em soluções com diferentes valores de pH. Os parâmetros de cor nos criogéis não sofreram modificações consideráveis pelo uso da pré-carga ou pós-carga ou pelo efeito da adição de pectina. Os criogéis produzidos a partir de ALB e ALB-PEC podem ser usados como matrizes para a proteção da betalaína. A concentração de PEC e a metodologia de incorporação permitem a liberação controlada de betalaína em diferentes condições de pH.

3.5 Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Proc. 2017/02808-6], à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pela bolsa, ao professor Luis Fernando Torres por permitir o uso do espectro de infravermelho, ao Grupo de Pesquisa BIOALI da Universidade de Antioquia (Colômbia), a Danisco Brasil pela doação da pectina e a Sensient Technologies Corporation Brasil pela doação do suco de beterraba em pó.

3.6 Referências.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, Ana et al. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and *psyllium*. **Food Chemistry**, v. 167, p. 378–386, 2015.

BETZ, Michael. 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.

BURAPAPADH, Kanokporn; TAKEUCHI, Hirofumi; SRIAMORNSAK, Pornsak. Development of pectin nanoparticles through mechanical homogenization for dissolution enhancement of itraconazole. **Asian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 365–375,

2015.

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.

CHAUX-GUTIÉRREZ, Ana María; PÉREZ-MONTERROZA, Ezequiel José; MAURO, Maria Aparecida. Rheological and structural characterization of gels from albumin and low methoxyl amidated pectin mixtures. **Food Hydrocolloids**, 2019.

CHEN, Lingyun; REMONDETTO, Gabriel E.; SUBIRADE, Muriel. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and 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.

DA ROSA, Cleonice Gonçalves et al. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 527–533, 2014.

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.

ESCRIBANO, Josefa et al. Characterization of betalains , saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. **Food Chemistry**, v. 234, p. 285–294, 2017.

FANG, Aiping; CATHALA, Bernard. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Smart swelling biopolymer microparticles by a microfluidic approach : Synthesis, in situ encapsulation and

controlled release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 81–86, 2011.

FARJAMI, Toktam; MADADLOU, Ashkan; LABBAFI, Mohsen. Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels. **Food Hydrocolloids**, v. 50, p. 159–165, 2015.

FATHI, Milad; JULIAN, David. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, n. 1, p. 18–39, 2014.

GANDÍA-HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa; GARCÍA-CARMONA, Francisco. Biological Activities of Plant Pigments Betalains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 937–945, 2016.

GANDÍA-HERRERO, Fernando; GARCÍA-CARMO. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 6, p. 334–343, 2013.

GARCÍA-GONZÁLEZ, Carlos A et al. Preparation of tailor-made starch-based aerogel microspheres by the emulsion-gelation method. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1378–1386, 2012.

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

JUNG, Jiyoun; ARNOLD, Robert D.; WICKER, Louise. Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon-targeted drug delivery carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 116–121, 2013.

KYOMUGASHO, Clare et al. Food Hydrocolloids Evaluation of cation-facilitated pectin-gel properties : Cryo-SEM visualisation and rheological properties. **Food hydrocolloids**, v. 61, p. 172–182, 2016.

MOORE, Dexter S. Amino acid and peptide net charges: A simple calculation procedure. **Biochemical Education**, v. 13, n. 1, p. 10–11, 1985.

MORENO, Diego A. et al. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 261–280, 2008.

NAKAGAWA, Kyuya; SOWASOD, Nataporn; TANTHAPANICHAKOON, Wiwut. Hydrogel based oil encapsulation for controlled release of curcumin by using a ternary system of chitosan, kappa- carrageenan, and carboxymethylcellulose sodium salt. **LWT - Food**

Science and Technology, v. 54, n. 2, p. 600–605, 2013.

OBÓN, José Maria. et al. Production of a red – purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 471–479, 2009.

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.

PASRIJA, Divya et al. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 289–296, 2015.

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.

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.

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.

SINGH, Bal Ram. Basic Aspects of the Technique and Applications of Infrared Spectroscopy of Peptides and Proteins. In: SING, Bal Ram (Ed.). **Infrared Analysis of Peptides and proteins: principles and application**. Washington, D.C: ACS symposium serie, 2000. p. 190.

SUTARIYA, Brijesh; SARAF, Madhusudan. Betanin , isolated from fruits of *Opuntia elatior* Mill attenuates renal fibrosis in diabetic rats through regulating oxidative stress and TGF- β pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, n. December 2016, p. 432–443, 2017.

TSIRIGOTIS-MANIECKA, Marta et al. Microencapsulation of hesperidin in polyelectrolyte complex microbeads: Physico-chemical evaluation and release behavior. **Journal of Food**

Engineering, v. 214, p. 104–116, 2017.

VERGARA, Cristina et al. Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. **Food Chemistry**, v. 157, p. 246–251, 2014.

CAPÍTULO IV Estabilidade da betalaína encapsulada em criogéis de albumina e albumina-pectina de baixa metoxilação

Estabilidade da betalaína encapsulada em criogéis de albumina e albumina-pectina de baixa metoxilação

Ana María Chaux-Gutiérrez^{1*}, Ezequiel José Pérez-Monterroza¹, Diana María Granda-Restrepo², Maria Aparecida Mauro¹

¹ Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista (Unesp) Rua Cristovão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Grupo de Investigación BIOALI, Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia

E-mail de correspondência: anachauxg@gmail.com, ana.chaux@unesp.br.

Resumo

A estabilidade da betalaína encapsulada em criogéis de albumina (ALB) e albumina-pectina (ALB-PEC) foi avaliada durante armazenamento a 32 e 83 % UR em diferentes condições de temperatura (4 °C, 30 °C e 40 °C). A retenção da betalaína (betanina + isobetanina), dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante, foram determinadas mediante cromatografia líquida (HPLC), método de Folin-Ciocalteu e captura do radical ABTS^{*+}, respectivamente. Parâmetros de cor e imagens dos encapsulados também foram obtidos. O criogel de ALB apresentou retenção de betanina e isobetanina a 32 % UR e 4 °C de 72 % e 82 % e maiores tempos de meia vida, de 108 e 165 dias, respectivamente. A atividade antioxidante e os compostos fenólicos apresentaram retenções acima de 70 % durante o tempo de armazenamento a 32 % UR, em todas as temperaturas. O aumento da umidade relativa a 83 % UR provocou intensa diminuição na retenção da betalaína.

Palavras-chave: Beterraba, isobetanina, Atividade antioxidante, Fenólicos, degradação.

4.1 Introdução

A betalaína é um pigmento natural hidrossolúvel, podendo ser classificada em betacianina ou betaxantina. A betacianina resulta da condensação do ácido betalâmico com um resíduo ciclo-Dopa [ciclo-3-(3,4-dihidroxifenilalanina)], enquanto que a betaxantina é produto da condensação do ácido betalâmico com um composto amino. As betalaínas são comercialmente obtidas da beterraba (*Beta vulgaris*), a cor vermelho-púrpura é atribuído às betacianinas principalmente à betaninas e isobetaninas, enquanto que a cor amarelo-laranja às betaxantinas (vulgaxantina-I e vulgaxantina-II) (CHHIKARA et al., 2019; GÜNEŞER, 2016; HERBACH; STINTZING; CARLE, 2004; OTÁLORA et al., 2016; SCHWARTZ; ELBE, 1983). Devido às diferenças estruturais entre as betacianinas e as betaxantinas, podem-se observar diferenças na sua estabilidade, no entanto, a concentração e outros fatores, tais como atividade de água, oxigênio, temperatura e pH, podem igualmente diminuir a estabilidade do pigmento (HERBACH; STINTZING; CARLE, 2006; PITALUA et al., 2010). A betanina pode se degradar e formar compostos como o ácido betalâmico e ciclo-DOPA-5-O-glicosídeo devido às reações de hidrólise, as quais são favorecidas pela atividade de água acima de 0,64 (MANCHALI et al., 2013). Enquanto que, o aumento da temperatura pode causar reações de isomerização e descarboxilação (HERBACH; STINTZING; CARLE, 2006). Para diminuir os efeitos das condições adversas durante o processamento e armazenamento desses compostos (CHHIKARA et al., 2019), e retardar sua degradação, são usados processos de encapsulação (JANISZEWSKA, 2014; OTÁLORA et al., 2015).

Nesse sentido, os criogéis apresentam-se como matrizes interessantes na encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos. Sendo o processo de secagem decisivo nas propriedades finais do material de parede (LAZARIDOU; KRITIKOPOULOU; BILIADERIS, 2015). O estudo de estabilidade durante o armazenamento de compostos bioativos encapsuladas em criogéis tem reportado por Rutz et al. (2013), os quais avaliaram a estabilidade dos carotenoides 4 e 25 °C encapsulados em criogéis de goma xantana e a mistura goma xantana-goma tara. De acordo com os autores foram atingidas retenções de 41,4 % e 44,3 %, a 25 °C e de 55,8 % a 4 °C para o criogel de goma xantana-goma tara e goma xantana respectivamente. A avaliação da estabilidade da betalaína encapsulada usando criogéis é escassa. Otálora et al. (2016) por exemplo, avaliou a estabilidade da betalaína extraída do figo da índia à umidade relativa de 34,6, 57,6, 74,8 e 84,3 % durante 25 dias, encapsulada em criogéis de alginato de cálcio e alginato de cálcio-albúmina de soro bovino.

Os resultados indicaram que as duas matrizes protegeram o pigmento, nas umidades relativas de 34,6 e 57,6 %.

A avaliação da estabilidade da betalaína encapsulada usando criogéis é escassa (OTÁLORA et al., 2016), por essa razão presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito de fatores externos tais como temperatura e umidade relativa, sobre os parâmetros da cor, retenção de betalaínas (betanina+isobetanina), de compostos fenólicos e de capacidade antioxidante, assim como os parâmetros cinéticos de degradação da betanina e isobetanina, em criogéis preparados com albumina de ovo (ALB) e com mistura de ALB e pectina amidada de baixa metoxilação (PEC).

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

Extrato de betalaína em pó (Bet) (Suco de beterraba (*Beta vulgaris*), maltodextrina, ácido cítrico e ácido ascórbico) foi doado por Sensient® Technologies Corporation (Jundiaí, São Paulo, Brasil), Albumina de ovo em pó (ALB) foi obtida da Naturovos Ltda. (Salvador do Sul, RS, Brasil, 90 % proteína, 4,98 % cinzas, 0,06 % lipídeos). Pectina amidada de baixa metoxilação (PEC) foi doada por Danisco Ltda. (GRINDSTED® LA 210, São Paulo, SP, Brasil, grau de esterificação (GE) 34 %, grau de amidação (GA) 17 %. Hidróxido de sódio, cloreto de cálcio, ácido clorídrico, cloreto de magnésio e cloreto de potássio foram adquiridos da Panreac (Castellar del Vallès, Barcelona, Espanha). 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzenotiazóico-6-sulfônico) (ABTS) Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), reagente de Folin-Ciocalteu (2,0 N), ácido Gálico, e padrão da betanina foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Preparação dos criogéis

Os criogéis de albumina (ALB) e pectina amidada de baixa metoxilação para a encapsulação de betalaína (Bet) foram preparados da seguinte maneira: primeiro foram preparadas dispersões de ALB (5 g/100g) e de PEC (5 g/100g) em água a 25 °C separadamente, sob agitação constante por 3 horas. Posteriormente o pH das dispersões foi ajustado em pH 8 (HCl (0,1 M); NaOH (0,1 M)). Para a preparação do gel de ALB-Bet a dispersão da ALB foi aquecida a 85 °C sob agitação constante por 15 minutos e resfriada até 40 °C. Depois de seu resfriamento, adicionou-se o extrato de betalaína em quantidade correspondente a 2 % (m/m) da massa total da dispersão de ALB, sendo que a mistura, protegida da luz, foi agitada por 20 minutos. Finalmente, a mistura ALB-Bet foi despejada em placas de petri e deixada a 4 °C, até a formação do gel. Para a formação do gel de ALB-Bet-PEC, foi realizado o aquecimento da dispersão de ALB como descrito anteriormente. Depois de resfriada até 40 °C, à dispersão de ALB foi adicionada à dispersão de PEC, de maneira a obter a proporção de 4:1 (ALB:PEC), sendo então agitada por 5 minutos. A seguir, foi adicionado o extrato de betalaína correspondente a 2 % (m/m) da massa total da mistura de ALB-PEC, a qual foi agitada por 20 minutos, protegida da luz. Seguiu-se a adição de solução do cloreto de cálcio (2 % m/v) em quantidade correspondente a 1 % (m/m) da massa da dispersão da PEC, sob agitação constante, por 10 minutos e, ao final, a dispersão foi despejada em placas de Petri e deixada a 4 °C até sua gelificação. Finalmente para a produção dos criogéis ALB-Bet e ALB-Bet-PEC, os géis, previamente preparados, foram congelados a -18 °C por 24 horas. A liofilização foi realizada usando liofilizador (LIOBRAS, São Carlos, SP, Brasil) a uma pressão interna de 50 mbar e uma temperatura no coletor de -42 °C. Para a obtenção do pó, os criogéis foram macerados manualmente usando almofariz.

4.2.2.2 Efeito da temperatura e da umidade relativa sobre os criogéis ALB-Bet e ALB-Bet-PEC.

A estabilidade dos criogéis ALB-Bet e ALB-Bet-PEC foi estudada em duas umidades relativas, por 45 dias, em diferentes temperaturas. Os criogéis e o suco de betalaína não encapsulado (Controle) foram dispostos em cápsulas de plástico sem tampa, as quais foram colocadas em recipientes com soluções salinas saturadas. Estas eram constituídas de $MgCl_2$ e KCl, de maneira a condicionar a atmosfera a umidades relativas (UR) de aproximadamente 32 % e 83 %, respectivamente, para o caso das temperaturas em torno de 30 °C. Em cada umidade relativa, as amostras foram armazenadas em ausência de luz, por 45 dias, a temperaturas controladas de 4 °C, 30 °C e 40 °C. Para as análises de estabilidade, foram medidos parâmetros de cor, conteúdo de betalaína e isobetanina, conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante. A cinética de degradação da betanina e da isobetanina foi também analisada, tomando-se amostras no tempo zero e depois de 10, 20, 30, 40 e 45 dias expostas às condições de umidade relativa e temperatura especificada.

4.2.2.3 Conteúdo de betanina, isobetanina e porcentagem de retenção.

A preparação dos extratos para quantificação da betanina e isobetanina foi realizada de acordo com metodologia de Otálora et al. (2016) com algumas modificações. Foram pesados 120 mg dos criogéis e dispersados em 15 mL de uma solução de metanol: água (1:1). A mistura foi agitada por 1 hora a 300 rpm em um agitador orbital (Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & C, Walpersdorfer, Schwabach, Alemanha) à temperatura ambiente (25 °C) e, posteriormente, centrifugada a 5500 rpm por 20 minutos. Para as análises realizadas com a amostra controle, foram pesados 60 mg do extrato de betalaína. Os sobrenadantes foram filtrados através de um filtro de 0,45 μm e a quantificação das betalaínas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema de HPLC Azura® (Knauer, Berlin, Alemanha) equipado com uma bomba (P 6.1L), um auto-amostrador (AS 6.1L) e um detector UV/vis (DAD 6.1L). Os analitos foram separados usando uma coluna C18 (100 mm×3 mm). A temperatura do forno da coluna foi mantida a 25 °C, a velocidade de fluxo foi de 0,5 mL/min e o volume de injeção, de 20 μL . A fase móvel usada foi uma mistura de ácido fórmico em água (2 % v/v) (componente A) e álcool metílico (componente B). O gradiente de

eluição usado foi: 0 minutos (5 % B), 12 minutos (25 % B) e 15 minutos (70 % B) (SPÓRNA-KUCAB et al., 2015). A detecção da betanina e isobetanina foi realizada a 534 nm. As análises foram realizadas em duplicata.

A retenção da betanina e isobetanina foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{Retenção} = \frac{\text{Concentração}_t}{\text{Concentração}_0} \times 100 \quad (1)$$

sendo que Concentração representa $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de betanina ou isobetanina, os subíndices t representa o tempo (dias) de armazenamento e zero (0) indica o início do experimento.

4.2.2.4 Compostos fenólicos

O conteúdo dos compostos fenólicos foi determinado usando o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Os extratos foram preparados usando uma solução metanol:água (1:1). As medidas de absorbância foram feitas a 725 nm em espectrofotômetro UV/VIS (UV-3000, Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd, Shanghai, China). A quantificação foi realizada usando uma curva de calibração de soluções aquosas de ácido gálico (0-500 ppm). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (EAG) por g ($\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$). As análises foram realizadas em triplicata. A retenção foi calculada com base na Equação 1, sendo que, *Concentração* representa $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de captura do radical ABTS^{*+} de acordo com a metodologia proposta por Re et al. (1999). Os extratos foram preparados usando uma solução de metanol:água (1:1). As leituras de absorbância foram realizadas a 730 nm em espectrofotômetro UV/VIS (UV-3000, Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd, Shanghai, China). A quantificação foi realizada através da curva de calibração preparada com uma

solução aquosa de Trolox (0-200 $\mu\text{M/L}$). A atividade antioxidante foi expressa em micromoles de Trolox equivalentes (TEs) por g ($\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$). A retenção foi calculada de acordo com a Equação 1, sendo que, *Concentração* representa $\mu\text{M TEs}\cdot\text{g}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.6 Análises de cor

Os parâmetros de cor foram medidos usando um espectrofotômetro X-Rite 939 (X-Rite, Inc, Michigan, USA). Os resultados foram expressos de acordo com o sistema de cor CIELAB (L^* , a^* , e b^*) e os parâmetros croma (C^*) e o ângulo hue (h^*) também foram calculados conforme equações 2 e 3, respectivamente:

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

$$h^* = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3)$$

4.2.2.7 Cinética de degradação das betalaínas

As concentrações da betalaína (betanina+isobetanina) foram ajustadas às equações 4 (reação de ordem zero) e 5 (reação de ordem um). A velocidade da reação (k) foi obtida da equação que melhor descreveu a degradação da betalaína (betanina e isobetanina) no criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC. A dependência da degradação da betalaína com a temperatura foi avaliada através do quociente de temperatura (Q_{10}) (Equação 6) e da energia de ativação (E_a) segundo modelo de Arrhenius (Equação 7) (MOURA et al., 2018).

$$C = C_0 - k \quad (4)$$

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (5)$$

$$Q_{10} = \frac{k_T}{k_{T-10}} \quad (6)$$

$$k = k_0 e^{-E_a/RT} \quad (7)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (8)$$

sendo que C é a concentração de betanina ou isobetanina no tempo (t), C_0 é a concentração de betanina ou isobetanina no tempo inicial ($t = 0$), T é a temperatura (K), R constante universal dos gases ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), k é a velocidade de reação e $t_{1/2}$ é o tempo de meia vida.

4.2.2.8 Planejamento Experimental

Para a avaliação da estabilidade da betalaína encapsulada nos criogéis no tempo de armazenamento de 45 dias, foi usado um planejamento fatorial geral com 6 tratamentos (Tabela 4.1), para cada criogel preparado (ALB-Bet e ALB-Bet-PEC). As variáveis independentes foram a temperatura de armazenamento ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $40 \text{ }^\circ\text{C}$) e a umidade relativa (32% e 83%). As variáveis dependentes foram os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*), a porcentagem de retenção da betanina, da isobetanina, dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante.

4.2.2.9 Análises Estatísticas

Os resultados do planejamento experimental foram analisados utilizando-se o programa estatístico Minitab 16 ®, (Minitab, State College, EUA) considerando-se um nível de significância de 0,05 nos testes estatísticos. O ajuste do modelo cinético foi realizado Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, EUA). O coeficiente de determinação (R^2) foi utilizado para avaliar a capacidade do modelo de representar a cinética de degradação, cujo melhor ajuste foi identificado por valores altos do R^2 (maior que 0,8).

4.3 Resultados e Discussão

A Tabela 4.1 apresenta os resultados das variáveis de respostas avaliadas durante o estudo de estabilidade da betalaína, que foram os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h^*) e os percentuais de retenção de betanina, de isobetanina, de compostos fenólicos e de atividade antioxidante nas amostras Controle, ALB-Bet e ALB-Bet-PEC.

4.3.1 Porcentagem de retenção de betanina e isobetanina.

A retenção da betanina e isobetanina no criogel de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC foi afetada significativamente ($p < 0,05$) pela temperatura, umidade relativa e pela interação entre as mesmas (Tabela 4.2). A retenção da betanina (Figura 4.1 a,b,c) no criogel ALB-Bet submetido a 32 % UR e às temperaturas de 4 e 30 °C foi maior que no Controle, porém, similar ao Controle na temperatura de 40 °C, indicando que ALB como material de parede exerceu papel protetor nas temperatura menores. No entanto, é importante destacar que o aumento da temperatura levou a uma diminuição da retenção da betanina com valores de 72 % (4 °C), 61 % (30 °C) e 52 % (40 °C). O criogel de ALB-Bet-PEC armazenado a 32 % atingiu retenções de betanina de 64 % (4 °C), 63 % (30 °C) e 58 % (40 °C), esses resultados sugerem que a ALB é melhor material de parede a baixa temperatura (4 °C) do que a mistura ALB-PEC, devido mantém protegida uma maior concentração de betanina. No entanto o criogel ALB-PEC a 30 °C e 40 °C ofereceu melhor estabilidade do que o criogel ALB (Figura 4.1 a,b,c).

Em relação à isobetanina a 32 % UR, o aumento da temperatura afetou sua estabilidade de maneira similar à observada com a betanina, porém, com mais intensidade. Sua retenção no criogel de ALB-Bet diminuiu de 82 % (4 °C) para 70 % (30 °C) e para 66 % (40 °C), enquanto que no criogel de ALB-Bet-PEC, diminuiu de 71 % (4 °C) para 66 % (30 °C) e para 60 % (40 °C) (Figura 4.1 a,b,c). A diminuição pouco expressiva foi observada na amostra Controle com valores de 49 % (4 °C), 48 % (30 °C) e 44 % (40 °C). Portanto, os resultados sugerem que a ALB é melhor material de parede para proteger a isobetanina.

O aumento da UR até 83% diminuiu significativamente a retenção da betalaína (betanina+isobetanina), no Controle e em ambos os criogéis. Mesmo assim, constatou-se que

no armazenamento a 4 °C, os dois criogéis apresentaram retenção de betanina de 24 % e de isobetanina de 16 % no criogel ALB-Bet e 22 % no criogel ALB-Bet-PEC, sendo que os valores atingidos foram superiores aos do Controle (Figura 4.1 d). Nas temperaturas de 30 °C e 40 °C não foi possível detectar e quantificar o conteúdo de betanina ou isobetanina, devido às mudanças apresentadas durante os 45 dias de armazenamento (Figura 4.1 e,f).

De acordo com os resultados, cabe ressaltar que, embora o aumento da temperatura tenha provocado uma diminuição na retenção da betanina e isobetanina nos criogéis armazenados a 32 % UR, os valores de retenção sempre estiveram acima de 50 %, o que indica uma boa proteção nas condições mais desfavoráveis do teste. O aumento na temperatura pode provocar reações de degradação da betanina e da isobetanina em produtos como o ciclodopa-5-*O*-glicosídeo (incolor) e ácido betalâmico (SCHWARTZ; ELBE, 1983). Em relação ao armazenamento a 83 % UR, as grandes perdas da betalaína (betanina + isobetanina) indicaram que a UR é uma variável que afeta drasticamente a retenção dessa substância.

A alta degradação da betalaína em atividade de água alta (a_w) é favorecida devido à maior probabilidade de ocorrência de reações hidrolíticas, levando à hidrólise da ligação aldimina e liberação de ácido betalâmico (cor amarelo brilhante) (HERBACH et al., 2006). O efeito da umidade relativa alta sobre as betalaínas foi reportado por Carmo et al. (2018) para extrato de beterraba encapsulado por *spray drying*, com proteína isolada de soro de leite (15 % m/m) como material de parede, sendo que os resultados mostraram mudanças de cor de vermelho-púrpura para marrom em pós expostos a a_w de 0,733, o que, de acordo com os autores, seria indicativo de hidrólise da betalaína mas também poderia ser de reação de Maillard. Serris e Biliaderis (2001) também estudaram armazenamento em diferentes umidades relativas e temperaturas, de pigmentos de beterraba encapsulados por *spray drying* utilizando pululana e dois tipos de maltodextrina, e encontraram a_w de 0,64 como valor limítrofe, acima do qual a taxa de degradação foi acelerada. Os autores concluíram que a estabilidade estaria relacionada com a microestrutura e a porosidade da matriz, assim como dos efeitos das modificações estruturais provocadas pela adsorção de água que alterariam as propriedades de barreira ao oxigênio. Também foi estudado o comportamento de microcápsulas de suco de beterraba usando como material de parede goma arábica, armazenadas a 30 °C em a_w de 0,110, 0,326, 0,521, 0,748 e 0,898. Os resultados mostraram que nas a_w de 0,748 e 0,898 a betalaína apresentou a maior degradação após 20 dias de

armazenamento (PITALUA et al., 2010). Elevado grau de degradação da betalaína, com formação de ácido betalâmico, também foi observado em umidades relativas altas quando alginato de sódio-albumina sérica bovina foram usados como material de parede, o que foi reduzido com a diminuição da umidade relativa e também com a ausência da proteína na matriz (OTÁLORA et al., 2016).

Tabela 4.1. Planejamento fatorial geral e variáveis de resposta para 45 dias de armazenamento dos criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC. x_1 : temperatura de armazenamento (°C) e x_2 : Umidade relativa (%).

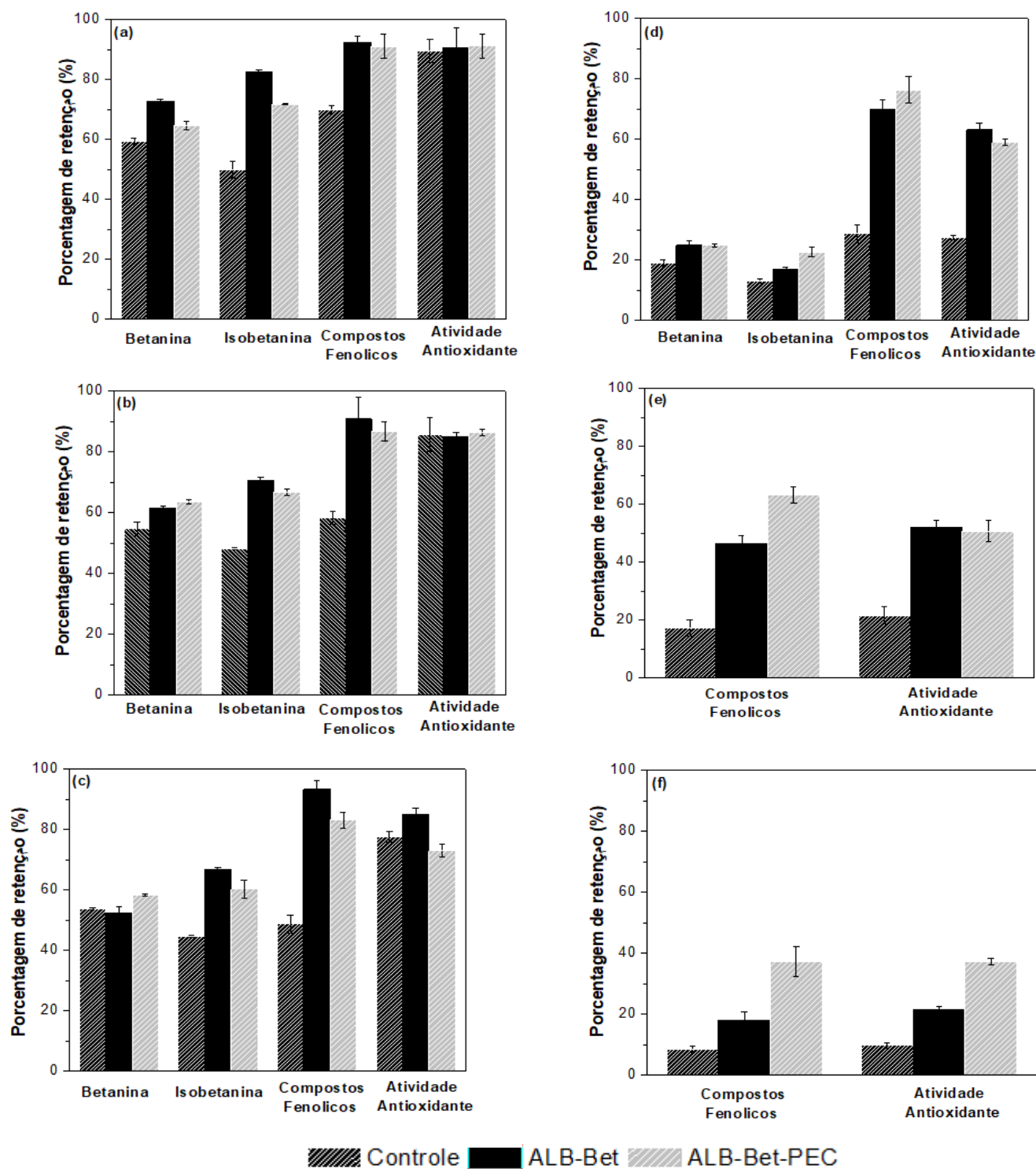
x_1	x_2	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*	Retenção Betanina (%)	Retenção Isobetanina(%)	Retenção compostos fenólicos(%)	Atividade Antioxidante (%)
ALB-Bet										
4	32	20,25 ± 0,25	22,53 ± 0,14	-10,83 ± 0,11	24,99 ± 0,08	337,20 ± 0,70	72,77 ± 0,60	82,66 ± 0,65	92,43 ± 2,08	90,52 ± 6,56
30	32	20,41 ± 0,06	22,72 ± 0,31	-7,55 ± 0,54	23,95 ± 0,47	340,20 ± 0,00	61,51 ± 0,46	70,56 ± 0,94	90,71 ± 7,12	85,01 ± 1,39
40	32	21,25 ± 0,09	22,37 ± 0,09	-4,73 ± 0,06	22,86 ± 0,10	346,95 ± 0,07	52,29 ± 1,99	66,88 ± 0,41	93,30 ± 2,77	84,88 ± 2,29
4	83	36,34 ± 0,38	26,23 ± 0,86	2,02 ± 0,01	26,31 ± 0,86	22,63 ± 1,81	24,82 ± 1,69	16,82 ± 0,77	70,01 ± 3,16	63,10 ± 2,24
30	83	53,49 ± 0,13	3,51 ± 0,57	30,41 ± 0,14	30,62 ± 0,08	83,41 ± 1,082	0,00	0,00	46,36 ± 2,81	52,04 ± 2,32
40	83	51,10 ± 0,54	2,84 ± 0,20	31,82 ± 0,23	31,95 ± 0,21	84,89 ± 0,40	0,00	0,00	18,12 ± 2,53	21,44 ± 1,17
ALB-Bet-PEC										
4	32	25,33 ± 0,29	22,31 ± 0,35	-9,95 ± 0,16	24,42 ± 0,38	336,95 ± 1,34	64,61 ± 1,48	71,78 ± 0,09	91,04 ± 4,09	91,15 ± 3,95
30	32	24,91 ± 0,00	23,60 ± 0,40	-7,74 ± 0,15	24,83 ± 0,43	339,40 ± 0,00	63,46 ± 0,72	66,71 ± 1,12	86,79 ± 3,09	86,33 ± 1,10
40	32	24,50 ± 0,93	22,55 ± 0,40	-4,86 ± 0,42	23,07 ± 0,48	346,70 ± 0,85	58,44 ± 0,37	60,27 ± 2,90	83,04 ± 2,67	72,99 ± 2,17
4	83	34,08 ± 1,78	29,63 ± 0,19	4,14 ± 0,79	29,92 ± 0,08	7,95 ± 1,55	24,81 ± 0,66	22,65 ± 1,52	76,32 ± 4,26	58,88 ± 1,09
30	83	54,04 ± 0,61	5,03 ± 0,18	31,88 ± 0,63	32,28 ± 0,60	81,03 ± 0,49	0,00	0,00	63,07 ± 2,85	50,61 ± 3,69
40	83	54,01 ± 1,10	5,71 ± 0,17	34,64 ± 1,18	35,11 ± 1,20	80,64 ± 0,04	0,00	0,00	37,31 ± 5,00	37,17 ± 1,12
Controle										
4	32	14,48 ± 0,09	21,74 ± 0,09	-5,30 ± 0,21	22,37 ± 0,14	345,86 ± 0,09	59,38 ± 0,97	49,94 ± 2,88	69,94 ± 1,48	89,52 ± 3,99
30	32	14,05 ± 0,01	22,80 ± 0,46	-4,73 ± 0,27	23,28 ± 0,51	345,19 ± 0,11	54,71 ± 2,30	48,13 ± 0,28	58,42 ± 2,15	85,70 ± 5,64
40	32	13,60 ± 0,22	22,91 ± 0,04	-3,79 ± 0,18	23,23 ± 0,07	346,50 ± 0,28	53,68 ± 0,31	44,65 ± 0,39	48,74 ± 3,00	77,60 ± 1,91
4	83	25,08 ± 0,09	7,32 ± 0,80	0,29 ± 0,04	7,32 ± 0,8	5,08 ± 0,04	19,10 ± 1,08	13,08 ± 0,66	28,80 ± 2,99	27,40 ± 0,63
30	83	25,54 ± 2,00	1,33 ± 0,01	2,58 ± 0,18	2,91 ± 0,16	62,80 ± 1,90	0,00	0,00	17,21 ± 2,90	21,61 ± 2,89
40	83	26,19 ± 0,01	1,79 ± 1,00	3,47 ± 1,54	3,91 ± 1,82	63,47 ± 3,18	0,00	0,00	8,41 ± 1,01	9,79 ± 0,88

Conteúdo inicial de betanina: 416,96 ± 9,93 mg·g⁻¹ (Controle), 343,13 ± 2,12 mg·g⁻¹ (ALB-Bet) e 343,72 ± 1,24 mg·g⁻¹ (ALB-Bet-PEC). Conteúdo inicial de Isobetanina: 574,56 ± 14,00 mg·g⁻¹ (Controle), 284,17 ± 4,64 mg·g⁻¹ (ALB-Bet) e 288,81 ± 6,21 mg·g⁻¹ (ALB-Bet-PEC). Conteúdo inicial de compostos fenólicos: 13,13 ± 0,88 mg EAG·g⁻¹ (Controle), 3,49 ± 0,23 mg EAG·g⁻¹ (ALB-Bet) e 2,51 ± 0,30 mg EAG·g⁻¹ (ALB-Bet-PEC). Atividade antioxidante inicial: 23,03 ± 0,40 μmoles Trolox·g⁻¹ (Controle), 15,23 ± 0,80 μmoles Trolox·g⁻¹ (ALB-Bet) e 16,32 ± 0,27 μmoles Trolox·g⁻¹ (ALB-Bet-PEC).

Tabela 4.2. Anova dos fatores (temperatura e umidade relativa) e das interações durante os 45 dias de armazenamento dos criogéis.

Fator	<i>L</i> *		<i>a</i> *		<i>b</i> *		<i>h</i> *		<i>C</i> *		Retenção Betanina (%)	Retenção Isobetanina(%)	Retenção compostos fenólicos(%)	Atividade Antioxidante (%)					
	GL	SQ	P valor	SQ	P valor	SQ	P valor	SQ	P valor	SQ	P valor	SQ	P value	SQ	P value	SQ	P valor		
ALB-Bet																			
x_1	2	183,7	0,000	354,4	0,000	769,9	0,000	3107	0,000	7,633	0,002	1146	0,000	637,6	0,000	1.552,3	0,000	855,6	0,000
x_2	1	2081,3	0,000	409,0	0,000	2543,9	0,000	231525	0,000	97,1	0,000	8722,5	0,000	13775	0,000	6570,5	0,000	5038,3	0,000
$x_1 x_2$	2	162,8	0,000	354,7	0,000	398,1	0,000	2041	0,000	31,7	0,000	95,9	0,009	12,3	0,003	1.532,5	0,000	845,5	0,000
Erro	6	0,53		1,23		0,38		5		1,02		25,1		2,1		36,4		9,8	
R^2		0,99		0,99		0,99		1		0,99		0,99		0,99		0,99		0,99	
R^2 ajust		0,99		0,99		0,99		1		0,99		0,99		0,99		0,99		0,99	
ALB-Bet-PEC																			
x_1	2	180,15	0,000	297,9	0,000	764,0	0,000	2915	0,000	20,608	0,014	553,4	0,000	659,1	0,000	1315,3	0,000	946,22	0,000
x_2	1	1554,5	0,000	374,6	0,000	2617,5	0,000	232850	0,000	115,9	0,000	8716,6	0,000	10341	0,000	2731,1	0,000	3618,2	0,000
$x_1 x_2$	2	207,5	0,000	342,5	0,000	464,3	0,000	1936	0,000	33,1	0,005	310,6	0,000	66,5	0,006	626,3	0,515	19,37	0,000
Error	6	9,94		5,05		4,55		15		6,6		3,3		9,0		28,6		78,12	
R^2		0,99		0,99		0,98		0,99		0,96		0,99		0,99		0,99		0,98	
R^2 ajust		0,99		0,99		0,97		0,99		0,93		0,99		0,99		0,98		0,96	

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).



4.3.2 Retenção de compostos fenólicos

A retenção dos compostos fenólicos no criogel de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC foi afetada significativamente ($p < 0,05$) pela temperatura, umidade relativa e interação entre as mesmas (Tabela 4.2). Na Figura 4.1, constata-se que a retenção dos compostos fenólicos na amostra Controle foi sempre inferior à retenção nos criogéis ALB-Bet e ALB-Bet-PEC, em todos os tratamentos estudados, o que mostra o efeito significativo dos materiais de parede (ALB e ALB-PEC) na redução da degradação desses compostos bioativos. Nas amostras de ALB-Bet armazenadas a 32 % UR, a retenção dos compostos fenólicos praticamente não variou com a temperatura, apresentando valores acima de 90 % (Tabela 4.1). Por outro lado, nos criogéis ALB-Bet-PEC, constatou-se diminuição da retenção com aumento da temperatura, que passou de 91 % (4 °C) para 83 % (40 °C).

O armazenamento a 83 % UR diminuiu consideravelmente a retenção de compostos fenólicos nos dois criogéis. (Tabela 4.1), porém, seu efeito foi mais pronunciado no criogel ALB-Bet, provocando uma menor retenção. Esse comportamento é atribuído à água presente, que favorece a mobilidade molecular e acelera as reações. Em vinho desalcoolizado em pó, encapsulado em matrizes de maltodextrina e goma arábica, armazenados em diferentes condições de umidade relativa, o aumento de atividade de água de 0,11 para 0,58 provocou grandes perdas em compostos fenólicos, sendo que a 0,58, foi encontrada uma retenção de 0 % da malvidina-3G. Devido a que ALB e a PEC podem interagir com os polifenóis através de ligação de hidrogênio e, inclusive, competir por esses tipos de compostos (GONÇALVES; MATEUS; DE FREITAS, 2011; JAKOBEK, 2015; OZDAL et al., 2019), os resultados sugerem que o criogel de ALB-Bet-PEC, em condições de elevada umidade relativa (83 % UR) teria maior capacidade de interagir com os polifenóis do que o gel contendo apenas ALB, proporcionando, assim, melhor proteção desses compostos nessas condições. Altas retenções de compostos fenólicos têm sido reportadas por Rutz et al. (2013) em suco de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) encapsulado em criogéis de goma xantana e goma tara, com valores acima de 82 % após de 56 dias de armazenamento nas temperaturas de 4 °C e 25 °C.

Ainda em relação ao armazenamento à umidade relativa de 83 %, nos criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC, um aumento na temperatura causou uma diminuição na retenção dos compostos fenólicos. Este mesmo comportamento tem sido reportado por Tsali and Goula et al. (2018), com compostos fenólicos extraídos do bagaço da uva e encapsulados em mistura

de maltodextrina e leite em pó desnatado (50:50). Em geral, observa-se que os compostos fenólicos apresentam maior estabilidade do que a betanina e isobetanina, especialmente à alta umidade relativa.

4.3.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC foi afetada significativamente ($p < 0,05$) pela temperatura, umidade relativa e interação entre as mesmas (Tabela 4.2). Em geral, o armazenamento na umidade relativa de 32 % causou mudanças leves da atividade antioxidante nos criogéis de ALB-Bet ou de ALB-Bet-PEC, em comparação com a amostra Controle (Figura 4.1 a,b,c). No entanto, o aumento da temperatura levou a uma diminuição da atividade antioxidante em ambos os criogéis. No armazenamento a 83 % UR, embora os materiais de parede tenham contribuído para a retenção da atividade antioxidante em comparação com o Controle, os valores foram inferiores aos obtidos a 32 % UR. O efeito do aumento da umidade na diminuição da atividade antioxidante tem sido reportado em pó de *myrica* (FANG; BHANDARI, 2011). No entanto, outros autores como Pitalua et al. (2010) indicaram que um aumento na umidade relativa provoca um aumento na atividade antioxidante devido a que durante a degradação da betalaína podem ser produzidos compostos intermediários que possuem alta atividade antioxidante.

Ao comparar os resultados da atividade antioxidante, cabe ressaltar que embora não terem sido realizadas correlações com o conteúdo de polifenóis, as duas variáveis têm um perfil similar de degradação a 32 % e 83 % UR (Figura 4.1), indicando que os compostos fenólicos têm maior predominância sobre a atividade antioxidante do que o conteúdo de betalaína. Esse comportamento foi descrito também em vinho encapsulado e submetido a condições de armazenamento de 38 °C e atividade de água de 0,33. Durante o período de armazenamento o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante apresentaram perfis similares e, além disso, foi reportado que a diminuição da malvindina-G, associada à cor avermelhada do vinho, não se refletiu na capacidade antioxidante (ROCHA-PARRA et al., 2016). A correlação da atividade antioxidante com o conteúdo de polifenóis e de antocianinas foi também descrita em pós de *myrica* (FANG; BHANDARI, 2011).

4.3.4 Parâmetros de cor

Os criogéis ALB-Bet e ALB-Bet-PEC tiveram todos os seus parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h^*) afetados significativamente pela temperatura, pela umidade relativa e pela interação entre as mesmas (Tabela 4.2). Depois de 45 dias de armazenamento a 32 % UR, os criogéis ALB-Bet apresentaram valores de L^* similares (entre 20 e 21), no entanto, a 83 % UR houve grande elevação desse parâmetro, atingindo valores de até 53 (Tabela 4.1). Os criogéis de ALB-Bet-PEC também apresentaram a mesma tendência para L^* , com valores entre 24 e 25 a 32 % UR aumentando até 54 a 83% UR. Os criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC a 32 % UR, quando armazenados a 30 e 40 °C, apresentaram notável diminuição da tonalidade vermelha (a^*) com o aumento da UR, passando de valores médios em torno de 23 (32 % UR) para valores de 3 a 6 (83 % UR). Entretanto, a 4 °C, a tonalidade vermelha foi maior em ambos os criogéis com o aumento da UR.

Ambos os criogéis, quando armazenados a 32 % UR, independentemente da temperatura, apresentaram tonalidade azul ($b^* < 0$). Entretanto, essa coloração foi perdida durante o armazenamento a 83 % UR, resultando em tonalidade amarela ($b^* > 0$), o que foi mais intenso nas temperaturas maiores, cujos valores de b^* resultaram maiores que 30. Os resultados nos valores de croma (C^*) a 32 % UR indicam uma ligeira tendência à diminuição da vivacidade com o aumento da temperatura. No entanto, comportamento inverso foi claramente observado a 83 % UR, onde o aumento na temperatura levou a um aumento da saturação da cor, com cores mais vivas. Em relação à tonalidade representada em coordenadas polares pelo ângulo hue (h^*), ambos os criogéis apresentaram tonalidade vermelho-púrpura na umidade relativa de 32 %, com ângulos crescentes em função do aumento de temperatura e variação similar, de 337 a 347 graus. Porém, quando armazenados a 83 % UR e a 4 °C, a tonalidade resultou mais vermelha, com ângulos aproximados de 23 graus para ALB-Bet e 8 graus para ALB-Bet-PEC, a 30 °C e 40 °C, a tonalidade tornou-se amarelada, com ângulos de 84 graus para ALB-Bet e de 81 graus para ALB-Bet-PEC.

De acordo com os resultados encontrou-se que a umidade relativa foi o fator que apresentou o maior efeito sobre os parâmetros de cor. Os criogéis submetidos a uma umidade relativa de 83 % apresentaram mudanças na cor (Figura 4.3), que foram mais expressivas em relação aos parâmetros a^* e b^* e, conseqüentemente, a h^* . Em geral o parâmetro a^* decresceu, em conseqüência da perda de pigmentos vermelhos, e b^* apresentou valores

positivos possivelmente pela formação de substâncias de cor amarela, levando à tonalidade amarelada (Figura 4.3), que foi bem representada pelos valores de h^* em torno de 80 graus (Tabela 4.1). Tais mudanças indicaram a presença do ácido betalâmico, resultado da hidrólise das betalaínas, cuja coloração é amarela brilhante (Herbach, Stintzing, & Carle, 2006). No entanto, cabe ressaltar que a temperatura de 4 °C, nas duas umidades relativas, ainda manteve a tonalidade vermelho nos criogéis durante os 45 dias de armazenamento, o que corrobora o efeito da temperatura sobre o parâmetro h^* (Tabela 4.2). Cejudo-Bastante et al. (2014) reportou que extratos de ulluco, que é uma fonte de betalaínas, quando submetidos à temperatura de 4 °C, tiveram variações pequenas de tonalidades, enquanto que, à temperatura de 20 °C, apresentaram mudanças até atingirem coloração amarela.

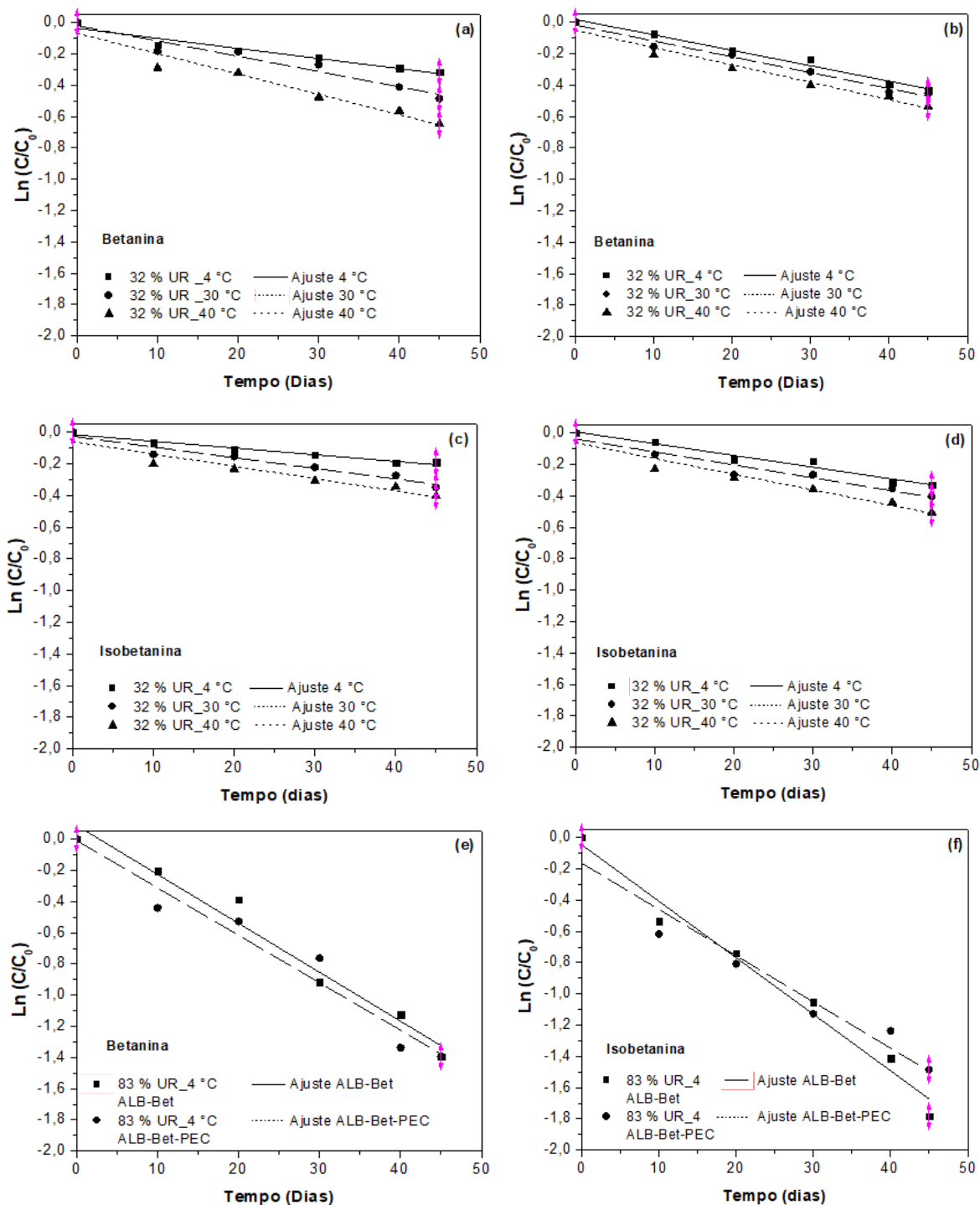
4.3.5 Cinética de degradação de betalaínas (betanina+isobetanina).

A degradação da betanina e da isobetanina segue uma cinética de primeira ordem (Equação 5), cujo ajuste da função aos dados experimentais apresenta coeficiente de determinação $R^2 > 0,91$. A meia vida ($t_{1/2}$) foi calculada segundo a Equação 8, cujos valores da constante de velocidade são apresentados na Tabela 4.3. O conteúdo de betalaínas (betanina+isobetanina) nos criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC, representado em função do tempo de armazenamento a 32 % UR, nas temperaturas de 4, 30 e 40 °C é apresentado na Figura 4.2. A velocidade de degradação da betanina e da isobetanina nos criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC submetidos a 32 % de UR aumentou significativamente com a temperatura durante o tempo de armazenamento, independentemente do material de parede usado. Este mesmo comportamento foi descrito por Güneşer (2016) no estudo de estabilidade da betalaína durante o tratamento térmico de leite colorido com extrato de beterraba.

No presente estudo, a velocidade de degradação das betalaínas (betanina+isobetanina) foi menor a 4 °C nos dois criogéis, sendo mais estáveis nesta temperatura durante todo o período de armazenamento, com os valores de $t_{1/2}$ mais altos observados em todos os tratamentos (Tabela 4.3). A ALB mostrou ser um melhor material de parede a 4 °C que a mistura ALB-PEC, com velocidades de degradação de $6,4 \times 10^{-3}$ e $4,2 \times 10^{-3}$ (dia^{-1}) para a betanina e isobetanina e com tempos de meia vida de 108 e 165 dias, respectivamente.

Na umidade de 32% UR e temperatura de 30 °C os dois materiais de parede ALB e ALB-PEC apresentaram velocidades de degradação da betanina similares, no entanto, a ALB mostrou-se mais efetiva na proteção da isobetanina, com $t_{1/2}$ de 103,5 dias e uma velocidade de degradação de $6,7 \times 10^{-3}$ (dia⁻¹) (Tabela 4.3). Cabe destacar que a 40°C foi encontrada uma menor velocidade de degradação da betanina $1,1 \times 10^{-2}$ (días⁻¹) no criogel de ALB-PEC comparada com a observada no criogel de ALB $1,3 \times 10^{-2}$ (días⁻¹), o que levou a um maior tempo de meia vida de 63 dias. Enquanto que, a ALB apresentou um melhor comportamento frente à degradação da isobetanina em todo o período de armazenamento com $t_{1/2}$ de 88,9 dias. O efeito do aumento da temperatura sobre a velocidade de degradação tem sido reportado para betalaína encapsulada por *spray drying* usando como material de parede maltodextrinas e maltodextrinas resistentes. De acordo com os autores, o aumento da temperatura de armazenamento de 4 °C para 40 °C causou um aumento nas velocidade de $4,1 \times 10^{-3}$ a $5,1 \times 10^{-3}$ semanas⁻¹ para a maltodextrina e de $4,1 \times 10^{-3}$ a $5,3 \times 10^{-3}$ semanas⁻¹ para a maltodextrina resistente (SHAARUDDIN et al., 2017).

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).



De acordo com a Tabela 4.3, o aumento da umidade relativa (83 %) e da temperatura afetaram consideravelmente a velocidade de degradação da betanina e isobetanina, de tal forma que a 4 °C foram encontrados tempos de meia-vida de no máximo de 19 dias (ALB-Bet) e 23 dias (ALB-Bet-Pec). Os dados da cinética de degradação a 4°C não mostraram prevalência da ALB ou da mistura ALB-PEC na proteção de betanina ou a isobetanina, uma vez que as velocidades de degradação e o tempo de meia vida foram muito semelhantes (Tabela 4.3). A morfologia dos criogéis corrobora os resultados obtidos no estudo da cinética de degradação da betanina e da isobetanina durante todo o período de armazenamento a 83 % UR (Figura 4.3). A 4 °C é possível observar uma leve mudança na cor dos criogéis, ao longo do tempo. A degradação intensa nas maiores temperaturas é refletida pela cor amarelada dos pós em todos os tempos de armazenamento analisados, o que não permitiu detectar e quantificar betalaína nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.

Os valores de velocidade de degradação das betalaína nos criogéis ALB-Bet e ALB-Bet-PEC foram menores que os reportados por Güneşer (2016) no tratamento térmico de betalaína em leite colorido com extrato de beterraba, cuja elevação de temperatura, de 70 °C para 90 °C aumentou a velocidade de degradação de $13,58 \times 10^{-3} \text{ minutos}^{-1}$ a $30,98 \times 10^{-3} \text{ minutos}^{-1}$, respectivamente, o que foi atribuído ao aumento nas reações de isomerização (HERBACH; STINTZING; CARLE, 2004). Também, foram menores que as encontradas por Otálora et al. (2016) em betalaína em cápsulas de alginato e alginato-albumina de soro bovino, armazenadas a 34 % UR e 25 °C, cujas velocidades de degradação foram $13,55 \times 10^{-2}$ e $11,14 \times 10^{-2} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente, acarretando baixíssimos tempos de meia vida, de 5,1 e 6,3 dias. O aumento da velocidade de degradação da betalaína com o aumento na umidade relativa foi reportado por Serris e Biliaderis (2001) na encapsulação de betalaína em matrizes de pululana e maltodextrinas com dextrose equivalente de 5 e 20. Os autores reportaram que a partir de 50 % UR, a velocidade de degradação cresceu, o que foi atribuído ao aumento da umidade e do oxigênio, os quais aceleram reações de degradação. Por outro lado, outros autores têm realizado testes de armazenamento acelerado mantendo as amostras a 60 °C, e têm avaliado o efeito do material encapsulante nas velocidades de degradação da betalaína. A polpa do figo da índia sem filtrar e filtrada foi encapsulada usando amido, sendo que as velocidades de degradação foram de $8,2 \times 10^{-3} \text{ dia}^{-1}$ e de $7,2 \times 10^{-3} \text{ dia}^{-1}$, a maior correspondendo à polpa não filtrada (Vergara et al. 2014). De acordo com os autores, isto se deve à mucilagem e às altas concentrações de açúcares contidas na fruta, o que aumenta a

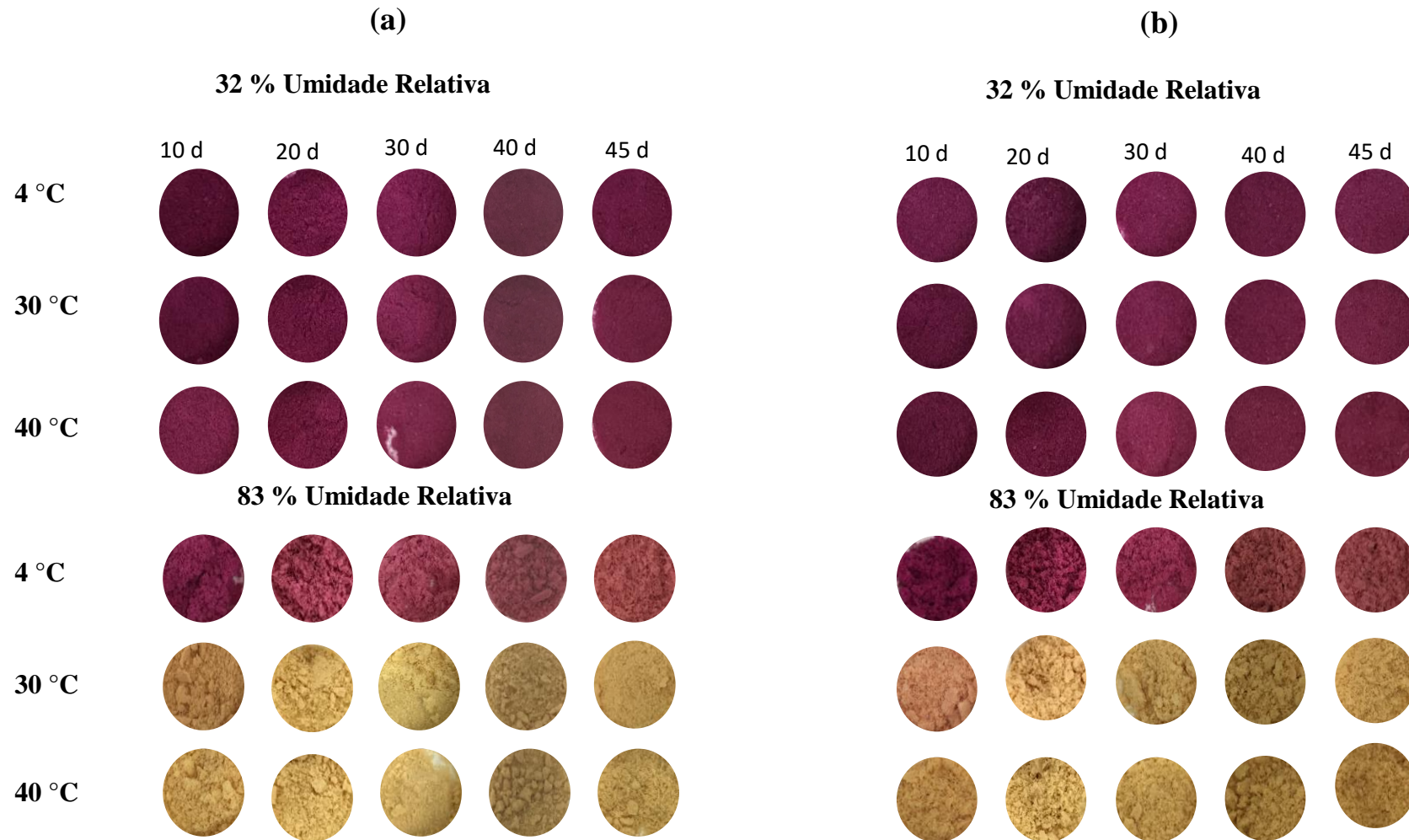
capacidade de absorção de água e provoca reações de hidrólise que levam a diminuir a estabilidade da betalaína durante o armazenamento. Em outro estudo de estabilidade, Robert et al. (2015) reportaram que a betalaína encapsulada com proteína isolada de soja (SPI) apresentou maior velocidade de degradação ($0,9 \times 10^{-2} \text{ dia}^{-1}$) que com misturas de SPI e maltodextrina ($0,5 \times 10^{-2} \text{ dia}^{-1}$) ou SPI e inulina ($0,8 \times 10^{-2} \text{ dia}^{-1}$). De acordo com os autores, essas diferenças estão relacionadas às características estruturais dos materiais de parede utilizados.

A dependência da reação de degradação da betalaína foi determinada pelo ajuste à equação de Arrhenius, a qual prediz as mudanças na concentração da betalaína a diferentes temperaturas e a determinação do valor do Q_{10} . A energia de ativação (E_a) e o valor de Q_{10} são apresentados na Tabela 4.3. A degradação de betanina e de isobetanina a 32 % UR, no criogel de ALB, apresentou valores de energia de ativação (E_a) maiores ($13,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para betanina e $12,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para isobetanina) que no criogel com a mistura ALB-PEC ($2,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para betanina e $5,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para isobetanina), o que indica uma maior dependência da degradação das betalaínas com a temperatura, quando encapsuladas no criogel que contém apenas ALB como material de parede. Nos criogéis de ALB-Bet e ALB-Bet-PEC os valores de E_a foram menores que os reportados por Serris & Biliaderis (2001) para betalaína encapsulada em pululana e maltodextrina (30, 40 e 50 °C, a_w 0,23, $E_a = 18,25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), mostrando assim que os criogéis obtidos neste estudo apresentaram maior proteção à ação da temperatura. Os valores de Q_{10} indicam um incremento entre 10 a 30 % na aceleração da reação de degradação das betalaínas com o aumento de 10 °C na temperatura, quando a ALB ou a mistura com PEC são usadas como material de parede; a maior aceleração foi observada na degradação da betanina no criogel de ALB atingindo um valor de Q_{10} de 1,3.

Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos da degradação de betalaínas.

Criogéis	Temperatura (°C)	k (dia ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (dias)	Energia de ativação (E_a) (kJ·mol ⁻¹)	Q_{10} (30-40 °C)
Betanina						
ALB-Bet (32 % UR)	4	$6,4 \times 10^{-3}$	0,95	108,3	13,5	1,3
	30	$9,8 \times 10^{-3}$	0,95	70,7		
	40	$1,3 \times 10^{-2}$	0,95	53,3		
ALB-Bet-PEC (32 % UR)	4	$9,8 \times 10^{-3}$	0,98	70,7	2,3	1,1
	30	$1,0 \times 10^{-2}$	0,98	68,6		
	40	$1,1 \times 10^{-2}$	0,96	63,0		
ALB-Bet (83 % UR)	4	$3,1 \times 10^{-2}$	0,97	22,1	-	-
	30	-	-	-		
	40	-	-	-		
ALB-Bet-PEC (83 % UR)	4	$3,0 \times 10^{-2}$	0,96	22,8	-	-
	30	-	-	-		
	40	-	-	-		
Isobetanina						
ALB-Bet (32 % UR)	4	$4,2 \times 10^{-3}$	0,97	165,0	12,4	1,2
	30	$6,7 \times 10^{-3}$	0,95	103,5		
	40	$7,8 \times 10^{-3}$	0,91	88,9		
ALB-Bet-PEC (32 % UR)	4	$7,5 \times 10^{-3}$	0,97	92,4	5,0	1,2
	30	$8,2 \times 10^{-3}$	0,94	84,5		
	40	$1,0 \times 10^{-2}$	0,94	69,3		
ALB-Bet (83 % UR)	4	$3,6 \times 10^{-2}$	0,98	19,2	-	-
	30	-	-	-		
	40	-	-	-		
ALB-Bet-PEC (83 % UR)	4	$2,9 \times 10^{-2}$	0,95	23,4	-	-
	30	-	-	-		
	40	-	-	-		

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



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*.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar o uso da betalaína encapsulada em criogéis na formulação de um produto alimentício.

Avaliar as características dos hidrogéis preparados a partir de albumina e pectina de baixa metoxilação, abaixo do ponto isoelétrico da proteína.

Avaliar o uso dos criogéis como matrizes encapsulantes de compostos bioativos de natureza lipofílica.