



FELICIANO DO ESPIRITO SANTO SILVA NETO

**ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE BETERRABA POR
GELIFICAÇÃO IÔNICA UTILIZANDO EMULSÕES
MÚLTIPLAS**

**LAVRAS – MG
2023**

FELICIANO DO ESPIRITO SANTO SILVA NETO

**ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE BETERRABA POR GELIFICAÇÃO IÔNICA
UTILIZANDO EMULSÕES MÚLTIPLAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel
Orientador

Prof. Dra. Ana Lucia Fernandes Pereira
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva Neto, Feliciano do Espírito Santo.

Encapsulação de extrato de beterraba por gelificação iônica
utilizando emulsões múltiplas / Feliciano do Espírito Santo Silva
Neto. - 2023.

47 p.

Orientador(a): Diego Alvarenga Botrel.

Coorientador(a): Ana Lucia Fernandes Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Microencapsulação. 2. Betalaínas. 3. Liberação controlada. I.
Botrel, Diego Alvarenga. II. Pereira, Ana Lucia Fernandes. III.
Título.

FELICIANO DO ESPIRITO SANTO SILVA NETO

**ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE BETERRABA POR GELIFICAÇÃO IÔNICA
UTILIZANDO EMULSÕES MÚLTIPLAS**

**ENCAPSULATION OF BEET EXTRACT BY IONIC GELLING USING MULTIPLE
EMULSIONS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de maio de 2023.

Dra. Jaqueline de Paula Rezende UFLA
Dr. Paulo Sergio Monteiro UFV

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel
Orientador

Prof. Dra. Ana Lucia Fernandes Pereira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

*Aos meus pais, irmão, familiares e amigos.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Toda honra e glória a Deus em primeiro lugar, pois entendo que sem sua permissão nada disso seria possível.

Agradeço também a minha família e amigos que estiverem me apoiando com palavras de conforto e força. Sempre me ajudando nas dificuldades que tive, nos desânimos e nas alegrias dessa caminhada. Onde cito meus pais Jose Maria Cardoso Ferreira Junior, Sonia Valeria Gomes da Silva Cardoso e meu irmão Lucas Eduardo da Silva Cardoso, meus avós Gilda de Abreu, Odete Gomes e avô Jose Maria, que estão sempre comigo.

Aos amigos que sempre estiveram ouvindo meus desabafos e estiveram em oração.

Também devo meus agradecimentos, ao meu orientador, Professor Dr. Diego Botrel que além de orientar, foi bastante compreensível e parceiro durante toda essa etapa, aqui agradeço a Deus pela sua vida.

A professora Dra. Ana Lúcia que apoiou e auxiliou em parte das análises na Universidade Federal do Maranhão, deixo meus agradecimentos.

A minha igreja pelas orações e apoio. E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu conseguisse essa vitória de concluir o mestrado em Engenharia de Alimentos.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras – UFLA pela parceria e disponibilidade de suas instalações e meios para realização de todo o processo de pesquisa e aprendizado.

RESUMO

A beterraba (*Beta vulgaris* L.), uma hortaliça de raiz tuberosa pertencente à família das Quenopodiáceas (*Chenopodiaceae*), é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil. Além disso, a beterraba possui quantidades consideráveis de betalaínas, compostos que são reconhecidos por sua atividade funcional. Os processos de encapsulação contribuem para a proteção e liberação controlada de compostos bioativos. A técnica de gelificação iônica é uma opção para o carregamento de compostos bioativos e o uso combinado com emulsões duplas, também chamadas de emulsões múltiplas, proporciona melhorias na eficiência no processo de encapsulação de compostos hidrofílicos nestes sistemas de encapsulação. Este trabalho teve como objetivo empregar a gelificação iônica, utilizando alginato, como método de microencapsulação visando o carregamento e a proteção das betalaínas presentes no extrato de beterraba. Foram testadas, inicialmente, diferentes formulações de emulsões, com concentrações variadas de extrato de beterraba e óleo de soja, sendo escolhida para a continuação do trabalho aquela considerada mais estável e com maior teor de extrato. As emulsões apresentaram formato esférico regular e uniforme. Produziram-se as microesferas com as seguintes proporções de emulsão:solução de alginato (%m/m): 20:80 (X1), 30:70 (X2) e 50:50 (X3). Os valores de eficiência de encapsulação obtidos foram de 97,9%, 93,9% e 75,8%, respectivamente. Avaliou-se o perfil de liberação das betalaínas encapsuladas ao longo do tempo em meios aquosos com pH diferentes (pH=4 e pH=10). Foi observado diferença entre os tratamentos e constatou-se que houve maior liberação quando exposto a meios mais ácidos. Foi avaliada, durante 30 dias, a estabilidade das betalaínas presentes no extrato de beterraba a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Foi possível observar reduções no teor de betalaínas de 94,8% (X1), 91,3% (X2) e 94,3% (X3) após 30 dias. Pode-se concluir que foi possível realizar a encapsulação de betalaína do extrato de beterraba. Entre as amostras, o tratamento X2 apresentou melhor características morfológicas, com formato mais regular e uniforme. No estudo da estabilidade verificou-se perda considerável de betalaínas ao longo do tempo, sendo necessárias a aplicação de outras estratégias para a manutenção de teores mais elevados de betalaínas. O tratamento (X1) apresentou menor perda ao longo do tempo. A microencapsulação utilizando alginato, combinada com o uso de emulsões múltiplas, pode ser considerada uma estratégia efetiva na encapsulação de componentes bioativos hidrofílicos.

Palavras-chave: Microencapsulação. Alginato. Liberação controlada. Betalaínas.

ABSTRACT

Beetroot (*Beta vulgaris* L.), a tuberous root vegetable belonging to the Quenopodiaceae family (*Chenopodiaceae*), is one of the main vegetables grown in Brazil. In addition, beets have considerable amounts of betalains, compounds that are recognized for their functional activity. Encapsulation processes contribute to the protection and controlled release of bioactive compounds. The ionic gelation technique is an option for carrying bioactive compounds and the combined use with double emulsions, also called multiple emulsions, provides improvements in the efficiency of the encapsulation process of hydrophilic compounds in these encapsulation systems. The objective of this work was to use ionic gelation, using alginate, as a microencapsulation method aiming at carrying and protecting the betalains present in the beetroot extract. Initially, different formulations of emulsions were tested, with varying concentrations of beet extract and soy oil, and the one considered the most stable and with the highest extract content was chosen for the continuation of the work. The emulsions had a regular and uniform spherical shape. The microspheres were produced with the following proportions of emulsion:alginate solution (%w/m): 20:80 (X1), 30:70 (X2) and 50:50 (X3). The encapsulation efficiency values obtained were 97.9%, 93.9% and 75.8%, respectively. The release profile of encapsulated betalains was evaluated over time in aqueous media with different pH (pH=4 and pH=10). Differences were observed between treatments and it was found that there was greater release when exposed to more acidic media. The stability of the betalains present in the beet extract at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ was evaluated for 30 days. It was possible to observe reductions in the betalain content of 94.8% (X1), 91.3% (X2) and 94.3% (X3) after 30 days. It can be concluded that it was possible to encapsulate betalain from the beetroot extract. Among the samples, the X2 treatment showed better morphological characteristics, with a more regular and uniform shape. In the stability study, there was a considerable loss of betalains over time, requiring the application of other strategies to maintain higher levels of betalains. Treatment (X1) showed less loss over time. Microencapsulation using alginate, combined with the use of multiple emulsions, can be considered an effective strategy for encapsulating hydrophilic bioactive components.

Keywords: Microencapsulation. Alginate. Ionic Gelation. Betalains.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da betacianinas(esquerda) e Betaxantinas(direita).....	14
Figura 2 – Tipos de micropartículas.....	16
Figura 3 – Diferentes estágios de preparação de cápsulas de alginato pelo método de gelificação iônica externa.....	18
Figura 4 – Diferentes bicos para aspersão das gotículas.....	19
Figura 5 – Representação esquemática das estruturas das emulsões simples e múltiplas mais comuns. 1: emulsão simples O/A; 2: emulsão simples A/O; 3: emulsão múltipla A/O/A; 4: emulsão múltipla O/A/O. A: fase aquosa; O: fase óleo; A1: fase aquosa interna; A2: fase aquosa externa.....	21
Figura 6 – Imagens das emulsões A (30:70), B (35:65), C (40:60), D (45:55) e E (50:50) após o processo de emulsificação usando o ultrassom.....	27
Figura 7 – Microscopia de luz invertida das emulsões A, B, C, D e E, produzidas nas seguintes proporções (A/O) 30:70, 35:65, 40:60, 45:55 e 50:50.....	28
Figura 8 – Microscopia de luz invertida das emulsões na fase contínua X1, X2 e X3, produzidas nas seguintes proporções (Emulsão simples: Solução de Alginato de sódio) 20:80, 30:70 e 50:50 (%(m/m)).....	29
Figura 9 – Microscopia estereoscópica das emulsões na fase contínua X1, X2 e X3, produzidas nas seguintes proporções (Emulsão simples g: Solução de Alginato de sódio g): 20:80, 30:70 e 50:50.....	29
Figura 10 – Resultados da Taxa de cisalhamento (Pa) versus Taxa de deformação (s^{-1}) dos materiais de Alginato puro e do óleo de soja.....	31
Figura 11 – Resultados da Taxa de cisalhamento (Pa) versus Taxa de deformação (s^{-1}) da emulsão escolhida e das emulsões duplas.....	31
Figura 12 – Fotografia das microesferas X1, X2 e X3 após gelificação iônica e filtradas.....	32
Figura 13 – Microscopia de luz invertida das microesferas X1, X2 e X3 produzidas nas proporções (Emulsão simples:Solução de Alginato de sódio: 20:80, 30:70 e 50:50 (%m/m)).....	33
Figura 14 – Microscopia estereoscópica das microesferas X1, X2 e X3 produzidas nas proporções (Emulsão simples g: Solução de Alginato de sódio g): 20:80, 30:70 e 50:50.....	34
Figura 15 – Estudo do perfil de liberação dos tratamentos X1, X2 e X3 em diferentes pH (4 e 10) e meios (Etanol e ácido Clorídrico) a temperatura ambiente (25°C).....	37
Figura 16 – Estabilidade das microesferas para as amostras X1, X2 e X3 no tempo de 30 dias.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação de Betaláínas e Eficiência De encapsulação das amostras.....	35
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. Beterrabas como fonte de betalínas	12
2.2. Encapsulação	14
2.2.1. Encapsulação por Gelificação Iônica	16
2.3. Emulsão múltipla.....	19
3. METODOLOGIA	22
3.1. Materiais	22
3.2. Obtenção do extrato do Suco da Beterraba	22
3.3. Produção das emulsões simples e otimização	22
3.4. Morfologia emulsões simples e múltiplas	23
3.5. Reologia das emulsões múltiplas	23
3.6. Preparo das microesferas	23
3.7. Caracterização das Micropartículas.....	24
3.7.1. Morfologia.....	24
3.7.2. Teor de Betalínas	24
3.7.3. Eficiência da encapsulação	25
3.7.4. Perfil de liberação da betalaína a diferentes pH.....	25
3.7.5. Estabilidade das micropartículas	25
3.7.6. Estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Avaliação das emulsões simples	26
4.2. Avaliações das emulsões duplas	27
4.2.1. Microscopia de Luz invertida e estereoscópica.....	27
4.2.2. Reologia	29
4.3. Caracterização das microesferas	31
4.3.1. Avaliação morfológica das microesferas	31
4.3.2. Determinação de betalínas e eficiência de encapsulação	33
4.3.3. Perfil de liberação das Betalínas	35
4.3.4. Estabilidade das betalínas contidas nas microesferas	37
5. CONCLUSÃO	38
REFERENCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

A beterraba (*Beta vulgaris* L.), uma hortaliça de raiz tuberosa, que consiste em uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, principalmente, nas regiões Sul e Sudeste e apresenta alta capacidade de cultivo e baixo custo de processamento (CLIFFORD et al., 2016). Porém, na cadeia produtiva, estima-se que 30% das plantas são descartadas devido a diversos danos como: rachaduras de impacto ou crescimento; compressões que deformam irreversivelmente os tecidos vegetais; lesões por insetos ou capinas com enxadas; distúrbio fisiológico, amadurecimento e germinação anormais devido a deficiências nutricionais e fatores climáticos. Portanto, quando a beterraba não atende aos padrões de qualidade relacionados à aparência, mesmo estando apta para o consumo em termos nutricionais e de segurança alimentar, elas acabam sendo descartadas. (LUENGO; CALBO, 2011).

A diversidade e quantidade de compostos bioativos presentes nestes subprodutos vêm atraindo o interesse das indústrias alimentícias, por serem responsáveis por atividades biológicas tais como, atividade antioxidante, prevenção de diversas doenças e benefícios gastrointestinais (KANNER et al., 2001; CLIFFORD et al., 2016). Entre esses compostos de interesse, destacam-se as betalainas, que são solúveis em água, atóxicas e responsáveis pela coloração vermelho-arroxeadada da beterraba, apresentando, assim, alto potencial para a substituição dos corantes artificiais, além de sua atuação como antioxidante. Entretanto, são moléculas altamente instáveis, cujas estruturas químicas são fortemente afetadas pelo pH do meio, solventes, temperatura, oxigênio, luz, enzimas e outras substâncias (KONG et al., 2003; PINTADO et al., 2009). Assim, o grande desafio das indústrias para utilizar esses pigmentos de origem natural está justamente relacionado à instabilidade apresentada por esses compostos. Dessa forma, a microencapsulação apresenta-se como uma alternativa para este problema (BRAGA et al., 2013).

Dentre as técnicas de microencapsulação, o processo por gelificação iônica é uma técnica emergente, simples e de baixo custo, na qual uma solução polimérica ou hidrocoloide contendo o material polimérico encapsulante e o composto ativo é gotejada ou atomizada sobre uma solução contendo íons divalentes (geralmente o Ca^{2+}). Após o contato, ocorre a formação instantânea de estruturas tridimensionais com elevado teor de água que são responsáveis pela proteção do composto ativo e, portanto, promovem melhora na estabilidade físico-química (OTÁLORA et al., 2016).

Dentre os polissacarídeos utilizados na geleificação iônica de ocorrência natural mais utilizados, destaca-se o alginato de sódio proveniente de algumas bactérias e encontrado nas

paredes celulares e intracelulares de algas marrons, principalmente da *Laminaria hyperborea*, *Ascophyl lumnodosum* e *Macrocystis pyrifera* (GARCIA-CRUZ et al., 2008). Apresenta-se na forma de um pó insípido e inodoro e possui coloração branca pálida ou marrom amarelado (SILVA; ANDRADE, 2012). Além das características citadas anteriormente, o alginato é um polímero natural de custo relativamente baixo, de fácil obtenção, biocompatível, atóxico, biodegradável e que não necessita de solventes orgânicos e nem condições rigorosas de temperatura para a formação das partículas (FUJIWARA et al., 2013). Sendo assim, o uso do alginato como material encapsulante é bastante relevante.

Entretanto, devido a porosidade apresentada pelas micropartículas formadas, a gelificação iônica apresenta limitações para o encapsulamento de materiais hidrofílicos ou de baixo peso molecular, como as betalaínas pois, favorecem a difusão e rápida liberação através dos espaçamentos da rede de gel, independentemente do pH (KIM et al., 2014). Para contornar esse problema, algumas estratégias podem ser aplicadas para reter os compostos ativos hidrofílicos presentes no extrato de beterraba, como os sistemas de emulsão múltipla.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o processo de encapsulação por meio da técnica de gelificação iônica em associação à emulsão dupla visando a carreação e a proteção das betalaínas presentes no extrato de beterraba.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

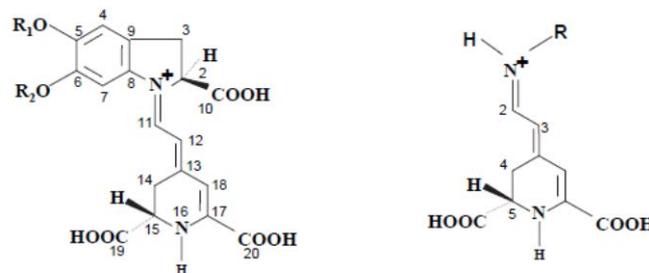
2.1. Beterrabas como fonte de betalaínas

A beterraba é uma hortaliça tuberosa, com uma variedade de vitaminas e minerais em sua composição, elevada quantidade de fibras, carboidratos e uma quantidade reduzida de gorduras (CROCETTI, 2017). Caracteriza-se por sua cor vermelho-púrpura, cuja pigmentação se deve à presença de pigmentos hidrossolúveis, as betalaínas, importantes antioxidantes naturais para o organismo capazes de eliminar os radicais livres e prevenir doenças. (BOVI, 2019).

As betalaínas são pigmentos hidrossolúveis e estão presentes na maior parte das plantas da ordem *Caryophyllales*. As betalaínas podem ser classificadas conforme a sua estrutura química, sendo elas betacianinas ou betaxantinas. Betacianinas são conjugados do ácido betalâmico com um resíduo ciclo-Dopa (ciclo-3,4-diidroxifenilalanina), os quais mostram-se em coloração vermelho-púrpura. Já as betaxantinas, formam o conjugado entre o ácido

betalâmico e compostos amino, como aminoácidos ou cadeias laterais de aminas, e exibem uma coloração amarela (Figura 1) (GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Além disso, contêm nas betacianinas, principalmente a betanina, prebetanina, isobetanina e neobetanina. Enquanto nas betaxantinas são dominantes a Vulgaxantina I e a Vulgaxantina II (CHHIKARA et al., 2019).

Figura 1 – Estruturas químicas da betacianinas (esquerda) e Betaxantinas (direita).



R: aminoácido, aminas ou derivados; R1: glicosil ou derivados e R2: glicosil, glucuronil, derivados;

Fonte: (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018)

Consideradas como substâncias bioativas promissoras, as betalaínas vem chamando atenção pela sua alta capacidade antioxidante, que confere a capacidade de eliminar radicais livres, além do elevado potencial de atuar como substância quimiopreventiva do câncer (CHRANIOTI; NIKOLOUDAKI; TZIA, 2015; GANDÍA-HERRERO; ESCRIBANO; GARCÍA-CARMONA, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Além dos benefícios já mencionados, a utilização das betalaínas torna o processo na indústria economicamente mais atrativo. Apesar do uso limitado nas indústrias de alimentos e farmacêutica devido a sua baixa estabilidade aos fatores externos, como atividade de água, pH, altas temperaturas, íons metálicos, luz e enzimas, as betalaínas degradam com maior facilidade em pH abaixo de 3 e acima de 7, entretanto, eles dependem também de outros fatores como temperatura e a presença ou a ausência de oxigênio (HERBACH; STINTZING; CARLE, 2006).

Diversos estudos se concentraram na investigação da estabilidade das betalaínas a fim de aumentar suas aplicações. Dentre os métodos de estabilização pode-se citar a adição de antioxidantes, agentes quelantes e encapsulamento (AUGUSTIN e HEMAR, 2009).

2.2. Encapsulação

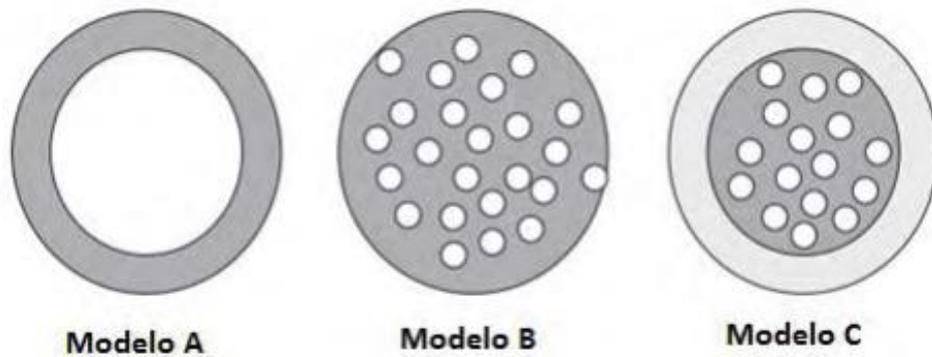
A encapsulação é uma técnica que consiste no recobrimento de compostos ativos por um ou mais materiais poliméricos, denominados materiais de parede. O principal objetivo é proteger substâncias ativas sensíveis a condições externas, como por exemplo, luz, oxigênio, umidade, calor e outros, e assim, aumentado sua estabilidade, prolongando a viabilidade. Além disso, dependendo da aplicação final desejada, é possível modular e controlar a liberação dos compostos bioativos, conseguindo planejar o local e a taxa específica desta liberação. A encapsulação pode ser realizada por diferentes técnicas, sendo uma das principais a baseada em métodos físicos, como o *spray drying*, uma das mais antigas e mais utilizada na indústria de alimentos. Entre os métodos físico-químicos, as emulsões e a gelificação iônica, tem se tornado uma alternativa de interesse para aplicação em diferentes compostos ativos (GUTIERREZ, 2019). Todavia, a eficiência de proteção e o controle de liberação dependem principalmente da composição e da estrutura do material de parede utilizado (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

Para a indústria de alimentos, a encapsulação tem sido bastante utilizada, devido a praticidade de sua aplicação como ingrediente, quando se trata de compostos instáveis, melhoramento do processo devido características específicas, como menor higroscopicidade, aumento da solubilidade e capacidade de dispersão em diferentes tipos de materiais (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

Para realizar a encapsulação é necessário analisar diversos pontos do processo, como o destino de aplicação, tamanho da partícula, mecanismo de liberação, as propriedades físico-químicas do material utilizado como agente de parede e do núcleo. Além disso, para uso industrial o custo de todo processo e material utilizado deve ser levado em consideração para que o processo seja considerado viável. Ao produzir as partículas pelos métodos de encapsulação é possível obter diversos tipos de partículas, denominadas conforme a localização do composto ativo na partícula (Figura 3). Modelo A: o núcleo central é envolto por uma camada de material de parede, mononucleadas, denominadas microcápsulas. O modelo B é denominado micropartículas ou microesfera, estrutura tipo matriz, o material fica distribuído por todo material encapsulante. E no Modelo C temos a combinação dos dois tipos, reservatório e matriz. Todos, importantes para aplicação prática e podem ter semelhança ou diferença na funcionalidade e utilidade. A morfologia típica destas microestruturas pode variar entre a forma

simples ou irregular, com um ou mais agentes encapsulantes (com ou sem agregados), mono ou multi-núcleo e da matriz (ZUIDAM; NEDOVIC, 2010).

Figura 2 – Tipos de micropartículas.



Fonte: Zuidam e Nedovic (2010).

Alguns pesquisadores vêm estudando o encapsulamento de betalaínas por diferentes meios com intuito de avaliar sua estabilidade e, várias matrizes têm sido empregadas, dentre as quais pode-se citar polissacarídeos, proteínas, ou mesmo a combinação dos dois. A maltodextrina é um exemplo de polissacarídeo que vem sendo estudado na encapsulação de betalaínas. Em seu trabalho, Ravichadran et al (2014) empregaram a combinação da maltodextrina com goma guar, goma arábica, goma xantana e pectina resultando em um aumento na estabilidade das betalaínas por meio deste encapsulamento por aspersão em *spray drying*.

Janiszewska et al. (2014), por sua vez, encapsularam suco de beterraba utilizando maltodextrina e goma arábica como matriz por aspersão em *spray drying*. Ao avaliar o efeito da estabilidade dos pigmentos, investigaram que a goma arábica possui maior adsorção de água quando comparada à maltodextrina, levando a uma mais rápida degradação desta matriz e, conseqüentemente, uma maior exposição do pigmento.

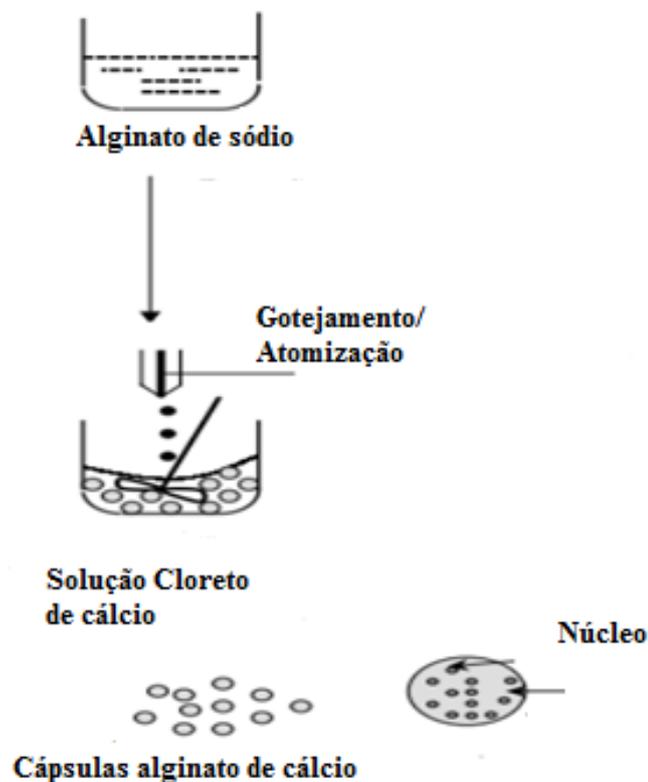
Em seu trabalho, Pitalua et al. (2010) investigaram a encapsulação por aspersão em *spray drying* de betalaínas utilizando goma arábica como matriz em diferentes valores de atividade de água, obtendo resultados semelhantes ao trabalho citado acima, uma vez que observaram que a matriz era dissolvida em um curto período quando exposta a maiores valores de atividade de água. No entanto, quando combinada à maltodextrina, a integridade estrutural foi mantida em presença de água, confirmando a eficácia deste encapsulamento.

2.2.1. Encapsulação por Gelificação Iônica

Por sua simplicidade e versatilidade, a gelificação iônica é uma tecnologia de microencapsulação de compostos sensíveis. É um método físico-químico baseado em interações iônicas entre compostos de carga oposta. A produção de microesferas sem o uso de solventes orgânicos tem permitido o contínuo desenvolvimento dessa tecnologia, principalmente para a microencapsulação de fármacos e compostos ativos termosensíveis. A formação de microesferas por gelificação iônica é baseada na capacidade de vários polissacarídeos (goma, alginato de sódio e carragena) de formar géis na presença de íons multivalentes. O processo inclui basicamente gotejar, ou pulverizar, uma solução de polissacarídeo aniônico na solução catiônica em uma concentração apropriada. Forma-se uma estrutura tridimensional com alto teor de água, responsável por proteger o composto ativo (NAZARENO et al., 2016).

Por exemplo, na presença de íons de cálcio, o contato de gotículas de solução de alginato de sódio causará a formação instantânea de uma estrutura de hidrogel insolúvel em água, como mostrado na Figura 4. O composto ativo é uniformemente disperso em toda a matriz protetora. A interação de íons multivalentes com o grupo carboxila da cadeia polimérica leva à formação de géis insolúveis, que podem obter microesferas de diferentes formas e tamanhos (BENAVIDES et al., 2016).

Figura 3 – Diferentes estágios de preparação de cápsulas de alginato pelo método de gelificação iônica externa.

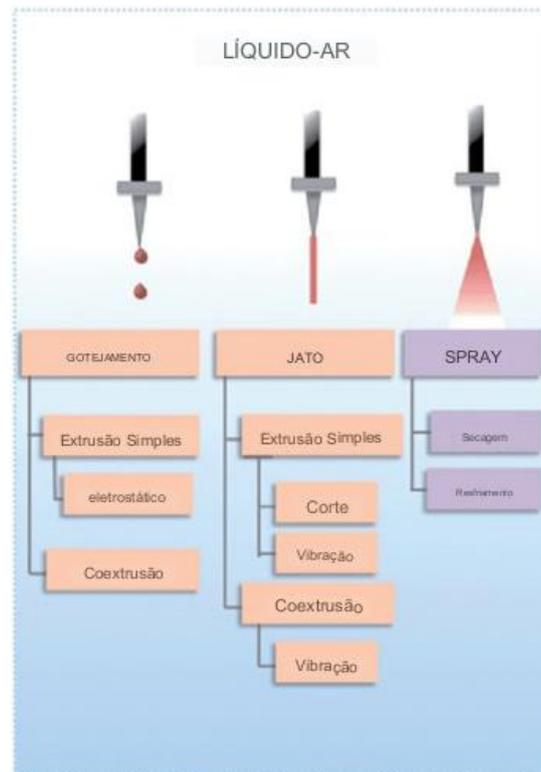


Fonte: Rocha (2017).

Um dos pontos centrais do uso da tecnologia de gelificação iônica é a formação de gotículas. É nessa etapa que se determina a forma das microcápsulas e seu tamanho conforme o objetivo de aplicação. As partículas de gelificação iônica podem ser preparadas por diversos sistemas diferentes, entre eles, extrusão, atomização por ar comprimido e pulverização eletrostática, dependente do tamanho desejado (Figura 5).

A técnica que utiliza os bicos ultrassônicos consiste em um sistema que se concede energia vibracional ultrassônico nas moléculas da emulsão, ocasionando a quebra das moléculas em tamanhos menores e formando gotículas em forma de spray, essas gotículas caem em uma solução que irá formar as esferas gelificadas (SOUSA, 2019).

Figura 4 – Diferentes bicos para aspersão das gotículas.



Fonte: Poncelet et al (2017)

Uma das vantagens dessa tecnologia é não requerer solventes orgânicos (PATIL et al., 2010). É uma excelente tecnologia de encapsulamento de emulsão. Neste sentido, proporciona o encapsulamento de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (GUZEY; MCCLEMENTS, 2007).

Lupo et al. (2014) realizaram a microencapsulação por gelificação iônica do extrato de polifenóis do cacau e observou uma eficiência de encapsulação de 60%. Segundo os autores, a técnica poderia ser implementada em produtos alimentares aumentando a ingestão diária de antioxidantes.

Sousa (2019) ao extrair corantes da casca da beterraba e encapsulado por meio da gelificação iônica verificou que processo contribuiu para a obtenção e preservação de altas taxas de compostos bioativos e atividade antioxidante, na qual o material de parede utilizado foi o alginato de sódio e obteve uma taxa de eficiência acima de 80%.

Otálora et al (2016), em estudos com encapsulamento de betalaína extraídas de frutos de palma roxa por gelificação iônica utilizando alginato de cálcio e albumina de soro bovino observaram que as betalaínas da palma roxa encapsuladas podem ser consideradas um potencial corante natural vermelho-violeta para ser utilizado como aditivo corante funcional para a indústria alimentícia. Os tipos de matrizes resguardaram os pigmentos encapsulados, sendo sua

estabilidade de armazenamento melhor em baixa umidade relativa. Em alta umidade relativa, não houve proteção e apresentou baixa estabilidade de armazenamento nas amostras.

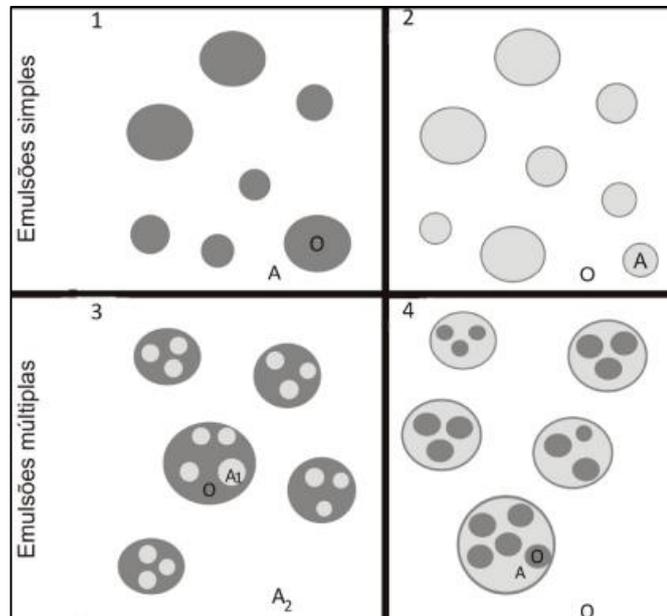
2.3. Emulsão múltipla

A técnica de emulsificação pode ser usada para melhorar os processos de microencapsulação, principalmente quando se tratar do uso de compostos bioativos com caráter hidrofílico em sistemas encapsulantes por via gelificação iônica. Esta estratégia tem como objetivo melhorar a eficiência de encapsulação e diminuir a liberação precoce do ativo em função da barreira imposta pela estrutura da emulsão (KUROZAWA e HUBINGER, 2017).

Pode-se caracterizar as emulsões como dispersões coloidais formadas por uma fase dividida designada de interna, dispersa ou descontínua, e por uma fase que rodeia as gotículas, designada de externa, dispersantes ou contínua (ZANON, 2010).

Emulsões múltiplas, também chamadas de emulsões duplas, são sistemas mais complexos, formados por processos de emulsificação seguidos, onde os dois tipos de emulsões (A/O e O/A) existem conjuntamente, constituindo emulsões do tipo A/O/A ou O/A/O (Figura 2). As emulsões A/O/A, por exemplo, são compostas de pequenas gotas de água (fase aquosa interna) dispersas em gotas maiores de óleo, dispersas ainda em outra fase aquosa (fase aquosa externa) (BOUYER et al., 2012). Estudos recentes comprovam a efetividade das micropartículas de géis para a encapsulação de compostos bioativos (MUN et al., 2016; MOKHTARI et al., 2017; CHEN et al., 2018; FENG et al., 2018).

Figura 5 – Representação esquemática das estruturas das emulsões simples e múltiplas mais comuns. 1: emulsão simples O/A; 2: emulsão simples A/O; 3: emulsão múltipla A/O/A; 4: emulsão múltipla O/A/O. A: fase aquosa; O: fase óleo; A1: fase aquosa interna; A2: fase aquosa externa.



Fonte: Pereira & Garcia-Rojas (2015)

Sabe-se que as emulsões múltiplas são sistemas polidispersos complexos. Eles são heterogêneos por conter dois tipos de emulsões simples (O/A e A/O) existirem ao mesmo tempo. Em uma variedade de aplicações, eles se destacam como transportadores de medicamentos, cosméticos e alimentos, pois podem reter e liberar lentamente diferentes agentes relacionados, ao mesmo tempo em que podem cobrir e proteger os produtos veiculados. Embora a formulação de múltiplas emulsões seja relativamente complexa e sujeita a múltiplas vias de degradação física, ainda existem algumas vantagens sobre as emulsões simples. Como já mencionado, as emulsões múltiplas possuem excelente capacidade de controlar a liberação de compostos ativos aprisionados, bem como a capacidade de proteger as substâncias encapsuladas da degradação (SANTOS, 2011).

O uso de emulsões apresenta algumas vantagens que incluem boa biocompatibilidade, completamente biodegradável, tem forte capacidade de combinar substâncias ativas com diferentes polaridades, proteger o composto administrado da inativação ou degradação por fatores endógenos, flutuação reduzida da concentração da substância ativa no estado de equilíbrio, possibilidade de direcionamento do composto ativo e serem usadas para mascarar as propriedades organolépticas do ativo. Os agentes emulsionantes podem ser classificados em

relação ao grau de ionização em solução aquosa e substâncias de origem natural e seus derivados, sendo eles, tensoativos sintéticos ou semissintéticos. Uma alternativa é a mistura de emulsionantes, com objetivo de reforçar a resistência do filme, contribuindo para a estabilidade da emulsão (AULTON, 2005).

Uma variedade de sistemas coloidais tem sido empregada para realizar encapsulação e como transporte de componentes bioativos. No caso das emulsões simples e múltiplas, essa última mostra-se mais eficaz, não apenas para proteção, mas para liberação controlada de componentes tanto lipossolúveis quanto hidrossolúveis, devido suas características químicas e estruturais que permitem o encapsulamento em diferentes locais e condições ambientais diversas. Tais propriedades de encapsulamento das emulsões múltiplas são avaliadas com frequência, que permite avaliar a eficiência de encapsulação. Por esses motivos diversos estudos vem aplicando as emulsões múltiplas na encapsulação para compostos bioativos (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015).

Como exemplo, podemos citar o estudo de encapsulação de antocianinas de uvas (*Vitis labrusca* L.) que utilizou alginato/pectina por processo emulsão múltipla e gelificação ultrassônica. A combinação das técnicas de microencapsulação influenciou nas propriedades físico-químicas, morfológicas e biológicas durante o processo de digestão (NORCINO et al, 2022).

Rocha-Selmi et al. (2013) ao realizarem estudos com a encapsulação de aspartame por emulsão dupla seguida por coacervação complexa, com o objetivo de proteger e controlar sua liberação, observaram que as microcápsulas foram multinucleadas e pouco higroscópicas. As técnicas empregadas conseguiram proteger o adoçante até mesmo em temperatura de 80 °C. Portanto, a solubilidade reduzida taxas de liberação baixas indicaram enorme potencial encapsular o aspartame em alimentos, prolongando assim a sua doçura.

Cho, Shim & Park (2006) encapsularam óleo de peixe em emulsões duplas feitas pela técnica de gelificação iônica. Esses autores obtiveram cápsulas esféricas com diâmetro médio de 23 µm. O estudo mostrou que o método melhorou a estabilidade dos ingredientes e permitiu a liberação controlada.

O estudo de Shi et al (2015) observou que as microesferas de licopeno obtidas por emulsão múltipla utilizando soro do leite e éster metílico de alta-pectina apresentaram estabilidade sob estresse ambiental, apresentando uma eficiência de encapsulação de 89%.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

Foram utilizadas beterrabas adquiridas no comércio local da cidade de Lavras – MG. Para a produção das micropartículas foram utilizados: Alginato de sódio (marca *Sigma Aldrich*); Óleo de soja (marca *LIZA*); Cloreto de cálcio hexahidratado (marca *Sigma Aldrich*) e o emulsificante polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) (marca *Danisco*).

3.2. Obtenção do extrato do Suco da Beterraba

Conforme a metodologia de Kuck e Noreña (2016) com modificações, as beterrabas foram lavadas, higienizadas, descascadas, e o extrato de beterraba foi obtido a partir da trituração da beterraba com auxílio de uma centrífuga processadora de alimentos (Philips Walita Juicer modelo RI1858, Royal Philips Electronics, Barueri, Brasil). Posteriormente foi filtrado em pano de organza e a vácuo em papel filtro qualitativo, para a separação dos sólidos em suspensão.

3.3. Produção das emulsões simples e otimização

Inicialmente, preparou-se as emulsões, onde solubilizou-se 4% (m/m) de emulsificante PGPR, em óleo de soja 400 RPM/ 10 minutos a temperatura ambiente (25°C) em Ultra Turrax (Marca IKA LABORTECHNIK, modelo RW20.n).

Foram selecionadas como variável de estudo as proporções mássicas da emulsão simples (Extrato de suco de beterraba:Solução de Óleo de Soja com PGPR (4% m/m)) 30:70, 35:65, 40:60, 45:55 e 50:50; (% v/v) e embasadas na literatura (DE MOURA et al., 2018). As emulsões foram preparadas nas proporções pré-definidas adicionando-se o extrato da beterraba ao óleo, com agitação em Ultra Turrax (Marca *IKA LABORTECHNIK*, modelo *RW20.n*) em 700 RPM/5 minutos. Em seguida, as emulsões foram submetidas ao ultrassom de ponteira (marca *Branson* modelo 250) na potência de 175W por 4 minutos intercalados de 1 em 1 minuto. Para determinar a melhor emulsão, avaliou-se a morfologia das gotas obtidas.

3.4. Morfologia emulsões simples e múltiplas

A morfologia das gotículas das emulsões fora avaliada através de um microscópio óptico de luz invertido (Carl Zeiss Sports Optics, modelo Axio Scope.A1, Zeiss, Alemanha), com aumento de 400x e microscópio estereoscópio (Nikon, modelo SMZ 1500). Para a obtenção das imagens utilizou-se o software AxioVision Rel. 4.8®.

3.5. Reologia das emulsões múltiplas

Para avaliação da viscosidade das soluções produzidas foi realizada análise da reologia utilizando o equipamento Reômetro rotacional (Anton Paar GmbH, modelo MCR301) da solução de Alginato de Sódio 2% (m/m), óleo de soja e das emulsões duplas.

3.6. Preparo das microesferas

Inicialmente, preparou-se uma solução encapsulante de Alginato de sódio 2% (m/m) empregada como fase contínua utilizando homogeneizador Ultra Turrax (Marca IKA LABOTECHNIK, modelo RW20.n) em 700 RPM por 15 minutos. A emulsão simples escolhida para a sequência dos estudos foi a emulsão que continha 40:60; A/O, sendo utilizada para o preparo da segunda emulsão com adição da solução polimérica nas seguintes proporções 20:80, 30:70 e 50:50 (%m/m) (Emulsão simples:Solução de Alginato de sódio), denominadas de X1, X2 e X3, respectivamente. As emulsões foram preparadas no Ultra Turrax (Marca IKA LABORTECHNIK, modelo RW20.n) em 700 RPM/ 15 minutos.

Em seguida, os tratamentos foram gotejados em uma solução de cloreto de cálcio 1,5% (m/m) a temperatura ambiente (25°C), a uma altura de 10 cm, utilizando-se bico atomizador pressurizado (Labmaq, Ribeirão Preto, Brasil), com vazão de alimentação de 0,5 mL/min e vazão de ar 25 L/min sob agitação magnética. Após o processo de gotejamento as partículas foram mantidas sob agitação por 15 minutos. Posteriormente, filtradas em papel filtro e lavadas com água destilada. As microesferas foram ainda secas em estufa a temperatura 40°C por 24 horas e armazenada para futuras análises.

3.7. Caracterização das Micropartículas

3.7.1. Morfologia

A análise da morfologia das microesferas fora avaliada por meio de observação em microscópio estereoscópio RZ UWF 10X (Meiji Tecno, Japão) e microscópio óptico de luz invertido (Carl Zeiss Sports Optics, modelo Axio Scope.A1, Zeiss, Alemanha), com aumento de 400 x. A obtenção das imagens foi realizada através do software AxioVision Rel. 4.8®.

3.7.2. Teor de Betalaínas

Para a determinação do teor de betalaínas, utilizou-se o método espectrofotométrico descrito por Elbe (2001) com modificações, utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-VIS SP 2000, Bel Photonics, Piracicaba, Brasil). As micropartículas inicialmente passaram por um processo de dissolução e consequente liberação das betalaínas, onde pesou-se 0,5 g das micropartículas, adicionou-se a 7 mL de solução de Citrato de sódio 3% (m/v) sendo mantido por 2 horas em banho ultrassônico (Ultraclear, modelo USC-1400). Posteriormente fez-se a filtragem em bomba a vácuo. Mediu-se 70µL da solução obtida em tubos de ensaio e fez-se uma diluição com 5 mL de solução Tampão Fosfato 0,05 M (pH 6,5). Por fim, as amostras foram levadas para a leitura da Absorbância e calculou-se o teor de Betalaína pelas equações (1), (2) e (3):

$$C_B = \frac{\{[1,095 * (A_{538} - A_{600})] * fd * 1000\}}{1120} \text{ Equação (1)}$$

$$C_{V-I} = \frac{\{(A_{476} - 0,258 * A_{538} - 0,742 * A_{600}) * fd * 1000\}}{750} \text{ Equação (2)}$$

$$C_T = C_B + C_{V-I} \text{ Equação (3)}$$

C_B é a concentração de betanina, C_{V-I} é a concentração de vulgaxantina-I, e C_T é a concentração total de betalaínas, todos expressos em mg /100mL. Os valores de 1,095, 0,258 e 0,742 correspondem a fatores de correção e o termo fd representa o fator de diluição. Os valores 1120

e 750 são de absorvidade ($A^{1\%}$) para betanina e vulgaxantina-I em comprimentos de onda de 538 e 476 nm, respectivamente.

3.7.3. Eficiência da encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada relacionando a concentração de betalaínas presente na emulsão dupla com a concentração de betalaína presente nas microesferas produzidas pela gelificação iônica, conforme Equação 4:

$$EE\% = \frac{\text{Teor de betalaína na microesfera}}{\text{Teor de betalaína na emulsão}} \text{ Equação (4)}$$

3.7.4. Perfil de liberação da betalaína a diferentes pH

O perfil de liberação da betalaína das microesferas secas foi avaliado em meios com diferentes pH: solução tampão pH 4 de e tampão pH 10. Para as análises foram pesados aproximadamente 120 mg das microesferas secas, os quais foram suspensos em 15 mL da solução selecionada, foram mantidas sob agitação constante a 200 rpm em um agitador orbital (Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & C, Walpersdorfer, Schwabach, Alemanha). Em determinados intervalos de tempos, retirou-se uma alíquota, para a determinação do conteúdo de betalaínas.

3.7.5. Estabilidade das micropartículas

As microesferas secas produzidas nos tratamentos estudados (X1, X2 e X3) foram armazenadas em embalagens de polietileno de baixa densidade seladas, as quais foram mantidas à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), ao abrigo da luz, por um intervalo de 30 dias, sendo avaliadas nos dias 0, 7, 15, 25 e 30. As amostras foram caracterizadas em relação ao teor de betalaínas.

3.7.6. Análises estatísticas

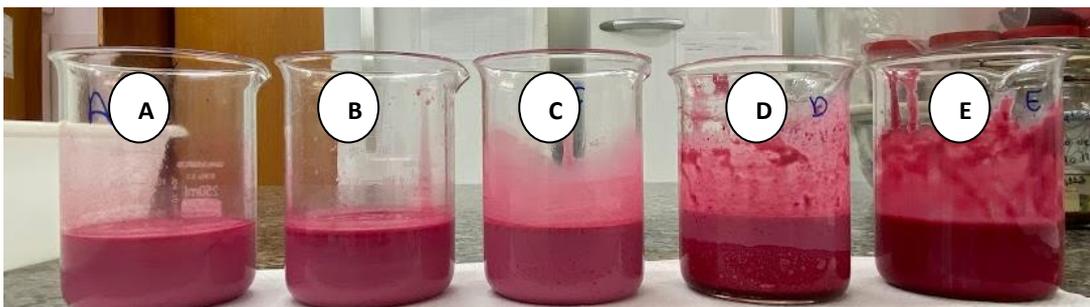
Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com pelo menos 2 repetições. Os dados foram analisados utilizando-se o software OriginPro 2022b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) e software Excel (Microsoft Office). Os valores médios foram avaliados pelo procedimento ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das emulsões simples

As emulsões simples foram identificadas de acordo com as proporções de extrato de beterraba:óleo de soja da seguinte forma: A (30:70), B (35:65), C (40:60), D (45:55) e E (50:50). O comportamento das emulsões foi observado qualitativamente durante todo o processo de preparação. Foi notado que após o processo de emulsificação em ultrassom, as amostras D e E, cujos tratamentos apresentavam maior concentração de extrato, iniciaram um processo de separação macroscópica de fases (Figura 6).

Figura 6 – Imagens das emulsões A (30:70), B (35:65), C (40:60), D (45:55) e E (50:50) após o processo de emulsificação usando o ultrassom.

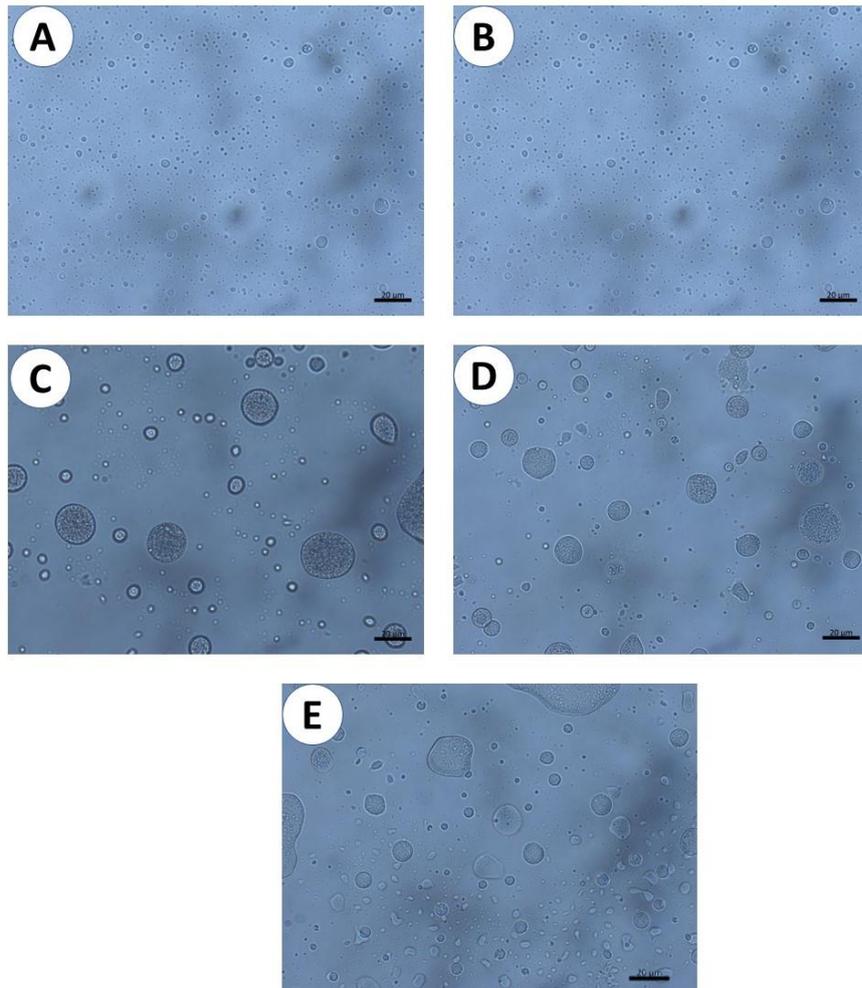


Fonte: Própria autoria

Para a escolha da melhor emulsão, as amostras foram analisadas em microscopia de luz invertida (400X) (Figura 7). Observou-se que as amostras D e E estavam com formato das esferas irregulares e durante a análise microscópica elas rompiam com facilidade, o que demonstrou instabilidade nestes tratamentos. As emulsões A, B e C apresentaram formato esférico regular e uniforme, com melhor homogeneidade. Para a escolha de qual emulsão usar

nas etapas seguintes do estudo, usou-se como critério a estabilidade da emulsão e o maior teor de extrato de beterraba. Portanto, sendo escolhida a emulsão C (40:60) % m/m extrato de beterraba:óleo vegetal.

Figura 7 – Microscopia de luz invertida das emulsões simples A, B, C, D e E, produzidas nas seguintes proporções (extrato:óleo) 30:70, 35:65, 40:60, 45:55 e 50:50.



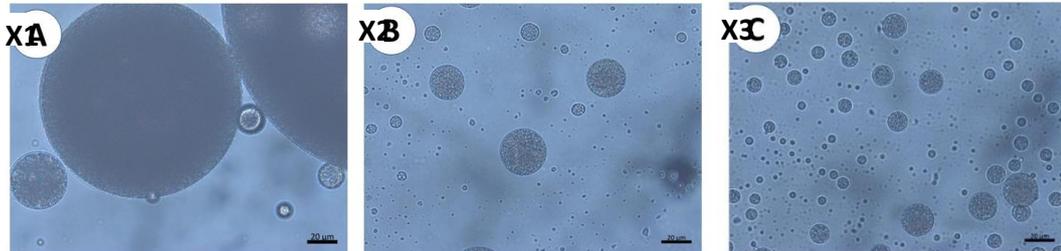
Fonte: Própria autoria

4.2. Avaliações das emulsões duplas

4.2.1. Microscopia de Luz invertida e estereoscópica

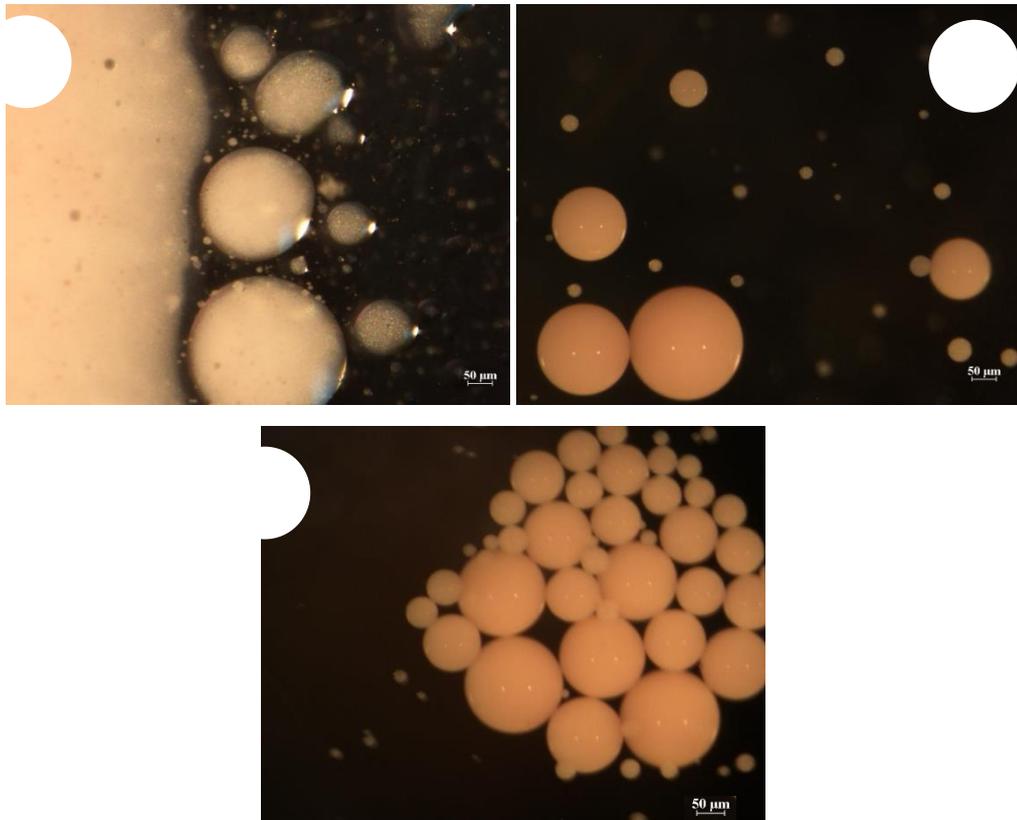
Foram analisadas as emulsões duplas produzidas a partir da emulsão simples C, sendo a fase contínua a solução de alginato de sódio. Foi possível obter as imagens microscópica de luz invertida (400X) (Figura 8) e estereoscópica (125X) (Figura 9).

Figura 8 – Microscopia de luz invertida das emulsões na fase contínua X1, X2 e X3, produzidas nas seguintes proporções 20:80, 30:70 e 50:50 (% m/m) (Emulsão simples: Solução de Alginato de sódio).



Fonte: Própria autoria

Figura 9 – Microscopia estereoscópica das emulsões na fase contínua X1, X2 e X3, produzidas nas seguintes proporções (Emulsão simples: Solução de Alginato de sódio %m/m): 20:80, 30:70 e 50:50.



Fonte: Própria autoria

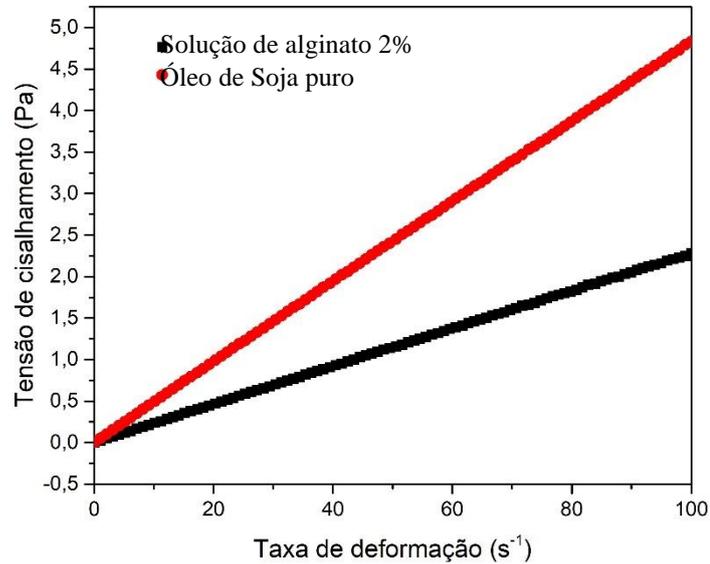
As emulsões obtidas na fase contínua antes do processo de gelificação iônica foram analisadas por meio de microscopia para observar a morfologia. Como resultado elas apresentaram formato esférico e regular, apresentando uma maior uniformidade nos tamanhos das amostras X2 e X3. A amostra X1 que continha maior concentração de alginato apresentou maiores tamanhos de gotículas comparadas às demais amostras. Menores tamanhos de gotículas nos tratamentos X2 e X3 podem ter sido favorecidos por conta da estabilização do sistema de emulsão ocasionado pela maior viscosidade nestes tratamentos em relação ao tratamento X1, com tamanhos maiores. Dias (2020), ao realizar a obtenção e processamento de microesferas de alginato/vidro bioativo em diferentes concentrações de sua formulação, observou que as microesferas com maior concentração de alginato, também apresentaram diâmetros maiores entres seus tratamentos.

Foram observadas durante a microscopia algumas bolhas de ar nas amostras, possivelmente agregadas durante o processo de emulsificação. ANTONIO (2019) também observou no seu trabalho o aparecimento de algumas bolhas de ar dentro da matriz lipídica devido a homogeneização enquanto estudava as emulsões assistidas por ultrassom para a microencapsulação do extrato de beterraba (*Beta vulgarisl.*) por meio da técnica de *spray chilling*.

4.2.2. Reologia

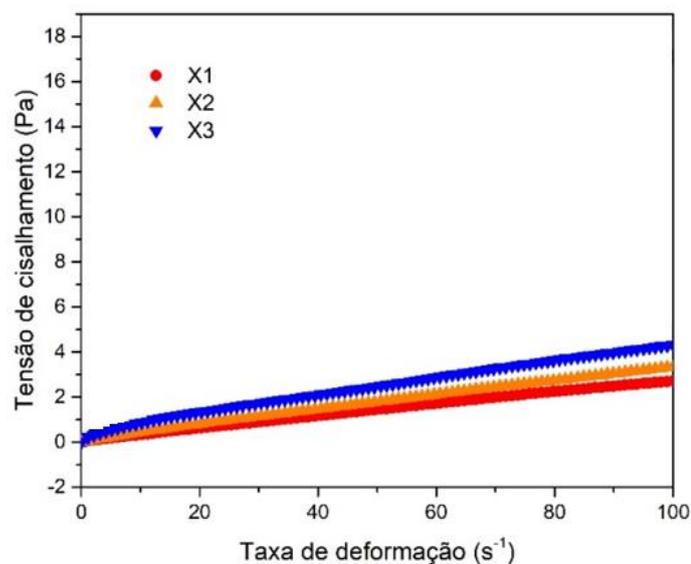
O estudo reológico dos materiais utilizados e das microesferas preparadas são importantes para entender como os materiais se comportam em relação à deformação e escoamento (SERGIO FILHO et al, 2020). Com os resultados da avaliação reológica (Figura 10) podemos observar que a solução de alginato de sódio 2% e o óleo de soja se comportaram como fluídos newtonianos, assim como também as emulsões múltiplas produzidas (Figura 11). Esses materiais graficamente têm por característica apresentar uma variação de tensão de cisalhamento (Pa) em relação a sua taxa de deformação (s^{-1}) no formato linear (PEREIRA, 2017).

Figura 10 – Resultados da Taxa de cisalhamento (Pa) versus Taxa de deformação (s^{-1}) da solução de alginato 2% e do óleo de soja.



Fonte: Própria autoria

Figura 11 – Resultados da Taxa de cisalhamento (Pa) versus Taxa de deformação (s^{-1}) das emulsões duplas X1 (20:80), X2 (30:70) e X3 (50:50) (Emulsão simples: Solução de Alginato de sódio %m/m).



Fonte: Própria autoria

Pode-se observar que a taxa de cisalhamento das emulsões duplas produzidas com alginato apresentou valores próximos, porém com tendência de redução com o aumento no teor de alginato e diminuição do teor de emulsão simples. Este fato pode ser explicado pela menor viscosidade do alginato em comparação ao óleo vegetal (Figura 10).

4.3. Caracterização das microesferas

4.3.1. Avaliação morfológica das microesferas

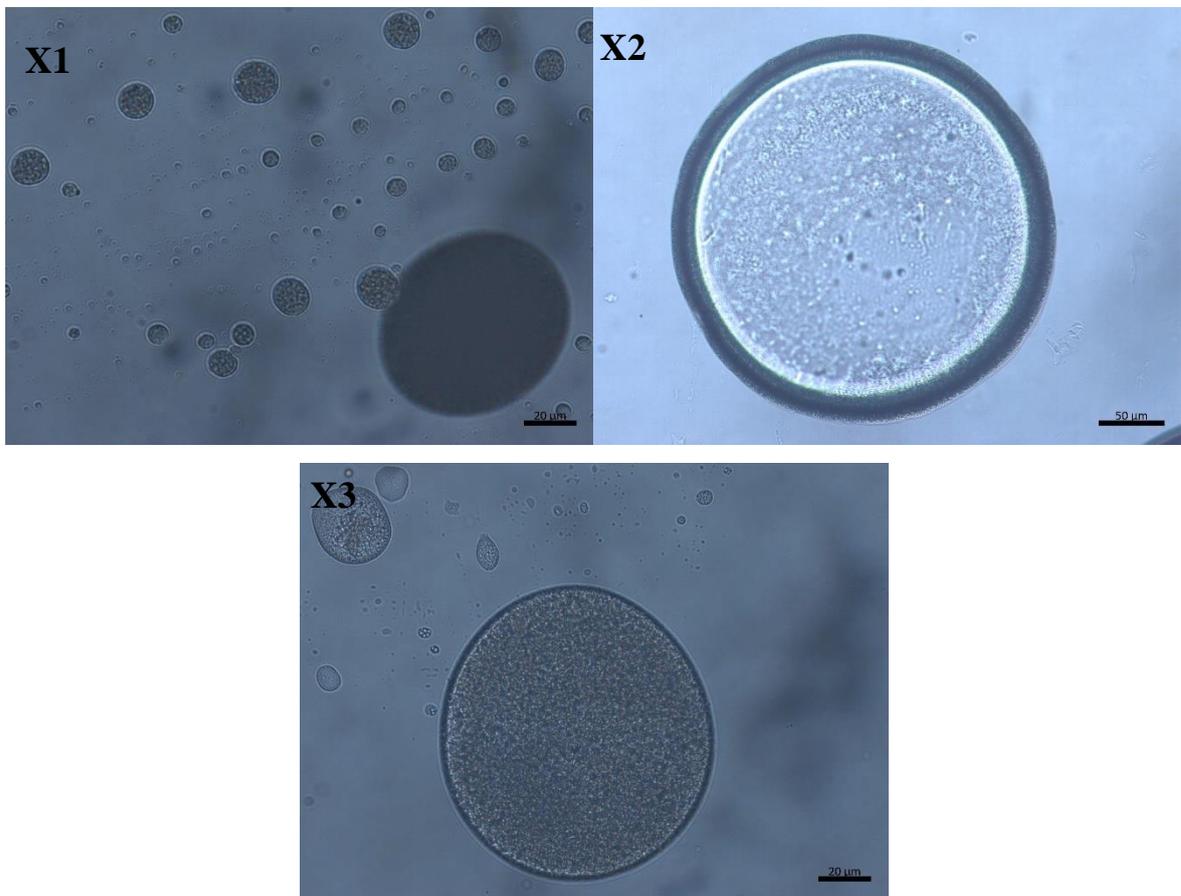
As microesferas obtidas após a gelificação iônica (Figura 12) foram analisadas qualitativamente por microscópica de luz invertida (400X). Foi observado que elas apresentaram morfologia esférica e regular (Figura 13). Observou-se que o tratamento X1 apresentou menores diâmetros quando em comparação aos tratamentos X2 e X3.

Figura 12 – Fotografia das microesferas X1, X2 e X3 após gelificação iônica e filtração.



Fonte: Própria autoria.

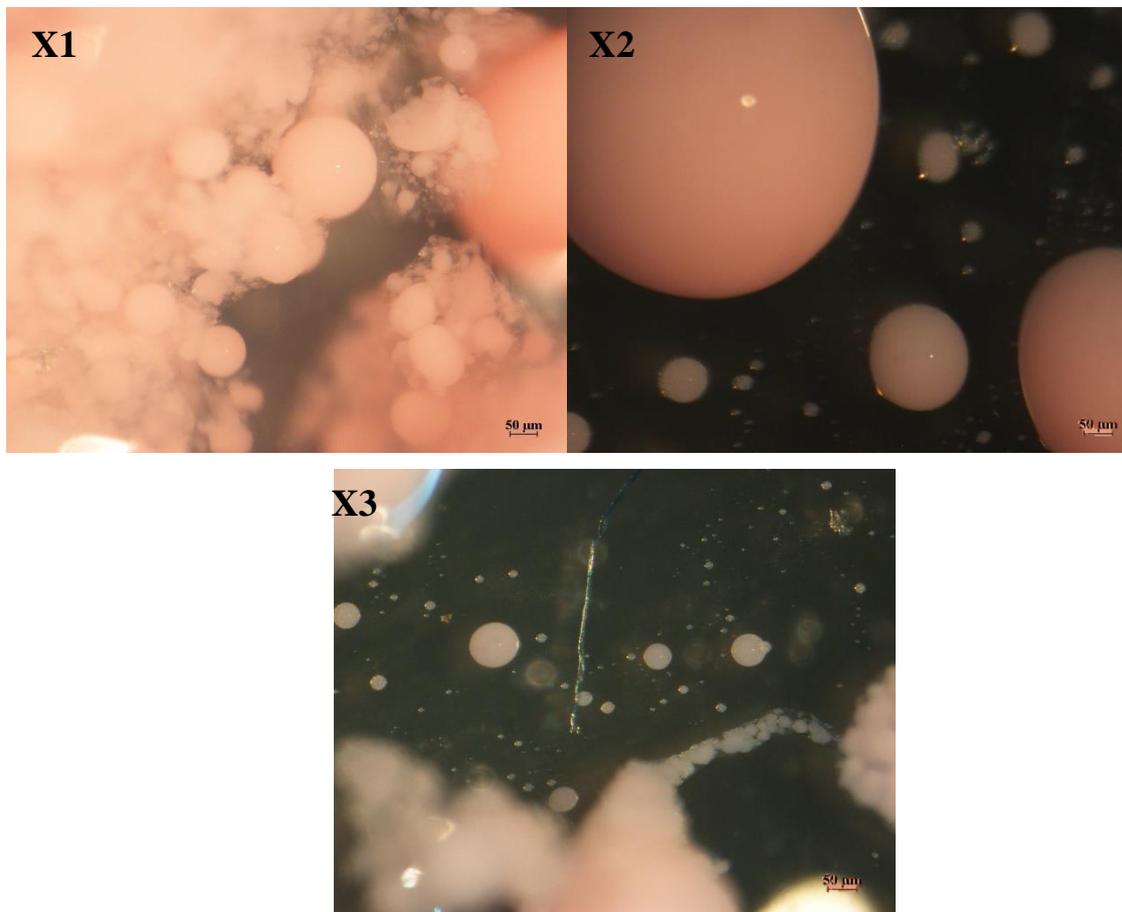
Figura 13 – Microscopia de luz invertida das microesferas X1, X2 e X3 produzidas nas proporções (Emulsão simples: Solução de Alginato de sódio: 20:80, 30:70 e 50:50 (%m/m)).



Fonte: Própria autoria.

Para as análises estereoscópicas foi possível perceber que as microesferas X1 apresentaram partículas mais unidas entre elas. Por outro lado, as microesferas do tratamento X2 mantiveram suas características uniformes e regulares perceptíveis. No entanto, no tratamento X3 foi possível perceber o rompimento de algumas microesferas durante a execução da análise (Figura 14), muito provavelmente devido ao menor teor de alginato neste tratamento, sendo um indicativo de limite de substituição pela emulsão contendo o extrato de beterraba.

Figura 14 – Microscopia estereoscópica das microesferas X1, X2 e X3 produzidas nas proporções (Emulsão simples: Solução de Alginato de sódio): 20:80, 30:70 e 50:50.



Fonte: Própria autoria.

4.3.2. Determinação de betalainas e eficiência de encapsulação

Por meio das análises de quantificação de betalaína foi possível determinar a eficiência de encapsulação (Tabela 1).

Tabela 1 – Teor médio de Betalaínas e valor médio da eficiência de encapsulação das dos tratamentos.

AMOSTRAS		Betalaínas (mg/100mL)	Eficiência de encapsulação
Extrato da beterraba		88,3±0,4	-
Emulsão escolhida (C)		32,2±0,1	-
Após Gelificação	X1 (20:80)	6,3±0,0	97,9±0,1%
	X2 (30:70)	9,1±0,2	93,9±6,4%
	X3 (50:50)	12,2±0,7	75,8±4,6%

Microesferas com as seguintes proporções de emulsão:solução de alginato (%m/m): 20:80 (X1), 30:70 (X2) e 50:50 (X3)

Pode-se observar que o suco extraído da beterraba apresentou 88,3 mg/100mL de betalaínas. Esse valor se aproxima do valor encontrado por LONGARAY (2014) de 110 mg/100mL no seu estudo de degradação das betalaínas no suco de beterraba. A diferença nos teores de betalaínas encontrada entre estudos é explicada por diversos fatores, como época, espécie, clima, qualidade, entre outros (HERNANDES et al, 2007).

Os resultados de eficiência de encapsulação, após a gelificação, apresentaram valores de 97,9±0,1%, 93,9±6,4% e 75,8±4,6% para as microesferas dos tratamentos X1, X2 e X3, respectivamente. Essa diminuição na eficiência pode estar relacionada as proporções de concentração de alginato que foram diminuindo conforme o tratamento. Quando se compara os tratamentos X2 e X3, observa-se um comportamento de diminuição da eficiência, mesmo com valores de betalaínas maiores para o tratamento X3, possivelmente dada pela diminuição da capacidade de proteção da matriz de alginato em relação ao componente ativo encapsulado, expondo ao meio as betalaínas.

Bazaria e Kumar (2017) em seu estudo afirmaram que para um rendimento de encapsulação ser considerado satisfatório é necessário ser superior a 50%, portanto todos os tratamentos poderiam ser considerados satisfatórios no quesito de eficiência.

Norcino *et al* (2022) ao desenvolver microcápsulas de alginato/pectina por processo emulsão dupla e gelificação ultrassônica para encapsulamento e liberação controlada de antocianinas de uvas (*Vitis labrusca L.*) observo eficiência de encapsulação após a gelificação

de 89% e de 64% para a emulsão. Corroborando assim com a obtenção de uma eficiência maior para o tratamento X2 (30:70), de $93,9 \pm 6,4\%$, possivelmente esses valores podem ser explicados devido a presença de maior proporção do Alginato, mantendo assim a estrutura carreadora da matriz encapsulantes.

ROJAS (2016) obteve uma eficiência de encapsulação de betalaínas a partir do extrato de planta *Bougainvillea* de 79%. Neste estudo utilizou-se o alginato diretamente na preparação da emulsão, na proporção de 1% (m/v) de alginato de sódio, 30% (v/v) de extrato e 79% (v/v) de água.

SANTOS (2018), obteve em seus estudos com extrato de beterraba por gelificação iônica utilizando alginato uma eficiência de 29%, no entanto, diferente dos outros trabalhos citados, foram utilizados equipamentos de menor potência para emulsionar e seringa para gotejar a emulsão na solução de Ca^{2+} 2% (m/v).

4.3.3. Perfil de liberação das Betalaínas

Com o objetivo de avaliar os efeitos da variação de pH na liberação controlada da betalaína a partir das microesferas obtidas, fez-se o estudo de liberação nos meios com pH 4 e 10 em temperatura ambiente.

A Figura 15 apresenta o comportamento para cada tratamento, todos apresentaram maior liberação em meio mais ácido (pH=4), em seguida em pH 10. Neste estudo, pode-se observar que os meios de maior acidez tendem a aumentar a capacidade de liberação e a intensidade de liberação das betalaínas da matriz de alginato. Pode-se observar que quanto menor a concentração de alginato, maior foi a porcentagem de liberação e sua velocidade, isso demonstra que as microesferas com maior concentração de alginato apresentaram maior resistência para a liberação do material aprisionado.

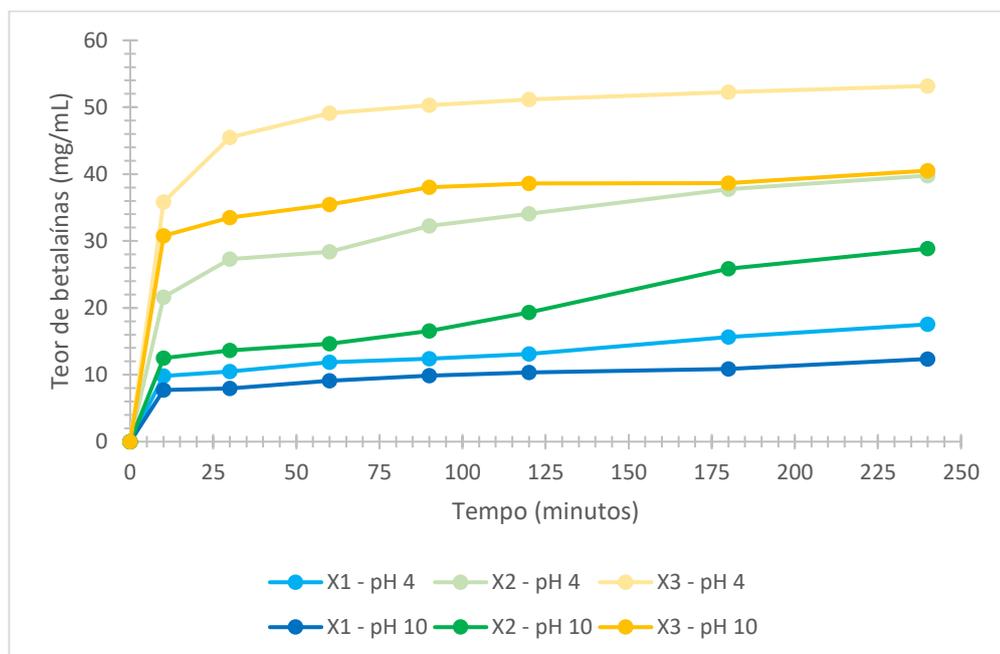
Gutiérrez (2019) observou o mesmo comportamento quando avaliou a liofilização para produção de criogeis como material de parede e sua aplicação em encapsulação de betalaínas, onde apresentou maior liberação e velocidade em pH mais ácido.

O gel iônico de alginato é formado a partir do contato da solução de alginato com soluções com íons bivalentes metálicos, tais como o Ca^{2+} . Esta interação, entre os monômeros do alginato com os íons, causa a ligação entre cadeias lineares do ácido α -L-gulurônico (G) formando uma rede tridimensional. O alginato apresenta elevada porosidade, e por fim alto

índice de difusão, podendo acelerar a liberação do material microencapsulado. Em meios ácidos essa interação pode ocasionar um aumento na velocidade de liberação por meio da difusão passiva, devido a sua sensibilidade a meios ácidos, a integridade do gel de alginato torna-se susceptível a degradação (CACURO, 2019; ARANHA, 2015;).

Horst (2005) ao preparar microesferas na proporção 1:1 (m/m) de extrato de beterraba e alginato, observou que todo corante foi liberado a partir da matriz polimérica de quitosana/alginato em menos de uma hora considerando-se diferentes pH, apresentando maior velocidade de liberação em pH mais ácidos.

Figura 15 – Estudo do perfil de liberação dos tratamentos X1 (20:80), X2 (30:70) e X3 (50:50), em diferentes meios tampão de pH 4 e 10 a temperatura ambiente (25 °C).

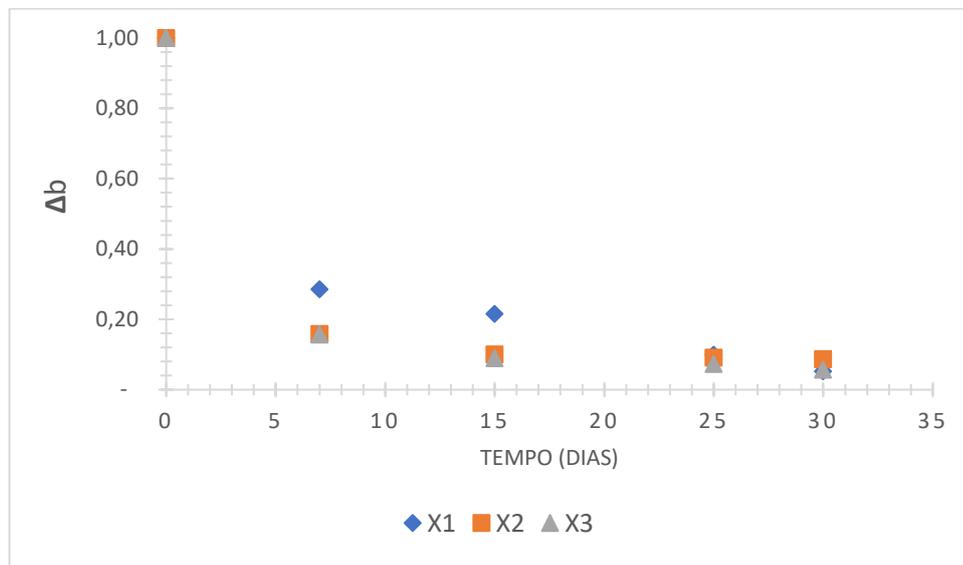


Fonte: Própria autoria

4.3.4. Estabilidade das betalaínas contidas nas microesferas

A estabilidade foi estudada por meio da determinação do teor de betalaínas ao longo do tempo nas microesferas secas. Dividiu-se a concentração de betalaínas encontrada no respectivo tempo medido pela concentração no tempo 0 para observar o comportamento entre os tratamentos no decorrer dos dias (Figura 16).

Figura 16 – Estabilidade das microesferas para as amostras X1, X2 e X3 no tempo de 30 dias.



$\Delta b = \text{Teor de betalaínas no tempo} / \text{Teor de betalaínas no T0}$

Fonte: Própria autoria

Pode-se averiguar que houve uma redução considerável no teor do composto ativo a partir de 7 dias. Os teores de betalaínas apresentaram uma redução de 71,5% (X1), 84,2% (X2) e 84,3% (X3) após 7 dias de estocagem a temperatura ambiente tendo como referencial a determinação de betalaínas no tempo inicial (T0). Logo, o tratamento X1 apresentou a melhor estabilidade entre as demais após os 7 dias. Este resultado evidencia a necessidade de teores consideráveis de alginato para a proteção dos compostos bioativos, indicando que existe um limite de substituição de alginato na solução/emulsão que contém o ativo. Do mesmo modo, X1 permaneceu como o melhor tratamento para a estabilidade após os 15 dias, apresentando uma redução do teor de betalaínas de 78,5%, enquanto X2 e X3 apresentaram redução de 90% e 91,1%, respectivamente.

Após 30 dias, observou-se uma constância na estabilidade entre os tratamentos, ao quantificar as betalaínas em relação a determinação no tempo 0, os três tratamentos estudados

apresentaram uma redução entre 92 e 95% no teor do ativo. Pode-se concluir que o alginato de sódio em maior concentração conferiu maior estabilidade ao tratamento X1. O alginato de sódio utilizado como material de parede, tem por característica produzir partículas porosas e seu recobrimento por interação eletroestática permite que se obtenha partículas mais protetivas (SILVERIO, 2018). Verifica-se, portanto, que o alginato protege a betalaína no interior de sua matriz, porém a extensão da estabilidade do composto ativo pode ser conseguida com possíveis complementações na formulação do material de parede com o intuito de reduzir a porosidade, aumentar a compactação do alginato e melhorar a proteção dos compostos carreados.

Ferreira et al (2021) ao estudar a microencapsulação de extrato de beterraba (*Beta Vulgaris L.*) pelo processo de gelificação iônica observou que as amostras armazenadas em diferentes meios a $5\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 dias, apresentaram uma redução no teor de ativo para 48% comparado ao tempo inicial após 7 dias e mostrando uma queda acentuada a partir de 21 dias. Sabe-se que as betalaínas são sensíveis a diversos fatores ambientais, dentre eles a temperatura de estocagem, podendo ser considerada um fator importante de estudo.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que foi possível realizar a encapsulação de betalaína do extrato de beterraba em microesferas de alginato e que o uso da técnica de emulsão múltipla proporciona bons índices de eficiência de encapsulação para este ativo, com características hidrofílicas. Verificou-se que as microesferas produzidas apresentaram estruturas regulas e esféricas. A liberação de betalaínas das microesferas foi influenciada pelo tipo de meio estudado, sendo maior em meios mais ácidos. O tratamento que continha maior teor de alginato (20:80 – alginato:emulsão) também foi aquele que apresentou maior estabilidade ao longo do tempo. A estabilidade da betalaína pode ser mantida pela aplicação da microencapsulação por gelificação iônica, porém técnicas complementares devem ser usadas para reduzir ainda mais as alterações e perdas de betalaínas ao longo do tempo, como uso de camadas múltiplas de encapsulação, complementação do alginato com outros materiais carreadores e adição de antioxidantes.

REFERENCIAS

ANTONIO, J. P. Microencapsulação do extrato de beterraba por spray chilling. Brasil. / Júlia Peres Antonio. - **Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras**, 2021.101 p.: il.

ARANHA C. P. M. (2015). Microencapsulação por gelificação iônica e interação eletrostática do corante de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). **Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Maryland: **AOAC International**, 2006.

AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Conjuntos nano e micro estruturados para encapsulamento de ingredientes alimentícios. **Chem Soc Rev** 38:902–912., 2009.

AULTON, Michael E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2ª edição. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

BAZARIA, B.; KUMAR, P. Effect of dextrose equivalency of maltodextrin together with Arabic gum on properties of encapsulated beetroot juice. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 1, p. 156–163, 2017.

BENAVIDES; S.; CORTÉS, P.; PARADA, J.; FRANCO, W. Development of alginate microspheres containing thy me essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, Barking, v. 204, p. 77–83, 2016.

BOUYER, E. et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 359–378, 2012.

BOVI, D. C. M. L. et al. Determinação dos teores de betalaína e composição centesimal de beterraba in natura e tipo chips. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 10, n. 2, p. 80-92, abr./jun. 2019.

BOMFIM, D. Por que o bico é importante no seu processo? Aplicações, Conceitos de Pulverização, Pulverização Geral. **Blog Spray**, 2020.

CASTRO, R. M. L. **Emulsão: uma revisão bibliográfica** / Rafaella Morgana Lima de Castro. João Pessoa: [s.n.], 2014.

CROCETTI, A. et al. Determinação da composição centesimal a partir de dois métodos de secagem para a produção da farinha de beterraba (*Beta vulgaris*, L. - Família Amaranthaceae). **Visão Acadêmica**, v. 17, n. 4, mar. 2017

CACURO, T. A. Compósitos de Alginato como Material Inteligente, Modulação de Solubilidade e Objeto de Ensino. **Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental**. Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba.

CLIFFORD, T. et al. The effects of beet root juice supplementation on indices of muscle damage follow in geccentric exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 2, p. 353–362, 2016.

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

CHO, Y.H., SHIM, H.K., PARK, J. Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins, **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2717–2723, 2006.

CHRANIOTI, C.; NIKOLOUDAKI, A.; TZIA, C. Saffronand beetroot textracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modifieds tarchand chitosan: Incorporation in a chewing gum system. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 252–263, 2015

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

DALLA COSTA, A. P. Aproveitamento de resíduos de cenoura e beterraba da indústria de minimamente processados para elaboração de ingredientes funcionais. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – **Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

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

DIAS, M. R. Obtenção e processamento de microesferas de alginato/vidro Bioativo. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.12 (2020). DOI: <http://dx.doi.org/10.22407/1984-5693.2020.v12.p.122-137>

ELBE, J. H. von. Betalains. In: *Current protocols in food analytical chemistry*. Madison: **University of Wisconsin**, 2001. p. F3.1.1-F3.1.7. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0301s00>

FENG, W. et al. Preparation and characterization of emulsion-filled gel beads for then capsulation and protection of resveratrol and α -tocopherol. **Food Research International**, v. 108, n. March, p. 161–171, 2018.

FERREIRA, J. E. M. **Estabilidade de carotenoides, flavonoides e vitamina C em alimentos submetidos às tecnologias emergentes de processamento** / José Emilson Mácedo Ferreira. - Campinas, SP: [s.n], 2011.

FERREIRA, L. P. C.; XAVIER, A. C. R. SANTOS, J.; WARTHA, E. R. S. A.; PAGANI, A. A. C. Microencapsulação de extrato de beterraba (*Beta Vulgaris* L.) pelo processo de gelificação iônica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, e454101220171, 2021 (CC BY 4.0). ISSN 2525-3409. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20171>.

FILHO, J. S. A.; SINHORELLI, K. S.; MEDEIROS, G. A., et al. Study of the rheology of cement pastes containing ceramic brick wastes end metakaolin. **Revista Matéria**, v.25, n.1, 2020.

FREIRE JUNIOR, M. Testes sensoriais de aceitação da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* L.), cv. Early Wonder, minimamente processada e irradiados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(supl.): 64-68, ago. 2007

FUJIWARA, G. M. et al. Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing Stig masterol through the external ionic gelation technique. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 537–547, 2013.

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.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Nature, Heidelberg**, v. 130, n. 2006, p. 227–248, 2007.

GUTIERREZ, A. M. C. Avaliação da liofilização para produção de criogeis como material de parede e sua aplicação em encapsulação de betalaínas. **Tese apresentada 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, 2019.

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.

HERNANDES¹, N. K.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; VITAL, H. C.; HORST, B. L. Estudo da estabilidade do corante Natural betalaína microencapsulado com Matriz polimérica de quitosana/alginato. **UFSC**, Florianópolis, 2005.

JANISZEWSKA E. Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. **Powder Technol** 264:190–196, 2014.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains - A new class of dietary antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5178–5185, 2001.

KIM, S. M. et al. The synthesis of Pt/Ag bimetallic nanoparticles using a successive solution plasma process. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 12, p. 8925–8929, 2014.

KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003.

KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569–576, 2016.

KUROZAWA, L. E.; HUBINGER, M. D. Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. **Current Opinion in Food Science**. Volume 15, June 2017, Pages 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.004>.

LUENGO, R. F. A.; CALBO, A. G. Pós-colheita de hortaliças. Brasília, DF: **EMBRAPA Informação Tecnológica**, 2011. 251 p.

LUPU, B. et al. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols, **Food Hydrocolloids**, 38, 56-65, 2014.

MOKHTARI, S.; JAFARI, S. M.; ASSADPOUR, E. Development of a nutraceutical nano-delivery system through emulsification/internal gelation of alginate. **Food Chemistry**, v. 229, p. 286–295, 2017.

MUN, S. et al. Influence of methyl cellulose nattributes of β -carotene fortified starch-based filled hydrogels: Optical, rheological, structural, digestibility, and bioaccessibility properties. **Food Research International**, v. 87, p. 18–24, 2016.

OTÁLORA, M. C.; CARRIAZO J. G.; ITURRIAGA, L.; OSORIO, C.; NAZARENO, M. A. Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. **Food Chemistry** 202 (2016) 373–382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.115>

PATIL, J.S.; KAMALAPUR, M.V.; MARAPUR, S.C.; KADAM, D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. Digest **Journal of Nanomaterials and Biostructures**, Cincinatti, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.

PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive components. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.1, p.155-162, jan, 2015. ISSN 0103-8478.

PINTADO, C. M. B. S.; FERREIRA, M. A. S. S.; SOUSA, I. Properties of Whey Protein–Based Films Containing Organic Acids and Nisin to Control *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, 2009.

PITALUA E, JIMENEZ M, VERNON-CARTER EJ, BERISTAIN CI. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. **Food Bioprod Process** 88:253–258, 2010.

PONCELET, D. MATINS, E. RODRIGUES, R. C. RENARD, D. Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. November 2017. **Journal of Microencapsulation** 34(2):1-18 DOI:10.1080/02652048.2017.1403495

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

RAVICHANDRAN K, PALANIRAJ R, SAW NMMT, GABR AM, AHMED AR, KNORR D, SMETANSKA I. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. **J Food Sci Technol** 51:2216–2221, 2014.

ROCHA, L. C. R. **Desenvolvimento de micropartículas contendo suco de tomate via gelificação iônica**. Lavras, 2017.

ROCHA-SELMI, G. A., BOZZA, F. T., THOMAZINI, M., BOLINI, H. M.A., FÁVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness, **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, pp. 72-78, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Betalains. In: MELTON, Laurence; SHAHIDI, Fereidoon; ROJAS, A. J. E. Evaluación de la protección y liberación del extracto de bugambilia (*bougainvilleasp.*) Encapsulado en perlas de alginato y almidón de maíz. **Universidad Autonoma del Estado de Mexico**, 2016.

SANTOS, F. R. A. Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre 2011.

SANTOS, E. F.; SILVA, G. S.; SOARES, A. C.; CABRAL, A. V.; XAVIER, A. C. R.; PAGANI, A. A. C. Desenvolvimento e caracterização de microcápsulas de beterraba. **Proceeding of ISTI/SIMTEC – ISSN:2318-3403 Aracaju/SE – 19 a 21/09/ 2018**. Vol. 9/n.1/ p.031-37 D.O.I.: 10.7198/S2318-3403201800010005

SILVERIO, G. B. Produção e caracterização de micropartículas de alginato obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática com concentrado proteico de soja. **Biblioteca UTFPR**, Londrina, 2018.

SHI, J., XUE, S. J., WANG, B., WANG, W., YE, X., QUEK, S. Y. Optimization of formulation and influence of environmental stresses on stability of lycopene-microemulsion, **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 999-1008, Part 1, 2015.

SOUSA, C. R. V. Extração assistida por ultrassom e encapsulamento de corante da casca de beterraba com potencial para aplicação em iogurte. **Dissertação – UFT**, Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2019.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

ZANON, A. B. Aspecto Teórico e prático sobre a avaliação da estabilidade de emulsão manipuladas em farmácia, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2010

ZUIDAM, N.J.; NEDOVIC, V.A. (Eds.) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer Science Business Media, **LLC**, New York, 2010.