



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**GABRIELA FELTRE**

**INCORPORAÇÃO DE AMIDO DE MILHO COM DIFERENTES  
TEORES DE AMILOSE NA MATRIZ DE ALGINATO PARA  
ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE GÉRMEN DE TRIGO**

**INCORPORATION OF CORN STARCH WITH DIFFERENT  
AMOUNTS OF AMYLOSE INTO ALGINATE MATRIX TO WHEAT  
GERM OIL ENCAPSULATION**

**CAMPINAS  
2020**

**GABRIELA FELTRE**

**INCORPORAÇÃO DE AMIDO DE MILHO COM DIFERENTES  
TEORES DE AMILOSE NA MATRIZ DE ALGINATO PARA  
ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE GÉRMEN DE TRIGO**

**INCORPORATION OF CORN STARCH WITH DIFFERENT  
AMOUNTS OF AMYLOSE INTO ALGINATE MATRIX TO WHEAT  
GERM OIL ENCAPSULATION**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos

Thesis presented to the School of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Food Engineering

***Orientadora:* PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MIRIAM DUPAS HUBINGER**

***Co-orientador:* PROF<sup>o</sup>. DR<sup>o</sup>. GUSTAVO CESAR DACANAL**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELA ALUNA GABRIELA FELTRE, E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.  
MIRIAM DUPAS HUBINGER

**CAMPINAS  
2020**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

F347i Feltre, Gabriela, 1986-  
Incorporação de amido de milho com diferentes teores de amilose na matriz de alginato para encapsulação de óleo de gérmen de trigo / Gabriela Feltre. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Miriam Dupas Hubinger.  
Coorientador: Gustavo Cesar Dacanal.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Gelificação iônica. 2. Microestrutura. 3. Amilopectina. 4. Digestibilidade. 5. Tocoferóis. I. Hubinger, Miriam Dupas. II. Dacanal, Gustavo Cesar. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Incorporation of corn starch with different amounts of amylose into alginate matrix to wheat germ oil encapsulation

**Palavras-chave em inglês:**

Ionic gelation

Microstructure

Amylopectin

Digestibility

Tocopherols

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Miriam Dupas Hubinger [Orientador]

Fabiana Perrechil Bonsanto

Wanderley Pereira Oliveira

Izabela Dutra Alvim

Paula Speranza

**Data de defesa:** 30-01-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Alimentos

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8210-2438>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7202194755283629>

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger**  
Orientadora  
DEA/ FEA/ UNICAMP

**Profa. Dra. Fabiana Perrechil Bonsanto**  
Membro Titular  
ICAQF/UNIFESP

**Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira**  
Membro Titular  
FCFRP/USP

**Dra. Izabela Dutra Alvim**  
Membro Titular  
CEREAL CHOCOTEC/ITAL

**Dra. Paula Speranza**  
Membro Titular  
DEA/FEA/UNICAMP

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, com todo meu amor.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor infinito, que me guiou em todo esse processo, e me permitiu enxergar as oportunidades que apareceram em meu caminho.

À Profa. Dra. Florencia Cecilia Menegalli (*in memoriam*), por acreditar em meu potencial, por todo o ensinamento e carinho. Muito obrigada por ter feito parte de minha vida!

À Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger, que me acolheu com muito carinho. Obrigada por sua orientação, dedicação e paciência durante essa trajetória.

Ao Prof. Dr. Gustavo Cesar Dacanal, por todo apoio e incentivo ao longo de tantos anos.

À Profa. Dra. Ana Carla Kawazoe Sato, por suas contribuições em diversos trabalhos e pelo incentivo.

À Profa. Dra. Maria Teresa Pedrosa Clerici, pela disponibilidade em ajudar em análises.

À UNICAMP e ao Departamento de Engenharia de Alimentos (FEA), que me proporcionaram uma nova experiência, enriquecendo-me profissional e pessoalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de minha bolsa de doutorado (Processo n° 142661/2015-5).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às funcionárias do laboratório de Engenharia de Processos (LEP) da FEA-UNICAMP, Zildene e Vanessa, por todo o apoio e amizade.

Aos amigos do coração, que estiveram presentes nas etapas dessa trajetória, me apoiando e incentivando: Tanara, Heloisa, Aline, Karine, Larissa, Mateus e Paula.

Aos meus amigos do LEP: Karen, Paula, Tati, Talita, Cris, Antonio e Jorge.

Aos colegas de laboratório, que me acolheram em seu grupo de pesquisa com muito carinho.

Aos meus pais, Zezé e Tarcisio, por todo apoio, compreensão, paciência e amor. Obrigada por acreditarem em mim!

À minha irmã Camila, minha melhor amiga, com quem compartilho todos os momentos da vida, e ao meu cunhado Arthur.

Ao Daniel, pelo companheirismo e amor.

Aos meus tios Mariinha, Sandra e Toninho, Salette e Beto, por seu amor e apoio.

Aos meus avós queridos, que muito me ensinaram, cada um à sua maneira. Sou grata a cada momento que vivemos juntos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

## RESUMO

O óleo de gérmen de trigo é fonte de tocoferóis, e por possuir alto teor de ácidos graxos insaturados, é suscetível à oxidação. A microencapsulação é usada para proteger o óleo e evitar sua oxidação lipídica. A gelificação iônica apresenta como vantagens a produção de partículas úmidas e com altas cargas de óleo encapsulado. O objetivo deste estudo foi a avaliação do efeito de amido de milho com diferentes teores de amilose (6,62, 28,46 e 61,10%), na forma de grânulos e gelatinizados, nas propriedades de matriz de alginato de sódio. A quantidade de amilose e a presença ou não do processo de gelatinização apresentaram influência nas propriedades dos géis e em seus comportamentos durante a digestibilidade *in vitro*. Géis produzidos com amidos de milho com médio e alto teor de amilopectina gelatinizados apresentaram alta liberação de glicose e microestrutura mais degradadas após o processo de digestão, mostrando-se como sistemas em potenciais para a microencapsulação de compostos que devem ser absorvidos na fase entérica da digestibilidade. Para a segunda etapa do projeto, definiu-se que o óleo de gérmen de trigo seria microencapsulado numa matriz composta por alginato de sódio e amido de milho com 28,46% de amilose gelatinizado. Foi investigada a influência da quantidade de amido de milho gelatinizado nas propriedades e estabilidade de partículas de óleo de gérmen de trigo produzidas por gelificação iônica, utilizando diferentes proporções de alginato e amido (2:0, 1:1, 1:2 e 1:4). As partículas apresentaram eficiências de encapsulação maiores que 90%. A substituição de uma parte de alginato por amido gelatinizado (matriz com proporção de alginato e amido de 1:1) melhorou significativamente a estabilidade oxidativa e a quantidade de tocoferóis em relação às partículas produzidas apenas com alginato de sódio, após 6 dias de estocagem acelerada, a 65 °C. Para a microencapsulação do óleo de gérmen de trigo, as emulsões passam por uma etapa de atomização, em que ficam sujeitas a altas taxas de cisalhamento, que podem influenciar em suas estabilidades e nas propriedades das partículas produzidas. Foi avaliada a influência do processo de atomização e da quantidade de amido gelatinizado na estabilidade e estrutura das emulsões. Emulsões sem ou com baixas quantidades de amido tiveram aumento no tamanho de gotas, enquanto as emulsões com maiores teores de amido mantiveram-se constantes após o processo de atomização.

**Palavras-chave:** gelificação iônica; microestrutura; amilopectina; digestibilidade; tocoferóis.

## ABSTRACT

Wheat germ oil is a source of tocopherols, and due to its high content of unsaturated fatty acids, it is susceptible to oxidation. Microencapsulation is used to protect the oil and prevent its lipid oxidation. Ionic gelation presents the advantages of producing wet particles with high encapsulated oil loads. The aim of this study was to evaluate the effect of corn starch with different amylose contents (6.62, 28.46 and 61.10%), in granules and gelatinized, on the properties of sodium alginate matrix. The amount of and the presence or absence of the gelatinization process influenced the properties of the gels and their behavior during *in vitro* digestibility. Gels produced with gelatinized medium and high amylopectin corn starches showed high glucose release and more degraded microstructure after the digestion process, showing as potential systems for the microencapsulation of compounds that must be absorbed in the enteric phase of digestibility. For the second stage of the project, it was defined that wheat germ oil would be microencapsulated in a matrix composed of sodium alginate and gelatinized corn starch with 28.46% amylose. The influence of the amount of gelatinized corn starch on the properties and stability of wheat germ oil beads produced by ionic gelation was investigated using different alginate and starch ratios (2: 0, 1: 1, 1: 2 and 1: 4). Beads presented encapsulation efficiencies greater than 90%. Replacing a part of alginate with gelatinized starch (1:1 alginate-starch ratio matrix) significantly improved oxidative stability and the amount of tocopherols, in relation to beads produced with sodium alginate alone, after 6 days of accelerated storage, at 65 °C. For the microencapsulation of wheat germ oil, emulsions undergo an atomization step, in which they are subjected to high shear rates, that can influence their stability and beads properties produced. The influence of the atomization process and the amount of gelatinized starch on the emulsions stability and structure was evaluated. Emulsions without or with low amounts of starch had an increase in droplet size, while emulsions with higher starch contents remained constant after the atomization process.

**Keywords:** ionic gelation; microstructure; amylopectin; digestibility; tocopherols.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

---

Figura 1.1. Diagrama de fluxo das etapas realizadas durante o projeto de pesquisa.....	20
--	----

### CAPÍTULO 2

---

Figura 2.1. Tipos de microcápsulas. (i) microcápsula simples; (ii) matriz (microesfera); (iii) microcápsula irregular; (iv) microcápsula multinucleada; (v) microcápsula com multicamadas; (vi) conjunto de microcápsulas. Adaptado de (BAKRY et al., 2016).....	25
Figura 2.2. Componentes do alginato: G-G, M-M e blocos M-G (GOH; HENG; CHAN, 2012).....	34
Figura 2.3. Estrutura do modelo “caixa de ovos” de um gel de alginato formado com íons $Ca^{2+}$ (ONSOYEN, 1997).....	35
Figura 2.4. Estruturas da amilose e amilopectina (ZOBEL, 1988).....	37

### CAPÍTULO 3

---

Figure 3.1. Optical micrographs of solutions used to produce gels. (a) NGCS: Alginate + non-gelatinized common corn starch; (b) NGAM: Alginate + non-gelatinized high amylose corn starch; (c) NGAP: Alginate + non-gelatinized high amylopectin corn starch; (d) GCS: Alginate + gelatinized common corn starch; (e) GAM: Alginate + gelatinized high amylose corn starch; (f) GAP: Alginate + gelatinized high amylopectin corn starch. Scale bar: 20 $\mu m$ . Magnification of x 40.....	58
Figure 3.2. SEM images of the gels before (a, b, c, d, e, f, g) and after (h, i, j, k, l, m, n) <i>in vitro</i> digestibility process. (a, h): ALG - Alginate; (b, i): NGCS - Alginate + non-gelatinized common corn starch; (c, j): GCS - Alginate + gelatinized common corn starch; (d, k): NGAM - Alginate + non-gelatinized high amylose corn starch; (e, l): GAM - Alginate + gelatinized high amylose corn starch; (f, m): NGAP - Alginate + non-gelatinized high amylopectin corn starch; (g, n): GAP - Alginate + gelatinized high amylopectin corn starch. Scale bar: 10 $\mu m$ . Magnification of x 1500.....	59

Figure 3.3. Glucose released from the gels during <i>in vitro</i> digestibility process. ALG: Alginate; NGCS: Alginate + non-gelatinized common corn starch; GCS: Alginate + gelatinized common corn starch; NGAM: Alginate + non-gelatinized high amylose corn starch; GAM: Alginate + gelatinized high amylose corn starch; NGAP: Alginate + non-gelatinized high amylopectin corn starch; GAP: Alginate + gelatinized high amylopectin corn starch.....	61
--	----

## CAPÍTULO 4

---

Figure 4.1. Optical (A-D), and CLSM (E-H) micrographs, and size distribution (I-L) of emulsions produced with different proportions of alginate and starch. (A, E, I): A2S0 (2:0); (B, F, J): A1S1 (1:1); (C, G, K): A1S2 (1:2); (D, H, L): A1S4 (1:4). Scale bar: 20 $\mu\text{m}$ .....	81
---	----

Figure 4.2. CLSM (A-D) and SEM (E-H) micrographs of beads with different proportions of alginate and starch. (A, E): A2S0 (2:0); (B, F): A1S1 (1:1); (C, G): A1S2 (1:2); (D, H): A1S4 (1:4). Scale bar: (A-D): 200 $\mu\text{m}$ ; (E-H); 10 $\mu\text{m}$ .....	85
--	----

Figure 4.3. FTIR spectra of biopolymer beads produced with different alginate and gelatinized corn starch ratios.....	86
---	----

Figure 4.4. Amount of remaining tocopherols during the storage. (a) Total tocopherols; (b) $\beta$ - $\gamma$ -tocopherols; (c) $\delta$ -tocopherols.....	90
--	----

## CAPÍTULO 5

---

Figura 5.1. Distribuição do tamanho de gotas das emulsões antes (símbolos) e depois (linhas) do processo de atomização. (a) A2S0; (b) A1S1; (c) A1S2; (d) A1S4.....	107
---	-----

Figura 5.2. Curvas de escoamento das emulsões antes e depois do processo de atomização.....	108
---	-----

Figura 5.3. Módulos de armazenamento $G'$ (símbolo cheio) e de perda $G''$ (símbolo vazio) das emulsões. (a) A2S0; (b) A1S1; (c) A1S2; (d) A1S4.....	111
--	-----

Figura 5.4. Parâmetro $\tan \delta$ das emulsões.....	112
---	-----

## APÊNDICES

---

Figura A.1. Curva de DSC do amido de milho comum (28,46% de amilose).....	139
---	-----

Figura A.2. Curva de DSC do amido de milho com alto teor de amilopectina (6,62% de amilose).....	140
--	-----

Figura A.3. Curva de DSC do amido de milho com alto teor de amilose (61,10% de amilose).....	140
Figura A.4. Difração de raio-X dos amidos de milho com diferentes teores de amilose.....	141
Figura C.1. Difração de raio-X das partículas produzidas com diferentes proporções de alginato e amido de milho gelatinizado. A2S0: 2:0; A1S1: 1:1; A1S2: 1:2; A1S4: 1:4.....	146

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

---

Tabela 2.1. Encapsulação de compostos utilizando alginato de sódio e diferentes tipos de amido, pelo método de gelificação iônica.....	29
Tabela 2.2. Porcentagem de cada ácido graxo presente no óleo de gérmen de trigo. Adaptado de (GHAFOOR et al., 2017).....	39

### CAPÍTULO 3

---

Table 3.1. Composition of the gels.....	53
Table 3.2. Mechanical properties of the gels.....	56
Table 3.3. Stress at rupture values (kPa) of gels during gastrointestinal <i>in vitro</i> process.....	60

### CAPÍTULO 4

---

Table 4.1. Experimental conditions for emulsion and beads formation using sodium alginate, gelatinized corn starch and wheat germ oil, in relation to total solids.....	75
Table 4.2. Consistency index (Pa.s), flow behavior index, oil droplet size ( $D_{[4,3]}$ ) ( $\mu\text{m}$ ), span and zeta potential values (mV) of emulsions produced with different alginate and gelatinized corn starch ratios.....	80
Table 4.3. Encapsulation efficiency (%), mean diameter ( $\mu\text{m}$ ) and span of biopolymer beads produced with different alginate and gelatinized corn starch ratios.....	83
Table 4.4. Tocopherols amount (mg/g oil) and peroxides value (PV) (meq. $\text{O}_2/\text{kg}$ oil) of bulk oil and oil extracted from the beads during the storage time.....	88

### CAPÍTULO 5

---

Tabela 5.1. Condições experimentais para as emulsões produzidas com alginato de sódio, amido de milho gelatinizado e óleo de gérmen de trigo.....	104
Tabela 5.2. Diâmetro médio de Brouckere ( $D_{[4,3]}$ ) e span das emulsões antes e depois do processo de atomização.....	106

Tabela 5.3. Índice de consistência (k) (Pa.s) e índice de comportamento reológico (n) (-) das emulsões antes e depois do processo de atomização.....	109
--	-----

## **APÊNDICES**

---

Tabela B.1. Composição de ácidos graxos do óleo de germen de trigo.....	144
---	-----

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

---

INTRODUÇÃO GERAL, OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE.....	17
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.2 OBJETIVOS.....	20
1.2.1 Objetivo Geral.....	20
1.2.2 Objetivos Específicos.....	20
1.3 ESTRUTURA DA TESE.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

### CAPÍTULO 2

---

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 MICROENCAPSULAÇÃO.....	25
2.2 GELIFICAÇÃO IÔNICA.....	26
2.3 GELIFICAÇÃO IÔNICA COM ALGINATO DE SÓDIO E AMIDO... ..	28
2.4 EMULSÕES.....	32
2.5 ALGINATO DE SÓDIO.....	33
2.6 AMIDO.....	35
2.6.1 Gelatinização do amido.....	37
2.7 ÓLEO DE GÉRMIN DE TRIGO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

### CAPÍTULO 3

---

ALGINATE AND CORN STARCH MIXED GELS: EFFECT OF GELATINIZATION AND AMYLOSE CONTENT ON THE PROPERTIES AND <i>IN VITRO</i> DIGESTIBILITY.....	47
3.1 INTRODUCTION.....	50
3.2 MATERIAL AND METHODS.....	52
3.2.1 Material .....	52
3.2.2 Preparation of hydrogels.....	52
3.2.3 <i>In vitro</i> static digestion.....	53
3.2.4 Mechanical properties.....	54
3.2.5 Water holding capacity (WHC) .....	54
3.2.6 Glucose release.....	55
3.2.7 Scanning electron microscopy (SEM) .....	55
3.2.8 Optical microscopy.....	55
3.2.9 Statistical data analysis.....	55
3.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	56
3.3.1 Characterization of hydrogels.....	56
3.3.2 <i>In vitro</i> digestibility.....	60
3.4 CONCLUSIONS.....	63
ACKNOWLEDGEMENTS.....	64

REFERENCES.....	65
-----------------	----

## CAPÍTULO 4

---

ENCAPSULATION OF WHEAT GERM OIL IN ALGINATE-GELATINIZED CORN STARCH BEADS: PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND TOCOPHEROLS' STABILITY.....	70
<b>4.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2 MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>74</b>
<b>4.2.1 Material.....</b>	<b>74</b>
<b>4.2.2 Preparation of emulsions.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2.3 Characterization of emulsions.....</b>	<b>75</b>
4.2.3.1 <i>Size distribution of oil droplets.....</i>	75
4.2.3.2 <i>Optical microscopy.....</i>	76
4.2.3.3 <i>Zeta potential.....</i>	76
4.2.3.4 <i>Flow behavior.....</i>	76
<b>4.2.4 Production of biopolymer beads.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2.5 Characterization of beads.....</b>	<b>77</b>
4.2.5.1 <i>Encapsulation Efficiency.....</i>	77
4.2.5.2 <i>Characterization of size distribution.....</i>	77
4.2.5.3 <i>Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR).....</i>	78
4.2.5.4 <i>Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) .....</i>	78
4.2.5.5 <i>Scanning Electron Microscopy (SEM) .....</i>	78
<b>4.2.6 Accelerated stability test of biopolymer beads.....</b>	<b>79</b>
4.2.6.1 <i>Peroxide value (PV) .....</i>	79
4.2.6.2 <i>Tocopherols amount.....</i>	79
<b>4.2.7 Statistical analysis.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3.1 Characterization of emulsions.....</b>	<b>80</b>
4.3.1.1 <i>Droplet size, zeta potential and morphology of emulsions.....</i>	80
4.3.1.2 <i>Flow behavior.....</i>	83
<b>4.3.2 Characterization of biopolymer beads.....</b>	<b>83</b>
4.3.2.1 <i>Encapsulation Efficiency, size and microstructure.....</i>	83
4.3.2.2 <i>Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) .....</i>	86
<b>4.3.3 Accelerated stability test.....</b>	<b>87</b>
<b>4.4 CONCLUSIONS.....</b>	<b>90</b>
ACKNOWLEDGEMENTS.....	91
REFERENCES.....	92

## CAPÍTULO 5

---

ESTABILIDADE DE EMULSÕES ÓLEO/ÁGUA DURANTE O PROCESSO DE ATOMIZAÇÃO: INFLUÊNCIA DO AMIDO DE MILHO GELATINIZADO NO TAMANHO DE GOTAS DE ÓLEO.....	99
<b>5.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>102</b>

<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	103
<b>5.2.1 Material</b> .....	103
<b>5.2.2 Preparação das emulsões</b> .....	104
<b>5.2.3 Processo de atomização das emulsões</b> .....	105
<b>5.2.4 Tamanho e distribuição de tamanho de gotas</b> .....	105
<b>5.2.5 Comportamento reológico</b> .....	105
<b>5.2.6 Testes oscilatórios</b> .....	106
<b>5.2.7 Análises estatísticas</b> .....	106
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	106
<b>5.3.1 Tamanho e distribuição de tamanho de gotas</b> .....	106
<b>5.3.2 Comportamento reológico</b> .....	108
<b>5.3.3 Ensaios oscilatórios</b> .....	110
<b>5.4 CONCLUSÃO</b> .....	113
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	113
<b>REFERENCES</b> .....	114

## **CAPÍTULO 6**

<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	118
<b>6.1 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	119

## **CAPÍTULO 7**

<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	122
<b>7.1 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	123

## **CAPÍTULO 8**

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	124
---	-----

## **APÊNDICES**

<b>APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS DE MILHO</b> .....	139
<i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i> .....	139
<i>Difração de Raio-X</i> .....	141
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	143
<b>APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE GÉRMEN DE TRIGO</b> .....	144
<i>Composição de ácidos graxos do óleo de germen de trigo</i> .....	144
<i>Índice de estabilidade de óleo de germen de trigo</i> .....	145
<b>APÊNDICE C – CRISTALINIDADE DAS PARTÍCULAS (CAPÍTULO 4)</b> .....	146
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	148

## **ANEXO**

<b>PERMISSÃO PARA USO DE ARTIGO</b> .....	149
---	-----



# CAPÍTULO 1

---

INTRODUÇÃO GERAL

OBJETIVOS

ESTRUTURA DA TESE

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O óleo de gérmen de trigo é rico em ácidos graxos polinsaturados, que constituem cerca de 80% dos triglicerídeos (GHAFOOR et al., 2017). É conhecido como o óleo com maior quantidade de tocoferóis (vitamina E), quando comparado a outros óleos vegetais (MEGAHAD; EL KINAWY, 2002; OZCAN et al., 2013). O consumo de tocoferóis presentes no óleo de gérmen de trigo é considerado importante para a saúde humana, já que não são sintetizados pelo organismo (OZCAN et al., 2013). O alto teor de ácidos graxos polinsaturados torna o óleo de gérmen de trigo susceptível à oxidação, e para evitar esse problema, a sua microencapsulação apresenta-se como uma solução (CHAN; LIM; HENG, 2000; YAZICIOGLU; SAHIN; SUMNU, 2015).

A microencapsulação é uma técnica versátil utilizada em diversas indústrias, como a química, farmacêutica e de alimentos. Existem várias razões para microencapsular um ativo, como por exemplo, para protegê-lo contra a degradação resultante de exposição a fatores ambientais, como água, oxigênio, altas temperaturas ou à luz (COMUNIAN et al., 2017; MOURA et al., 2018). A gelificação iônica é uma técnica que vem sendo usada para microencapsulação de compostos ativos (NOGUEIRA; PRATA; GROSSO, 2017; SILVA; SATO, 2017; TELLO et al., 2015). Ela apresenta como vantagem o fato de não ser necessário o uso de solventes orgânicos nem de temperatura ou pH extremos, o que a torna de menor custo, quando comparada a outras técnicas de microencapsulação (PATIL et al., 2010).

O alginato de sódio é um polissacarídeo aniônico natural muito utilizado na microencapsulação por gelificação iônica. Ele é extraído de algas e é constituído de monômeros de ácidos  $\alpha$ -L-gulurônico (G) e (1-4)  $\beta$ -manurônico (M) (THU et al., 1996). Quando os blocos G do alginato se ligam a cátions divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , formam estruturas tridimensionais conhecidas como modelo “caixa de ovos” (GRANT et al., 1973). Por suas propriedades de gelificação, alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, o alginato é amplamente utilizado como material de parede de compostos ativos (HAUG; SMIDSRØD, 1965; MARTINSEN; STORRØ; SKJÅRK-BRAEK, 1992) e fibras dietéticas (BROWNLEE et al., 2007; PAXMAN et al., 2008).

Ao longo dos anos, muito já se estudou sobre produção de partículas por gelificação iônica. A modificação da matriz de alginato também já foi realizada com a adição de diversos compostos, como quitosana, gelatina, gomas arábica e xantana, seja para aumentar a eficiência de encapsulação do composto, ou para controlar sua liberação. O amido, tanto na forma de grânulos, quanto gelatinizado, foi utilizado na modificação da matriz de alginato em diversos

estudos, mostrando-se, em alguns casos, como um aditivo que fortaleceu a matriz em cápsulas produzidas por gelificação iônica. Os grânulos de amido apresentam-se como uma espécie de barreira tornando a matriz menos porosa, o que diminuiu a liberação do composto ativo (BISWAS; SAHOO, 2016; CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013; HOSSEINI et al., 2014; NAYAK; PAL, 2013). Amido gelatinizado de mandioca, batata e milho foram utilizados em combinação com alginato de sódio para microencapsular compostos ativos, como tartarato de metoprolol, lornoxicam e microrganismos (*Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium bifidum*), respectivamente (BISWAS; SAHOO, 2016; CHOWDARY; RAVI SHANKAR; SUBRAHMANYAM, 2014; KHOSRAVI ZANJANI et al., 2014). A combinação do alginato de sódio com o amido gelatinizado é capaz de produzir partículas com alta eficiência de encapsulação e pode ter a liberação do ingrediente ativo controlada, para que ele tenha sua absorção efetiva no local desejado.

O amido é um carboidrato produzido pelas plantas, está em forma de grânulos que existem naturalmente dentro das células e é a maior fonte de carboidratos na alimentação humana (SINGH; DARTOIS; KAUR, 2010; SINGH et al., 2003). O grânulo de amido é semicristalino, com variações nos níveis de cristalinidade, por possuir uma região amorfa e uma cristalina (SINGH et al., 2003; WAIGH et al., 1997). A amilopectina é responsável pela cristalinidade do grânulo do amido, enquanto a região amorfa representa principalmente a amilose (ZOBEL, 1988). A gelatinização do amido é causada pela ruptura da estrutura granular, gerando moléculas que se dissolvem em água (ZOBEL, 1988). Segundo Copeland et al. (2009), a gelatinização ocorre quando o amido é aquecido na presença suficiente de umidade. Os grânulos absorvem água e incham, rompendo a organização cristalina irreversivelmente.

A modificação da matriz de alginato por algum composto origina um novo material de parede para sistemas de encapsulação, que possuem comportamentos diferentes daqueles apresentados inicialmente, tanto nas propriedades, quanto durante o processo de digestibilidade *in vitro*. Atualmente não são encontradas pesquisas no que diz respeito ao efeito da razão de amilose e amilopectina presente no amido, nas propriedades da matriz de alginato durante a digestibilidade, somada ao uso ou não do processo de gelatinização do amido. Assim, o desenvolvimento deste trabalho visou avaliar a influência tanto da quantidade dos componentes do amido (amilose e amilopectina), quanto de sua gelatinização na matriz de alginato, e assim, contribuir com o desenvolvimento de novos sistemas para microencapsulação de compostos e sua liberação controlada, dependendo do objetivo desejado.

Este trabalho foi desenvolvido em três etapas, que são apresentadas em um diagrama de fluxo (Figura 1.1).

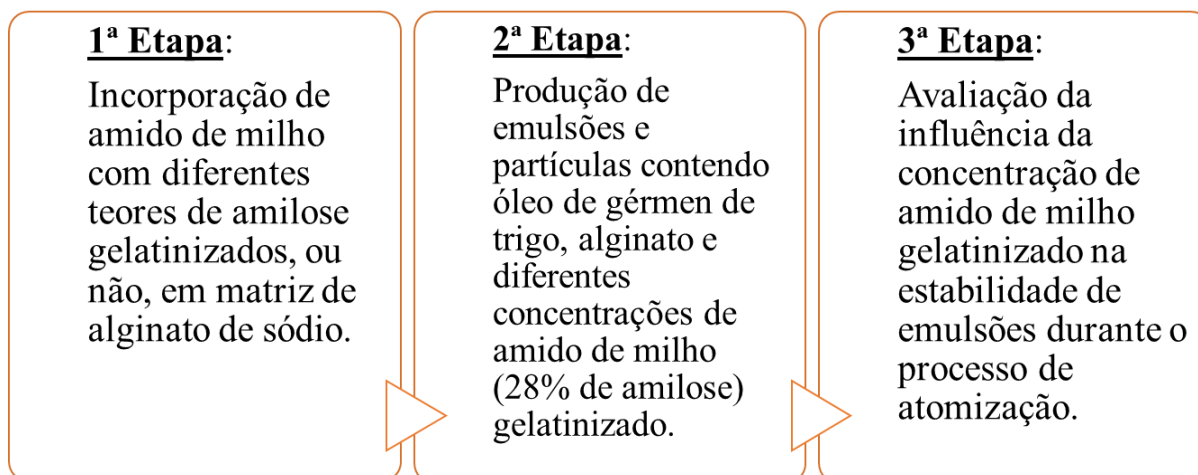


Figura 1.1. Diagrama de fluxo das etapas realizadas durante o projeto de pesquisa.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da incorporação de amido de milho com diferentes teores de amilose, gelatinizado ou não, em matriz de alginato. Definido o melhor sistema para encapsular óleo, avaliou-se a influência da concentração de amido de milho gelatinizado nas propriedades físico-químicas de emulsões e na estrutura e estabilidade de partículas produzidas com óleo de gérmen de trigo. Por fim, estudou-se o efeito das diferentes concentrações de amido na estabilidade de emulsões durante o processo de atomização para produção de partículas.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a influência da substituição de parte de alginato de sódio por amido de milho com teores de amilose de 6,62%, 28,46% e 61,10%, gelatinizado ou não, na produção de hidrogéis, quanto à sua resistência mecânica, capacidade de retenção de água e microestrutura. Estudar os efeitos do processo de digestibilidade *in vitro* em cada uma das formulações.
- ✓ Desenvolver emulsões contendo alginato de sódio, óleo de gérmen de trigo e diferentes concentrações de amido de milho com 28,46% de amilose, e com a reticulação em cloreto de cálcio, produzir partículas. Caracterizar as emulsões e as partículas em relação às suas propriedades físicas e químicas. Avaliar a estabilidade oxidativa do óleo

e de tocoferóis presente durante o processo de estocagem. Verificar o efeito das diferentes concentrações de amido nas propriedades das emulsões e partículas.

- ✓ Verificar a influência do processo de atomização na estabilidade de emulsões produzidas com óleo de gérmen de trigo, alginato de sódio e amido de milho com 28,46% de amilose. Avaliar o efeito da quantidade de amido na estabilidade das emulsões durante a atomização.

### 1.3 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está apresentada em forma de Capítulos. O **Capítulo 1** apresenta uma introdução geral, mostrando as motivações que justificam a realização desse trabalho, além dos objetivos gerais e específicos do projeto e a estruturação da tese. No **Capítulo 2**, é realizada uma Revisão Bibliográfica, em que são abordados aspectos teóricos dos sistemas estudados, além do relato sobre a literatura recente e relevante do tema abordado na tese. Os **Capítulos 3, 4 e 5** tratam de artigos gerados com os resultados obtidos durante a realização do projeto de pesquisa. No **Capítulo 3**, foram apresentados os resultados sobre a influência da adição de amido de milho de diferentes teores de amilose (6,62, 28,46 e 61,10%), gelatinizado e não gelatinizado, na matriz de alginato de sódio, em relação a propriedades mecânicas e microestrutura, antes e depois do processo de digestibilidade *in vitro*. No **Capítulo 4**, foi avaliada a influência da substituição de parte do alginato de sódio por amido de milho gelatinizado (28,46% de amilose), em diferentes concentrações, em emulsões e partículas produzidas com óleo de gérmen de trigo, por gelificação iônica e avaliada a estabilidade do óleo durante a estocagem. No **Capítulo 5**, foi estudada a influência da presença do amido gelatinizado na estabilidade das emulsões após o processo de atomização. O **Capítulo 6** traz uma discussão geral e o **Capítulo 7**, a conclusão geral do desenvolvimento da tese. O **Capítulo 8** apresenta todas as referências bibliográficas utilizadas no desenvolvimento da tese.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BISWAS, N.; SAHOO, R. K. Tapioca starch blended alginate mucoadhesive-floating beads for intragastric delivery of Metoprolol Tartrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 61–70, 2016.
- BROWNLEE, I. A. et al. Alginate as a Source of Dietary Fiber. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 497–510, 2007.
- CHAN, L. W.; LIM, L. T.; HENG, P. W. Microencapsulation of oils using sodium alginate. **Journal of microencapsulation**, v. 17, n. 6, p. 757–766, 2000.
- CHOWDARY, K. P. R.; RAVI SHANKAR, K.; SUBRAHMANYAM, S. V. V. Preparation and evaluation of pregelatinized starch microspheres for controlled release of lornoxicam. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 467–474, 2014.
- COMUNIAN, T. A. et al. Combination of microfluidic devices, ionic gelation and phenolic compounds to improve the oxidative stability of echium oil. **Food Chemistry**, v. 233, p. 125–134, 2017.
- COPELAND, L. et al. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527–1534, 2009.
- CÓRDOBA, A. L.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 315–323, 2013.
- GHAFOOR, K. et al. Nutritional composition, extraction, and utilization of wheat germ oil: A review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 7, p. 1600160- - n/a, 2017.
- GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.
- HAUG, A.; SMIDSRØD, O. The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions: II. Comparison of different metal ions. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 19, p. 341–351, 1965.
- HOSSEINI, S. M. et al. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 573–580, 2014.
- KHOSRAVI ZANJANI, M. A. et al. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition . **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v. 13, n. 3, p. 843–852, fev. 2014.
- MARTINSEN, A.; STORRØ, I.; SKJÅRK-BRAEK, G. Alginate as Immobilization Material: III. Diffusional Properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 186–194, 1992.

- MEGAHAD, O. A.; EL KINAWY, O. S. Studies on the extraction of wheat germ oil by commercial hexane. **Grasas y Aceites**, v. 53, n. 4, p. 414–418, 2002.
- MOURA, S. C. S. R. 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.
- NAYAK, A. K.; PAL, D. Formulation optimization and evaluation of jackfruit seed starch – alginate mucoadhesive beads of metformin HCl. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 264–272, 2013.
- NOGUEIRA, G. F.; PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. F. Alginate and whey protein based-multilayered particles: production, characterisation and resistance to pH, ionic strength and artificial gastric/intestinal fluid. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 2, p. 151–161, 17 fev. 2017.
- OZCAN, M. M. et al. Quality of wheat germ oil obtained by cold pressing and supercritical carbon dioxide extraction. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 3, p. 236–240, 2013.
- PATIL, J. S. et al. Iontropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.
- PAXMAN, J. R. et al. Daily ingestion of alginate reduces energy intake in free-living subjects. **Appetite**, v. 51, p. 713–719, 2008.
- SILVA, K. C. G.; SATO, A. C. K. Biopolymer gels containing fructooligosaccharides. **Food Research International**, v. 101, n. June, p. 88–95, 2017.
- SINGH, J.; DARTOIS, A.; KAUR, L. Starch digestibility in food matrix: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 4, p. 168–180, 2010.
- SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.
- TELLO, F. et al. Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 670–678, 2015.
- THU, B. et al. Alginate polycation microcapsules - I. Interaction between alginate and polycation. **Biomaterials**, v. 17, p. 1031–1040, 1996.
- WAIGH, T. A. et al. Analysis of the Native Structure of Starch Granules with X-ray Microfocus Diffraction. **Macromolecules**, v. 30, n. 13, p. 3813–3820, 1997.
- YAZICIOGLU, B.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Microencapsulation of wheat germ oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3590–3597, 2015.
- ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch - Stärke**, v. 40, n. 2, p. 44–50, 1988.

## CAPÍTULO 2

---

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



## 2.1 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é o processo de enclausurar um sólido, ou um líquido ou um gás dentro de uma camada de revestimento ou dentro de uma matriz. É um processo em que vários ingredientes alimentícios podem ser armazenados dentro de uma partícula microscópica ou recobertos, para proteção e/ou posterior liberação (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014).

As micropartículas são pequenas esferas que normalmente consistem em duas partes: o recheio, que é a parte de dentro, e o material de parede. O recheio representa um ingrediente ativo, enquanto a camada protege o recheio e, na maioria das vezes, é formado de um ou mais polímeros naturais ou sintéticos (URBAS et al., 2017). As micropartículas são classificadas dependendo de como o recheio se posiciona dentro dela, como apresentado na Figura 2.1. A microcápsula de núcleo simples apresenta um só núcleo do material de recheio envolvido por uma camada do material de parede (i). As microesferas são aquelas em que o recheio se distribui em toda a estrutura do tipo matriz ou “esponja” (BAKRY et al., 2016; JAFARI et al., 2008; VASISHT, 2014).

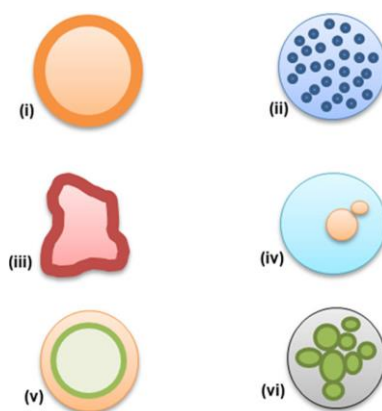


Figura 2.1. Tipos de microcápsulas. (i) microcápsula simples; (ii) matriz (microesfera); (iii) microcápsula irregular; (iv) microcápsula multinucleada; (v) microcápsula com multicamadas; (vi) cápsula multinucleadas. Adaptado de (BAKRY et al., 2016).

A microencapsulação é uma técnica versátil utilizada em diversas indústrias, como a química, farmacêutica e de alimentos. Existem várias razões para se microencapsular um ativo, como por exemplo, para protegê-lo contra a degradação resultante de exposição a fatores ambientais, como oxigênio, altas temperaturas ou à luz. Normalmente, a vida de prateleira de um composto aumenta quando ele é microencapsulado (COMUNIAN et al., 2017a; MOURA et al., 2018). Em alguns casos, a microencapsulação pode ser utilizada para mascarar o sabor, odor ou cor desagradável de um ingrediente (STANGE; FÜHRLING; GIESELER, 2014). Além

disso, pode ser realizada para transformar um ingrediente líquido em um ingrediente sólido (pó) (LEE et al., 2018). Por fim, a microencapsulação é uma técnica de extrema importância na finalidade de controlar a liberação de um ingrediente ou composto ativo através da liberação controlada (BANNIKOVA et al., 2018).

Diversas técnicas são utilizadas na microencapsulação, classificadas em físicas, químicas e físico-químicas. Dentre os métodos físicos, destacam-se o *spray drying*, o *spray chilling* e a extrusão, entre outros. Os métodos físico-químicos mais tradicionais são a coacervação simples e complexa (DESAI; PARK, 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; MADENE et al., 2006). A gelificação iônica é uma técnica envolvendo uma ligação iônica entre um polissacarídeo e um íon de carga oposta e é amplamente utilizada para microencapsulação de compostos hidrofóbicos (AMIRI et al., 2020; HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019; KARIMIRAD; BEHNAMIAN; DEZHSETAN, 2020; SILVA et al., 2019; WISSAM; SAMER, 2019). A escolha de qual método de encapsulação utilizar depende de vários fatores, como o tamanho da microcápsula desejado, a estabilidade do material de recheio, propriedades físicas e químicas dos materiais de recheio e de parede, mecanismos de liberação e a aplicação em que se deseja utilizar as micropartículas (SHAHIDI; HAN, 1993).

## 2.2 GELIFICAÇÃO IÔNICA

A gelificação iônica é uma técnica que vem sendo usada para microencapsulação de compostos ativos (NOGUEIRA; PRATA; GROSSO, 2017; SILVA; SATO, 2017; TELLO et al., 2015). Ela apresenta como vantagem o fato de não ser necessário o uso de solventes orgânicos nem de temperatura ou pH extremos, o que a torna de menor custo, quanto comparada a outras técnicas de microencapsulação (PATIL et al., 2010). Outra vantagem dessa técnica é que as micropartículas insolúveis formadas podem ser incorporadas a produtos com alto teor de umidade, como iogurte, por exemplo, o que não é possível com partículas em pó, que são solúveis em água (BUREY et al., 2008; COMUNIAN et al., 2017a; SILVA et al., 2018).

A gelificação iônica trata da formação de géis devido a ligações formadas entre polissacarídeos e íons de cargas opostas, através de “cross-linking” (BUREY et al., 2008). A formação do gel acontece quando os íons, como por exemplo, de cálcio ou potássio, se difundem para a cadeia do polissacarídeo, resultando em um rearranjo estrutural e produzindo a matriz sólida (FUNAMI et al., 2009).

Existem dois mecanismos de gelificação iônica: a gelificação interna (PONCELET et al., 1992) e a gelificação por difusão ou externa (DRAGET et al., 1998). A gelificação iônica

externa ou por difusão acontece quando se introduz uma solução de biopolímero em uma solução iônica. Por exemplo, para a produção de micropartículas de alginato, goteja-se a solução do biopolímero em uma solução gelificante carregada com cargas opostas. A gelificação começa na superfície da partícula, onde os íons reagem instantaneamente, aprisionando as moléculas de água na rede. Porém, a água ainda está livre, o que permite que os íons de cálcio migrem por difusão para o interior da partícula, favorecendo a reticulação (HELGERUD et al., 2010; SMRDEL et al., 2008). Consequentemente, pode ocorrer uma gelificação não homogênea da partícula, tornando a superfície rígida e o recheio menos reticulado (BUREY et al., 2008).

Diversos estudos foram realizados com a gelificação iônica externa, tanto com microencapsulação de compostos hidrofílicos (MOURA et al., 2018; SILVA; SATO, 2017), como de compostos hidrofóbicos (COMUNIAN et al., 2017b; TELLO et al., 2015). Moura et al. (2018) encapsularam antocianinas de hibisco, utilizando emulsão dupla e gelificação iônica, e observaram que houve alto índice de retenção dos compostos, sem causar degradação, mostrando ser uma técnica viável para estabilização de compostos sensíveis ao calor. Comunian et al. (2017b) produziu partículas de óleo de ecchio por gelificação iônica combinada com a técnica de microfluidica, concluindo que houve proteção oxidativa do óleo estudado. Tello et al. (2015) produziram partículas por gelificação iônica com alginato de sódio e pectina, contendo um óleo modelo e recobriram-as com proteína de clara de ovo e proteína do soro do leite. Os autores observaram que as partículas recobertas foram mais efetivas contra a oxidação lipídica que aquelas sem recobrimento.

A gelificação interna baseia-se na adição de íons à solução de polissacarídeo e o “cross-linking” ocorre quando há mudança de pH e liberação dos íons de cálcio. Um sal de cálcio é adicionado à solução do polímero, sendo que o sal deve ser insolúvel na solução. Depois, é adicionado um ácido orgânico, para redução do pH, permitindo a solubilização dos íons de cálcio, que se complexam com os grupos carboxílicos do polímero. O gel é então formado conforme a penetração do ácido na fase aquosa, liberando os íons de cálcio (HOLKEM et al., 2017; PONCELET et al., 1992).

Alguns estudos foram feitos utilizando-se os dois diferentes métodos de gelificação. Lupo et al. (2015) encapsularam extrato de cacau por gelificação interna e externa. Eles observaram que a gelificação externa produziu cápsulas menores, devido ao efeito da sinérese, ou seja, a perda de água, e o aumento da concentração do cálcio também resultou na diminuição do tamanho da partícula. Assim, as cápsulas formadas pela gelificação externa apresentaram-

se mais duras que aquelas formadas pela interna, devido à rigidez da parede formada, já que o cálcio migra do exterior para o interior das cápsulas.

### **2.3 GELIFICAÇÃO IÔNICA COM ALGINATO DE SÓDIO E AMIDO**

Com o objetivo de modificar a matriz de alginato, aumentar a retenção do composto ativo encapsulado e melhorar a estabilidade das partículas produzidas, diversas pesquisas são realizadas combinando-se alginato de sódio com outros polissacarídeos. Muitos deles utilizaram amido, de diversas fontes, gelatinizado ou nativo (BISWAS; SAHOO, 2016; CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013; ETCHEPARE et al., 2016; ODEKU et al., 2017). A Tabela 2.1 apresenta trabalhos realizados utilizando alginato de sódio e diferentes tipos de amido, para encapsular diversos compostos.

Tabela 2.1. Encapsulação de compostos utilizando alginato de sódio e diferentes tipos de amido, pelo método de gelificação iônica.

Tipo de Amido	Composto ativo	EE	Liberação	Referência
Hi-maize não gelatinizado (2%)	Nisina	EE aumentou de 50,46% sem amido para 55,30% com amido	As taxas de liberação foram menores para partículas com amido	(HOSSEINI et al., 2014)
Amido de mandioca gelatinizado (0, 10, 20, 30, 50%)	Metronidazol	EE aumentou de 30,22% (sem amido) para 54,17% (com 50% de amido); 60,37% (com 30%);	Liberação entérica foi mais rápida em partículas com maiores quantidades de amido	(ODEKU et al., 2017)
Amido de milho não gelatinizado (0,1; 0,5; 1; 2; 5 e 10%)	Antioxidantes de erva mate	Adição de 2% de amido aumentou EE de 55% 65%	2% de amido diminuiu a erosão das partículas.	(CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013)
Amido de semente de jaca não gelatinizado	Cloridrato de metformina	Aumento da quantidade de amido influenciou positivamente na EE	Em pH 7,4, a liberação do medicamento diminuiu com o aumento da quantidade de amido.	(NAYAK; PAL, 2013)
Amido de araruta gelatinizado e não gelatinizado (0,25; 0,5 e 1%)	Diclofenaco de sódio	EE aumentou com os dois amidos. Aumento maior com amido gelatinizado	Em pH 6,8, partícula com amido gelatinizado teve liberação mais lenta	(KHLIBSUWAN; TANSENA; PONGJANYAKUL, 2018)
Amido de milho com alto teor de amilose (2,0%)	Caféina	Com adição de amido, EE aumentou de 71,2% para 78,86%	A liberação em condições bucais foi mais lenta com a adição de amido	(MOHAMMADI; EHSANI; BAKHODA, 2018)
Amido de frutapão gelatinizado com diferentes proporções de alginato:amido	Teofilina	EE de encapsulação aumentou para todas as formulações com adição de amido	Adição de amido retardou a liberação em condições gastro-intestinais	(OKUNLOLA; ADEWUSI, 2019)

Para produção de partículas de alginato de sódio, autores adicionaram diversos tipos de amido na formulação das partículas. Nayak e Pal (2013) utilizaram amido de semente de jaca para a microencapsulação de cloridrato de metformina e observaram que o aumento da quantidade de amido influencia positivamente na eficiência de encapsulação. Os autores explicaram que, com o aumento do teor de amido, a viscosidade da solução para a formação das partículas aumenta e impede que o medicamento se difunda para a solução gelificante. A

concentração da solução gelificante de cloreto de cálcio também foi determinante para a eficiência de encapsulação, já que com baixas concentrações, o “cross-linking” pode ter sido insuficiente, permitindo a presença de poros maiores nas partículas, por onde o medicamento pode ter difundido. As partículas tiveram seus tamanhos aumentados com a adição de amido, pois com a diminuição de alginato, o número de ânions para o “cross-linking” foi reduzido, diminuindo a compactação da partícula. O tamanho aumentou também com o aumento da concentração de  $\text{CaCl}_2$ , devido ao inchamento do gel pelo alto grau de “cross-linking”. Até 2 horas após o início do experimento de liberação, em pH 1,2, característico do estômago, a quantidade de cloridrato de metformina liberada das partículas foi menor que 15%. Uma pequena quantidade é liberada devido às moléculas do medicamento que estão aderidas na superfície da partícula. Após 10 horas de experimentos (em pH 7,4 por 8 horas), a liberação do medicamento diminui com o aumento da quantidade de amido. O amido possui propriedades hidrofílicas, ligando-se à água para formar estrutura de gel viscosa, que bloqueia os poros na superfície das cápsulas e mantém o medicamento dentro da matriz da partícula.

Hosseini et al. (2014) produziram partículas contendo nisina utilizando amido com alto teor de amilose e alginato de sódio. A adição do amido aumentou a eficiência de encapsulação, pois o amido apresentou efeito de estabilização da matriz do alginato. O tamanho das partículas também foi influenciado com a adição de amido, devido ao aumento da viscosidade, que gera gotas maiores, e conseqüentemente, partículas maiores. A liberação de nisina apresentou dois estágios. No primeiro estágio, a liberação foi rápida, pois correspondeu à nisina que estava na superfície das partículas. No segundo estágio, a liberação foi gradual, pois foi atribuída à degradação do polímero ou difusão da nisina de dentro para fora das partículas. Partículas com maiores quantidades de nisina apresentaram quantidade de liberação menor, enquanto partículas com menores quantidades, apresentaram maior liberação fracionada. Partículas menores (com menores quantidades de nisina) liberam o medicamento mais rapidamente, pois a difusão é mais fácil. Partículas maiores começam a liberar a nisina quando a matriz polimérica degrada. As taxas de liberação foram menores para partículas com amido resistente, pois sua presença na matriz de alginato retarda a liberação.

Córdoba, Deladino e Martino (2013) utilizaram amido de milho combinado com alginato de sódio na gelificação iônica para microencapsular antioxidantes extraídos de erva mate. Foram utilizadas quantidades de 0,1; 0,5; 1, 2, 5 e 10 g de amido para cada 100 g de solução da mistura de alginato de sódio e antioxidantes. Foi observado que a eficiência de encapsulação aumentou de 55% referente às partículas sem amido de milho para 65% quando se acrescentou 2g de amido de milho. As partículas produzidas com 0,1 e 0,5 g de amido não

tiveram melhora na EE em relação às partículas sem amido. Acima de 2 g de amido, não houve diferença significativa na EE. Foi realizada análise de cinética de liberação controlada e os dados experimentais foram ajustados aos modelos de Ritger e de Peppas. Através desses ajustes, foi possível concluir que a difusão foi o mecanismo principal responsável pela liberação dos polifenóis nas partículas que continham amido, enquanto o mecanismo de erosão apresentou-se quase desprezível. Isso pode ser explicado devido aos grânulos de amido que fortalecem a matriz do alginato e evitam sua erosão.

Em um estudo para produzir partículas carregadas com metronidazol, foram utilizadas soluções de 0, 10, 20, 30 e 50% de amido de mandioca gelatinizado misturados com solução de alginato de sódio 2%, de modo que a concentração total de polímero fosse 2% e que a proporção entre polímeros:composto fosse de 2:1. Foi observado que as partículas referentes à solução de 30% de amido apresentaram eficiência de encapsulação (EE) aumentada para 60,37%, em relação àquelas sem amido, que possuíam EE de 30,22%. Entretanto, as partículas com 50% apresentaram EE de 54,17%, provavelmente porque houve saturação de retenção do fármaco, já que a matriz alginato-amido tornou-se mais porosa. Em relação à liberação entérica, as partículas com amido apresentaram liberação mais rápida do que aquelas apenas com alginato (ODEKU et al., 2017).

Em um estudo, amido de araruta gelatinizado e não gelatinizado foram adicionados em partículas de alginato de sódio para microencapsulação de diclofenaco de sódio. Houve aumento da eficiência de encapsulação nas partículas produzidas com o amido nas duas formas, nas diferentes concentrações utilizadas (0,25; 0,5 e 1,0%), indicando que a presença de amido gerou uma matriz mais densa que impediu a perda de água durante o processo de produção das partículas. Porém, as partículas produzidas com amido de araruta gelatinizado apresentaram maior quantidade da droga, devido às cadeias linear da amilose e ramificada da amilopectina que estão lixiviadas após a gelatinização e interagiram com as cadeias de alginato antes da reticulação, formando uma rede mais forte do que a produzida com amido não gelatinizado. A adição de 1% de amido nas duas diferentes formas diminuiu a liberação da droga em ambiente ácido, embora as partículas com amido não gelatinizado apresentaram menor liberação que aquelas produzidas com amido gelatinizado. Após a mudança de pH ácido para pH 6,8, as partículas com amido gelatinizado apresentaram liberação mais lenta que as partículas apenas com alginato e com amido não gelatinizado, devido a interações moleculares entre o alginato e o amido gelatinizado que fortaleceram a matriz (KHLIBSUWAN; TANSENA; PONGJANYAKUL, 2018).

Cafeína foi microencapsulada em matriz de alginato de sódio combinado com diversos materiais separadamente (amido de milho com alto teor de amilose, proteína de leite, xantana e recobrimento de quitosana). A adição de 2% de amido ao alginato de sódio aumentou a eficiência de encapsulação de 71,2% para 78,86%. Os resultados apresentaram que a liberação da cafeína em condições bucais tornou-se mais lenta com a presença de amido, quando comparada com a formulação obtida apenas com alginato (MOHAMMADI; EHSANI; BAKHODA, 2018).

Okunlola e Adewusi (2019) produziram partículas contendo teofilina por gelificação iônica com razões de alginato e de amido de fruta-pão gelatinizado, com recobrimento com quitosana. Independente da proporção de amido utilizada, houve aumento da eficiência de encapsulação e retenção do composto, quando comparado à formulação apenas com alginato. O comportamento da liberação de teofilina durante 8 horas em condições gastrointestinais foram dependentes da quantidade de amido utilizado e da proporção entre polímeros e a droga, mas de um modo geral, a presença do amido contribuiu para atrasar a liberação do composto, devido à estrutura da matriz que se tornou menos porosa e diminuiu a difusão da droga encapsulada.

## 2.4 EMULSÕES

As emulsões são formadas por dois líquidos imiscíveis, em que um deles está disperso em outro na forma de gotas. A fase dispersa é a substância que forma as gotas e a fase contínua é a substância que compõe o meio. Um sistema que possui gotas de óleo dispersas em água é chamado de emulsão óleo em água (O/A) e aquele que possui gotas de água dispersas em óleo é chamado emulsão água em óleo (A/O). Exemplos de emulsões óleo em água são maionese, sopas e molhos e de água em óleo são manteiga e margarina (GUZEY; MCCLEMENTS, 2006; MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). As emulsões são classificadas conforme o diâmetro das gotas. Existem as nanoemulsões, com 10-100 nm, as microemulsões, com 100-1000 nm e as macroemulsões, com 0,5-100  $\mu\text{m}$  (WINDHAB et al., 2005).

Com o passar do tempo, há uma tendência natural de separação das fases numa emulsão, devido à diminuição da área de contato interfacial. Para aumentar a estabilidade cinética das emulsões, são utilizadas substâncias chamadas surfactantes e/ou estabilizantes (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). Os surfactantes são adsorvidos na superfície das gotas e formam uma camada protetora, reduzindo a tensão interfacial (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). Eles podem ser divididos em dois grupos, de acordo com sua massa



molecular. Existem os de baixa massa molecular, como por exemplo, os monoglicérides, polissorbatos e a lecitina e os compostos macromoleculares, que usualmente são proteínas, como do leite, do ovo e da soja (DICKINSON, 2003).

Outra maneira de se aumentar a estabilidade de emulsões é alterando-se sua fase contínua, como por exemplo, aumentando sua viscosidade, que diminui ou impede o movimento das gotas. Para isso, são utilizadas substâncias chamadas estabilizantes (GUZEY; MCCLEMENTS, 2006). Alguns polissacarídeos são utilizados como estabilizantes, como alginato, gomas carragena, xantana e gelana (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007).

A solução de alginato de sódio é utilizada como fase contínua, muitas vezes na tentativa de aumentar a estabilidade das emulsões (ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017; GU; DECKER; MCCLEMENTS, 2004). Soluções de amido gelatinizado também vem sendo estudadas como um meio de alterar as propriedades físico-químicas das emulsões e melhorar sua estabilidade (VILLAMONTE; JURY; DE LAMBALLERIE, 2016).

## 2.5 ALGINATO DE SÓDIO

O alginato é um polissacarídeo aniônico natural composto do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G) e do ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) (SARKER et al., 2015). Os dois ácidos são unidos linearmente por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. O alginato possui em sua cadeia regiões homopoliméricas de ácido D-manurônico (MM) e ácido L-gulurônico (GG), que são intercaladas com regiões heteropoliméricas de M e G (MG). Suas cadeias são apresentadas na Figura 2.2 (GOH; HENG; CHAN, 2012). A razão entre os monômeros M e G do alginato e sua sequência variam de acordo com a sua origem e influenciam nas propriedades químicas e físicas (SARKER et al., 2015). A distribuição de cargas negativas ao longo da estrutura do alginato, quando este se encontra em solução aquosa, é devido ao arranjo sequencial dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico presentes (ANNAN; BORZA; HANSEN, 2008).

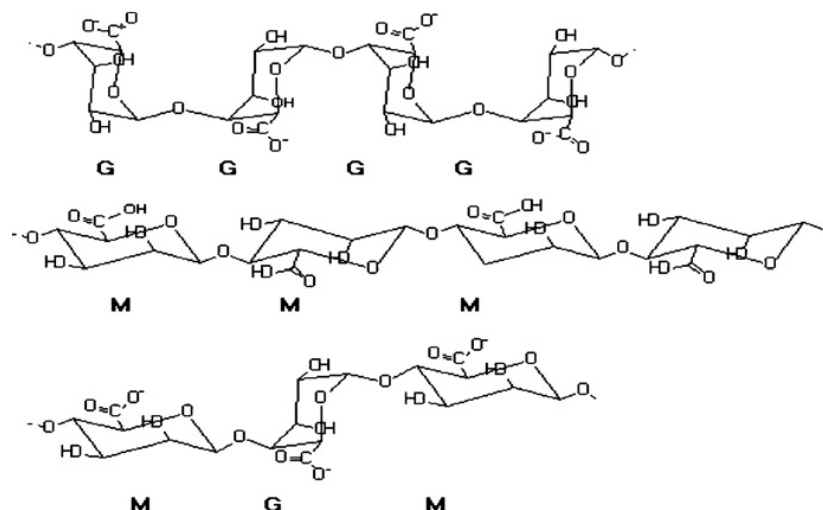


Figura 2.2. Componentes do alginato: G-G, M-M e blocos M-G (GOH; HENG; CHAN, 2012).

O alginato de sódio rico em ácido gulurônico é mais solúvel em água do que aquele rico em ácido manurônico. A viscosidade da solução de alginato de sódio é fortemente relacionada à concentração e ao número de unidades monoméricas nos segmentos de alginato. Em concentrações similares, alginato com segmentos longos apresentam altas viscosidades. A viscosidade da solução de alginato pode ser afetada pela massa molecular dos segmentos poliméricos constituintes do alginato (GOH; HENG; CHAN, 2012).

O alginato apresenta-se como um agente encapsulante muito utilizado, devido a sua propriedade de gelificação na presença de cálcio ou de outro íon bivalente ou trivalente. Quando o alginato de sódio é gotejado em uma solução de cloreto de cálcio, são formados géis esféricos rígidos de alginato de cálcio. A gelificação do alginato ocorre pela troca dos íons sódio dos ácidos gulurônicos pelos cátions bivalentes da solução gelificante, ocasionando a junção entre as cadeias e a formação de uma rede tridimensional (HU; AZADI; ARDEKANI, 2015). Os géis de alginato de cálcio são muito utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia, pois não apresentam toxicidade e serem formados com facilidade (LEE; MOONEY, 2012).

O gel de alginato é formado por um mecanismo de interação de segmentos G (ácido gulurônico) do alginato com os íons de cálcio. Esse mecanismo é explicado pelo modelo “caixa de ovos”. Os blocos G do alginato se alinham, formando uma cavidade, onde os cátions divalentes de cálcio se ligam, formando uma rede tridimensional. A estrutura formada é semelhante a uma caixa de ovos, em que os ovos representam os cátions de  $\text{Ca}^{2+}$  (GRANT et al., 1973). A estrutura do gel de alginato é apresentada na Figura 2.3 (ONSOYEN, 1997).

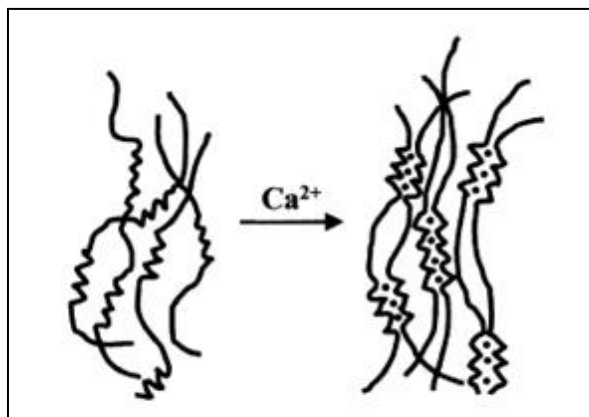


Figura 2.3. Estrutura do modelo “caixa de ovos” de um gel de alginato formado com íons  $\text{Ca}^{2+}$  (ONSOYEN, 1997).

Os géis de alginato apresentam estabilidade térmica, o que permite que sejam submetidos a tratamentos térmicos (inclusive cozimento e esterilização) sem serem alteradas sua forma e características reológicas. Essa característica dos géis de alginato também possibilita que eles sejam armazenados à temperatura ambiente (ONSOYEN, 1997).

Puguan, Yu e Kim (2014) estudaram as propriedades físico-químicas e a difusão da vitamina  $\text{B}_{12}$  nas cápsulas de alginato de cálcio. Para a gelificação externa, foi observado que a formação do gel não foi um fenômeno instantâneo e que o processo para o alcance da maturação leva cerca de 15 horas. A concentração de cálcio, a força iônica e o pH determinaram a cinética da formação do gel e o volume e estabilidade das cápsulas. As cápsulas produzidas pela gelificação interna apresentaram-se mais uniformes e com estrutura do gel menos rígida, além de tamanho de poros maiores, o que favoreceu a difusão da vitamina  $\text{B}_{12}$ . Os autores concluíram que as partículas produzidas por ambos os métodos possuem a habilidade de controle de transferência de massa.

## 2.6 AMIDO

Diversos tipos de amido são utilizados como material de parede para diferentes técnicas de microencapsulação, como spray drying e gelificação iônica (BLEMUR et al., 2016; CHAN et al., 2011; ETCHEPARE et al., 2016). Em muitos estudos, o amido se mostrou como um aditivo que fortaleceu a matriz de alginato em cápsulas produzidas por gelificação iônica. Os grânulos de amido se apresentaram como uma espécie de barreira, ocupando espaços intersticiais dos poros da matriz de alginato, o que diminuiu a liberação do composto ativo nesse tipo de partícula (BISWAS; SAHOO, 2016; CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013; HOSSEINI et al., 2014; NAYAK; PAL, 2013).

O amido é o carboidrato mais comum produzido pelas plantas, está em forma de grânulos que existem naturalmente dentro das células e é a maior fonte de carboidratos na alimentação humana (SINGH; DARTOIS; KAUR, 2010; SINGH et al., 2003). Ele é o carboidrato de reserva de muitas plantas e é depositado como grânulo insolúvel e semicristalino em tecidos de reserva como grãos, tubérculos e raízes e seu tamanho e forma dependem da espécie e da maturidade da planta (COPELAND et al., 2009; MANNERS, 1989).

O grânulo de amido é semicristalino, com variações nos níveis de cristalinidade, por possuir uma região amorfa e uma cristalina (SINGH et al., 2003; WAIGH et al., 1997). A amilopectina é responsável pela cristalinidade do grânulo do amido, enquanto a região amorfa representa principalmente a amilose (ZOBEL, 1988). A maior porção presente no grânulo de amido é de amilopectina, que corresponde à cerca de 70% a 80% do grânulo (MANNERS, 1989).

A amilose apresenta cadeia linear longa, com unidades de D-glicose e em torno de 99% das ligações do tipo  $\alpha$ -(1→4) (SINGH; DARTOIS; KAUR, 2010; SINGH et al., 2003; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). A amilose tem um peso molecular entre  $10^5$  Da e  $10^6$  Da, correspondendo ao grau de polimerização (DP) de 1000 a 10000 unidades de glicose. Menos que 0,5% da glicose na amilose são de ligações  $\alpha$ -(1→6), resultando no baixo grau de ramificação, e a estrutura possui de 3 a 11 cadeias e aproximadamente 200-700 resíduos de glicose por molécula. Devido ao baixo grau de ramificação, a amilose dissolvida tem tendência a formar agregados insolúveis semicristalinos, dependendo da localização da ramificação na estrutura (COPELAND et al., 2009).

A amilopectina é um polímero maior que a amilose, com peso molecular aproximado de  $10^7$  Da a  $10^9$  Da (MUA; JACKSON, 1997) e grau de polimerização (DP) na faixa de 9600 e 15900 (TAKEDA; SHIBAHARA; HANASHIRO, 2003). A amilopectina possui um dos maiores pesos moleculares conhecidos entre os polímeros naturais (KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000). Muitos grânulos de amido possuem de 60% a 90% de amilopectina, embora existam amidos cerosos, que contém 100% de amilopectina. A amilopectina tem aproximadamente 5% de sua glicose em ligações  $\alpha$ -(1→6), e em torno de 95% de ligações  $\alpha$ -(1→4) (BULÉON et al., 1988; TESTER; KARKALAS; QI, 2004), dando-lhe alto nível de ramificação, e arranjo molecular complexo que pode variar dependendo da localização e do comprimento das ramificações. Os ramos de amilopectina são classificados de acordo com o padrão de substituição: cadeias A são definidas como insubstituíveis, cadeias B são substituídas por outras cadeias e cadeias C carregam a glicose resultante (COPELAND et al., 2009). As estruturas da amilopectina e da amilose são apresentadas na Figura 2.4 (TESTER;

KARKALAS; QI, 2004).

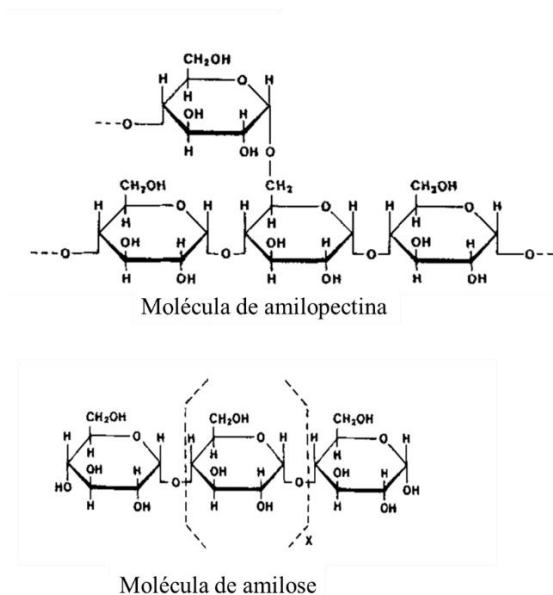


Figura 2.4. Estruturas da amilose e amilopectina (ZOBEL, 1988).

### 2.6.1 Gelatinização do amido

A gelatinização do amido é causada pela ruptura da estrutura granular, gerando moléculas que se dissolvem em água (ZOBEL, 1988). Segundo Copeland et al. (2009), a gelatinização ocorre quando o amido é aquecido na presença suficiente de umidade. Os grânulos absorvem água e incham, rompendo a organização cristalina irreversivelmente. Segundo Jenkins e Donald (1998), a água primeiramente entra nos anéis de crescimento amorfos e em certo grau de inchaço, a tensão é transmitida através das moléculas conectadas da região amorfa para a região cristalina. As moléculas de amilose começam a lixiviar dos grânulos de amido, à medida que são rompidos sob cisalhamento, e a viscosidade aumenta ao máximo. Nesse ponto da gelatinização, ainda existem muitos grânulos inchados, mas ainda não rompidos. Então, conforme a maioria dos grânulos são rompidos, ocorre um decréscimo na viscosidade da pasta, e as moléculas de amido são dispersas na fase aquosa (COPELAND et al., 2009). A taxa e extensão do inchaço e quebra são dependentes do tipo e da quantidade de amido, do gradiente de temperatura, da força de cisalhamento e da composição da mistura, como por exemplo, a presença de lipídios e proteínas (DEBET; GIDLEY, 2007).

A gelatinização começa no “hilum” do grânulo e dilata-se rapidamente para a periferia. Ela ocorre inicialmente na região amorfa, porque nessas áreas as ligações de hidrogênio estão enfraquecidas, diferentemente das regiões cristalinas (SINGH et al., 2003). A temperatura de gelatinização de muitos amidos está entre 60 °C e 80 °C. Em geral, há uma

relação negativa entre o conteúdo de amilose do amido e a temperatura de gelatinização e o pico de viscosidade (COPELAND et al., 2009).

As temperaturas de gelatinização e entalpias associadas com a gelatinização endotérmica estão relacionadas ao grau de perfeição cristalina, que é variável entre as diferentes espécies de amido (SINGH et al., 2003). A estrutura molecular da amilopectina e a razão entre material cristalino e amorfo controlam a gelatinização e as propriedades de inchaço. A temperatura de pico ( $T_p$ ) indica a medida da qualidade cristalina (comprimento de dupla hélice). A entalpia de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ) é indicador da perda da ordem molecular dentro do grânulo (TESTER; MORRISON, 1990). As moléculas ramificadas de amilopectina formam duplas hélices que se agrupam em domínios cristalinos. Assim, quanto maior o teor de amilopectina no grânulo, maior sua cristalinidade, o que explica a sugestão de Singh et al. (2003) em calcular os valores de  $\Delta H_{gel}$  em base de amilopectina.

## 2.7 ÓLEO DE GÉRMEN DE TRIGO

O gérmen de trigo, um subproduto da moagem do trigo, é um produto rico em nutrientes, contendo cerca de 10-15% de lipídeos, 26-35% de proteínas, 17% de açúcares, 1,5-4,5% de fibras, 4% de minerais e vários compostos bioativos, como tocoferóis, fitoesteróis, carotenóides, fenólicos, folatos, tiamina e riboflavina (BRANDOLINI; HIDALGO, 2012).

O óleo de germen de trigo bruto geralmente tem a cor escura e, dependendo de suas condições oxidativas, pode ter forte odor e sabor (WANG; JOHNSON, 2001). Durante o refino do óleo, para eliminação de compostos indesejáveis e produção de um óleo com alta qualidade e estabilidade, procura-se retirar o mínimo de nutrientes e tocoferóis possível, mas normalmente há uma perda (BRANDOLINI; HIDALGO, 2012).

A composição de ácidos graxos do óleo de gérmen de trigo pode variar dependendo da variedade do trigo, das características do gérmen, como rancidez, maturidade e qualidade, e das condições dos métodos de separação, extração e estocagem. O óleo de gérmen de trigo é rico em ácidos graxos polinsaturados, que constituem cerca de 80% dos triglicerídeos. O ácido graxo mais abundante é o ácido linoleico (18:2), que representa em média de 42 a 59 % do total de triglicerídeos, seguido do ácido palmítico (16:0) e do ácido oleico (18:1). O ácido esteárico, que é um ácido graxo saturado, representa menos de 2% dos triglicerídeos (GHAFOOR et al., 2017). Os principais ácidos graxos que compõem o óleo de gérmen de trigo são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 1.2. Porcentagem de cada ácido graxo presente no óleo de gérmen de trigo. Adaptado de (GHAFOOR et al., 2017).

<b>Ácido graxo</b>	<b>% do total de ácidos graxos (%)</b>
Ácido linoleico (18:2)	49-60
Ácido oleico (18:1)	14-25
Ácido palmítico (16:0)	11-17
Ácido linolênico (18:3)	4-10
Ácido esteárico (18:0)	0,6-3,6

O óleo de gérmen de trigo é conhecido como o óleo com maior quantidade de tocoferóis (vitamina E), quando comparado a outros óleos vegetais, podendo alcançar 2500 mg/Kg de óleo, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o mais abundante (cerca de 60%) (MEGAHAD; EL KINAWY, 2002; OZCAN et al., 2013). Os tocoferóis são compostos por um núcleo de cromanol e uma cadeia lateral saturada de 16 carbonos. Existem diferentes formas de tocoferóis,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , dependendo do número e da localização do grupo metil no núcleo de cromanol (GHAFOOR et al., 2017).

A quantidade de fitoesteróis no óleo de gérmen de trigo também se apresenta maior do que outros óleos comerciais, principalmente sitoesterol e campesterol (EISENMENGER; DUNFORD, 2008). Além disso, o óleo de gérmen de trigo é fonte de outras vitaminas e minerais, como vitaminas A, B1, B3, B5 e B6, ácido fólico, riboflavina, tiamina, magnésio, ferro e zinco (GHAFOOR et al., 2017).

O consumo de ácidos graxos presentes no óleo de gérmen de trigo é considerado importante para a saúde humana, já que não são sintetizados pelo organismo. Eles ajudam na síntese de grupos de hormônios chamados prostaglandinas, que são importantes para as contrações musculares e nas propriedades anti-inflamatórias (OZCAN et al., 2013). O óleo de gérmen de trigo, devido aos seus compostos bioativos, como tocoferóis e carotenoides, está associado a diferentes benefícios nutricionais e de saúde, como a redução dos níveis de colesterol e gordura no fígado, a melhora da resistência física, a prevenção de doenças e o adiamento dos efeitos do envelhecimento (BRANDOLINI; HIDALGO, 2012; GHAFOOR et al., 2017).

O alto teor de ácidos graxos polinsaturados torna o óleo de gérmen de trigo susceptível à oxidação e antioxidantes são utilizados para evitar o problema. Porém, o uso desses compostos pode alterar a cor, textura e sabor do produto (YAZICIOGLU; SAHIN; SUMNU, 2015). Além disso, quando adicionado em alimentos na sua forma livre, o óleo de gérmen de trigo, além de oxidar, pode alterar as propriedades originais do alimento, como cor,

odor e sabor.

Para evitar a oxidação do óleo de gérmen de trigo, alguns autores estudaram sua microencapsulação. Yaziciogly, Sahin e Sumnu (2015) utilizaram a técnica de emulsificação e secagem por liofilização, utilizando como materiais de parede maltodextrina e concentrado proteico de soro (WPC), em diferentes proporções (3:1, 2:2, 1:3). Foi observado que aumentando a quantidade de WPC em relação à maltodextrina, foram obtidos melhores resultados quanto à eficiência de encapsulação e partículas com menores diâmetros. Não foram realizados estudos quanto à oxidação do óleo de gérmen de trigo livre e encapsulado.

Um estudo foi realizado para encapsular óleo de gérmen de trigo por emulsificação, utilizando alginato de sódio e amido Encapsul 855 (mistura de dextrina de mandioca e dextrina de milho) e a máxima eficiência de encapsulação obtida foi de 88%. Observou-se que a eficiência de encapsulação aumentou conforme o aumento da concentração de óleo na preparação da emulsão. Nesse estudo, os autores não realizaram análise de oxidação do óleo de gérmen de trigo (CHAN; LIM; HENG, 2000).



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AMIRI, A. et al. Fabrication of cumin loaded-chitosan particles: Characterized by molecular, morphological, thermal, antioxidant and anticancer properties as well as its utilization in food system. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125821, 2020.
- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 184–193, 2008.
- ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 191–200, 2017.
- BAKRY, A. M. et al. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 2016.
- BANNIKOVA, A. et al. Microencapsulation of fish oil with alginate : *In vitro* evaluation and controlled release. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. July 2017, p. 310–315, 2018.
- BISWAS, N.; SAHOO, R. K. Tapioca starch blended alginate mucoadhesive-floating beads for intragastric delivery of Metoprolol Tartrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 61–70, 2016.
- BLEMUR, L. et al. Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 344–353, 2016.
- BRANDOLINI, A.; HIDALGO, A. Wheat germ: not only a by-product. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. sup1, p. 71–74, 1 mar. 2012.
- BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85–112, 1988.
- BUREY, P. et al. Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 361–377, 2008.
- CHAN, E. S. et al. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 225–232, 2011.
- CHAN, L. W.; LIM, L. T.; HENG, P. W. Microencapsulation of oils using sodium alginate. **Journal of microencapsulation**, v. 17, n. 6, p. 757–766, 2000.
- COMUNIAN, T. A. et al. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. **Food Chemistry**, v. 237, p. 948–956, 2017a.

- COMUNIAN, T. A. et al. Combination of microfluidic devices, ionic gelation and phenolic compounds to improve the oxidative stability of echium oil. **Food Chemistry**, v. 233, p. 125–134, 2017b.
- COPELAND, L. et al. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527–1534, 2009.
- CÓRDOBA, A. L.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 315–323, 2013.
- DEBET, M. R.; GIDLEY, M. J. Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4752–4760, 2007.
- DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, 2005.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25–39, 2003.
- DRAGET, K. I. et al. Na- and K-alginate; effect on Ca<sup>2+</sup>-gelation. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, n. 1–2, p. 1–6, 1998.
- EISENMENGER, M.; DUNFORD, N. T. Bioactive Components of Commercial and Supercritical Carbon Dioxide Processed Wheat Germ Oil. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 85, n. 1, p. 55–61, 2008.
- ETCHEPARE, M. DE A. et al. Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 321–329, 2016.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103–112, 2008.
- FUNAMI, T. et al. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1746–1755, 2009.
- GHAFOOR, K. et al. Nutritional composition, extraction, and utilization of wheat germ oil: A review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 7, p. 1600160, 2017.
- GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 1–12, 2012.
- GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.

- GU, Y. S.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of pH and iota-carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of beta-lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 3626–3632, 2004.
- GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 128–130, n. 2006, p. 227–248, 2006.
- HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 275, p. 113–122, 2019.
- HELGERUD, T. et al. Alginates. In: IMESON, A. (Ed.). . **Food stabilisers, thickeners and gelling agents**. New Jersey: Blackwell Publishing Ltd, 2010. p. 50–72.
- HOLKEM, A. T. et al. Production of microcapsules containing *Bifidobacterium BB-12* by emulsification/internal gelation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 216–221, 2017.
- HOSSEINI, S. M. et al. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 573–580, 2014.
- HU, Y.; AZADI, G.; ARDEKANI, A. M. Microfluidic fabrication of shape-tunable alginate microgels: Effect of size and impact velocity. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 38–45, 2015.
- JAFARI, S. M. et al. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816–835, 2008.
- JENKINS, P. J.; DONALD, A. M. Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. **Carbohydrate Research**, v. 308, n. 1, p. 133–147, 1998.
- KARIM, A. A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 9–36, 2000.
- KARIMIRAD, R.; BEHNAMIAN, M.; DEZHSETAN, S. Bitter orange oil incorporated into chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and their potential application on antioxidant and antimicrobial characteristics of white button mushroom. **Food Hydrocolloids**, v. 100, p. 105387, 2020.
- KHLIBSUWAN, R.; TANSENA, W.; PONGJANYAKUL, T. Modification of alginate beads using gelatinized and ungelatinized arrowroot (*Tacca leontopetaloides L. Kuntze*) starch for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 683–692, 2018.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate : properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

- LEE, W. J. et al. Microencapsulation of red palm oil as an oil-in-water emulsion with supercritical carbon dioxide solution-enhanced dispersion. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 100–109, 2018.
- LUPO, B. et al. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 25–34, 2015.
- MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1–21, 2006.
- MANNERS, D. J. Recent development in our understanding of amylopectin structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 11, p. 87–112, 1989.
- MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, 2007.
- MEGAHAD, O. A.; EL KINAWY, O. S. Studies on the extraction of wheat germ oil by commercial hexane. **Grasas y Aceites**, v. 53, n. 4, p. 414–418, 2002.
- MOHAMMADI, N.; EHSANI, M. R.; BAKHODA, H. Development of caffeine-encapsulated alginate-based matrix combined with different natural biopolymers, and evaluation of release in simulated mouth conditions. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 33, n. March, p. 357–366, 2018.
- MOURA, S. C. S. R. 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.
- MUA, J. P.; JACKSON, D. S. Fine structure of corn amylose and amylopectin fractions with various molecular weights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 3840–3847, 1997.
- NAYAK, A. K.; PAL, D. Formulation optimization and evaluation of jackfruit seed starch – alginate mucoadhesive beads of metformin HCl. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 264–272, 2013.
- NOGUEIRA, G. F.; PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. F. Alginate and whey protein based-multilayered particles: production, characterisation and resistance to pH, ionic strength and artificial gastric/intestinal fluid. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 2, p. 151–161, 17 fev. 2017.
- ODEKU, O. A. et al. Formulation of floating metronidazole microspheres using cassava starch (*Manihot esculenta*) as polymer. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 47, n. 5, p. 445–451, 2017.
- OKUNLOLA, A.; ADEWUSI, S. A. Development of Theophylline Microbeads Using Pregelatinized Breadfruit Starch (*Artocarpus altilis*) as a Novel Co-polymer for Controlled Release. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 1, p. 93–101, 2019.
- ONSOYEN, E. Alginates. In: IMESON, A. (Ed.). **Thickening and gelling agents for food**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 22–44.

- OZCAN, M. M. et al. Quality of wheat germ oil obtained by cold pressing and supercritical carbon dioxide extraction. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 3, p. 236–240, 2013.
- PATIL, J. S. et al. Iontropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.
- PONCELET, D. et al. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 39–45, 1992.
- PUGUAN, J. M. C.; YU, X.; KIM, H. Characterization of structure, physico-chemical properties and diffusion behavior of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 432, p. 109–116, 2014.
- SARKER, B. et al. Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 72–78, 2015.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1 jan. 1993.
- SILVA, K. C. G. et al. Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, n. November 2017, p. 503–509, 2018.
- SILVA, K. C. G.; SATO, A. C. K. Biopolymer gels containing fructooligosaccharides. **Food Research International**, v. 101, n. June, p. 88–95, 2017.
- SILVA, K. F. C. E et al. Sacha inchi oil encapsulation: Emulsion and alginate beads characterization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 116, p. 118–129, 2019.
- SINGH, J.; DARTOIS, A.; KAUR, L. Starch digestibility in food matrix: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 4, p. 168–180, 2010.
- SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.
- SMRDEL, P. et al. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 2, p. 90–105, 2008.
- SOBEL, R.; VERSIC, R.; GAONKAR, A. G. Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. In: GAONKAR, A. et al. (Eds.). **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 3–12.
- STANGE, U.; FÜHRLING, C.; GIESELER, H. Taste masking of naproxen sodium granules by fluid-bed coating. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 2, p. 137–147, 1 mar. 2014.
- TAKEDA, Y.; SHIBAHARA, S.; HANASHIRO, I. Examination of the structure of amylopectin molecules by fluorescent labeling. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 5, p. 471–475, 2003.

- TELLO, F. et al. Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 670–678, 2015.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.
- TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 551–557, 1990.
- URBAS, R. et al. Microcapsules application in graphic arts industry: a review on the state-of-the-art. **Iranian Polymer Journal**, v. 26, n. 7, p. 541–561, 2017.
- VASISHT, N. Factors and Mechanisms in Microencapsulation. In: GAONKAR, A. et al. (Eds.). **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 15–24.
- VILLAMONTE, G.; JURY, V.; DE LAMBALLERIE, M. Stabilizing emulsions using high-pressure-treated corn starch. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 581–589, 2016.
- WAIGH, T. A. et al. Analysis of the Native Structure of Starch Granules with X-ray Microfocus Diffraction. **Macromolecules**, v. 30, n. 13, p. 3813–3820, 1997.
- WANG, T.; JOHNSON, L. A. Refining high-free fatty acid wheat germ oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 1, p. 71–76, 2001.
- WINDHAB, E. J. et al. Emulsion processing - From single-drop deformation to design of complex processes and products. **Chemical Engineering Science**, v. 60, n. 8- 9 SPEC. ISS., p. 2101–2113, 2005.
- WISSAM, Z.; SAMER, H. Encapsulation of flaxseed oil extract in alginate-salep system by ionic gelation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 1–9, 2019.
- YAZICIOGLU, B.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Microencapsulation of wheat germ oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3590–3597, 2015.

## CAPÍTULO 3

---

ALGINATE AND CORN STARCH MIXED GELS: EFFECT OF GELATINIZATION AND AMYLOSE CONTENT ON THE PROPERTIES AND *IN VITRO* DIGESTIBILITY

*Paper published in "Food Research International", v. 132, 109069, 2020*

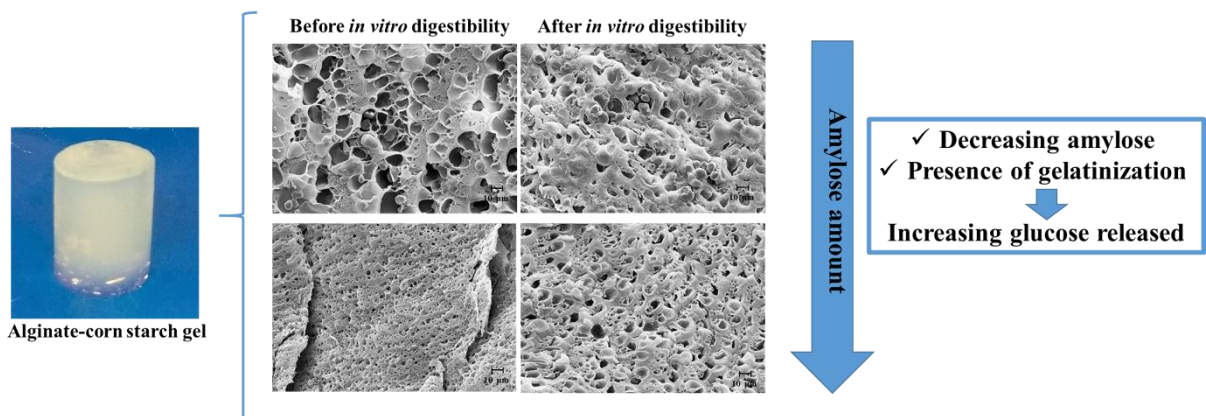
**ALGINATE AND CORN STARCH MIXED GELS: EFFECT OF GELATINIZATION AND AMYLOSE CONTENT ON THE PROPERTIES AND *IN VITRO* DIGESTIBILITY**

Gabriela Feltre<sup>1\*</sup>, Flávia Souza Almeida<sup>1</sup>, Ana Carla Kawazoe Sato<sup>1</sup>, Gustavo Cesar Dacanal<sup>2</sup>, Miriam Dupas Hubinger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, 13083-862, Brazil

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, 13635-900, Brazil

Graphical Abstract





### Abstract

The aim of this work was to evaluate the effects of gelatinized and non-gelatinized corn starches with different amounts of amylose (6.62, 28.46, and 61.10%) in the alginate matrix in relation to mechanical properties and microstructure before and after *in vitro* digestibility. The use of alginate together with corn starch with different amounts of amylose, in the gelatinized and non-gelatinized form, resulted in gels with different morphological characteristics. All hydrogels produced with gelatinized starches showed a more closed microstructure when compared to those produced with non-gelatinized starches due to the mixed network formed by the alginate matrix and the leached chains during gelatinization. After digestion, the microstructure of these gels became more porous, and the stress at rupture decreased in relation to the initial sample, while the modifications for the sample with non-gelatinized starches were less pronounced due to the susceptibility of gelatinized starch to enzymes. Gels with gelatinized common and high amylopectin starches presented higher amounts of released glucose and a more degraded microstructure after digestion, indicating that it is a suitable system for enteric delivery. Compound release can be controlled depending on the amylose amount and the form of corn starch used in combination with alginate to produce a matrix.

Keywords: ionic gelation, hydrogel, starch, amylopectin, microstructure, digestibility

### 3.1 INTRODUCTION

Hydrogels are polymeric materials with a three-dimensional network structure, and in aqueous medium, can swell considerably without dissolution. Hydrogels are widely used in the controlled release of compounds due to the facility with which they disperse in the matrix, to the soft tissue biocompatibility, and to the high control of release (Wang, Luo, Chen, Fu, & Tamer, 2020; Zhang et al., 2020). The properties of hydrogels depend on the physicochemical characteristics of the macromolecules and on external conditions (Picone & Cunha, 2011).

Alginate and alginate-starch hydrogels have been studied widely for compound encapsulation, aiming at their protection and delivery (Bannikova, Evteev, Pankin, Evdokimov, & Kasapis, 2018; Bušić et al., 2018; Khlibsuwan, Tansena, & Pongjanyakul, 2018). Some authors observed that the use of starch in alginate hydrogels modified the matrix structure, generating systems that allowed a slower release of the compound (Mohammadi, Ehsani, & Bakhoda, 2018; Okunlola & Adewusi, 2019).

Sodium alginate is a natural anionic polysaccharide extracted from brown algae, consisting of  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) and (1-4)-linked  $\beta$ -mannuronic acid (M) monomers (Thu et al., 1996); it generates three-dimensional structures by binding of G blocks to divalent cations, such as  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Mg}^{2+}$ , known as the “egg box” model (Grant, Morris, Rees, Smith, & Thom, 1973). Due to its gelling property and high biocompatibility and biodegradability, alginate is used as wall material for the encapsulation of compounds (Bevilacqua et al., 2019; Pereira et al., 2019) and as dietary fiber (Brownlee et al., 2007; Paxman, Richardson, Dettmar, & Corfe, 2008).

Starch is a biodegradable, non-toxic, inexpensive, and abundantly available material. Starch granules are composed of amylose and amylopectin molecules and present a semi-crystalline structure due to the amorphous and crystalline regions (Singh, Singh, Kaur, Sodhi, & Gill, 2003). Amylopectin is responsible for the crystallinity of starch granules, and the amorphous region mainly represents amylose (Zobel, 1988). There are large and highly branched molecules with  $\alpha$ -(1-4)-linked, interconnected by  $\alpha$ -1,6 glycosidic linkages (Manners, 1989; Zhang & Hamaker, 2009). Amylose has a long linear chain with  $\alpha$ -(1-4)-linked D-glucose units (Singh, Dartois, & Kaur, 2010; Singh, Singh, Kaur, Sodhi, & Gill, 2003; Tester, Karkalas, & Qi, 2004). When the starch is heated in the presence of moisture, the granules absorb water, swell, and rupture, generating molecules that dissolve in water. This phenomenon is known as “gelatinization”, and it breaks the crystalline organization irreversibly (Copeland, Blazek, Salman, & Tang, 2009; Zobel, 1988).

The rate and extent of starch granule digestion are related to factors such as botanical origin, amylose and amylopectin ratio, crystallinity, and granule size. Enzyme access is greater in amorphous regions of granules than in crystalline regions (Copeland et al., 2009). In relation to the amylose and amylopectin ratio, waxy starches, with low amylose proportion, are attacked by enzymes more readily than granules with higher amounts of amylose (Blazek et al., 2009; Jane, 2007). After gelatinization, the starch molecules are more susceptible to enzymatic hydrolysis than the granules (Copeland et al., 2009).

Digestibility assays are important to evaluate the behavior of products during the gastrointestinal process. *In vitro* methods are used since they are more rapid and less expensive than *in vivo* methods, and they have no ethical restrictions. These methods simulate *in vivo* physiological conditions, with suitable digestive enzyme concentrations, environmental pH, and digestion time (Minekus et al., 2014).

The modification of the alginate matrix with starch generates gels with different microstructures, which can be more or less porous, depending on the type and form of the starch. The starch used also defines the matrix behavior in relation to water retention, mechanical properties, and digestibility rate. Studies of the matrix properties, such as stability and microstructure, are important, especially in gastrointestinal conditions. Such information allows choosing the most suitable matrix, depending on the application, such as the use as wall material or dietetic fiber.

In this context, the aim of the present study was to investigate the behavior towards digestibility of systems obtained by the blend of alginate and non-gelatinized and gelatinized corn starch, with regular composition, high amylose levels, and high amylopectin levels. The effect of the addition of the starches on the alginate matrix characteristics was evaluated in relation to mechanical properties, water holding capacity, and microstructure. *In vitro* digestibility assays were performed, and the matrices' microstructures as well as the amounts of glucose released were determined to analyze the changes that occurred on the gels during the stages of the digestion process.

## 3.2 MATERIAL AND METHODS

### 3.2.1 Material

Sodium alginate (GRINDSTED, Alginate FD 175, guluronic acid > 60%) was kindly provided by Danisco Brazil Ltda. (Pirapozinho, São Paulo, Brazil). Common corn starch (AMISOL 3408,  $28.46 \pm 0.18\%$  amylose content;  $10.52 \pm 0.37\%$  moisture;  $0.20 \pm 0.03\%$  lipids;  $1.03 \pm 0.13\%$  proteins;  $0.08 \pm 0.03\%$  ashes;  $D[4,3] = 14.70 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ) and the high amylose content corn starch (HYLON VII,  $61.10 \pm 1.09\%$  amylose content;  $11.76 \pm 0.32\%$  moisture;  $0.26 \pm 0.04\%$  lipids;  $0.80 \pm 0.12\%$  proteins;  $0.141 \pm 0.002\%$  ashes;  $D[4,3] = 10.97 \pm 0.05 \mu\text{m}$ ) were both donated by Ingredion (Limeira, São Paulo, Brazil). High amylopectin corn starch, also known as waxy maize (Probiótica Laboratórios Ltda., Matão, São Paulo, Brazil,  $6.62 \pm 0.65\%$  amylose content;  $10.94 \pm 0.30\%$  moisture;  $0.14 \pm 0.03\%$  lipids;  $0.441 \pm 0.005\%$  proteins;  $0.141 \pm 0.005\%$  ashes;  $D[4,3] = 18.66 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ) was purchased at a local market. The enzymes  $\alpha$ -amylase from porcine pancreas (A3176, enzymatic activity 9.65 U/mg), pepsin from porcine gastric mucosa (77160, enzymatic activity 772.39 U/mg), and pancreatin from porcine pancreas (P3292, enzymatic activity 2.81 U/mg), used for the preparation of simulated gastrointestinal fluids, were obtained from Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, Missouri, USA). Bile extract porcine was obtained from ChemCruz Biochemicals (Huissen, Gelderland, Netherlands). The other reagents were of analytical grade.

### 3.2.2 Preparation of hydrogels

Initially, sodium alginate solution was prepared by dissolving powder in distilled water under magnetic stirring, for 12 hours. Non-gelatinized starch suspensions were prepared by dissolving powders in distilled water. Gelatinized starches solutions were prepared by mixing the starch with distilled water, followed by autoclave treatment (model CS50, Primatec, Itu, São Paulo, Brazil), at  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , for 40 minutes. The blends of alginate-starch (gelatinized and non-gelatinized) were further obtained by mixing biopolymers, in a Ultra Turrax rotor-stator (model T18 basic, IKA, Staufen, Baden-Württemberg, Germany), operating at 14,000 rpm, for 5 min. To obtain macrogels, the blends were dialyzed in membranes (SnakeSkin Dialysis Tubing, 3500 molecular weight cut-off, Pierce, Rockford, Illinois, USA) against 500 ml of  $\text{CaCl}_2$  solution (150 mM), for 3 days, according to the method described by Pires Vilela, Cavallieri, and Cunha (2011) with some modifications. Macro gels were

characterized in relation to mechanical properties, water holding capacity, and microstructure. The assays were performed in triplicate. The composition of macrogels is shown Table 3.1.

Table 3.1. Composition of the gels.

<b>Gel</b>	<b>Alginate (%)</b>	<b>Common starch (%)</b>	<b>High amylose starch (%)</b>	<b>High amylopectin starch (%)</b>	<b>Water (%)</b>	<b>Thermal treatment</b>
<b>ALG</b>	2.0	0	0	0	98.0	No
<b>NGCS</b>	1.0	1.0	0	0	98.0	No
<b>GCS</b>	1.0	1.0	0	0	98.0	Yes
<b>NGAM</b>	1.0	0	1.0	0	98.0	No
<b>GAM</b>	1.0	0	1.0	0	98.0	Yes
<b>NGAP</b>	1.0	0	0	1.0	98.0	No
<b>GAP</b>	1.0	0	0	1.0	98.0	Yes

ALG: Gel produced with alginate only; NGCS: Gel produced with 1% alginate and 1% non-gelatinized corn starch; GCS: Gel produced with 1% alginate and 1% gelatinized corn starch; NGAM: Gel produced with 1% alginate and 1% non-gelatinized high amylose corn starch; GAM: Gel produced with 1% alginate and 1% gelatinized high amylose corn starch; NGAP: Gel produced with 1% alginate and 1% non-gelatinized high amylopectin corn starch; GAP: Gel produced with 1% alginate and 1% gelatinized high amylopectin corn starch.

### 3.2.3 *In vitro* static digestion

Simulated gastrointestinal *in vitro* digestion was carried out according to Minekus et al. (2014). Cylindrical gel samples (approximately 20 mm in diameter and 20 mm in height) were added to simulated salivary fluid (SSF) with calcium chloride solution, and the mixture was subjected to static digestion in a water bath (Dubnoff Model, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil) at 37°C for 2 minutes. Simulated gastric fluid (SGF), porcine pepsin, and calcium chloride were then added, and the pH was adjusted to 3. Gastric digestion was performed for 2 hours, and subsequently, simulated intestinal fluid (SIF), pancreatin, calcium chloride, and bile extract were added to the mixture, the pH was adjusted to 7, and *in vitro* digestion was performed for 2 hours. Calcium chloride solution was used in oral, gastric, and enteric stages, because this salt is present in human digestive fluids (Zangenberg, Müllertz, Kristensen, & Hovgaard, 2001). Gel samples were collected at the end of oral, gastric, and intestinal phases for mechanical property evaluation. The microstructure was evaluated at the end of the *in vitro* digestion. In addition, aliquots of the simulated fluids were collected during *in vitro* gastrointestinal simulation to evaluate glucose release.

### 3.2.4 Mechanical properties

The mechanical properties of the gels were measured by uniaxial compression test using an uniaxial TA-XTPlus Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd, Godalming, Surrey, UK), equipped with an acrylic cylindrical plate (80 mm diameter), and lubricated with silicon oil in order to minimize friction between gel and probe. The assays were performed with cylindrical gels with 20 mm diameter and 20 mm height. The Hencky stress or true stress ( $\sigma$ ) and strain at rupture ( $\varepsilon$ ) were calculated from the force-deformation data (Steffe, 1996), according to the Equations (3.1) and (3.2).

$$\sigma = F(t) \times [H(t)/H_0 A_0] \quad (3.1)$$

$$\varepsilon = - \ln [H(t)/H_0] \quad (3.2)$$

where  $F(t)$  is the force at time  $t$ ,  $A_0$  and  $H_0$  are the initial area and height of the sample, respectively, and  $H(t)$  is the height at time  $t$ .

The Young modulus or elasticity modulus ( $E$ ) was obtained from the slope of the initial linear region of the stress-strain curve up to 5% strain. Stress at rupture ( $\sigma_{rup}$ ) was used as an indicator of gel hardness and strain at rupture ( $\varepsilon_{rup}$ ) as an indicator of gel deformability. At least five replicates were carried out for each batch.

### 3.2.5 Water holding capacity (WHC)

Water holding capacity (WHC) measurements were performed according to Ikeda and Foegeding (1999), with some modifications. Cylindrical gel samples (approximately 20 mm diameter and 20 mm height) were weighed, wrapped in parchment paper and placed into centrifuge tubes that were centrifugated (centrifuge Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter, Brea, California, USA), at 4000 G-force, for 10 minutes, at 22 °C. Samples were weighed before and after centrifugation. The water holding capacity (% w/w) of the gels was determined according to the Equation (3.3).

$$WHC = [m_f/m_0] \times 100\% \quad (3.3)$$

where  $m_0$  is the mass of the gel before the centrifugation (g) and  $m_f$  is the mass of the gel after centrifugation (g). At least five replicates were carried out for each batch.

### 3.2.6 Glucose release

To evaluate the disintegration of the gels during the digestibility process, the glucose released from the gastrointestinal fluid was quantified. The glucose released was determined using the assay kit Glucose Liquid Stable GOD-PAP (Laborlab, Guarulhos, São Paulo, Brazil), according manufacturer's instructions. Aliquots of digestive fluids were taken at 0, 2, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 minutes. The analysis were performed in duplicate.

### 3.2.7 Scanning electron microscopy (SEM)

For the SEM analysis, the samples were prepared according to the methodology described by Vilela, Cavallieri, and Cunha (2011), with some modifications. Initially, the gels samples (approximately 10 mm × 5 mm × 5 mm) were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer of 0.1 M (pH 7.2), in order to minimize structure modification during the subsequent drying treatment. The fixed samples were then fractured under liquid nitrogen and they were dehydrated in graded ethanolic series (30%, 50%, 70% and 90%). Dehydration was continued in 100% ethanol (three changes over 1 hour), followed by critical point drying (Balzers Critical Point Dryer CPD03, Cambridge, Massachusetts, USA). The dried samples were placed on aluminum stubs and coated with gold, in a sputter deposition system (Sputter Coater Emitech K450, Kent, UK). Images of the structures of each gel were obtained at a magnification of × 1500, using a scanning electron microscope (Leo 440i, LEO Electron Microscopy, Cambridge, UK) operated at 15 kV.

### 3.2.8 Optical microscopy

The solutions used to produce the macrogels were analyzed under an optical microscope (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Gottingen, Lower Saxony, Germany) at 40× magnification in order to investigate the structure of starch granules gelatinized or not. The images were captured with the software AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Gottingen, Lower Saxony, Germany). To stain the starch, Lugol's solution was used.

### 3.2.9 Statistical data analysis

Statistical analysis were performed from triplicates of experimental trials and analysis of variance and Tukey's test was performed by the mean of comparisons at 95% of confidence level ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.3.1 Characterization of hydrogels

Mechanical properties and water holding capacity (Table 3.2) were analyzed to characterize the gels.

Table 3.2. Mechanical properties of the gels.

Gels	Stress at rupture ( $\sigma_{rup}$ ) (kPa)	Strain at rupture ( $\epsilon_{rup}$ ) (-)	Young modulus (E) (kPa)	Water holding capacity (WHC) (%)
ALG	295.77±39.69	1.30±0.14	198.06±41.91	63.26±4.48 <sup>b,c</sup>
NGCS	76.93±12.84 <sup>a1,A1</sup>	1.03±0.07 <sup>a1,A1</sup>	47.14±8.73 <sup>a1,B1</sup>	52.49±2.86 <sup>e</sup>
GCS	71.31±12.37 <sup>a1,B2</sup>	0.92±0.08 <sup>a1,B2</sup>	47.16 ± 6.47 <sup>a1,B2</sup>	72.15±3.70 <sup>a</sup>
NGAM	77.70±8.51 <sup>b2,A1</sup>	1.01±0.06 <sup>a2,A1</sup>	53.84±7.27 <sup>a2,A1</sup>	61.01±3.55 <sup>d,e</sup>
GAM	97.31±10.83 <sup>a2,A2</sup>	1.06±0.08 <sup>a2,A2</sup>	58.85±8.54 <sup>a2,A2</sup>	62.52±3.97 <sup>c,d</sup>
NGAP	75.60±12.01 <sup>a3,A1</sup>	1.04±0.07 <sup>a3,A1</sup>	46.59±8.10 <sup>a3,B1</sup>	57.26±1.56 <sup>d,e</sup>
GAP	79.96±13.12 <sup>a3,B2</sup>	0.93±0.05 <sup>b3,B2</sup>	46.52±9.15 <sup>a3,B2</sup>	71.23±3.79 <sup>a,b</sup>

Different lowercase letters with the same number in each column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between gels produced with the same starch (gelatinized and non-gelatinized). Different capital letters with the same number in each column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between gels produced with different starches, but with the same treatment (gelatinized and non-gelatinized).

ALG: Alginate; NGCS: Alginate + non-gelatinized common corn starch; GCS: Alginate + gelatinized common corn starch; NGAM: Alginate + non-gelatinized high amylose corn starch; GAM: Alginate + gelatinized high amylose corn starch; NGAP: Alginate + non-gelatinized high amylopectin corn starch; GAP: Alginate + gelatinized high amylopectin corn starch.

Gels produced only with alginate presented higher stress and strain at rupture, as well as higher Young modulus values when compared with the other samples, indicating that they are harder, more deformable, and firmer at low deformation conditions than the starch-containing samples. This result was associated with the higher amount of sodium alginate contained in ALG gel and, consequently, the higher number of carboxylate anions of alginate guluronate units to bind the calcium ions of the crosslinking agent (Singh, Sharma, & Gupta, 2009). Samples produced with different types of non-gelatinized starch showed no statistically different values of stress and strain at rupture between them. Gel obtained with gelatinized high amylose starch (GAM) presented higher values of  $\sigma_{rup}$ ,  $\epsilon_{rup}$ , and E when compared with gels obtained with gelatinized common corn starch (GCS) and gelatinized high amylopectin corn starch (GAP): most likely, this is due to the higher amylose concentration, with a tendency to retrograde and to produce tough gels (Tabasum et al., 2019). Amylose chains, during retrograding form double-helical associations (Jane & Robyt, 1984), promoting intermolecular interaction between leached amylose after the gelatinization process and other hydrocolloid molecules, such as alginate (Shi & Bemiller, 2002). Regarding heat treatment, there was no significant difference in the values of the stress at rupture of gels produced with gelatinized and



non-gelatinized common corn starch (GCS and NGCS) or with high amylopectin corn starch (NGAP and GAP). Starch granules have numerous hydroxyl groups that interact with the carboxyl groups of sodium alginate via intermolecular hydrogen bonding. When gelatinized starch is used, the branched chain of amylopectin has numerous contact points, creating a more complex matrix network with alginate. Both interactions with sodium alginate are strong, creating a harder structure (Khlibsuwan et al., 2018). However, GAM presented higher stress at rupture than NGAM, due to the higher amount of leached amylose molecules than in gels produced with other starches (common and high amylopectin contents), which form double-helical associations after gelatinization, assisting in the packaging of the molecule chains.

The presence of different types of corn starch affected the WHC of the gels when compared with ALG (Table 3.2). The GCS and GAP presented the highest WHC due to the gelatinization process. Gels obtained with non-gelatinized starches (NGCS, NGAM, and NGAP) presented intact granules, which could be seen in the solution morphology (Figure 3.1 (a, b, and c)), and a non-tridimensional matrix that incorporated water, resulting in a lower water retention capacity (Table 3.2). Starch granules present large amounts of crystalline regions, preventing water retention. Gels obtained with gelatinized starches presented lower WHC than the ALG gel, which is related to the lower amount of alginate of the gelatinized-starch-containing gels, since the alginate is the compound responsible for the three-tridimensional network that retains water after ionic gelation with  $\text{CaCl}_2$ . The GAM gel was produced with gelatinized high amylose corn starch, but the process was not effective to gelatinize all starch granules, since intact granules were found in the solution (Figure 3.1 (e)), which were not observed in the solutions produced with common and high amylopectin corn starches (Figure 3.1 (d, and f)). Therefore, this gel contained a smaller proportion of the starch network formed during gelatinization than the other gels obtained with gelatinized starches, in addition to a certain portion of intact granules.

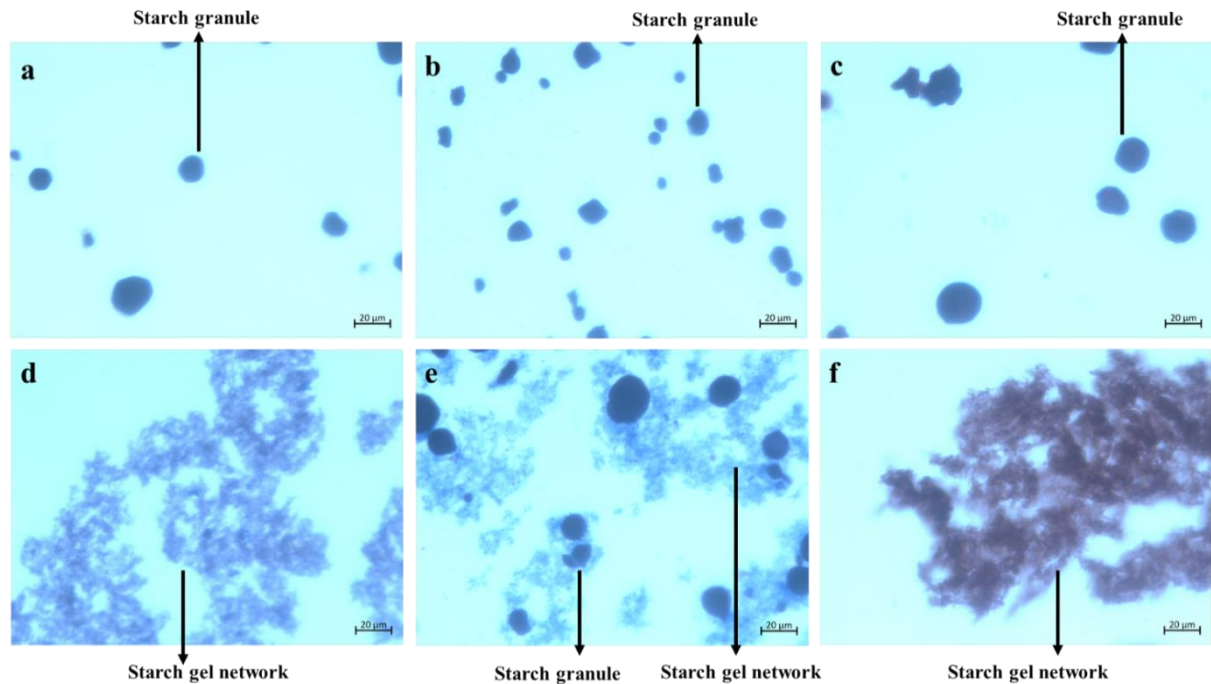


Figure 3.1. Optical micrographs of solutions used to produce gels. (a) NGCS: Alginate + non-gelatinized common corn starch; (b) NGAM: Alginate + non-gelatinized high amylose corn starch; (c) NGAP: Alginate + non-gelatinized high amylopectin corn starch; (d) GCS: Alginate + gelatinized common corn starch; (e) GAM: Alginate + gelatinized high amylose corn starch; (f) GAP: Alginate + gelatinized high amylopectin corn starch. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . Magnification of  $\times 40$ .

The replacement of 1% sodium alginate by 1% of different gelatinized and non-gelatinized corn starch modified the microstructure of the alginate matrix (Figure 3.2(a-g)). The ALG gel presented a more closed structure in comparison to the other gels, due to the double amount of sodium alginate present in its composition. Considering the gels obtained with different treatments, the gels prepared with gelatinized starches (GCS, GAM, and GAP) showed a more closed structure with smaller pores (Figure 3.2c, 3.2e, and 3.2g, respectively) than gels produced with non-gelatinized starches (NGCS, NGAM, and NGAP) (Figure 3.2 (b, d, and f)). This result was probably due to the leached amylose during gelatinization, which interacts with carboxyl groups of alginate via hydrogen bonds, compacting the gel structure. Gels produced with non-gelatinized starches showed a more porous microstructure (Figure 3.2 (b, d, and f)), although there are hydrogen bonds between starch granules and the alginate matrix (Khlibsuwan et al., 2018). The network of gels produced with gelatinized starches was homogeneous, while gels with non-gelatinized starches presented starch granules dispersed in the alginate matrix. In this case, the starch granules present in the gels obtained with non-gelatinized starches occupy interstitial spaces in the matrix (Córdoba, Deladino, & Martino, 2013; Hosseini et al., 2014), but do not contribute to the formation of the network matrix. Gels

produced with gelatinized starches with different proportions of amylose showed a highly similar microstructure (Figure 3.2 (c, e, and g)). However, visually, GAP gel (Figure 3.2 (g)) presented a more porous microstructure due to the low amounts of amylose, a molecule that forms double-helical associations after gelatinization, leading to a more compact structure.

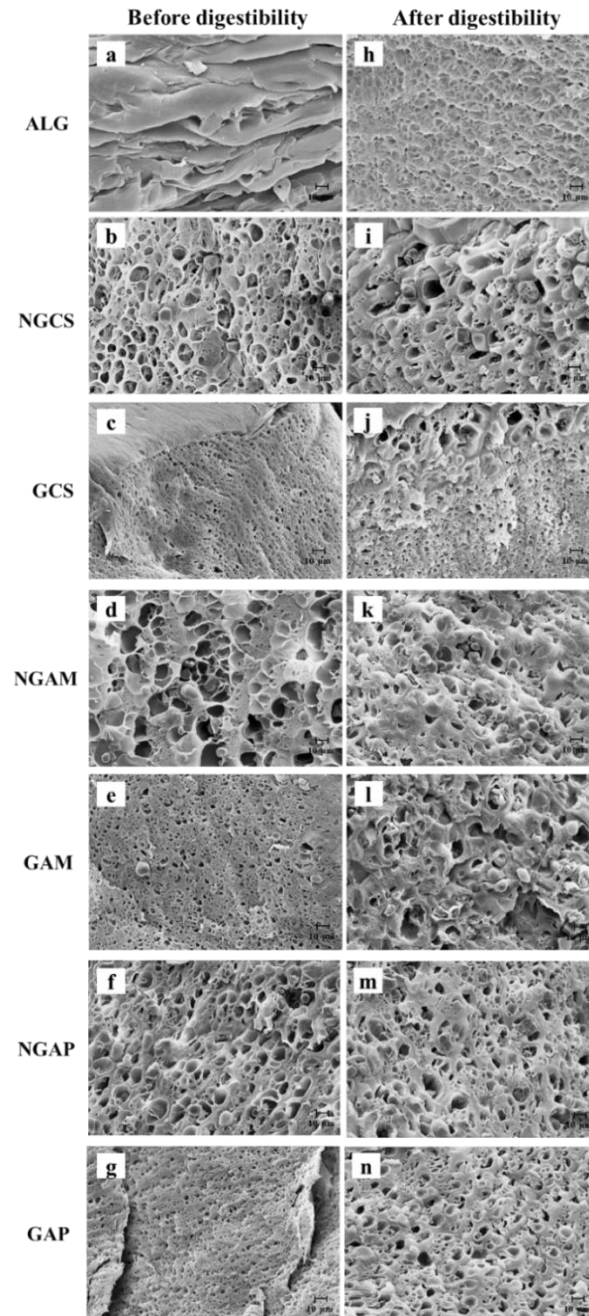


Figure 3.2. SEM images of the gels before (a, b, c, d, e, f, g) and after (h, i, j, k, l, m, n) *in vitro* digestibility process. (a, h): ALG - Alginate; (b, i): NGCS - Alginate + non-gelatinized common corn starch; (c, j): GCS - Alginate + gelatinized common corn starch; (d, k): NGAM - Alginate + non-gelatinized high amylose corn starch; (e, l): GAM - Alginate + gelatinized high amylose corn starch; (f, m): NGAP - Alginate + non-gelatinized high amylopectin corn starch; (g, n): GAP - Alginate + gelatinized high amylopectin corn starch. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . Magnification of x 1500.

### 3.3.2 *In vitro* digestibility

*In vitro* digestibility simulation was performed to evaluate the differences in the behavior of the gels produced with gelatinized and non-gelatinized starches with different amounts of amylose. Hardness at the beginning and at the end of each digestibility step (Table 3.3) as well as their microstructure after process (Figure 3.2 (h-n)) were evaluated.

Table 3.3. Stress at rupture values (kPa) of gels during gastrointestinal *in vitro* process.

Gels	Oral phase	Stomach phase	Intestinal phase
ALG	227.63±17.70 <sup>b</sup>	211.91±19.53 <sup>b</sup>	178.67±13.82 <sup>c</sup>
NGCS	77.05±9.77 <sup>*a</sup>	85.35±10.81 <sup>*a</sup>	75.05±10.49 <sup>*a</sup>
GCS	81.35±7.80 <sup>*a</sup>	80.20±9.37 <sup>*a</sup>	56.52±9.57 <sup>b</sup>
NGAM	79.55±10.04 <sup>*a</sup>	83.09±8.08 <sup>*a</sup>	67.49±9.61 <sup>b</sup>
GAM	83.88±13.14 <sup>*ab</sup>	81.57±11.89 <sup>b</sup>	53.10±7.28 <sup>c</sup>
NGAP	81.12±9.82 <sup>*a</sup>	80.04±9.95 <sup>*a</sup>	74.93±12.62 <sup>*a</sup>
GAP	79.07±10.94 <sup>*a</sup>	71.38±7.83 <sup>*a,b</sup>	63.42±14.27 <sup>b</sup>

\* There are no statistical significant differences ( $p < 0.05$ ), in relation to the initial gel (values presented in Table 3.2).

Different letters indicate statistical significant differences ( $p < 0.05$ ) in each line.

ALG: Alginate; NGCS: Alginate + non-gelatinized common corn starch; GCS: Alginate + gelatinized common corn starch; NGAM: Alginate + non-gelatinized high amylose corn starch; GAM: Alginate + gelatinized high amylose corn starch; NGAP: Alginate + non-gelatinized high amylopectin corn starch; GAP: Alginate + gelatinized high amylopectin corn starch.

In the oral phase, the reduction of stress at rupture of the ALG gel (23.04%) was higher than for gels produced with corn starches (gelatinized and non-gelatinized), ranging between 0 and 13.80%, showing that the weakening was higher for the gel obtained only with alginate (Table 3.3). Gels presented low reduction of stress at rupture in the stomach phase in relation to the oral phase (0-9.73%) due to the lower pH, which makes the alginate matrix stronger. At the end of the total digestion process, gels produced only with alginate (ALG) presented a great reduction of stress at rupture in relation to the initial gel (decrease by 39.69%). The weakening of this gel in the intestinal phase occurs because of the interaction between alginate and bile acids and the basic pH, weakening the network. The SEM images show that the initial ALG gel microstructure was more continuous and scaled (Figure 3.2(a)), and after the intestinal phase, the microstructure presented a disintegrating aspect (Figure 3.2(h)). Initial GAM gel presented higher stress at rupture than the other gels produced with gelatinized starch, indicating that it was stronger. This gel became softer than the others at the end of the digestion process, with a decrease of stress at rupture by 45.43% in relation to the initial gel. The GCS and GAP gels did not statistically differ in stress at rupture until the stomach phase, while in the intestine phase, there was a decrease in the hardness of these gels (by 20.74 and 12.76%, respectively, in stress at rupture compared to the initial gels). The NGCS and NGAP gels did

not significantly differ in stress at rupture between the initial gel and the gel after digestion. Different from other gels produced with non-gelatinized starches, the NGAM gel presented a decrease of stress at rupture in the intestinal phase in relation to the initial gel (13.14%) (Table 3.3). The morphology of high amylose starch granules presents a significant heterogeneity under non-polarized and polarized light, different from common and high amylopectin starches (Cai, Zhao, Huang, Chen, & Wei, 2014). The heterogeneous granules influence the hilum size and birefringence, facilitating or hindering enzyme access and generating several levels of granule swelling and digestibility behavior (Huang et al., 2016). For the NGAM gels, the high heterogeneity of the granules led to different levels of granule digestibility. Moreover, the smaller size of the high amylose starch granules (Material section) would result in faster digestion, reducing stress at rupture and softening the gel after the enteric step.

Aliquots of the gastrointestinal fluid were taken every 30 minutes to evaluate the amount of released glucose during the digestion process (Figure 3.3). The gel samples were characterized in relation to the microstructure after the digestibility process by SEM (Figure 3.2 (h-n)).

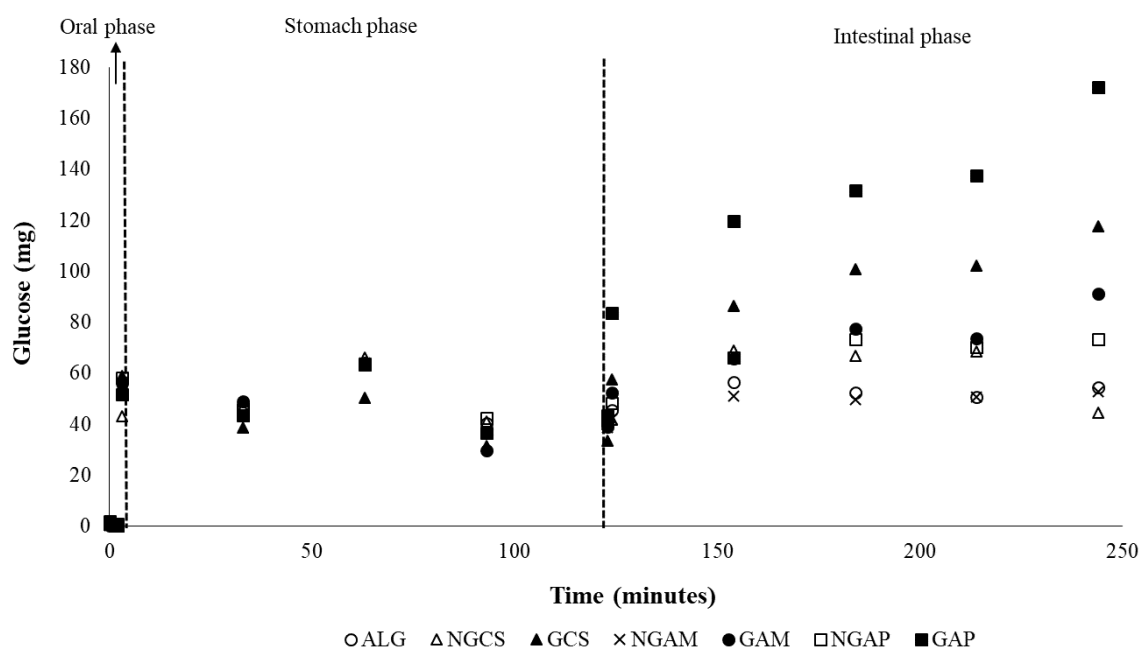


Figure 3.3. Glucose released from the gels during *in vitro* digestibility process. ALG: Alginate; NGCS: Alginate + non-gelatinized common corn starch; GCS: Alginate + gelatinized common corn starch; NGAM: Alginate + non-gelatinized high amylose corn starch; GAM: Alginate + gelatinized high amylose corn starch; NGAP: Alginate + non-gelatinized high amylopectin corn starch; GAP: Alginate + gelatinized high amylopectin corn starch.

In the oral and stomach phases, all gels showed low amounts of released glucose, without any differences among the samples (Figure 3.3). In the intestinal phase, gels obtained with gelatinized starches presented higher amounts of released glucose (Figure 3.3) and a more porous microstructure (Figure 3.2 (j, l, and n)) than gels produced with non-gelatinized starches (Figure 3.2 (i, k, and m)), indicating that there was greater disintegration of the structure of the gels obtained with gelatinized starches, mainly due to the difference in the digestibility of treated and native starches. Gelatinized starches are more susceptible to enzymatic hydrolysis than starch granules, due to disruption and disintegration of the crystalline granular structure in the granules during gelatinization (El Faki, Venkataraman, & Desikachar, 1984; Holm, Björck, Asp, Sjöberg, & Lundquist, 1985; Lee, Brooks, Kim, Heitlinger, & Lebenthal, 1985). The GAP gel, produced with gelatinized high amylopectin starch, was the sample that showed the higher amount of released glucose in the intestinal phase and a porous microstructure after the intestinal phase (Figure 3.2 (n)), followed by the GCS gel and the GAM gel, indicating that the starch of the GAM gel was less digested than the content presented in the other gelatinized starches. The amount of released glucose from these gels is related to their amylose content. After retrogradation, the amylose polymers, which show a linear structure and are tightly bound, have a greater resistance to the amylase enzyme than the amylopectin molecules, which contain branched chains (Colonna, Leloup, & Buléon, 1992; Lobo & Lemos Silva, 2003). Moreover, gelatinization was not sufficient to gelatinize all the starch granules of high amylose starch, and the solution used to produce GAM gel presented high amounts of intact granules (Figure 3.1(e)), which probably contributed to the resistance of GAM gels in the digestion process. This result demonstrates that starches with different contents of amylose, in addition to sodium alginate, generate different types of materials which can be used in the microencapsulation of compounds, depending on their properties and the velocity at which they should be released during digestion. For example, a compound that has to be released rapidly in the intestinal phase will probably have a better response if encapsulated with GAP or GCS gels, which presented greater disintegration.

In relation to the gels obtained with non-gelatinized starches, NGAP and NGCS gels released more glucose in the intestinal phase than NGAM, following the same tendency of the gelatinized gels, which is in agreement with other previous work (Evans & Thompson, 2004; Mohd Azemi & Wootton, 1984; Tangsrianugul, Suphantharika, & McClements, 2015). The presence of high amylopectin contents enables greater hydrolysis of the starch granules due to specific characteristics of its molecules. Apart from having a larger size and a larger surface area than amylose, amylopectin molecules present many branched chains of glucose,

making it more available to amylolytic enzymes (Thorne, Thompson, & Jenkins, 1983). The NGAM gel presented low contents of released glucose, indicating that high amylose starch granules were poorly digested by the enzyme. High amylose starch presents numerous amorphous regions, which are densely packed and arranged tightly to the crystalline regions, inhibiting hydrolysis (Zhang, Ao, & Hamaker, 2006). In amylose molecules, the glucose chains are more bound to each other by hydrogen bonds, making it difficult for enzymes to access them (Thorne et al., 1983). This result is corroborated by the SEM image (Figure 3.2 (d, and k)), which showed that the NGAM gel structure became more closed after digestion, indicating that this gel can be used in addition to the alginate to form a matrix when the purpose is to microencapsulate compounds that would be absorbed in the colon, or as dietary fibers, for fermentation in the colon, which is beneficial especially against the background of fermentation deficiency of other carbohydrates (Kaur, Rose, Rumpagaporn, Patterson, & Hamaker, 2011).

### 3.4 CONCLUSIONS

The replacement of part of alginate with corn starch allowed to obtain gels with different characteristics, depending on the amount of amylose and the form of the used starch: granules or gelatinized. In gels produced with gelatinized starches, the higher content of amylose is related to higher stress and strain at rupture, presenting a hard and deformable gel. Gelatinization on regular and high amylopectin starches generated matrices with higher water holding capacity in relation to the other gels.

Via *in vitro* digestibility assays, it was possible to evaluate the behavior of each gel during all processes, showing its main properties and the differences between them. Gels produced with gelatinized starches presented a more degraded microstructure in comparison to gels with non-gelatinized starches, indicating that gelatinization is associated with the production of matrices with higher susceptibility to enzymes. A high amylose amount in the starch is related to the production of gels with less degraded matrices after digestibility when compared with common and high amylopectin starches. By increasing the proportion of amylose in starch, the disintegration of the network during digestion process decreases. The application of high amylose starch in the form of granules to the alginate matrix allowed the network to become more closed after the intestinal phase.

When choosing the most suitable system, it is important to consider the compound to be encapsulated and its purpose, such as rate and site of release. For example, a compound that is desired to be rapidly released into the intestine would show better results if encapsulated in a matrix produced with gelatinized high amylopectin starch. When using the gel to

encapsulate some compounds to be absorbed in the colon, or as dietary fibers, the gel obtained with non-gelatinized, high amylose starch is most suitable. This study allowed the design of new matrix structures with different behaviors, which can be used in different applications according to the purpose of use.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to FAPESP (2015/11984-7; 2018/20466-8), CNPq (428644/2018-0) and CAPES (Finance Code 001) for the financial support, and for CNPq (142661/2015-5) and CNPq (141112/2018-2) by fellowships support.



## REFERENCES

- Bannikova, A., Evteev, A., Pankin, K., Evdokimov, I., & Kasapis, S. (2018). Microencapsulation of fish oil with alginate : *In vitro* evaluation and controlled release. *LWT - Food Science and Technology*, *90*, 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.045>
- Bevilacqua, A., Speranza, B., Santillo, A., Albenzio, M., Gallo, M., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2019). Alginate-microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*: Performances of encapsulated microorganisms and bead-validation in lamb rennet. *LWT - Food Science and Technology*, *113*, 108349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108349>
- Blazek, J., Salman, H., Rubio, A. L., Gilbert, E., Hanley, T., & Copeland, L. (2009). Structural characterization of wheat starch granules differing in amylose content and functional characteristics. *Carbohydrate Polymers*, *75*(4), 705–711. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.017>
- Brownlee, I. A., Allen, A., Pearson, J. P., Dettmar, P. W., Havler, M. E., Atherton, M. R., & Onsøyen, E. (2007). Alginate as a Source of Dietary Fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*, 497–510. <https://doi.org/10.1080/10408390500285673>
- Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Cebin, V., Karlović, S., Kovač, V., Špoljarić, I., ... Komes, D. (2018). Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Research International*, *111*, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.034>
- Cai, C., Zhao, L., Huang, J., Chen, Y., & Wei, C. (2014). Morphology, structure and gelatinization properties of heterogeneous starch granules from high-amylose maize. *Carbohydrate Polymers*, *102*, 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.010>
- Colonna, P., Leloup, V., & Buléon, A. (1992). Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, *46*, 17–32. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/1330526>
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, *23*(6), 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Córdoba, A. L., Deladino, L., & Martino, M. (2013). Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate Polymers*, *95*(1), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.019>

- El Faki, H. A., Venkataraman, L. V., & Desikachar, H. S. R. (1984). Effect of processing on the *in vitro* digestibility of proteins and carbohydrates in some Indian legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 34, 127–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01094840>
- Evans, A., & Thompson, D. B. (2004). Resistance to  $\alpha$ -Amylase Digestion in Four Native High-Amylose Maize Starches. *Cereal Chemistry*, 81(1), 31–37. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.1.31>
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195–198. <https://doi.org/10.1002/rmv.519>
- Holm, J., Björck, I., Asp, N.-G., Sjöberg, L.-B., & Lundquist, I. (1985). Starch availability *in vitro* and *in vivo* after flaking, steam-cooking and popping of wheat. *Journal of Cereal Science*, 3, 193–206. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(85\)80013-8](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(85)80013-8)
- Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., German, J. B., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., ... Khaksar, R. (2014). Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydrate Polymers*, 103(1), 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.078>
- Huang, J., Lin, L., Wang, J., Wang, Z., Liu, Q., & Wei, C. (2016). *In vitro* digestion properties of heterogeneous starch granules from high-amylose rice. *Food Hydrocolloids*, 54, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.016>
- Jane, J., & Robyt, J. F. (1984). Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate Research*, 132, 105–118. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85068-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85068-5)
- Jane, Jay. (2007). Structure of Starch Granules. *Journal of Applied Glycoscience*, 36, 31–36. <https://doi.org/10.5458/jag.54.31>
- Kaur, A., Rose, D. J., Rumpagaporn, P., Patterson, J. A., & Hamaker, B. R. (2011). *In vitro* Batch Fecal Fermentation Comparison of Gas and Short-Chain Fatty Acid Production Using “Slowly Fermentable” Dietary Fibers. *Journal of Food Science*, 76(5), 137–142. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02172.x>
- Khlibsuwan, R., Tansena, W., & Pongjanyakul, T. (2018). Modification of alginate beads using gelatinized and ungelatinized arrowroot (*Tacca leontopetaloides* L. Kuntze) starch for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.118>

- Lee, P. C., Brooks, S. P., Kim, O., Heitlinger, L. A., & Lebenthal, E. (1985). Digestibility of Native and Modified Starches: *In vitro* Studies with Human and Rabbit Pancreatic Amylases and *in vivo* Studies in Rabbits. *The Journal of Nutrition*, *115*(1), 93–103. <https://doi.org/10.1093/jn/115.1.93>
- Lobo, A. R., & Lemos Silva, G. M. (2003). Amido resistente e suas propriedades físico-químicas - Resistant starch and its physicochemical properties. *Revista de Nutrição*, *16*(2), 219–226. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000200009>
- Manners, D. J. (1989). Recent development in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, *11*, 87–112. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(89\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0144-8617(89)90018-0)
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mohammadi, N., Ehsani, M. R., & Bakhoda, H. (2018). Development of caffeine-encapsulated alginate-based matrix combined with different natural biopolymers, and evaluation of release in simulated mouth conditions. *Flavor and Fragrance Journal*, *33*, 357–366. <https://doi.org/10.1002/ffj.3452>
- Mohd Azemi, M. N., & Wootton, M. (1984). *In vitro* digestibility of hydroxypropyl maize, waxy maize and high amylose maize starches. *Starch - Stärke*, *36*, 273–275. <https://doi.org/10.1002/star.19840360805>
- Okunlola, A., & Adewusi, S. A. (2019). Development of Theophylline Microbeads Using Pregelatinized Breadfruit Starch (*Artocarpus altilis*) as a Novel Co-polymer for Controlled Release. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *9*(1), 93–101. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.012>
- Paxman, J. R., Richardson, J. C., Dettmar, P. W., & Corfe, B. M. (2008). Daily ingestion of alginate reduces energy intake in free-living subjects. *Appetite*, *51*, 713–719. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.06.013>
- Pereira, A. da S., Diniz, M. M., Jong, G. De, Gama Filho, H. S., dos Anjos, M. J., Finotelli, P. V., ... Amaral, P. F. F. (2019). Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, *139*, 621–630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.009>
- Picone, C. S. F., & Cunha, R. L. (2011). Influence of pH on formation and properties of gellan gels. *Carbohydrate Polymers*, *84*, 662–668. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.045>

- Shi, X., & Bemiller, J. N. (2002). Effects of food gums on viscosities of starch suspensions during pasting. *Carbohydrate Polymers*, 50, 7–18. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00369-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00369-1)
- Singh, B., Sharma, D. K., & Gupta, A. (2009). A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch – alginate beads to control environmental and health hazards, 161, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.074>
- Singh, J., Dartois, A., & Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(4), 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.12.001>
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., & Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81(2), 219–231. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00416-8)
- Tabasum, S., Younas, M., Zaeem, M. A., Majeed, I., Majeed, M., Noreen, A., ... Zia, K. M. (2019). A review on blending of corn starch with natural and synthetic polymers, and inorganic nanoparticles with mathematical modeling. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 969–996. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.092>
- Tangsrianugul, N., Suphantharika, M., & McClements, D. J. (2015). Simulated gastrointestinal fate of lipids encapsulated in starch hydrogels: Impact of normal and high amylose corn starch. *Food Research International*, 78, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.004>
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch - Composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>
- Thorne, M. J., Thompson, L. U., & Jenkins, D. J. A. (1983). Factors affecting starch digestibility and the glycemic response with special reference to legumes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 38, 481–488. <https://doi.org/10.1093/ajcn/38.3.481>
- Thu, B., Bruheim, B., Espevik, T., Smidsrød, P., Soon-Shiong, P., & Skjåk-Bræk, G. (1996). Alginate polycation microcapsules - I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*, 17, 1031–1040. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85907-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85907-2)
- Wang, P.-P., Luo, Z.-G., Chen, C., Fu, X., & Tamer, T. M. (2020). Effects of octenyl succinic anhydride groups distribution on the storage and shear stability of Pickering emulsions formulated by modified rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 228, 115389. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115389>

- Zangenberg, N. H., Müllertz, A., Kristensen, H. G., & Hovgaard, L. (2001). A dynamic *in vitro* lipolysis model: I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *14*(2), 115–122. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00169-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00169-5)
- Zhang, G., Ao, Z., & Hamaker, B. R. (2006). Slow Digestion Property of Native Cereal Starches. *Biomacromolecules*, *7*, 3252–3258. <https://doi.org/10.1021/bm060342i>
- Zhang, G., & Hamaker, B. R. (2009). Slowly Digestible Starch: concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(10), 852–867. <https://doi.org/10.1080/10408390903372466>
- Zhang, H., Liu, Y., Chen, C., Cui, W., Zhang, C., Ye, F., & Zhao, Y. (2020). Responsive drug-delivery microcarriers based on the silk fibroin inverse opal scaffolds for controllable drug release. *Applied Materials Today*, *19*, 100540. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100540>
- Zobel, H. F. (1988). Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch - Stärke*, *40*(2), 44–50. <https://doi.org/10.1002/star.19880400203>

## CAPÍTULO 4

---

ENCAPSULATION OF WHEAT GERM OIL IN ALGINATE-GELATINIZED CORN STARCH BEADS: PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND TOCOPHEROLS' STABILITY

*Paper submitted to "Journal of Food Science"*

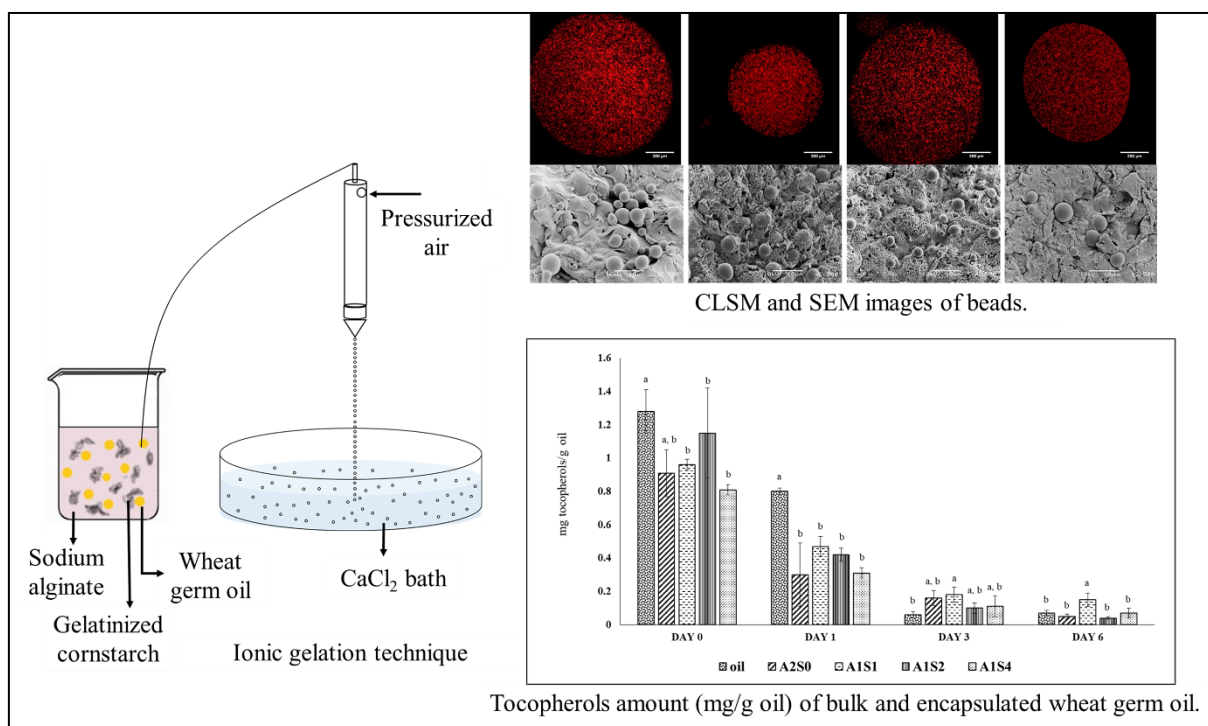
## ENCAPSULATION OF WHEAT GERM OIL IN ALGINATE-GELATINIZED CORN STARCH BEADS: PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND TOCOPHEROLS' STABILITY

Gabriela Feltre<sup>1\*</sup>, Tanara Sartori<sup>1</sup>, Klycia F. C. Silva<sup>1</sup>, Gustavo C. Dacanal<sup>2</sup>, Florencia C. Menegalli<sup>1</sup>, Miriam D. Hubinger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, 13083-862, Brazil

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, 13635-900, Brazil

### Graphical Abstract



### Abstract

The microencapsulation by production of polymer beads from ionic gelation is a useful method to improve the stability nutritional compounds. Wheat germ oil is a nutritional source of unsaturated fatty acids and phytonutrients, as tocopherols ( $\alpha$  and  $\beta$ ), phytosterols, carotenoids, and phenolic compounds. This work studied the development of physical barriers of alginate-starch beads over the stability of encapsulated wheat germ oil. The beads contained sodium alginate and gelatinized corn starch at proportions of (2:0, 1:1, 1:2, and 1:4). The addition of small amounts (1:1) of gelatinized starch in the alginate emulsions improved the physicochemical properties and stability during storage. The emulsions had oil droplets with mean size ranging from 4.5 to 12.2  $\mu\text{m}$ . The 1:1 samples showed a more disperse oil droplets, explained by the molecular interaction between starch chains and oil. The encapsulation efficiency was higher than 91%, and the beads' mean diameter were between 383 and 797  $\mu\text{m}$ . The proportion of 1:1 of alginate-starch enhanced the beads' microstructure, avoiding the oil oxidation. The 6 days accelerated stability (65 °C) evidenced a higher tocopherols amount (0.66 mg/g oil) and a lower oxidation (2.52 meq.O<sub>2</sub>/kg oil) for the 1:1 samples if compared to the remained samples.

**Keywords:** emulsion; ionic gelation, microstructure, stability, oxidation.



## 4.1 INTRODUCTION

Wheat germ oil is a rich source of vitamins, such as thiamin and tocopherols (vitamin E). Tocopherols are known as compounds with high antioxidant activity, and present several benefits to human health, such as improvement of physical strength, retardation of aging, decrease of cholesterol levels in plasma, and delay of the progression of degenerative diseases (Ozcan et al., 2013). Due to being synthesized by plants and cyanobacteria only, the vitamin E consumption is essential for human diet (Bramley et al., 2000). Despite the advantages of wheat germ oil, it presents a short shelf life, due to the degradation of tocopherols, that can reach 98% depending on the storage temperature and time (Margariño, Mateo, & Nolasco, 2015). In addition, the high amount of polyunsaturated fatty acids makes wheat germ oil susceptible to oxidation. To carry and protect this oil, some microencapsulation methods have been used (Karadeniz, Sahin, & Sumnu, 2018; Yazicioglu, Sahin, & Sumnu, 2015).

Emulsion is an encapsulation method used to establish a protective barrier to compounds, delivering them at specific sites and protecting against deterioration. Emulsions can be produced at ambient temperature, which reduces the risk of compound degradation during the process (Azizi, Kierulf, Lee, & Abbaspourrad, 2018). Emulsifiers or stabilizers are used to stabilize emulsions, which are thermodynamically unstable. Some studies demonstrated the ability of starch as a stabilizer of emulsions, due to the steric forces and the complexes formed by starch molecules and lipid droplets interactions (Gómez-Luría, Vernon-Carter, Alvarez-Ramirez, & Cruz-Sosa, 2019; Song, Zheng, Ma, Kang, & Ren, 2020; Villamonte, Jury, & de Lamballerie, 2016). Generally, the emulsification process is used as a pre-immobilization of a compound, followed by another encapsulation method, such as spray drying, spray chilling, and ionic gelation.

Hydrogels produced by ionic gelation have been used in microencapsulation of bioactive compounds. Particle production occurs by ionic interaction between a polymer and di- or trivalent ions such as calcium, generating a three-dimensional matrix. This method allows the production of high oil load particles, that can be applied in foods for enrichment and development of functional foods (Chang & Dobashi, 2003; Menin et al., 2018). Sodium alginate is widely used in ionic gelation method, due to its good compatibility and non-toxicity (Sarker et al., 2015).

Although the advantages of microencapsulation by ionic gelation, sodium alginate matrix exhibits some limitations, due to its porous structure, that can expose the encapsulated compound to environmental conditions, causing its degradation. Researchers have used

different materials as filler to alginate matrix, such as proteins and polysaccharides, to improve hydrogels properties (Balanč et al., 2016; Otálora, Carriazo, Iturriaga, Osorio, & Nazareno, 2016; Silva & Sato, 2017). The incorporation of starch into alginate matrix improved the chemical and mechanical stability, and allowed a controlled release of encapsulated compounds (Khlibsuwan, Tansena, & Pongjanyakul, 2018; Mohammadi, Ehsani, & Bakhoda, 2018; Okunlola & Adewusi, 2019). Some studies have reported the production of alginate beads with gelatinized starch as filler material to encapsulate compounds, due to its ability to bind to the carboxyl groups of alginate, creating a uniform matrix, and improving the adhering capacity and beads formation (Khlibsuwan et al., 2018; Okunlola & Adewusi, 2019; Suvarna, Dsouza, Ragavan, & Nilanjana, 2018).

The matrix composed by alginate and starch has been studied; most of the works use hydrophilic compounds and microorganisms as encapsulated material. The oil encapsulation into this type of matrix is not common. Considering the ability of the gelatinized starch molecules to bind to the alginate carboxyl groups and to interact with lipids, the use of starch could generate a closed microstructure matrix and retard oil oxidation and degradation of compounds. This work aimed to evaluate the influence of gelatinized corn starch at different concentrations in the stability of wheat germ oil encapsulated by ionic gelation with sodium alginate.

## 4.2 MATERIAL AND METHODS

### 4.2.1 Material

Emulsions were prepared using wheat germ oil (Midelt Quimica Ltda., Diadema, São Paulo, Brazil) with the following fatty acid composition: 0.16% 14:0 (myristic acid); 0.03% 15:0 (pentadecanoic acid); 10.92% 16:0 (palmitic acid); 0.10% 16:1 (palmitoleic acid); 0.09% 17:0 (margaric acid); 0.07% 17:1 (cis-10-heptadecenoic acid); 3.61% 18:0 (stearic acid); 26.44% 18:1 (oleic acid); 0.30% 18:2 (trans t-linolenic acid); 51.08% 18:2 (linoleic acid); 0.71% 18:3 (trans t-linolenic acid); 5.17% 18:3 (linolenic acid); 0.38% 20:0 (arachidic acid); 0.24% 20:1 (eicosenoic acid); 0.48% 22:0 (behenic acid); 0.22% 24:0 (lignoceric acid). Sodium alginate (GRINDSTED, Alginate FD 175, guluronic acid > 60%) and corn starch (AMISOL 3408, 28.46% ± 0.18% amylose content) were kindly provided by Danisco Brazil LTDA (Pirapozinho, São Paulo, Brazil) and Ingredion Brazil Ingredients LTDA (Limeira, São Paulo, Brazil), respectively. The external standard used to quantification of tocopherols was a mixed

of tocopherols (W530066), from Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA). The other reagents were of analytical grade.

#### 4.2.2 Preparation of emulsions

Emulsions were prepared from blends of sodium alginate, gelatinized corn starch, wheat germ oil, and water. Four emulsion were prepared with different alginate:corn starch ratios: 2:0 (A2S0), 1:1 (A1S1), 1:2 (A1S2), and 1:4 (A1S4). Table 4.1 presents the content of each material in relation to total solids.

Table 4.1. Experimental conditions for emulsion and beads formation using sodium alginate, gelatinized corn starch and wheat germ oil, in relation to total solids, on wet basis.

Emulsions	Sodium alginate (%)	Gelatinized starch (%)	Wheat germ oil (%)
A2S0	50	0	50
A1S1	25	25	50
A1S2	20	40	40
A1S4	14.3	57.1	28.6

Sodium alginate solution was obtained by dissolving alginate powder in distilled water under magnetic stirring, during 12 hours. Suspensions containing corn starch and distilled water were maintained under mechanical stirring during 20 min. The gelatinization of corn starch occurred at 91 °C and 40 min, under mechanical stirring, and suspensions were subsequent cooled to 25 °C in an ice bath. The gelatinized starch suspension was mixed to wheat germ oil and homogenized in a rotor-stator Ultra Turrax model T18 basic (IKA, Staufen, Germany) operating at 14,000 rpm for 3 min. Final emulsions were obtained by addition of alginate solution and applying extra 5 min homogenization. All emulsions were submitted to a 8 min homogenization step.

#### 4.2.3 Characterization of emulsions

##### 4.2.3.1 Size distribution of oil droplets

Mean diameter of oil droplets were evaluated from Brouckere diameter,  $D_{[4,3]}$  (Equation 4.1). The size distribution of oil droplets was determined with a laser light diffraction instrument Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). Emulsions were dispersed in distilled water and analyzed immediately after they were prepared. Span ratio evaluated the polydispersity index (Equation 4.2).

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum n_i D_i^4}{\sum n_i D_i^3} \quad (4.1)$$

$$\text{Span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (4.2)$$

where  $n_i$  is the number of droplets with diameter  $D_i$ , and  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ , and  $D_{90}$  are the oil droplets size at percentiles 10%, 50%, and 90%, respectively.

#### 4.2.3.2 Optical microscopy

The morphologies of the emulsions were observed under an optical microscope (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Gottingen, Lower Saxony, Germany) at 1000x magnification. The images were captured with the software AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Gottingen, Lower Saxony, Germany). To stain the gelatinized starch, Lugol's solution was used in the emulsions.

#### 4.2.3.3 Zeta potential

Zeta potential measured the electrical charge of emulsions by microelectrophoresis method at room temperature (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). Emulsions were analyzed immediately after they were produced, and the measurements were performed in triplicate.

#### 4.2.3.4 Flow behavior

The flow measurements of the emulsions were performed immediately after preparation using a rheometer (AR1500ex, TA Instruments, New Castle, Delaware, USA), with a flat plate geometry (4 cm diameter, with a 200  $\mu\text{m}$  gap), at 25 °C. Flow curves were plotted in three sweeps (up-, down-, and up-cycles) with a shear rate ranging from 0 to 1000  $\text{s}^{-1}$ . The data were fitted with the Power Law's Model, according to Equation 4.3.

$$\sigma = K \cdot \gamma^n \quad (4.3)$$

where  $\sigma$  (Pa) is the shear stress,  $\gamma$  ( $\text{s}^{-1}$ ) is the shear rate,  $n$  (-) is the flow behavior index and  $K$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ) is the consistency index.

#### 4.2.4 Production of biopolymer beads

The biopolymer beads were obtained from extrusion of emulsions over a 150 mM CaCl<sub>2</sub> aqueous solution (Vilela, Perrechil, Picone, Sato, & Cunha, 2015). The volume of CaCl<sub>2</sub> solution was x10 of emulsion volume. A 0.7 mm diameter nozzle (Labmaq do Brazil Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) performed the emulsion atomization, using a pumping flow rate of 3 mL/min (Masterflex Computadorized Drive, Vernon Hills, Illinois, USA). An airflow of 848 mL/min generate the drag force on nozzle. The height between the atomizer nozzle and surface of CaCl<sub>2</sub> solution was fixed at 20 cm. The biopolymer beads were maintained under magnetic stirring in CaCl<sub>2</sub> solution for 30 min in order to complete the ionic gelation. A washing step with distilled water and filtration finished the production of beads.

#### 4.2.5 Characterization of beads

##### 4.2.5.1 Encapsulation Efficiency

The encapsulation efficiency (EE) was achieved by releasing of the wheat germ oil in sodium citrate aqueous solution 7% w/w. A magnetic stirrer at 450 rpm kept biopolymer beads under agitation, at 60 °C, in a period of 60 minutes. After, the methodology described by Bligh and Dyer (1959) was performed to oil extraction. Equation 4.4 evaluated the encapsulation efficiency from weighted released oil.

$$EE = \frac{\text{Released oil (g)}}{\text{Initial oil (g)}} \times 100 \quad (4.4)$$

##### 4.2.5.2 Characterization of size distribution

To determine the mean diameter of beads, they were first observed under an optical microscope Multizoom AZ100 (Nikon, Tokyo, Japan) with 10x magnification. The images were recorded with a DS-Ri1 camera (Nikon, Tokyo, Japan) and analyzed with an image-processing program (ImageJ, Fiji) to determine diameter parameters. More than 500 beads were evaluated. The mean diameter of the biopolymer beads was expressed as the volume-weighted mean diameter,  $D_{[4,3]}$  (Equation 4.1), while the Span was calculated from Equation (4.2), as presented in section 4.2.3.1.

#### 4.2.5.3 Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR)

Functional groups of the biopolymer beads were analyzed by Fourier transform infrared spectrometry (Nicolet 6700, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The freeze-dried samples were mixed with KBr and pressed into pellets. Spectra were analyzed from ranged from 400 to 4000  $\text{cm}^{-1}$ , under transmission mode, taking 32 scans per experiment, with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.5.4 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

CLSM was used in order to observe the distribution of the oil droplets in the emulsions and the beads. The oil used to produce the emulsions and the biopolymer beads was labeled with the Nile Red dye at a concentration of 0.002 g / 100 g of oil. The samples were examined under a Zeiss LSM 780-NLO confocal Axio Observer Z.1 microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) with a 10x objective. The 514-nm laser line was used to excite the dye; 527–728 nm emission filters were employed. The pinholes were set to 1 airy unit for each channel, 1024 x 1024 image format, and 1x and 2x optical zoom. For the emulsions, the images were acquired in the same way by using a 63x objective.

#### 4.2.5.5 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The samples were prepared for SEM according to the methodology described by Vilela, Cavallieri, and Cunha (2011), with some modifications. The beads were produced in greater size, of approximately 5 mm. The gel was fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer of 0.1 M (pH 7.2), in order to minimize structure modification during the subsequent drying treatment. The fixed samples were fractured under liquid nitrogen and placed in 1% osmium solution in cacodylate buffer of 0.1 M to fix the oil, where they were maintained for 2 hours. Then, the samples were rinsed twice with cacodylate buffer. They were dehydrated in graded ethanolic series (30%, 50%, 70% and 90%). Dehydration was continued in 100% ethanol, followed by critical point drying (Balzers Critical Point Dryer CPD03, Cambridge, Massachusetts, USA). The dried samples were mounted on aluminum stubs and coated with gold-palladium alloy, in a sputter deposition system (Balzers Sputter Coater SCD 050, Cambridge, Massachusetts, USA). Images of the typical structures of each gel were obtained at a magnification of 2500 $\times$ , using a JEOL JSM 5800 LV (Tokyo, Japan) operated at 10 kV.

#### 4.2.6 Accelerated stability test of biopolymer beads

The stability of wheat germ oil beads was tested under accelerated storage condition, according to Menin et al. (2018), with some modifications. Beads were incubated in a desiccator with saturated KCl solution to ensure approximately 80% of moisture control (Greenspan, 1977). The desiccator was stored in a forced-air oven (MA-035/2, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil), at 65 °C, for 6 days. One day represents approximately one month of storage at room temperature. Samples were removed after 0, 1, 3 and 6 days and the oil was extracted by breaking the beads with sodium citrate solution, under magnetic stirrer at 450 rpm, for 60 minutes, and then, the methodology described by Bligh and Dyer (1959) for oil extraction was performed. The stability were evaluated in relation to the peroxide values (PV) and tocopherols amount.

##### 4.2.6.1 Peroxide value (PV)

Peroxide value (PV) of the oil extracted from beads was determined spectrophotometrically. 0.1 mL of oil was mixed to 9.8 mL of a chloroform/methanol (7:3 v/v) solution and 50 µL of iron II solution, followed by 50 µL of ammonium thiocyanate solution, and the mixture was incubated in the dark during exactly 5 minutes to absorbance measurements at 500 nm in a spectrophotometer Unico SpectroQuest 2800 UV/Vis (United Products & Instruments Inc., Dayton, New Jersey, USA). A Fe<sup>+3</sup> standard curve with iron concentration varying from 0 to 40 µg was performed, as described by Shantha and Decker (1994), to determine hydroperoxide concentrations.

##### 4.2.6.2 Tocopherols amount

Tocopherols amount of oil was determined according to the methodology described by Gliszczyńska-Świąło and Sikorska (2004). 0.1 g of oil were diluted in 1 mL of 2-propanol and passed through polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filters (0.22µm) into glass vials. Tocopherols identification in the samples was performed using a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Dionex liquid chromatograph (Ultimate 3000 Standard LC, Sunnyvale, California, USA) with a diode array detector. The column used was reversed phase C18 column (Poroshell 100 x 4.6 mm, particle size 2.7 µm, Agilent, Santa Clara, California, USA), and sample volume injected was 10 µL. Tocopherols are detected using fluorescence detector set at excitation and emission wavelength 295 nm and 325 nm. The mobile phase was a mixture of acetonitrile/methanol (1:1 v/v), and the flow rate was 1 mL.min<sup>-1</sup>. Quantification

was performed using the software Chromeleon 6.8, and a calibration curve ( $R^2=0.9984$ ) was prepared with tocopherols concentration. Tocopherols concentration was expressed as mg tocopherols/g oil. The external standard used to the quantification was a mixed of tocopherols.

#### 4.2.7 Statistical analysis

The measurements were performed in triplicate. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.). The significance of difference was calculated by ANOVA, by Tuckey's test, and values  $< 0.05$  were considered to be significant. The software used was Excel.

### 4.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 4.3.1 Characterization of emulsions

##### 4.3.1.1 Droplet size, zeta potential and morphology of emulsions

The o/w emulsions presented droplets size ranging from ( $4.5 \pm 0.3$  to  $12.2 \pm 0.5$ )  $\mu\text{m}$ , with Span values between  $1.9 \pm 0.1$  to  $4.9 \pm 0.1$  (Table 4.2). The increase in gelatinized starch concentration in emulsions promoted a significant rise in the values of the parameters (D [4,3] and Span).

Table 4.2. Consistency index (Pa.s), flow behavior index, oil droplet size (D[4,3]) ( $\mu\text{m}$ ), span and zeta potential values (mV) of emulsions produced with different alginate and gelatinized corn starch ratios.

	<b>k (Pa.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>D<sub>[4,3]</sub> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Span</b>	<b>Zeta Potential (mV)</b>
A2S0	$16.0^a \pm 0.1$	$0.431^d \pm 0.001$	0.9927	$4.5^b \pm 0.3$	$1.9^c \pm 0.1$	$-92^c \pm 3$
A1S1	$2.33^d \pm 0.03$	$0.563^a \pm 0.001$	0.9980	$5.5^b \pm 0.7$	$1.9^c \pm 0.1$	$-71^b \pm 2$
A1S2	$3.9^c \pm 0.3$	$0.543^b \pm 0.006$	0.9986	$12.2^a \pm 0.5$	$6.8^a \pm 0.1$	$-68^{ab} \pm 2$
A1S4	$9.5^b \pm 0.5$	$0.459^c \pm 0.006$	0.9975	$11.26^a \pm 0.06$	$4.8^b \pm 0.1$	$-67^a \pm 2$

<sup>a-d</sup> Different letters in each column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

A2S0 (Figure 4.1 (I)), and A1S1 (Figure 4.1 (J)) emulsions exhibited similar droplet size distribution, with two peaks. The highest peak, approximately at the 5  $\mu\text{m}$  mark, corresponds to the larger oil droplets; the lower shoulder, approximately at 2  $\mu\text{m}$ , refers to the smaller oil droplets. These two emulsions showed no statistically different span values (Table



4.2) and displayed the lowest polydispersity degree. Among the emulsions, A1S2 ( $D [4,3] = (12.2 \pm 0.5) \mu\text{m}$  and  $\text{Span} = (6.8 \pm 0.1)$ ) and A1S4 ( $D [4,3] = (11.26 \pm 0.06) \mu\text{m}$  and  $\text{Span} = (4.8 \pm 0.1)$ ) presented the highest values of droplet dimensions and polydispersity. The size distribution for these formulations exhibited bimodal behavior (Figure 4.1 (K, L)). The droplet size distribution of emulsion A1S2 shows one minor peak with a lower volume ( $\leq 2\%$ ) and larger droplets diameters (approximately  $30 \mu\text{m}$ ), and one predominant peak with larger volume (around 5%) and small droplets sizes around  $5 \mu\text{m}$  (Figure 4.1 (K)). Similar behavior can be observed for the A1S4 emulsion (Figure 4.1 (L)), in which the highest peak presents a volume of approximately 4% ( $5 \mu\text{m}$ ), and a lower peak with a volume of 2% ( $30 \mu\text{m}$ ). In both formulations, the predominant peak expresses the oil droplets, and the minor peak represents insoluble structures created in the gelatinization process. With excess of water and high temperatures, starch granules swell and the amylose and amylopectin chains are released from granules, leaving only insoluble structure, known as “ghosts” (Gómez-Luría et al., 2019). Into the swollen granules, double helices are formed from amylose and amylopectin chains and crosslinked, creating the ghosts (Debet & Gidley, 2007).

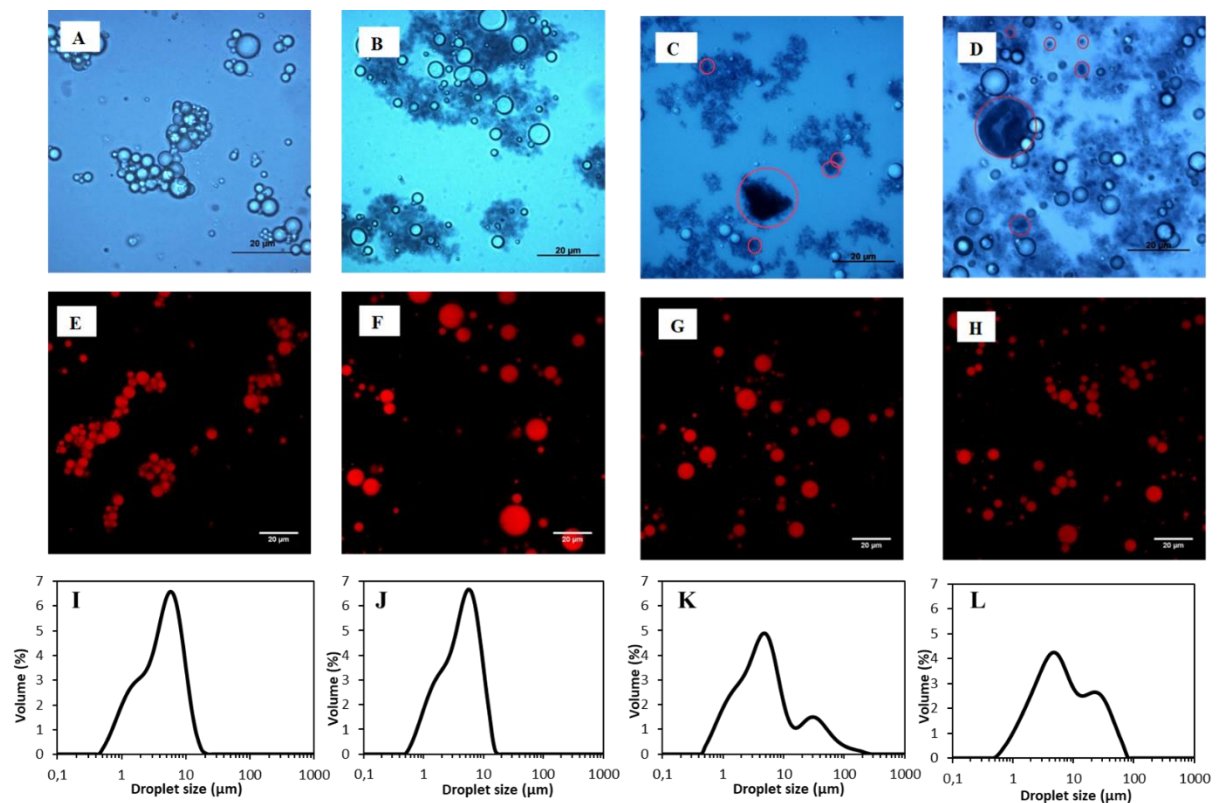


Figure 4.1. Optical (A-D), and CLSM (E-H) micrographs, and size distribution (I-L) of emulsions produced with different proportions of alginate and starch. (A, E, I): A2S0 (2:0); (B, F, J): A1S1 (1:1); (C, G, K): A1S2 (1:2); (D, H, L): A1S4 (1:4). Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

Optical microscopic images show some “clouds” around the oil droplets in emulsions containing gelatinized corn starch (Figure 4.1 (B, C, and D)). On the gelatinization process, during the homogenization, granules break down and amylose is released to the disperse phase. When it is in contact with oil, the small “clouds” surround the droplets, decreasing the interfacial tension, and preventing the coalescence droplets (Gómez-Luría et al., 2019). This behavior was reported by Yulianingsih and Gohtani (2019), that evaluated the properties of gelatinized waxy rice starch in emulsion stabilization, and by Meng, Ma, Sun, Wang, and Liu (2014), that reported that the amylose released from starch granules formed complex particles with palmitic acid. The interaction between amylose and lipids have been reported by several authors (Gelders, Goesart, & Delcour, 2006; Morrison, Law, & Snape, 1993). Due to this interaction, the emulsion with no amount of starch presented more agglomerated oil droplets, while in the emulsion containing starch, oil droplets are more dispersed, as can be observed in optical and CLSM images (Figure 4.1 (A-H)).

Emulsions (with and without starch) showed highly electronegative values for zeta potential, ranging from  $-67 \pm 2$  to  $-92 \pm 3$  (Table 4.2), which contributed to the electrostatic stability, since systems with zeta potential values of  $\geq |30|$  mV are considered highly stable (Cano-Sarmiento et al., 2018). Alginate is the main agent responsible for the high negative charge present in the emulsions, promoting stability by a decrease of the interfacial tension on the oil droplet and increase of steric forces (Silva, Carvalho, Rabelo, & Hubinger, 2019). The substitution of 50% (g/100g) of alginate by gelatinized corn starch (A1S1) promoted a significant decrease in the electronegativity of the systems. This behavior may be related to the adsorption of the amylose molecules onto the droplet interface, as well as the interaction with the alginate molecules. Amylose has a flexible molecular structure that allows the oil droplets to be enveloped, as a film (Weissenborn, 1996). This ability was shown to be relevant in preventing the instability mechanism (coalescence) in emulsions, as can be seen in the morphological images (Figure 4.1 (A-H)). The increase in gelatinized starch concentration from 25% to 40% (A1S2) and 57.1% (A1S4) presented a significant difference in the reduction of electronegativity. However, this decrease is less expressive when compared to that shown by the A1S1 emulsion. Therefore, it can be inferred that increasing the concentration to 40% and 57.1% saturates the droplet interface. Negative charges of the emulsions prepared herein indicated that the sodium alginate had more influence on the continuous phase, regardless of the added quantity of gelatinized starch.

#### 4.3.1.2 Flow behavior

Rheological measurements indicate that all the emulsions with and without gelatinized corn starch exhibited pseudoplastic behavior, with shear-thinning properties, since Power Law's Model revealed  $n$  values lower than 1 (Table 4.2). The same behavior was observed for emulsions stabilized with 7-28 g/100g of corn starch treated under high pressure and for emulsions stabilized with 3-5 g/100g OSA-rice starches (Song, Pei, Zhu, Fu, & Ren, 2014; Villamonte et al., 2016). The emulsions had distinct  $n$  values at confidence level of 95 % ( $\alpha=0.05$ ). The emulsion A2S0 presented the lowest  $n$  value and, for emulsions containing gelatinized starch, the  $n$  value decreased with proportional increases in the concentration of the gelatinized starch (Dzuy Nguyen et al., 1998). A2S0 had the highest consistency index ( $k$ ). High concentrations of sodium alginate generate high  $k$  values (Belalia & Djelali, 2014). A1S1 presented  $k$  value more than 6 times lower than A2S0 (Table 4.2), showing that the replacing part of sodium alginate by gelatinized corn starch decreased the viscosity of the emulsion.

### 4.3.2 Characterization of biopolymer beads

#### 4.3.2.1 Encapsulation Efficiency, size and microstructure

Results of the biopolymer beads encapsulation efficiency (EE), and size are shown in Table 4.3.

Table 4.3. Encapsulation efficiency (%), mean diameter ( $\mu\text{m}$ ) and span of biopolymer beads produced with different alginate and gelatinized corn starch ratios.

Beads	Encapsulation Efficiency (%)	D[4,3] ( $\mu\text{m}$ )	Span
Beads A2S0	95.3 <sup>a</sup> ±1.3	797.4 <sup>a</sup> ±69.7	0.7 <sup>b</sup> ±0.1
Beads A1S1	93.5 <sup>a</sup> ±3.5	383.2 <sup>c</sup> ±15.0	1.9 <sup>a</sup> ±0.3
Beads A1S2	91.5 <sup>a</sup> ±1.0	596.0 <sup>b</sup> ±104.2	1.6 <sup>ab</sup> ±0.2
Beads A1S4	92.0 <sup>a</sup> ±2.0	572.6 <sup>b</sup> ±5.4	1.8 <sup>ab</sup> ±0.7

<sup>a-c</sup> Different letters in each column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

A2S0 beads presented 95.3% of EE, while the A1S1, A1S2 and A1S4 biopolymer beads presented 93.5%, 91.5%, and 92.0% of EE, respectively, and did not show any significant differences between themselves ( $p > 0.05$ ). Studies using alginate matrix to encapsulate oils showed similar results of high EE (Aguilar et al., 2015; Bannikova, Evteev, Pankin,

Evdokimov, & Kasapis, 2018; Comunian et al., 2017; Soliman, El-Moghazy, Mohy El-Din, & Massoud, 2013; Tello et al., 2015), confirming that ionic gelation is an efficient method for encapsulation of lipid materials, due to the matrix ability to retain core material. Moreover, the replacement of one part of alginate by one part of starch has not changed the encapsulation efficiency of beads, since A2S0 and A1S1 showed no significant difference ( $p > 0.05$ ). Thus, increases in the starch concentration did not alter the EE of the beads.

Table 4.3 displays the particle size for all the beads. The biopolymer A2S0 beads had the biggest size, which was related to the higher apparent viscosity of the emulsion,  $k = (15.97 \pm 0.06) \text{ Pa}\cdot\text{s}$  (Section 3.1.1). These beads presented the narrowest range of diameters, with  $\text{span} = 0.7$ . This value differed significantly from those obtained for the other beads prepared in this work ( $p < 0.05$ ).

The  $D_{[4,3]}$  mean diameter of biopolymer beads prepared from emulsions A1S2 and A1S4 were similar. Both biopolymer beads presented a wide range of diameters (Table 4.3), with span values of 1.6 and 1.8, respectively. The A1S1 beads presented the smallest  $D_{[4,3]}$ , with value of  $(383.22 \pm 15.05) \mu\text{m}$ , more than twice as small as the biopolymer A2S0 beads, that contains the same amount of polymers, but which emulsion has higher viscosity. The mean diameters of the biopolymer beads were directly related to the viscosity of the emulsions. The bead size increased in direct proportion to the increase in the emulsion viscosities. Davarcı, Turan, Ozelik, and Poncelet (2017) varied the viscosities of alginate solutions in order to study the properties of the respective beads, reporting that the alginate beads increased in size when the viscosity of the alginate solution increased.

The microstructure of the biopolymer beads was analyzed by micrographs obtained by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and by scanning electron microscopy (SEM), presented in Figure 4.2. To obtain CLSM micrographs, the oil was stained with Nile red before the production of the beads.

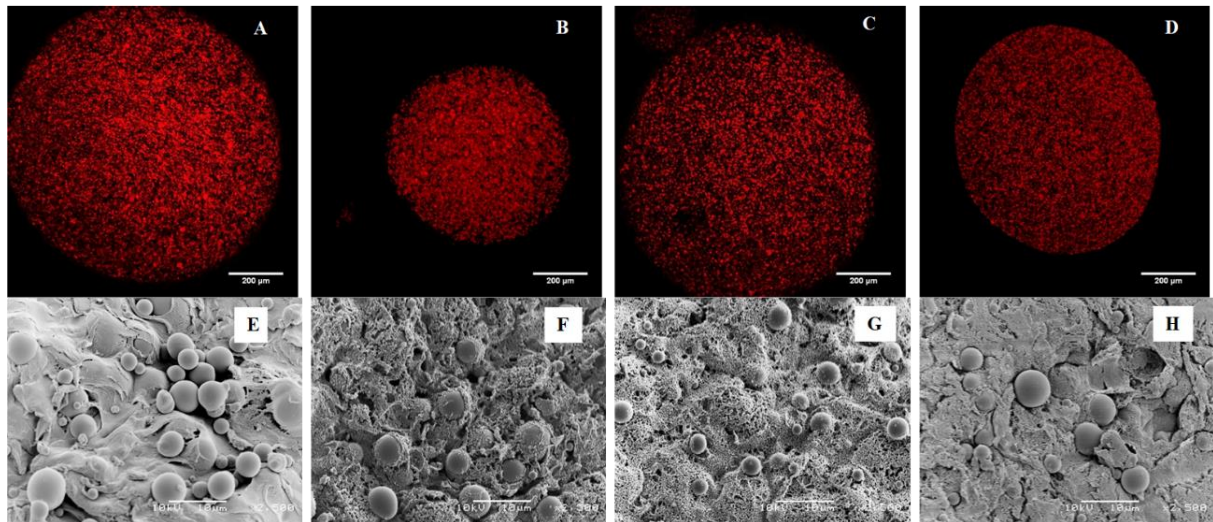


Figure 4.2. CLSM (A-D) and SEM (E-H) micrographs of beads with different proportions of alginate and starch. (A, E): A2S0 (2:0); (B, F): A1S1 (1:1); (C, G): A1S2 (1:2); (D, H): A1S4 (1:4). Scale bar: (A-D): 200  $\mu\text{m}$ ; (E-H); 10  $\mu\text{m}$ .

SEM images showed the internal structure of the beads, since they were broken for analysis. From CLSM (Figure 4.2 (A, B, C, D)) and SEM (Figure 4.2 (E, F, G, H)) images, it can be observed that the oil is dispersed in the alginate and in the alginate-starch matrix, confirming that the wheat germ oil was encapsulated inside the matrix. Microencapsulation of compounds by ionic gelation technique usually generates capsules with the core material distributed throughout the matrix, which are called microspheres (Bakry et al., 2016).

By analyzing SEM images and correlating them to their respective emulsions, it can be observed that the beads without starch, A2S0 presented agglomerated oil droplets, the same behavior observed for the emulsion. However, the behavior was different from that of the emulsions containing gelatinized starch and of their corresponding beads, which presented more dispersed oil droplets.

A2S0 beads, produced only with alginate showed a more compacted microstructure, due the higher amount of carboxyl groups of sodium alginate, in relation to the other formulations, that binds to the calcium ions and forms a tridimensional network (Grant, Morris, Rees, Smith, & Thom, 1973; Singh, Sharma, & Gupta, 2009). A1S1 exhibited a homogeneous microstructure, with a small content of pores, due to the complex matrix formed by the binding of starch molecules with the carboxyl groups of alginate (Khlibsuwan et al., 2018; Shi & Bemiller, 2002). The microstructure of A1S4 beads is more compacted than the other beads produced with gelatinized starch, due to the high amount of polymers in its formulation (71.4%), and A1S2 beads presented a more porous matrix and apparently weaker than the other microstructure beads.

#### 4.3.2.2 Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) is a technique that assigns absorption or transmittance bands in relation to functional groups. From the bands generated in the spectra, it is possible to identify molecular structures (Rohman & Man, 2010). Since it is important to know, in this study, the complex formation and interaction between functional groups of the wall material (alginate and gelatinized corn starch) and the core material (wheat germ oil), this technique was employed. Figure 4.3 exhibits the spectra of native corn starch, of alginate and of the biopolymer beads produced with different concentrations of gelatinized corn starch and alginate.

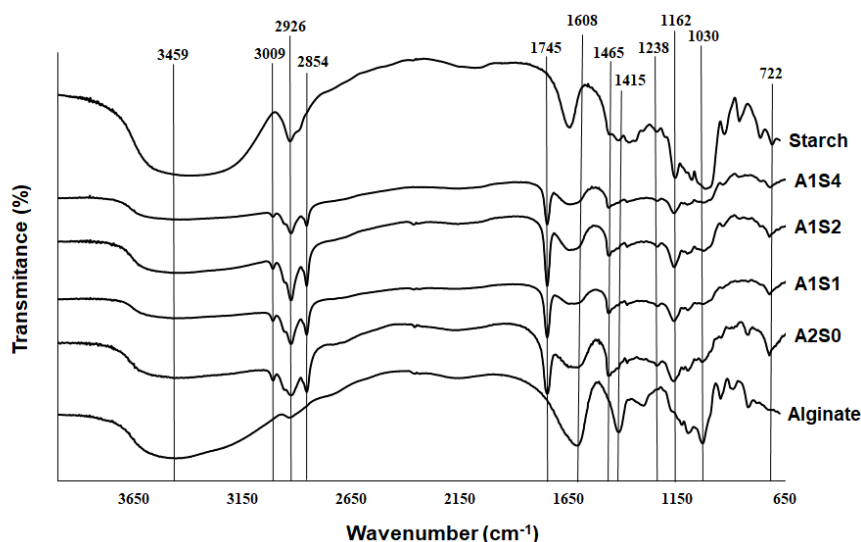


Figure 4.3. FTIR spectra of biopolymer beads produced with different alginate and gelatinized corn starch ratios.

Alginate presented peaks at  $3459\text{ cm}^{-1}$ , related to OH- stretching (hydroxyl), at  $2935\text{ cm}^{-1}$ , related to stretching of CH, at both  $1608\text{ cm}^{-1}$  and  $1415\text{ cm}^{-1}$ , assigned to asymmetric and symmetric COO-, respectively (Lawrie et al., 2007). The band at  $1030\text{ cm}^{-1}$ , related to antisymmetric stretching of C-O-C, is given by guluronic units (Pereira, Sousa, Coelho, Amado, & Ribeiro-Claro, 2003). In the spectra of the beads, the intensity of the peaks related to COO- and the peak at  $1030\text{ cm}^{-1}$  decreased when compared to the same peaks obtained for the alginate powder. This occurs due to the reticulation of alginate with calcium ions. The COO- bands are indicative of an ionic bonding between carboxyl groups of alginate and calcium ions and the C-O-C band indicates that there was a partial covalent bonding between calcium and the oxygen atom of ether groups (Bekhit, Sánchez-González, Ben Messaoud, & Desobry, 2016).

In all the obtained spectra for the beads, it is observed that peaks related to wheat germ oil do not exist in the alginate and starch spectra. The band at  $1745\text{ cm}^{-1}$  is characteristic

of the ester carbonyl functional group of triglyceride ( $\text{-C=O}$ ), while the bands around  $1162\text{ cm}^{-1}$  and  $1238\text{ cm}^{-1}$  are typical of the stretching vibration of  $\text{-C-O}$  ester groups. The peaks at  $2926\text{ cm}^{-1}$  and  $2854\text{ cm}^{-1}$  are related to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of  $\text{-CH}_2$  group (methylene), respectively. The band around  $1465\text{ cm}^{-1}$  refers to the bending vibrations of the  $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3$  aliphatic groups. The peak exhibited at  $722\text{ cm}^{-1}$  is characteristic of the overlapping of the rocking vibration of  $\text{CH}_2$  and the out-of plane vibration of *cis*-disubstituted olefins (Rohman & Man, 2010; Vlachos et al., 2006). The transmittance at  $3009\text{ cm}^{-1}$  is related to the C-H stretching vibration of the *cis*-double bond. This transmittance value indicates a high content of linoleic acid, present at the wheat germ oil. When this band appears at  $3006\text{ cm}^{-1}$ , it indicates that there is a high content of oleic acid (Guillén & Cabo, 1997). The presence of characteristic peaks of wheat germ oil in the beads' spectra confirmed that the oil did not interact with either the alginate or the starch, showing that these matrixes are adequate to encapsulate this hydrophobic core.

### 4.3.3 Accelerated stability test

Beads stability were evaluated in relation to amount of tocopherols and the peroxide values (PV) during the storage for 6 days at  $65\text{ }^\circ\text{C}$  (Table 4.4). In relation to the peroxide values, the oil extracted from beads did not show significant difference in comparison to the bulk oil on days 0, 1, and 3 of storage. On the sixth day of storage, the oil extracted from A1S1 and A1S4 showed lower values of PV than bulk oil, and oil from A2S0 and A1S2 beads. Comparing the beads containing the same proportion of biopolymers (A1S1 and A2S0), the presence of starch generated greater protection to the oil, probably due to the mixed network formed by alginate and gelatinized corn starch. Amylose chains of starch form double-helical associations, interacting with carboxyl groups of alginate (Khlibsuwan et al., 2018; Shi & Bemiller, 2002). The branched-chain of amylopectin, that has numerous contact points, also binds to alginate molecules, creating a more complex matrix network (Khlibsuwan et al., 2018). The oil from A1S2 beads exhibited high PV ( $7.03\text{ meq.O}_2/\text{kg oil}$ ). This formulation presented higher starch amount than alginate, creating a less resistant matrix, since the only alginate has carboxylate anions that bind to the calcium ions of crosslinking agent, forming a strong tridimensional network (Grant et al., 1973; Singh et al., 2009). The weakening of the matrix probably allowed greater exposure of the entrapped oil to high temperatures and oxygen after 6 days of storage. The oil obtained from A1S4 beads presented PV statistically equal to the oil from A1S1. This has occurred due to the higher biopolymers and oil ratio of the A1S4 beads as compared to the other formulations, which provided greater protection against oxidation to the encapsulated oil.

Table 4.4. Tocopherols amount (mg/g oil) and peroxides value (PV) (meq. O<sub>2</sub>/kg oil) of bulk oil and oil extracted from the beads during the storage time.

Beads	Tocopherols (mg/g oil)				Peroxides value (PV) (meq. O <sub>2</sub> /kg oil)			
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 6	Day 0	Day 1	Day 3	Day 6
Oil	3.54 <sup>a</sup> ±0.13	2.70 <sup>a</sup> ±0.16	2.19 <sup>a</sup> ±0.24	0.23 <sup>b</sup> ±0.1	1.21 <sup>a</sup> ±0.05	1.53 <sup>a</sup> ±0.06	2.53 <sup>a</sup> ±0.08	6.46 <sup>a</sup> ±0.61
A2S0	2.58 <sup>b</sup> ±0.40	1.75 <sup>c</sup> ±0.02	0.81 <sup>c</sup> ±0.08	0.16 <sup>b</sup> ±0.05	1.21 <sup>a</sup> ±0.07	1.55 <sup>a</sup> ±0.15	2.52 <sup>a</sup> ±0.85	8.58 <sup>a</sup> ±1.30
A1S1	2.59 <sup>b</sup> ±0.06	2.11 <sup>b</sup> ±0.1	1.55 <sup>b</sup> ±0.24	0.66 <sup>a</sup> ±0.19	1.24 <sup>a</sup> ±0.04	1.31 <sup>a</sup> ±0.09	1.76 <sup>a</sup> ±0.39	2.52 <sup>b</sup> ±0.93
A1S2	2.78 <sup>b</sup> ±0.53	1.83 <sup>c</sup> ±0.07	0.96 <sup>c</sup> ±0.12	0.13 <sup>b</sup> ±0.05	1.07 <sup>a</sup> ±0.11	1.65 <sup>a</sup> ±0.29	2.10 <sup>a</sup> ±0.21	7.03 <sup>a</sup> ±0.42
A1S4	2.3 <sup>b</sup> ±0.07	1.70 <sup>c</sup> ±0.00066	0.86 <sup>c</sup> ±0.06	0.079 <sup>b</sup> ±0.02	1.22 <sup>a</sup> ±0.05	1.42 <sup>a</sup> ±0.45	1.65 <sup>a</sup> ±0.02	3.50 <sup>b</sup> ±0.36

<sup>a-c</sup> Different letters in the same day of storage indicate significant differences (p<0.05).  
Alginate:corn starch ratios: 2:0 (A2S0); 1:1 (A1S1); 1:2 (A1S2); 1:4 (A1S4).



Although on day 0 the peroxide values were the same for all samples, the bulk oil presented higher amount of tocopherols than oil extracted from beads. It occurred because during the oil encapsulation and extraction process, the oil goes to several processes, which probably initiates its oxidation and the release of free radicals (Karaca, Low, & Nickerson, 2013). The tocopherols present in the oil have the ability to donate hydrogen to free radicals, resulting in a decrease in the tocopherols in the oil and preventing an increase in the peroxide values (Budilarto & Kamal-Eldin, 2015; Chaiyasit, Elias, McClements, & Decker, 2007; Kumar & Krishna, 2013; Ramalho & Jorge, 2006).  $\alpha$ -tocopherols were the first to be degraded and were detected only in the bulk oil on the day 0 ( $0.66\pm 0.09$  mg/g oil), since they are less stable than  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ -tocopherols (Lampi & Kamal-Eldin, 1998; Yoshida, Tatsumi, & Kajimoto, 1991). On days 1 and 3, the content of tocopherols remained higher to bulk oil (Table 4.4), but the percentage of remaining tocopherols in relation to day 0 was high for both bulk oil and oil extracted from A1S1 beads (Figure 4.4 a). After 6 days of storage, both the content of total tocopherols (Table 4.4) and the percentage of remaining tocopherols (Figure 4.4 a) were higher to oil extracted from A1S1 beads than to bulk oil and oil extracted from other beads. During the storage,  $\delta$ -tocopherols presented higher percentage of remaining tocopherols than  $\beta$ - $\gamma$ -tocopherols (Figures 4.4b and 4.4c), indicating that  $\delta$ -tocopherols are the most stable isomer. This result corroborates with other studies (Lampi & Kamal-Eldin, 1998; Yoshida et al., 1991).

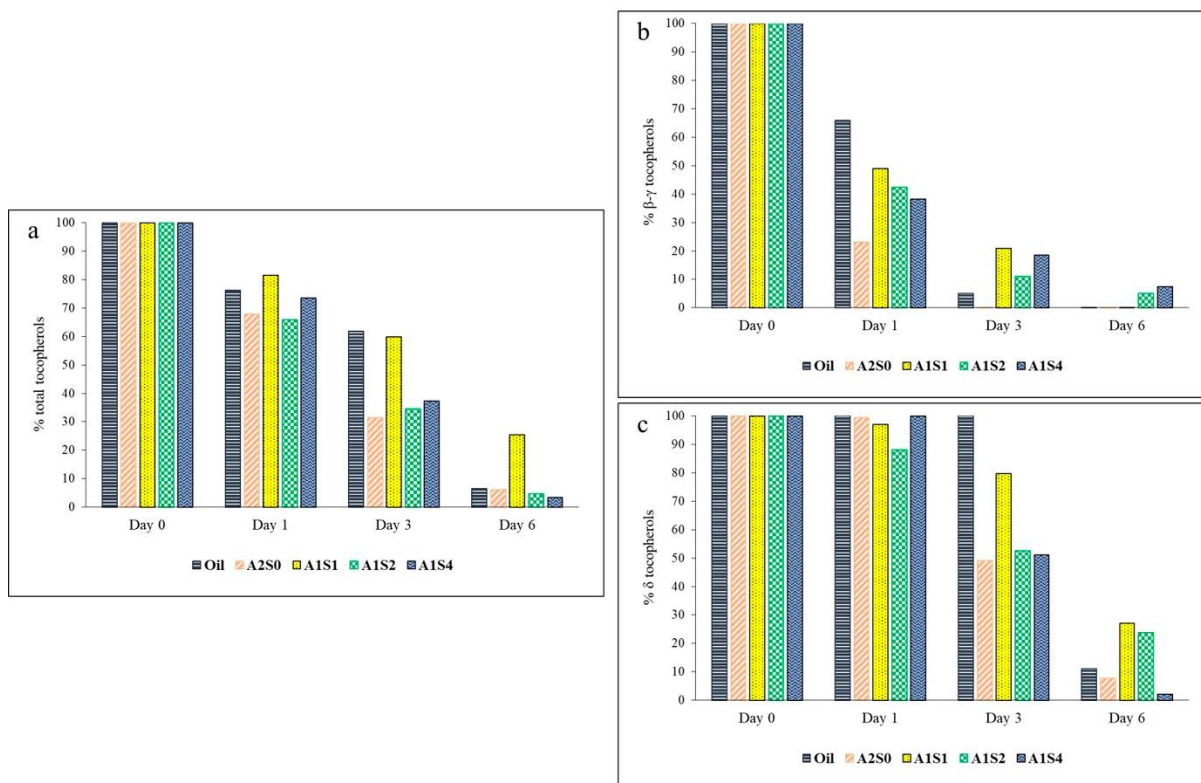


Figure 4.4. Amount of remaining tocopherols during the storage. (a) Total tocopherols; (b)  $\beta$ - $\gamma$ -tocopherols; (c)  $\delta$ -tocopherols.

#### 4.4 CONCLUSIONS

The presence of gelatinized starch on the emulsions allowed a better encapsulation of oil droplets and kept them more dispersed in the matrix as compared to the emulsions produced with sodium alginate only. The same behavior was observed in the corresponding beads. Results from the encapsulation efficiency and FTIR showed that the encapsulation of oil in the beads has not changed with the replacement of part of the sodium alginate by different amounts of gelatinized starch. The proportion of gelatinized starch used in the production of the beads influences on their microstructure and on the stability in relation to oxidation and content of tocopherols. After 6 days of storage at 65 °C, beads with 0%, 40% and 57.1% starch did not present difference in relation to the tocopherols, while beads with 25% starch showed greater retention of the compound. Oil from beads with 25% and 57.1% starch were less oxidized than the oil from the other beads. The combination of equal parts of alginate and gelatinized corn starch to wheat germ oil microencapsulation showed better results than beads formed by alginate matrix only.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to FAPESP (2015/11984-7), CNPq (304475/2013-0) and CAPES with Finance Code 001 for the financial support, and for CNPq (142661/2015-5) by fellowships support. We thank National Institute of Science and Technology on Photonics Applied to Cell Biology (INFABIC) at the State University of Campinas by used the Confocal Laser Scanning Microscopy, which it is co-funded by FAPESP (08/57906-3) and CNPq (573913/2008-0).

**REFERENCES**

- Aguilar, K. C., Tello, F., Bierhalz, A. C. K., Garnica Romo, M. G., Martínez Flores, H. E., & Grosso, C. R. F. (2015). Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. *Journal of Food Engineering*, *154*, 17–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.12.020>
- Azizi, M., Kierulf, A., Lee, M. C., & Abbaspourrad, A. (2018). Improvement of physicochemical properties of encapsulated echium oil using nanostructured lipid carriers. *Food Chemistry*, *246*, 448–456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.009>
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(1), 143–182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Balanč, B., Kalušević, A., Drvenica, I., Coelho, M. T., Djordjević, V., Alves, V. D., ... Bugarski, B. (2016). Calcium – Alginate – Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract. *Journal of Food Science*, *81*(1), 65–75. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13167>
- Bannikova, A., Evteev, A., Pankin, K., Evdokimov, I., & Kasapis, S. (2018). Microencapsulation of fish oil with alginate : *In vitro* evaluation and controlled release. *LWT - Food Science and Technology*, *90*, 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.045>
- Bekhit, M., Sánchez-González, L., Ben Messaoud, G., & Desobry, S. (2016). Design of microcapsules containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in alginate shell and xanthan gum with nutrients core. *LWT - Food Science and Technology*, *68*, 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.037>
- Belalia, F., & Djelali, N. (2014). Rheological properties of sodium alginate solutions. *Academia Română - Revue Roumaine de Chimie*, *59*(2), 135–145.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bramley, P. M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. J., Manios, Y., Roxborough, H. E., ... Wagner, K. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 913–938.

- Budilarto, E. S., & Kamal-Eldin, A. (2015). The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *117*, 1095–1137. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400200>
- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D. I., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M., Figueroa-Hernández, C. Y., García-Armenta, E., ... Gutiérrez-López, G. F. (2018). Zeta Potential of food matrices. *Food Engineering Reviews*, *10*, 113–138. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9176-z>
- Chaiyasit, W., Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*(3), 299–317. <https://doi.org/10.1080/10408390600754248>
- Chang, C. P., & Dobashi, T. (2003). Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *32*(3), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.07.002>
- Comunian, T. A., Ravanfar, R., de Castro, I. A., Dando, R., Favaro-Trindade, C. S., & Abbaspourrad, A. (2017). Combination of microfluidic devices, ionic gelation and phenolic compounds to improve the oxidative stability of echium oil. *Food Chemistry*, *233*, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.085>
- Davarcı, F., Turan, D., Ozcelik, B., & Poncelet, D. (2017). The influence of solution viscosities and surface tension on calcium- alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocolloids*, *62*, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.029>
- Debet, M. R., & Gidley, M. J. (2007). Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(12), 4752–4760. <https://doi.org/10.1021/jf070004o>
- Dzuy Nguyen, Q., Jensen, C. T. B., & Kristensen, P. G. (1998). Experimental and modelling studies of the flow properties of maize and waxy maize starch pastes. *Chemical Engineering Journal*, *70*(2), 165–171. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-0467\(98\)00081-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-0467(98)00081-5)
- Gelders, G. G., Goesaert, H., & Delcour, J. A. (2006). Amylose–Lipid Complexes as Controlled Lipid Release Agents during Starch Gelatinization and Pasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(4), 1493–1499. <https://doi.org/10.1021/jf051743c>
- Gliszczyńska-Świątło, A., & Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, *1048*, 195–198. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.051>

- Gómez-Luría, D., Vernon-Carter, E. J., Alvarez-Ramirez, J., & Cruz-Sosa, F. (2019). Insights of the ability of gelatinized fractions from non-chemical modified corn, rice, wheat, and waxy corn starches to stabilize O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, *89*, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.045>
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, *32*(1), 195–198. <https://doi.org/10.1002/rmv.519>
- Guillén, M. D., & Cabo, N. (1997). Infrared Spectroscopy in the Study of Edible Oils and Fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *75*, 1–11. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199709\)75:1<1::AID-JSFA842>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199709)75:1<1::AID-JSFA842>3.0.CO;2-R)
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2013). Encapsulation of flaxseed oil using a benchtop spray dryer for legume protein-maltodextrin microcapsule preparation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 5148–5155.
- Karadeniz, M., Sahin, S., & Sumnu, G. (2018). Enhancement of storage stability of wheat germ oil by encapsulation. *Industrial Crops & Products*, *114*, 14–18.
- Khlibsuwan, R., Tansena, W., & Pongjanyakul, T. (2018). Modification of alginate beads using gelatinized and ungelatinized arrowroot (*Tacca leontopetaloides* L. Kuntze) starch for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.118>
- Kumar, G. S., & Krishna, A. G. G. (2013). Studies on the nutraceuticals composition of wheat derived oils wheat bran oil and wheat germ oil. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(2), 1145–1151. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1119-3>
- Lampi, A. M., & Kamal-Eldin, A. (1998). Effect of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols on thermal polymerization of purified high-oleic sunflower triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *75*(12), 1699–1703. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0319-x>
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., & Grøndahl, L. (2007). Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, *8*(8), 2533–2541. <https://doi.org/10.1021/bm070014y>
- Margariño, M., Mateo, C. M., & Nolasco, S. M. (2015). Kinetics of Tocopherol Degradation During the Storage of Wheat Germ Oil. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *93*, 1999–2004. <https://doi.org/10.1002/cjce.22316>

- Meng, S., Ma, Y., Sun, D.-W., Wang, L., & Liu, T. (2014). Properties of starch-palmitic acid complexes prepared by high pressure homogenization. *Journal of Cereal Science*, *59*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.012>
- Menin, A., Zanoni, F., Vakarelova, M., Chignola, R., Donà, G., Rizzi, C., ... Zoccatelli, G. (2018). Effects of microencapsulation by ionic gelation on the oxidative stability of flaxseed oil. *Food Chemistry*, *269*, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.144>
- Mohammadi, N., Ehsani, M. R., & Bakhoda, H. (2018). Development of caffeine-encapsulated alginate-based matrix combined with different natural biopolymers, and evaluation of release in simulated mouth conditions. *Flavor and Fragrance Journal*, *33*(March), 357–366. <https://doi.org/10.1002/ffj.3452>
- Morrison, W. R., Law, R. V., & Snape, C. E. (1993). Evidence for Inclusion Complexes of lipids with V-amylose in maize, rice and oat starches. *Journal of Cereal Science*, *18*, 107–109. <https://doi.org/doi.org/10.1006/jcers.1993.1039>
- Okunlola, A., & Adewusi, S. A. (2019). Development of Theophylline Microbeads Using Pregelatinized Breadfruit Starch (*Artocarpus altilis*) as a Novel Co-polymer for Controlled Release. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *9*(1), 93–101. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.012>
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Osorio, C., & Nazareno, M. A. (2016). Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. *Food Chemistry*, *202*, 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.115>
- Ozcan, M. M., Rosa, A., Dessi, M. A., Marongiu, B., Piras, A., & AL-Juhaimi, F. Y. I. (2013). Quality of wheat germ oil obtained by cold pressing and supercritical carbon dioxide extraction. *Czech Journal of Food Sciences*, *31*(3), 236–240. <https://doi.org/10.17221/172/2012-CJFS>
- Pereira, L., Sousa, A., Coelho, H., Amado, A. M., & Ribeiro-Claro, P. J. A. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, *20*(4–6), 223–228. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00058-3)
- Ramalho, V. C., & Jorge, N. (2006). Atividade antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, *65*(1), 15–20.

- Rohman, A., & Man, Y. B. C. (2010). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Research International*, 43(3), 886–892. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.006>
- Sarker, B., Rompf, J., Silva, R., Lang, N., Detsch, R., Kaschta, J., ... Boccaccini, A. R. (2015). Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.061>
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77, 421-424.
- Shi, X., & Bemiller, J. N. (2002). Effects of food gums on viscosities of starch suspensions during pasting. *Carbohydrate Polymers*, 50, 7–18. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00369-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00369-1)
- Silva, K. C. G., & Sato, A. C. K. (2017). Biopolymer gels containing fructooligosaccharides. *Food Research International*, 101, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.042>
- Silva, K. F. C. e, Carvalho, A. G. da S., Rabelo, R. S., & Hubinger, M. D. (2019). Sacha inchi oil encapsulation: Emulsion and alginate beads characterization. *Food and Bioprocess Processing*, 116, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.05.001>
- Singh, B., Sharma, D. K., & Gupta, A. (2009). A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch – alginate beads to control environmental and health hazards. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.074>
- Soliman, E. A., El-Moghazy, A. Y., Mohy El-Din, M. S., & Massoud, M. A. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and *in vitro* Evaluation of Antifungal Activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3(March), 48–55. <https://doi.org/10.4236/jeas.2013.31006>
- Song, X., Pei, Y., Zhu, W., Fu, D., & Ren, H. (2014). Particle-stabilizers modified from indica rice starches differing in amylose content. *Food Chemistry*, 153, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.046>
- Song, X., Zheng, F., Ma, F., Kang, H., & Ren, H. (2020). The physical and oxidative stabilities of Pickering emulsion stabilized by starch particle and small molecular surfactant. *Food Chemistry*, 303, 125391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125391>



- Suvarna, S., Dsouza, J., Ragavan, M. L., & Nilanjana, D. (2018). Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Food Science Biotechnology*, *27*, 745–753. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0310-8>
- Tello, F., Falfan-Cortés, R. N., Martínez-Bustos, F., Martins da Silva, V., Hubinger, M. D., & Grosso, C. (2015). Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloids*, *43*, 670–678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.029>
- Vilela, J. A. P., Cavallieri, Â. L. F., & Cunha, R. L. (2011). The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate–gellan gum. *Food Hydrocolloids*, *25*(7), 1710–1718. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.03.012>
- Vilela, J. A. P., Perrechil, F. D. A., Picone, C. S. F., Sato, A. C. K., & Cunha, R. L. (2015). Preparation, characterization and *in vitro* digestibility of gellan and chitosan – gellan microgels. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.019>
- Villamonte, G., Jury, V., & de Lamballerie, M. (2016). Stabilizing emulsions using high-pressure-treated corn starch. *Food Hydrocolloids*, *52*, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.031>
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantinidou, V., Chatzilazarou, A., & Tegou, E. (2006). Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, *573–574*, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.034>
- Weissenborn, P. K. (1996). Behaviour of amylopectin and amylose components of starch in the selective flocculation of ultrafine iron ore. *International Journal of Mineral Processing*, *47*, 197–211. [https://doi.org/10.1016/0301-7516\(95\)00096-8](https://doi.org/10.1016/0301-7516(95)00096-8)
- Yazicioglu, B., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015). Microencapsulation of wheat germ oil. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(6), 3590–3597. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1428-1>
- Yoshida, H., Tatsumi, M., & Kajimoto, G. (1991). Relationship between oxidative stability of vitamin E and production of fatty acids in oils during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *68*(8), 566–570. <https://doi.org/10.1007/BF02660151>

Yulianingsih, R., & Gohtani, S. (2019). Dispersion characteristics of pregelatinized waxy rice starch and its performance as an emulsifier for oil-in-water emulsions: Effect of gelatinization temperature and starch concentration. *Food Hydrocolloids*, 95, 476–486. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.12.013>

## CAPÍTULO 5

---

ESTABILIDADE DE EMULSÕES ÓLEO/ÁGUA DURANTE O PROCESSO DE ATOMIZAÇÃO: INFLUÊNCIA DO AMIDO DE MILHO GELATINIZADO NO TAMANHO DE GOTAS DE ÓLEO

*Artigo a ser submetido em "Brazilian Journal of Food Technology"*

**ESTABILIDADE DE EMULSÕES ÓLEO/ÁGUA DURANTE O PROCESSO DE ATOMIZAÇÃO: INFLUÊNCIA DE AMIDO DE MILHO GELATINIZADO NO TAMANHO DE GOTAS DE ÓLEO**

Gabriela Feltre<sup>1\*</sup>, Gustavo C. Dacanal<sup>2</sup>, Florencia C. Menegalli<sup>1</sup>, Miriam D. Hubinger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, CEP 13083-862, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, CEP 13635-900, Brazil

### Resumo

A atomização de emulsões óleo/água para produção de partículas é amplamente utilizada na indústria alimentícia. Durante esse processo, a emulsão fica sujeita a altas taxas de cisalhamento que podem influenciar sua estabilidade e as propriedades dos produtos finais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade de emulsões contendo diferentes concentrações de alginato de sódio e amido de milho gelatinizado como fase contínua e óleo de gérmen de trigo, após o processo de atomização. Emulsões com 2% de amido gelatinizado não apresentaram mudanças quanto ao tamanho das gotas e suas propriedades reológicas. Emulsões produzidas sem amido e com 1% de amido apresentaram aumento no diâmetro médio das gotas de 44,47% e 24,45%, respectivamente, devido à coalescência das gotas, além da diminuição de sua viscosidade aparente. A diminuição do perfil viscoso nas emulsões com maiores quantidades de amido evitou o rearranjo das moléculas e a coalescência das gotas, o que ocorreu com as demais emulsões. O conhecimento do comportamento das emulsões durante o processo de atomização auxilia na definição dos melhores parâmetros do processo e das amostras, a fim de produzir partículas com propriedades específicas.

Palavras-chave: atomização, ensaios oscilatórios, viscosidade, amido de milho, alginato de sódio

## 5.1 INTRODUÇÃO

Emulsões são constituídas de dois ou mais líquidos imiscíveis, formando duas fases, uma dispersa na outra. Para dispersão dos ingredientes na fase contínua, a emulsificação é utilizada para fornecer uma interface e atuar como uma barreira. Porém, as emulsões são termodinamicamente instáveis, e há tendência de separação de fases ao longo do tempo, devido à diminuição da área de contato interfacial (McClements, Decker, & Weiss, 2007). Para a estabilidade das emulsões, são utilizados surfactantes, que são adsorvidos na superfície das gotas e formam uma camada protetora, reduzindo a tensão interfacial ou estabilizantes, que atuam aumentando a viscosidade da fase contínua, impedindo o movimento das gotas de óleo (Guzey & McClements, 2006; McClements et al., 2007).

A solução de alginato de sódio é utilizada como fase contínua de emulsões óleo/água, muitas vezes na tentativa de aumentar a estabilidade das emulsões (Artiga-Artigas, Acevedo-Fani, & Martín-Belloso, 2017; Gu, Decker, & McClements, 2004). O alginato de sódio é um polissacarídeo aniônico obtido de algas marrons e constituído de  $\beta$ -D-ácido manurônico (M) e  $\alpha$ -L-ácido gulurônico (G). Devido à sua boa compatibilidade e não toxicidade, o alginato é muito utilizado na indústria farmacêutica e de alimentos (Sarker et al., 2014).

Amidos gelatinizados de diversas fontes vem sendo estudados como um meio de alterar as propriedades físico-químicas de uma emulsão e melhorar sua estabilidade (Kasprzak, Macnaughtan, Harding, Wilde, & Wolf, 2018; Villamonte, Jury, & de Lamballerie, 2016; Wang, Luo, Chen, Fu, & Tamer, 2020). O amido é um material biodegradável, não tóxico e abundante (Herman, Remon, & De Vilder, 1989; Neelam, Vijay, & Lalit, 2012), e está distribuído na forma de grânulos, encontrados em raízes, grãos e frutas. O amido é um polissacarídeo composto por moléculas de amilose e amilopectina, com variações na cristalinidade, devido à presença de regiões cristalinas e amorfas (Singh, Singh, Kaur, Sodhi, & Gill, 2003; Waigh et al., 1997). A gelatinização do amido ocorre quando os grânulos são aquecidos na presença de água, absorvem esse solvente e incham, quebrando a estrutura cristalina irreversivelmente, gerando moléculas que se dissolvem em água (Copeland, Blazek, Salman, & Tang, 2009; Zobel, 1988).

Para microencapsular um composto por *spray drying*, *spray chilling* e gelificação iônica, as emulsões passam por uma etapa de atomização, que as submete a forças de cisalhamento e/or alongação intensas. A tensão sofrida pelas gotas da emulsão durante a formação das partículas deixam-na suscetíveis a deformações e quebras, modificando a

estrutura e propriedades da emulsão (Munoz-Ibanez, Azagoh, Dubey, Dumoulin, & Turchiuli, 2015). As propriedades das partículas produzidas por um determinado processo normalmente são relacionadas às suas respectivas emulsões, sem a consideração de que durante a passagem pelo processo de atomização, as propriedades das emulsões podem mudar devido à alta tensão de cisalhamento.

Alguns estudos observaram que no processo de *spray drying*, durante a atomização, as emulsões óleo/água sofreram mudanças na distribuição de tamanho de gotas quando foi aplicada uma alta velocidade de alimentação do fluido (Soottitantawat et al., 2005; Soottitantawat, Yoshii, Furuta, Ohkawara, & Linko, 2003). A coalescência das gotas foi observada em emulsões contendo surfactantes com baixo peso molecular e de alto peso molecular em concentrações insuficientes, quando uma tensão externa foi aplicada (Taneja, Ye, Jones, Archer, & Singh, 2013).

Alguns autores já estudaram a estabilidade de emulsões durante o processo de atomização. Munoz-Ibanez, Azagoh, Dubey, Dumoulin e Turchiuli (2015) caracterizaram o tamanho e a polidispersidade das gotas antes e depois da atomização e observaram que em algumas condições estudadas houve redução no tamanho das gotas de óleo. O trabalho concluiu que a estabilidade das emulsões durante o processo de atomização depende do tamanho inicial da gota de óleo, da energia de atomização aplicada e das viscosidades da fase dispersa e contínua. Villalobos-Espinosa et al. (2019) estudaram a influência de dois tipos de bicos atomizadores na estabilidade das emulsões preparadas por microfluidização. Os autores concluíram que o bico com geometria que forçava o fluido a uma mudança repentina em direção ao fluxo de ar gerou uma emulsão menos estável e com gotas maiores em comparação com a emulsão inicial, devido à alteração na estrutura do material de parede durante a passagem pelo bico, que expôs as superfícies das gotas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do processo de atomização com bico duplo fluido nas propriedades das emulsões produzidas com óleo de gérmen de trigo, alginato de sódio e amido de milho gelatinizado. Além disso, foi estudado o efeito do uso de amido de milho gelatinizado na estabilidade das emulsões durante o processo de atomização.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Material**

As emulsões foram preparadas usando óleo de gérmen de trigo (Midelt Quimica Ltda., Diadema, São Paulo, Brazil) com a seguinte composição de ácidos graxos: 0.16% 14:0

(ácido mirístico); 0,03% 15:0 (ácido pentadecanóico); 10,92% 16:0 (ácido palmítico); 0,10% 16:1 (ácido palmitoléico); 0,09% 17:0 (ácido margárico); 0,07% 17:1 (ácido cis-10-heptadecenóico); 3,61% 18:0 (ácido esteárico); 26,44% 18:1 (ácido oléico); 0,30% 18:2 (ácido trans t-linoléico); 51,08% 18:2 (ácido linoléico); 0,71% 18:3 (ácido trans t-linolênico); 5,17% 18:3 (ácido linolênico); 0,38% 20:0 (ácido araquídico); 0,24% 20:1 (ácido eicosenóico); 0,48% 22:0 (ácido behênico); 0,22% 24:0 (ácido lignocérico). Alginato de sódio (GRINDSTED, Alginate FD 175, ácido gulurônico > 60%) e amido de milho (AMISOL 3408, (28,46 ± 0.18)% de amilose) foram doados por Danisco Brazil LTDA (Pirapozinho, São Paulo, Brazil) e Ingredion Brazil Ingredients LTDA (Limeira, São Paulo, Brazil), respectivamente. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 5.2.2 Preparação das emulsões

As emulsões foram preparadas com solução de alginato de sódio, amido de milho gelatinizado, óleo de gérmen de trigo e água destilada. Quatro diferentes formulações foram produzidas com diferentes proporções de alginato e amido, como apresentado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Condições experimentais para as emulsões produzidas com alginato de sódio, amido de milho gelatinizado e óleo de gérmen de trigo.

Emulsão	Alginato de sódio (%)	Amido gelatinizado (%)	Óleo de gérmen de trigo (%)
A2S0	2,0	0	2,0
A1S1	1,0	1,0	2,0
A1S2	1,0	2,0	2,0
A1S4	1,0	4,0	2,0

A solução de alginato de sódio foi obtida dissolvendo-se o alginato em água destilada sob agitação magnética por 12 horas. Suspensões de amido contendo amido de milho e água destilada foram mantidas sob agitação mecânica durante 20 minutos e depois foram aquecidas até 91 °C por 40 min, processo em que ocorreu a gelatinização. As soluções de amido gelatinizado foram resfriadas até 25 °C em banho de gelo e misturadas ao óleo de germen de trigo e homogeneizadas em um rotor-stator Ultra Turrax model T18 basic (IKA, Staufen, Germany), operando a 14.000 rpm por 3 minutos. As emulsões finais foram obtidas pela adição da solução de alginato e aplicação de homogeneização por 5 minutos. Todas as emulsões foram submetidas a 8 minutos de homogeneização.



### 5.2.3 Processo de atomização das emulsões

As emulsões foram atomizadas utilizando-se um bico atomizador duplo fluido de diâmetro de 0,7 mm (Labmaq do Brazil Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) em uma taxa de escoamento de 3 mL/min, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex Computadorized Drive, Vernon Hills, Illinois, USA). Um escoamento de ar de 848 mL/min gerou a força de arraste no bico. A distância entre o bico atomizador e a superfície do recipiente utilizado para recolher a emulsão foi fixada em 20 cm. Após a atomização, as emulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho de gotas, microestrutura e propriedades de escoamento e viscoelásticas.

### 5.2.4 Tamanho e distribuição de tamanho de gotas

O diâmetro médio das gotas foi avaliado por Diâmetro de Brouckere,  $D_{[4,3]}$  (Equação 5.1). A distribuição das gotas de óleo foi determinada por um equipamento de difração a laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). As emulsões foram dispersas em água destilada e analisadas imediatamente após a preparação e atomização. Span avaliou o índice de polidispersidade (Equação 5.2).

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum n_i D_i^4}{\sum n_i D_i^3} \quad (5.1)$$

$$\text{Span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (5.2)$$

Em que  $n_i$  é o número de gotas com diâmetro  $D_i$ , and  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ , and  $D_{90}$  são as gotas de óleo com percentis 10%, 50%, and 90%, respectivamente.

### 5.2.5 Comportamento reológico

As medidas de escoamento das emulsões foram realizadas imediatamente após sua produção e atomização, utilizando-se um reômetro (AR1500ex, TA Instruments, New Castle, Delaware, USA), com geometria de placa plana (4 cm de diâmetro, com gap de 200  $\mu\text{m}$ ), a 25 °C. As curvas de escoamento foram plotadas com taxa de cisalhamento de 0 a 1000  $\text{s}^{-1}$ . Os dados foram ajustados ao modelo da Lei da Potência, de acordo com a Equação 5.3.

$$\sigma = K \cdot \gamma^n \quad (5.3)$$

Em que  $\sigma$  (Pa) é a tensão de cisalhamento,  $\gamma$  ( $s^{-1}$ ) é a taxa de cisalhamento,  $n$  (-) é o índice de comportamento reológico e  $K$  ( $Pa \cdot s^n$ ) é o índice de consistência.

### 5.2.6 Ensaios oscilatórios

Os testes oscilatórios foram realizados em um reômetro Physica MCR301 (Anton Paar, Graz, Austria); com geometria de placa plana (50 mm, com gap de 200  $\mu m$ ). As medidas foram conduzidas a 25 °C, imediatamente após terem sido preparadas e atomizadas. A região de viscoelasticidade linear foi obtida por varredura de tensão de 0,0001 a 10 Pa, a 1 Hz. As propriedades viscoelásticas foram avaliadas por varredura de frequência entre 0,1 e 10 Hz, com taxa de tensão fixa em 0,1 Pa.

### 5.2.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas a partir de triplicatas dos ensaios experimentais e a análise de variância e o teste de Tukey foram realizados para comparações médias a nível de 5% de significância.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Tamanho e distribuição de tamanho de gotas

A Figura 5.1 apresenta a distribuição de tamanho de gotas das emulsões. As formulações A2S0 e A1S1 apresentaram distribuição semelhante, unimodal, com um pico aproximadamente em 5  $\mu m$ . O span dessas duas amostras é menor que os demais, indicando baixa polidispersidade de tamanho tanto nas emulsões iniciais quanto naquelas que passaram pelo processo de atomização (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Diâmetro médio de Brouckere ( $D_{[4,3]}$ ) e span das emulsões antes e depois do processo de atomização.

Emulsão	D [4,3] ( $\mu m$ )		Span (-)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
A2S0	4,52 <sup>b,B</sup> ±0,32	6,53 <sup>c,A</sup> ±0,03	1,87 <sup>c,A</sup> ±0,10	1,96 <sup>c,A</sup> ±0,13
A1S1	5,48 <sup>b,B</sup> ±0,70	6,82 <sup>c,A</sup> ±0,07	1,90 <sup>c,A</sup> ±0,04	1,90 <sup>c,A</sup> ±0,02
A1S2	12,24 <sup>a,A</sup> ±0,51	13,19 <sup>a,A</sup> ±0,67	6,84 <sup>a,A</sup> ±0,14	5,84 <sup>a,B</sup> ±0,19
A1S4	11,26 <sup>a,A</sup> ±0,08	11,28 <sup>b,A</sup> ±0,12	4,77 <sup>b,A</sup> ±0,11	4,81 <sup>b,A</sup> ±0,05

<sup>a-c</sup>Letras minúsculas diferentes em cada coluna indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

<sup>A-B</sup>Letras maiúsculas diferentes em cada linha indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

O diâmetro médio das gotas das emulsões com maiores quantidades de amido (A1S2 e A1S4) é maior que o diâmetro das outras emulsões (Tabela 5.2), e a distribuição do tamanho das gotas apresenta um pico em torno de 50  $\mu\text{m}$  (Figura 5.1 (c, d)). Esse pico é referente a estruturas insolúveis criadas no processo de gelatinização do amido, conhecidas como “ghosts”. Com o excesso de água e altas temperaturas, os grânulos incham e as cadeias de amilose e amilopectina são liberadas, sobrando apenas estruturas insolúveis, que são formadas pelas duplas hélices entre as cadeias do amido (Debet & Gidley, 2007; Gómez-Luría, Vernon-Carter, Alvarez-Ramirez, & Cruz-Sosa, 2019). A presença das estruturas insolúveis nas emulsões com maiores quantidades de amido gera um alto span, indicando maior polidispersidade de tamanho (Tabela 5.2).

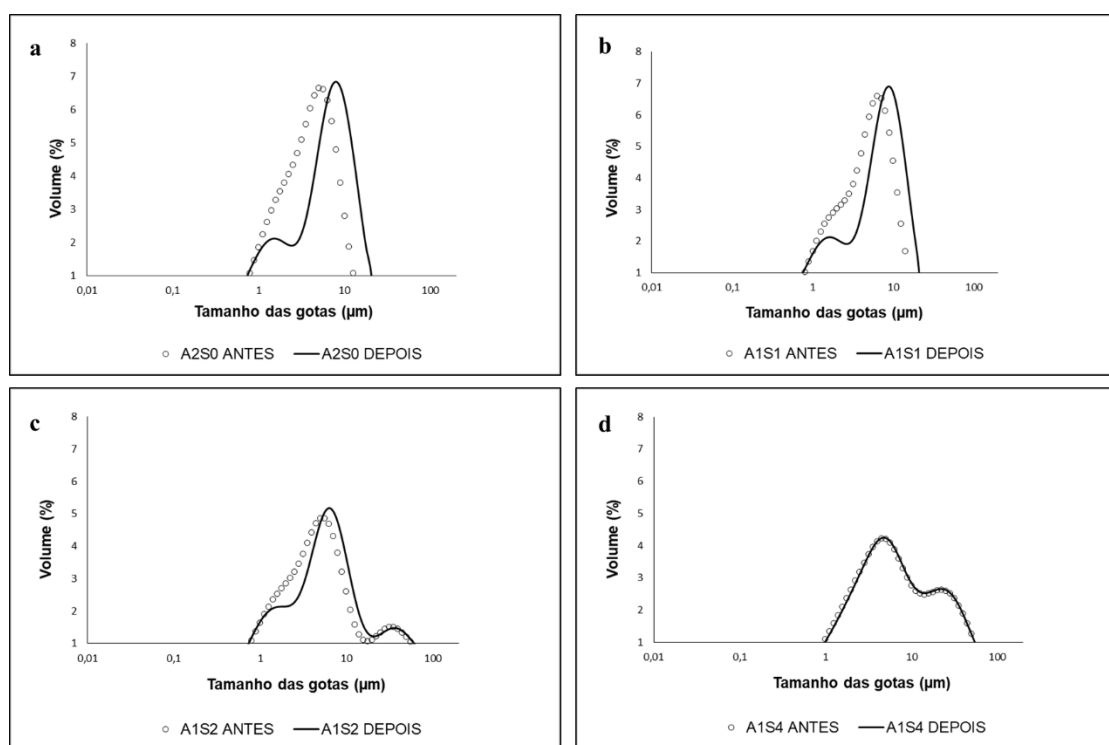


Figura 5.1. Distribuição do tamanho de gotas das emulsões antes (linha pontilhada) e depois (linha contínua) do processo de atomização. (a) A2S0; (b) A1S1; (c) A1S2; (d) A1S4.

Após a atomização, observou-se mudança no perfil de distribuição de gotas nas emulsões A2S0, A1S1 e A1S2 (Figura 5.1 (a, b, c)). Durante o processo de atomização, com a tensão causada pelo bico, há mudanças na distribuição dos grupos polares e não polares do alginato, para formar novas superfícies, alterando a distribuição de tamanho das gotas das amostras (Villalobos-Espinosa et al., 2019).

Em relação ao diâmetro médio, as formulações contendo mais amido (A1S2 e A1S4) não apresentaram diferença significativa em comparação com as emulsões iniciais, enquanto as emulsões A2S0 (sem amido) e A1S1 (com 1% de amido) apresentaram aumento

de 44,47% e 24,45% em relação às emulsões originais, respectivamente (Tabela 5.2). Isso ocorreu porque as cadeias de amilose lixiviadas durante a gelatinização do amido circundam e interagem com as gotas de óleo, formando complexos, que diminuem a tensão interfacial e previnem a coalescência das gotas (Gómez-Luría et al., 2019; Yulianingsih & Gohtani, 2019). A emulsão sem amido e com menores quantidades de amido, e conseqüentemente de amilose lixiviada, apresentaram coalescência das gotas de óleo, o que resultou no aumento do Diâmetro médio de Brouckere ( $D_{[4,3]}$ ), em comparação com as demais amostras.

### 5.3.2 Comportamento reológico

As propriedades reológicas das emulsões foram determinadas utilizando-se taxas de cisalhamento de 0 to  $1000 \text{ s}^{-1}$ . Todas as amostras estudadas exibiram comportamento pseudoplástico, com tendência à diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 5.2).

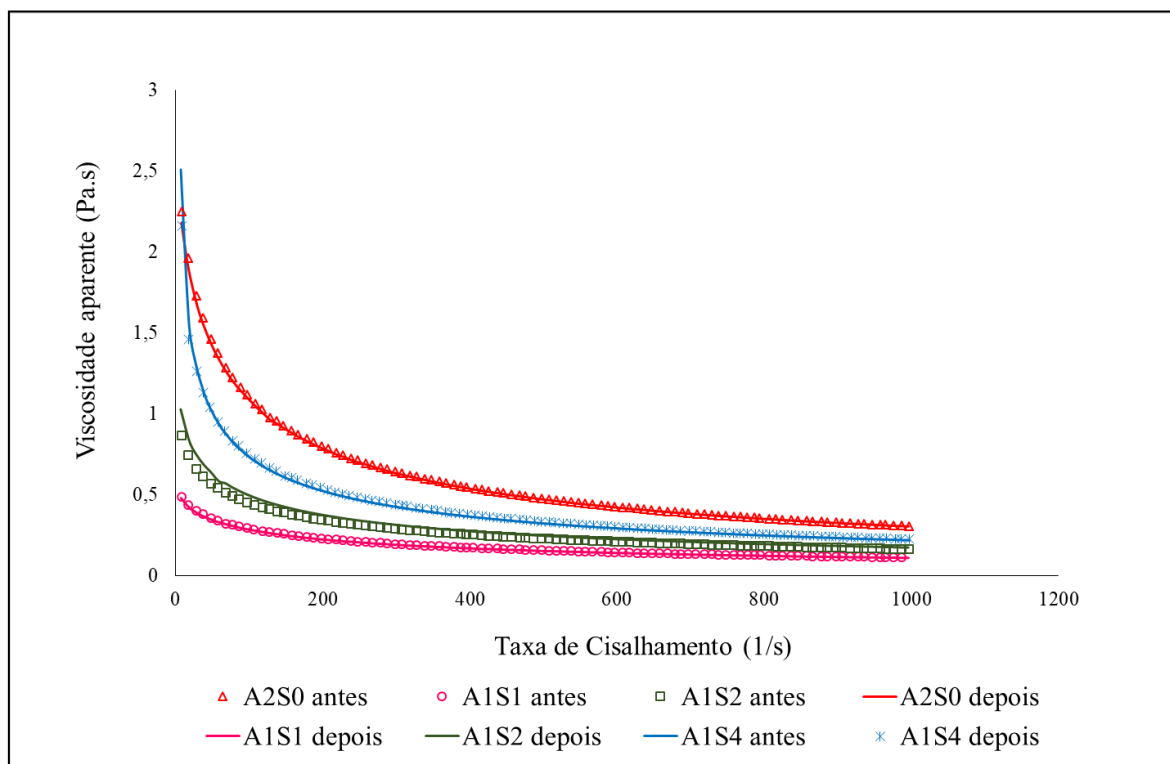


Figura 5.2. Curvas de escoamento das emulsões antes e depois do processo de atomização.

Os dados experimentais foram ajustados ao Modelo da Lei da Potência e ao Modelo de Herschel-Bulkley, mas apresentaram melhor ajuste com o Modelo da Lei da Potência, porque as emulsões apresentaram  $\sigma_0$  igual a zero. O índice de comportamento reológico ( $n$ ) apresentou valores menores que 1, o que indica comportamento pseudoplástico. Quanto ao

índice de consistência (k), a emulsão A2S0 apresentou maior k, comportando-se como a amostra mais viscosa (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Índice de consistência (k) (Pa.s) e índice de comportamento reológico (n) (-) das emulsões antes e depois do processo de atomização.

Emulsão	K (Pa.s <sup>n</sup> )		n (-)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
A2S0	16,00 <sup>a,A</sup> ±0,06	15,65 <sup>a,B</sup> ±0,12	0,43 <sup>d,B</sup> ±0,0009	0,43 <sup>d,A</sup> ±0,0003
A1S1	2,33 <sup>d,A</sup> ±0,02	2,24 <sup>d,B</sup> ±0,02	0,56 <sup>a,B</sup> ±0,001	0,57 <sup>a,A</sup> ±0,006
A1S2	3,94 <sup>c,A</sup> ±0,25	4,41 <sup>c,A</sup> ±0,18	0,54 <sup>b,A</sup> ±0,006	0,53 <sup>b,A</sup> ±0,002
A1S4	9,53 <sup>b,A</sup> ±0,55	8,38 <sup>b,A</sup> ±0,32	0,46 <sup>c,B</sup> ±0,007	0,47 <sup>c,A</sup> ±0,001

<sup>a-c</sup>Letras minúsculas diferentes em cada coluna indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

<sup>A-B</sup>Letras maiúsculas diferentes em cada linha indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

A emulsão com 2% de alginato de sódio e sem amido (A2S0) apresentou maior viscosidade que as demais emulsões. Substituindo-se 1 parte de alginato por uma parte de amido de milho gelatinizado, e obtendo-se então a emulsão A1S1, a viscosidade aparente teve uma grande diminuição, principalmente em baixas taxas de cisalhamento. A grande diferença na viscosidade aparente e no parâmetro k entre essas duas emulsões provavelmente é devido ao peso molecular do amido ser significativamente menor do que do alginato, não sendo suficiente para manter a viscosidade alta como na emulsão com 2% de alginato.

Os parâmetros k e n foram analisados antes e depois do processo de atomização. Para as emulsões com maiores de amido (A1S2 e A1S4), não houve alteração nos parâmetros, corroborando com os resultados de diâmetro médio de gotas, que também não apresentaram mudanças após o processo. Para as emulsões A2S0 e A1S1, após a atomização, houve decréscimo do valor do índice de consistência (k), indicando que a viscosidade aparente diminuiu com o cisalhamento causado pelo processo. Os valores de n aumentaram para ambas as emulsões. O índice de consistência não está diretamente relacionado à estabilidade das emulsões durante o processo de atomização, pois as amostras com maior e menor índice tiveram sua estabilidade enfraquecida. Porém, a diminuição de k após o processo influenciou em sua estabilidade. Na emulsão A2S0, que não possui amido, quando as moléculas entraram em contato com altas taxas de cisalhamento, o mecanismo estérico das moléculas de alginato não foi suficiente para manter as gotas de óleo dispersas, fazendo com que elas coalescessem. Na emulsão A1S1, a quantidade de amido era pequena, e não foi suficiente para as moléculas lixiviadas interagirem com as gotas de óleo. Já nas emulsões A1S2 e A1S4, que apresentam maior quantidade de amido, as moléculas ou agregados moleculares do amido entraram em

contato com a interface óleo/água, permitindo a manutenção da dispersão das gotas durante o processo e evitando a coalescência (Kasprzak et al., 2018).

### 5.3.3 Ensaios oscilatórios

Para determinar a região de viscoelasticidade linear das amostras, foi realizada uma varredura de tensão entre 0,0001 e 10 Pa, em frequência fixa em 1 Hz (resultados não foram mostrados). Os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de dissipação ( $G''$ ) foram determinados pela varredura de frequência oscilatória, em que a tensão de cisalhamento foi fixada em 0,1 Pa. O módulo de armazenamento está associado à quanto de energia o material armazena em cada ciclo, ou à contribuição elástica, enquanto o módulo de dissipação está relacionado à dissipação da energia em cada ciclo, ou à contribuição viscosa. Em todas as emulsões estudadas, o módulo de dissipação ( $G''$ ) é maior que o módulo de armazenamento ( $G'$ ), indicando que as amostras apresentam comportamento viscoso, ou seja, a maior parte da energia é dissipada, principalmente em altas frequências. Os parâmetros viscoelásticos  $G'$  e  $G''$  aumentaram em função da frequência (Figura 5.3), porque os pontos de ligações das cadeias macromoleculares do alginato não tiveram tempo de deslizar e limitar a orientação das cadeias ao longo de forças externas como pontos de ligação, indicando que as amostras apresentam comportamento viscoelástico, entre líquido e sólido (Zhou et al., 2019). Esse comportamento é comum para sistemas poliméricos diluídos (Steffe, 2008), e similar a estudos realizados com soluções de alginato (Belalia & Djelali, 2014; Ma, Lin, Chen, Zhao, & Zhang, 2014; Zhou et al., 2019). Os valores de  $G'$  e  $G''$  são maiores para a emulsão com maior quantidade de alginato e sem a presença de amido (A2SO).

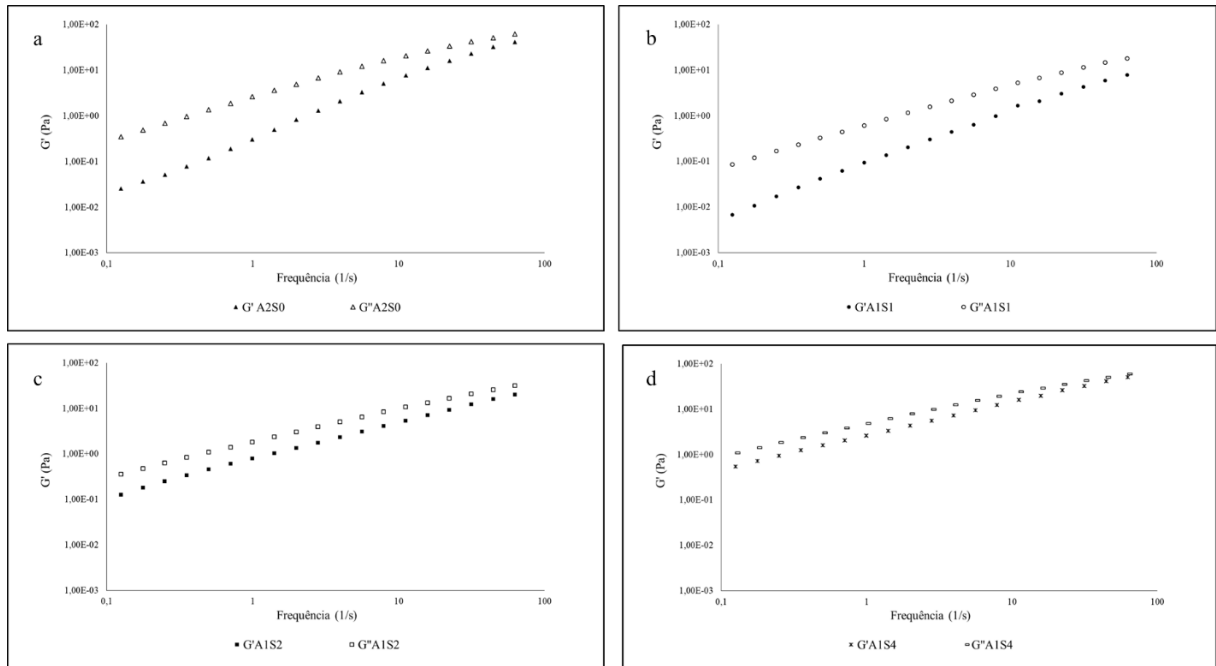


Figura 5.3. Módulos de armazenamento  $G'$  (símbolo cheio) e de perda  $G''$  (símbolo vazio) das emulsões. (a) A2S0; (b) A1S1; (c) A1S2; (d) A1S4.

O parâmetro  $\tan \delta$  é a razão entre o módulo viscoso ( $G''$ ) e o módulo de armazenamento ( $G'$ ) e foi utilizado para comparar o comportamento viscoelástico das emulsões (Figura 5.4). Em baixas frequências, ou seja, maior tempo, o  $\tan \delta$  das emulsões A2SO e A1S1 é maior, e vai diminuindo com o aumento da frequência, demonstrando que as emulsões vão se tornando menos viscosas. Soluções de alginato com altas concentrações exibem comportamento mais elástico com o aumento da frequência (Rezende, Bártolo, Mendes, & Maciel Filho, 2009). Nas emulsões com maior quantidade de amido (A1S2 e A1S4), o  $\tan \delta$  é menor do que nas outras amostras, mesmo a baixas frequências, indicando um comportamento menos viscoso que as demais formulações. Além disso, o  $\tan \delta$  da emulsão A1S2 e A1S4, com maiores concentrações de amido mantiveram-se mais constante ao longo da frequência estudada do que as demais amostras, demonstrando serem fluidos mais estáveis, (menor dependência do tempo de observação).

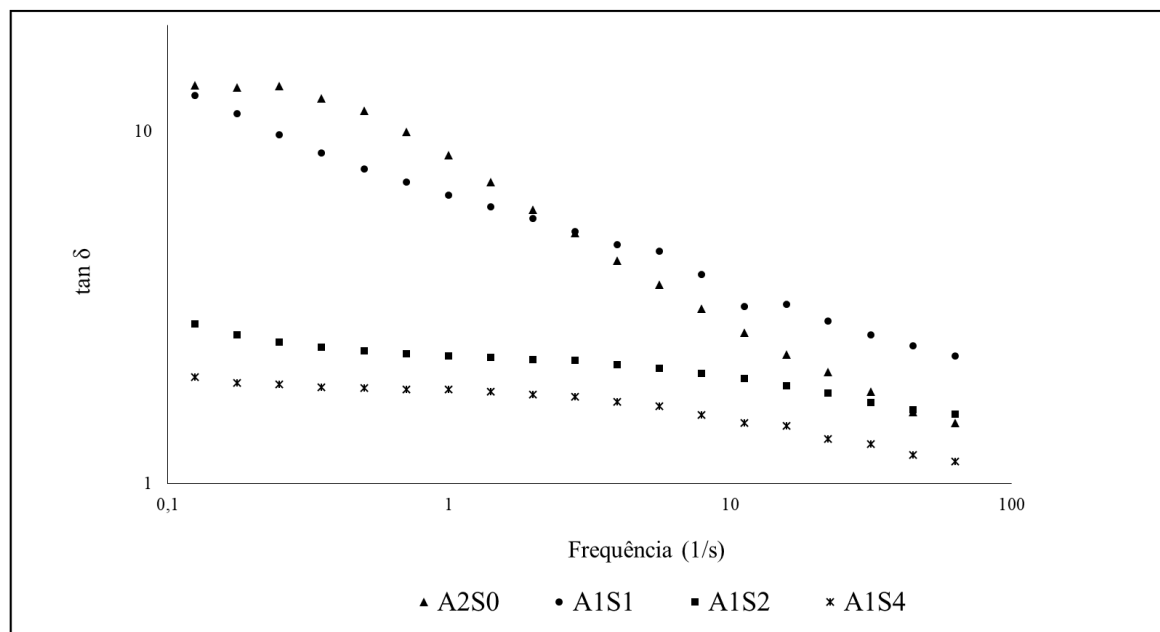


Figura 5.4. Parâmetro  $\tan \delta$  das emulsões.

As emulsões estudadas não apresentaram mudanças nas propriedades viscoelásticas após o processo de atomização, mas os diferentes comportamentos viscoelásticos influenciaram na estabilidade das gotas durante o processo. Analisando as curvas de  $\tan \delta$  (Figura 5.4), observa-se que as emulsões A2S0 e A1S1 apresentaram maiores valores de  $\tan \delta$  que as outras amostras, principalmente em baixas frequências, indicando um comportamento mais viscoso. A resposta viscosa predominante nessas emulsões pode estar relacionada com o desentrelaçamento e rearranjo das cadeias moleculares dos polímeros durante um longo período de oscilação (Ferreira, 2008). Esse rearranjo molecular pode ter sido o responsável por desestabilizar o sistema e causar a coalescência das gotas de óleo, tornando o diâmetro médio maior após a atomização, em relação às emulsões iniciais. As emulsões com maiores quantidades de amido gelatinizado A1S2 e A1S4, apesar de possuírem comportamento viscoso, apresentaram  $\tan \delta$  menor. O fato das emulsões com maiores quantidades de amido apresentarem comportamento menos viscoso ao longo da frequência está em concordância com outros trabalhos, que exibem comportamento predominantemente elástico para suspensões de amidos gelatinizados (Li, Ye, Zhou, Lei, & Zhao, 2019; Precha-Atsawan, Uttapap, & Sagis, 2018; Wang et al., 2020).



## 5.4 CONCLUSÃO

O estudo experimental de atomização de emulsões contendo alginato de sódio e amido de milho gelatinizado como fase contínua mostrou que a estabilidade das emulsões durante o processo de atomização é dependente da quantidade de amido presente. As emulsões contendo pouca ou nenhuma concentração de amido gelatinizado apresentaram aumento no tamanho de gotas de óleo de gérmen de trigo, além de diminuição da viscosidade aparente, enquanto as emulsões com maiores teores de amido não tiveram suas propriedades alteradas após a atomização. Além da influência da quantidade de amido na estabilidade das gotas, o comportamento viscoelástico das emulsões também demonstrou ser um fator importante, já que o comportamento predominantemente viscoso causou rearranjos moleculares, que contribuiu para a coalescência das gotas. A estabilidade de emulsões sob altas taxas de cisalhamento durante o processo de atomização é importante para garantir que não ocorram quebras e coalescência das gotas de óleo, prejudicando as propriedades das partículas produzidas.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FAPESP (2015/11984-7), CNPq (304475/2013-0) and CAPES (Finance Code 001-) for the financial support, and for CNPq (142661/2015-5) by fellowships support.

**REFERENCES**

- Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A., & Martín-Belloso, O. (2017). Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, *70*, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.006>
- Belalia, F., & Djelali, N. (2014). Rheological properties of sodium alginate solutions. *Academia Română - Revue Roumaine de Chimie*, *59*(2), 135–145.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, *23*(6), 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Debet, M. R., & Gidley, M. J. (2007). Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(12), 4752–4760. <https://doi.org/10.1021/jf070004o>
- Ferreira, G. M. (2008). *Estudo das propriedades reológicas do sistema polpa de cupuaçu-biopolímeros*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Gómez-Luría, D., Vernon-Carter, E. J., Alvarez-Ramirez, J., & Cruz-Sosa, F. (2019). Insights of the ability of gelatinized fractions from non-chemical modified corn, rice, wheat, and waxy corn starches to stabilize O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, *89*, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.045>
- Gu, Y. S., Decker, E. a, & McClements, D. J. (2004). Influence of pH and iota-carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of beta-lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 3626–3632. <https://doi.org/10.1021/jf0352834>
- Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, *128–130*(2006), 227–248. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.021>
- Herman, J., Remon, J. P., & De Vilder, J. (1989). Modified starches as hydrophilic matrices for controlled oral delivery. I. Production and characterisation of thermally modified starches. *International Journal of Pharmaceutics*, *56*, 51–63. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90060-4)
- Kasprzak, M. M., Macnaughtan, W., Harding, S., Wilde, P., & Wolf, B. (2018). Stabilisation of oil-in-water emulsions with non-chemical modified gelatinised starch. *Food Hydrocolloids*, *81*, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.002>

- Li, S., Ye, F., Zhou, Y., Lei, L., & Zhao, G. (2019). Rheological and textural insights into the blending of sweet potato and cassava starches: In hot and cooled pastes as well as in fresh and dried gels. *Food Hydrocolloids*, 89, 901–911. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.041>
- Ma, J., Lin, Y., Chen, X., Zhao, B., & Zhang, J. (2014). Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 38, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.016>
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- Munoz-Ibanez, M., Azagoh, C., Dubey, B. N., Dumoulin, E., & Turchiuli, C. (2015). Changes in oil-in-water emulsion size distribution during the atomization step in spray-drying encapsulation. *Journal of Food Engineering*, 167, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.02.008>
- Neelam, K., Vijay, S., & Lalit, S. (2012). Various techniques for the modification of starch and the applications of its derivatives. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(5), 25–31.
- Precha-Atsawanan, S., Uttapap, D., & Sagis, L. M. C. (2018). Linear and nonlinear rheological behavior of native and debranched waxy rice starch gels. *Food Hydrocolloids*, 85, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.050>
- Rezende, R. A., Bártolo, P. J., Mendes, A., & Maciel Filho, R. (2009). Rheological behavior of alginate solutions for biomanufacturing. *Journal of Applied Polymer Science*, 113, 3866–3871. <https://doi.org/10.1002/app>
- Sarker, B., Papageorgiou, D. G., Silva, R., Zehnder, T., Gul-E-Noor, F., Bertmer, M., ... Boccaccini, A. R. (2014). Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(11), 1470. <https://doi.org/10.1039/c3tb21509a>
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., & Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81(2), 219–231. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00416-8)
- Sootitawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Inovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.09.003>

- Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003). Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Journal of Food Science*, 68(7), 2256–2262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05756.x>
- Steffe, J. F. (2008). Viscoelasticity. In J. F. Steffe (Ed.), *Rheological Methods in Food Engineering* (2nd ed., pp. 294–349). East Lansing: Freeman Press.
- Taneja, A., Ye, A., Jones, J. R., Archer, R., & Singh, H. (2013). Behaviour of oils droplets during spray drying of milk-protein-stabilised oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 28, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.08.004>
- Villalobos-Espinosa, J. C., Quintanilla-Carvalho, M. X., Granillo-Guerrero, V. G., Alamilla-Beltrán, L., Hernández-Sánchez, H., Perea-Flores, M. J., ... Gutiérrez-López, G. F. (2019). Effect of two-fluid nozzles on the stability characteristics of emulsions prepared by a high-energy method (microfluidization). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18, 165–180. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/Villalobos>
- Villamonte, G., Jury, V., & de Lamballerie, M. (2016). Stabilizing emulsions using high-pressure-treated corn starch. *Food Hydrocolloids*, 52, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.031>
- Waigh, T. a., Hopkinson, I., Donald, A. M., Butler, M. F., Heidelbach, F., & Riekkel, C. (1997). Analysis of the Native Structure of Starch Granules with X-ray Microfocus Diffraction. *Macromolecules*, 30(13), 3813–3820. <https://doi.org/10.1021/ma970075w>
- Wang, P.-P., Luo, Z.-G., Chen, C., Fu, X., & Tamer, T. M. (2020). Effects of octenyl succinic anhydride groups distribution on the storage and shear stability of Pickering emulsions formulated by modified rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 228, 115389. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115389>
- Yulianingsih, R., & Gohtani, S. (2019). Dispersion characteristics of pregelatinized waxy rice starch and its performance as an emulsifier for oil-in-water emulsions: Effect of gelatinization temperature and starch concentration. *Food Hydrocolloids*, 95, 476–486. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.12.013>

- Zhou, W., Zhang, H., Liu, Y., Zou, X., Shi, J., Zhao, Y., ... Guo, J. (2019). Preparation of calcium alginate/polyethylene glycol acrylate double network fiber with excellent properties by dynamic molding method. *Carbohydrate Polymers*, 226, 115277. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115277>
- Zobel, H. F. (1988). Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch - Stärke*, 40(2), 44–50. <https://doi.org/10.1002/star.19880400203>

# CAPÍTULO 6

---

DISCUSSÃO GERAL

## 6.1 DISCUSSÃO GERAL

A incorporação de ingredientes saudáveis em alimentos tem aumentado significativamente na indústria de alimentos. O consumo de óleo de gérmen de trigo apresenta diversas vantagens, como redução do nível de colesterol no sangue e retardamento do envelhecimento, já que possui diversos antioxidantes e aminoácidos. Esse óleo apresenta a maior quantidade de tocoferóis quando comparado a outros óleos vegetais. Devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, o óleo de gérmen de trigo é suscetível à oxidação, que deteriora os seus componentes nutricionais. Para proteger e veicular esse óleo, a microencapsulação é amplamente utilizada. A técnica de gelificação iônica permite a produção de partículas úmidas e com forte matriz encapsulante. O uso de amido combinado com alginato de sódio para produção de partículas por gelificação iônica tem sido bastante estudado, mas há poucos estudos sobre a influência dos componentes do amido nas propriedades da matriz formada. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar as diferentes redes formadas, dependendo do amido utilizado, e definir uma melhor condição para a microencapsulação de óleo de gérmen de trigo.

Para a determinação de uma matriz com propriedades compatíveis à microencapsulação do óleo de gérmen de trigo, no **Capítulo 3** foram produzidos macrogéis com matrizes de alginato de sódio e amidos de milho com diferentes teores de amilose, com e sem gelatinização. Foi avaliada a influência do teor de amilose e gelatinização nas propriedades dos géis, antes e depois do processo de digestibilidade *in vitro*. A escolha por analisar macrogéis foi devido à maior facilidade de observação da microestrutura das matrizes formadas e de suas características ao longo do processo digestivo, em comparação às micropartículas. Os macrogéis produzidos com amidos gelatinizados apresentaram estrutura menos porosa que aqueles com amidos não gelatinizados, devido à rede mista formada pela ligação de hidrogênio entre as cadeias de amido e alginato. Durante a fase entérica do processo de digestibilidade *in vitro*, os géis com amidos gelatinizados, que originalmente possuíam rede mais estruturada, apresentaram maior liberação de glicose e microestruturas mais degradadas e porosas que os demais géis, já que as cadeias lixiviadas do amido são mais suscetíveis à hidrólise enzimática do que os grânulos. Com relação à proporção de amilose/amilopectina, a maior degradação dos géis após o processo digestivo é relacionada com o maior conteúdo de amilopectina do amido. Este estudo mostrou que cada amido utilizado na matriz confere características específicas aos macrogéis. A partir das microscopias e dos dados de glicose liberada durante a digestibilidade dos macrogéis, determinou-se que o uso dos amidos com média e alta

quantidade de amilopectina seriam os ideais para uma matriz utilizada na encapsulação de compostos a serem liberados no intestino, como é o caso do óleo de gérmen de trigo.

Numa segunda etapa, apresentada no **Capítulo 4**, definiu-se que o óleo de gérmen de trigo seria microencapsulado em matriz de alginato contendo amido de milho comum (28% de amilose), já que a rede estudada permite rápida liberação na fase entérica. Foi avaliada a influência da proporção de amido gelatinizado nas propriedades das emulsões e das partículas obtidas por gelificação iônica, principalmente em relação à microestrutura e à estabilidade. A presença de amido nas emulsões ajudou na dispersão das gotas de óleo, devido à interação entre as cadeias de amilose lixiviada na gelatinização e o óleo. As partículas produzidas pela atomização das emulsões em solução reticulante de cloreto de cálcio apresentaram eficiência de encapsulação maior que 90%. A proporção entre alginato e amido gelatinizado influenciou na microestrutura das partículas e sua estabilidade. O estudo de estabilidade foi realizado a 65°C, com umidade controlada de 80%, por 6 dias. As matrizes com proporção de 1:1 de alginato:amido apresentaram microestrutura uniforme, com poucos poros, e menor valor de peróxidos que as partículas produzidas apenas com alginato, além de maior quantidade de tocoferóis que as demais partículas, mostrando-se uma partícula apropriada para a manutenção da estabilidade do óleo encapsulado. Aumentando-se a proporção de amido para 1:2 de alginato:amido, observou-se enfraquecimento da rede e maior porosidade, permitindo maior exposição do óleo de gérmen de trigo à alta temperatura e ao oxigênio durante a estocagem, gerando baixa estabilidade das partículas. Já as partículas obtidas com a maior proporção de alginato:amido (1:4), apresentaram microestrutura homogênea e mais compacta que as demais contendo amido, devido à alta proporção de material de parede em relação ao óleo, resultando em baixos valores de peróxidos, porém sem diferenças na quantidade de tocoferóis em relação às partículas produzidas apenas com alginato. Este estudo mostrou que uma pequena quantidade de amido gelatinizado incorporada à rede de alginato gera matriz que garante melhor estabilidade oxidativa e de tocoferóis do óleo encapsulado.

Para a produção das micropartículas de óleo de gérmen de trigo, a emulsão contendo o óleo como fase dispersa e a solução mista de alginato de sódio e amido gelatinizado como fase contínua passam por um processo de atomização para a formação de gotas que são reticuladas na solução de cloreto de cálcio. Durante esse processo, a emulsão fica sujeita a altas taxas de cisalhamento que podem influenciar sua estabilidade e as propriedades dos produtos finais. Por isso, no **Capítulo 5**, foram analisados o efeito da atomização nas propriedades das emulsões e a influência do amido gelatinizado em suas estabilidades. As emulsões foram produzidas e atomizadas num recipiente sem a presença de solução reticulante. Foram



utilizadas proporções de alginato:amido de 2:0, 1:1, 1:2 e 1:4. Este estudo mostrou que a atomização influencia na estabilidade das emulsões quando elas são produzidas com pouca ou nenhuma quantidade de amido. As emulsões com as proporções de alginato:amido de 2:0 e 1:1 apresentaram aumento no tamanho de gotas de óleo das gotas de óleo, além de diminuição da viscosidade aparente, enquanto as emulsões com maiores teores de amido não tiveram suas propriedades alteradas após o processo de atomização. O comportamento viscoelástico das emulsões, apesar de não ter sido alterado, é um fator que influencia na estabilidade das emulsões, já que as amostras com menos amido apresentaram comportamento predominantemente viscoso, em que ocorreu rearranjo molecular das cadeias, causando coalescência das gotas.

Para trabalhos futuros, sugere-se a produção de partículas contendo óleo de gérmen de trigo utilizando-se o alginato de sódio e amido de milho com os diferentes teores de amilose, gelatinizados ou não, e a avaliação dos efeitos de cada um desses amidos na estabilidade do óleo encapsulado. Para complementar, o processo de digestibilidade *in vitro* de cada uma das formulações estudadas aumentaria o conhecimento sobre a influência do material de parede na liberação do óleo. Uma segunda sugestão seria a utilização de compostos hidrofílicos como material de recheio, com a combinação de alginato e amido de milho com diferentes teores de amilose como material de parede. A avaliação do comportamento das partículas seria realizada em relação à eficiência de encapsulação, estabilidade do composto e à liberação durante a digestibilidade *in vitro*, sendo possível a seleção da melhor combinação para a encapsulação de compostos hidrofílicos.

# CAPÍTULO 7

---

CONCLUSÃO GERAL

## 7.1 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados obtidos, as seguintes conclusões são apresentadas:

- O uso de amido de milho associado ao alginato de sódio permitiu a criação de matrizes com diferentes características, dependendo do teor de amilose do amido e da presença ou não de gelatinização.
- O alto teor de amilose no amido gerou géis mais fortes, antes e depois da digestibilidade *in vitro*, quando comparados aos géis produzidos com amidos com baixo e médio teores de amilose.
- Géis produzidos com amidos com médio e alto teores de amilopectina foram rapidamente degradados na fase entérica da digestão.
- O uso de amido de milho gelatinizado em substituição parcial ao alginato de sódio em emulsões com óleo de gérmen de trigo permitiu melhor encapsulação das gotas e a mantiveram mais disperas na fase contínua quando comparadas à emulsão contendo apenas alginato.
- A substituição de parte do alginato por amido de milho gelatinizado na obtenção de partículas por gelificação iônica não afetou a eficiência de encapsulação, que foi maior que 90% para todas as formulações estudadas.
- A proporção de alginato e amido influenciou na microestrutura e na estabilidade de partículas produzidas por gelificação iônica. A proporção de 1:1 permitiu a produção de partículas que apresentaram maior estabilidade oxidativa do óleo e maior quantidade de tocoferóis, no sexto dia de estocagem acelerada.
- Maiores concentrações de amido de milho gelatinizado em emulsões com óleo de gérmen de trigo e alginato de sódio geraram menor coalescência das gotas de óleo durante o processo de atomização.
- O comportamento predominantemente viscoso das emulsões sem amido e com proporção de 1:1 de alginato:amido causou rearranjos moleculares, que contribuíram para a coalescência das gotas de óleo durante o processo de atomização.

## CAPÍTULO 8

---

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochimica Acta**, v. 319, p. 17–25, 1998.
- AGUILAR, K. C. et al. Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, v. 154, p. 17–24, 2015.
- AMIRI, A. et al. Fabrication of cumin loaded-chitosan particles: Characterized by molecular, morphological, thermal, antioxidant and anticancer properties as well as its utilization in food system. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125821, 2020.
- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 184–193, 2008.
- ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 191–200, 2017.
- AZIZI, M. et al. Improvement of physicochemical properties of encapsulated echium oil using nanostructured lipid carriers. **Food Chemistry**, v. 246, p. 448–456, 2018.
- BAKRY, A. M. et al. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 2016.
- BALANČ, B. et al. Calcium – Alginate – Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 1, p. 65–75, 2016.
- BANNIKOVA, A. et al. Microencapsulation of fish oil with alginate : *In vitro* evaluation and controlled release. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 310–315, 2018.
- BEKHIT, M. et al. Design of microcapsules containing *Lactococcus lactis subsp. lactis* in alginate shell and xanthan gum with nutrients core. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 446–453, 2016.
- BELALIA, F.; DJELALI, N. Rheological properties of sodium alginate solutions. **Academia Română - Revue Roumaine de Chimie**, v. 59, n. 2, p. 135–145, 2014.
- BEVILACQUA, A. et al. Alginate-microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*: Performances of encapsulated microorganisms and bead-validation in lamb rennet. **LWT - Food Science and Technology**, v. 113, p. 108349, 2019.
- BISWAS, N.; SAHOO, R. K. Tapioca starch blended alginate mucoadhesive-floating beads for intragastric delivery of Metoprolol Tartrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 61–70, 2016.

- BLAZEK, J. et al. Structural characterization of wheat starch granules differing in amylose content and functional characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 4, p. 705–711, 2009.
- BLEMUR, L. et al. Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 344–353, 2016.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BRAMLEY, P. M. et al. Vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 913–938, 2000.
- BRANDOLINI, A.; HIDALGO, A. Wheat germ: not only a by-product. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 71–74, 2012.
- BROWNLEE, I. A. et al. Alginate as a Source of Dietary Fiber. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 497–510, 2007.
- BUDILARTO, E. S.; KAMAL-ELDIN, A. The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, p. 1095–1137, 2015.
- BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85–112, 1988.
- BUREY, P. et al. Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 361–377, 2008.
- BUŠIĆ, A. et al. Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale L.*) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. **Food Research International**, v. 111, p. 244–255, 2018.
- CAI, C. et al. Morphology, structure and gelatinization properties of heterogeneous starch granules from high-amylose maize. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 606–614, 2014.
- CANO-SARMIENTO, C. et al. Zeta Potential of food matrices. **Food Engineering Reviews**, v. 10, p. 113–138, 2018.
- CAPARINO, O. A. et al. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (*Philippine “Carabao” var.*) powder. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 135–148, 2012.
- CHAIYASIT, W. et al. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 299–317, 2007.
- CHAN, E. S. et al. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 225–232, 2011.

- CHAN, L. W.; LIM, L. T.; HENG, P. W. Microencapsulation of oils using sodium alginate. **Journal of microencapsulation**, v. 17, n. 6, p. 757–766, 2000.
- CHANG, C. P.; DOBASHI, T. Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 32, n. 3, p. 257–262, 2003.
- CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 277–284, 1998.
- CHOWDARY, K. P. R.; RAVI SHANKAR, K.; SUBRAHMANYAM, S. V. V. Preparation and evaluation of pregelatinized starch microspheres for controlled release of lornoxicam. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 467–474, 2014.
- COLONNA, P.; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. **European journal of clinical nutrition**, v. 46, p. 17–32, 1992.
- COMUNIAN, T. A. et al. Combination of microfluidic devices, ionic gelation and phenolic compounds to improve the oxidative stability of echium oil. **Food Chemistry**, v. 233, p. 125–134, 2017a.
- COMUNIAN, T. A. et al. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. **Food Chemistry**, v. 237, p. 948–956, 2017b.
- COPELAND, L. et al. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527–1534, 2009.
- CÓRDOBA, A. L.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 315–323, 2013.
- DAVARCI, F. et al. The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 119–127, 2017.
- DEBET, M. R.; GIDLEY, M. J. Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4752–4760, 2007.
- DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, 2005.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25–39, 2003.
- DRAGET, K. I. et al. Na- and K-alginate; effect on Ca<sup>2+</sup>-gelation. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, n. 1–2, p. 1–6, 1998.
- EISENMENGER, M.; DUNFORD, N. T. Bioactive Components of Commercial and Supercritical Carbon Dioxide Processed Wheat Germ Oil. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 85, n. 1, p. 55–61, 2008.

- EL FAKI, H. A.; VENKATARAMAN, L. V.; DESIKACHAR, H. S. R. Effect of processing on the *in vitro* digestibility of proteins and carbohydrates in some Indian legumes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 34, p. 127–133, 1984.
- ETCHEPARE, M. DE A. et al. Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 321–329, 2016.
- EVANS, A.; THOMPSON, D. B. Resistance to  $\alpha$ -Amylase Digestion in Four Native High-Amylose Maize Starches. **Cereal Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 31–37, 2004.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103–112, 2008.
- FELTRE, G. et al. Production of Thermal-Resistant Cornstarch-Alginate Beads by Dripping Agglomeration. **International Journal of Food Engineering**, v. 14, n. 1, 2018.
- FERREIRA, G. M. **Estudo das propriedades reológicas do sistema polpa de cupuaçu-biopolímeros**. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- FERRINI, L. M. K. et al. Effect of acid-methanol treatment on the physicochemical and structural characteristics of cassava and maize starches. **Starch/Staerke**, v. 60, n. 8, p. 417–425, 2008.
- FUNAMI, T. et al. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and  $\text{Ca}^{2+}$  binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1746–1755, 2009.
- GELDERS, G. G.; GOESAERT, H.; DELCOUR, J. A. Amylose–Lipid Complexes as Controlled Lipid Release Agents during Starch Gelatinization and Pasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1493–1499, 1 fev. 2006.
- GHAFOOR, K. et al. Nutritional composition, extraction, and utilization of wheat germ oil: A review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 7, p. 1600160, 2017.
- GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A.; SIKORSKA, E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 195–198, 2004.
- GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 1–12, 2012.
- GÓMEZ-LURÍA, D. et al. Insights of the ability of gelatinized fractions from non-chemical modified corn, rice, wheat, and waxy corn starches to stabilize O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 726–734, 2019.
- GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.



- GREENSPAN, L. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, v. 81A, p. 89–96, 1977.
- GU, Y. S.; DECKER, E. A; MCCLEMENTS, D. J. Influence of pH and iota-carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of beta-lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3626–3632, 2004.
- GUILLÉN, M. D.; CABO, N. Infrared Spectroscopy in the Study of Edible Oils and Fats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 1–11, 1997.
- GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 128–130, n. 2006, p. 227–248, 2006.
- HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 275, p. 113–122, 2019.
- HAUG, A.; SMIDSRØD, O. The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions: II. Comparison of different metal ions. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 19, p. 341–351, 1965.
- HELGERUD, T. et al. Alginates. In: IMESON, A. (Ed.). . **Food stabilisers, thickeners and gelling agents**. New Jersey, USA: Blackwell Publishing Ltd, 2010. p. 50–72.
- HERMAN, J.; REMON, J. P.; DE VILDER, J. Modified starches as hydrophilic matrices for controlled oral delivery. I. Production and characterisation of thermally modified starches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 56, p. 51–63, 1989.
- HOLKEM, A. T. et al. Production of microcapsules containing *Bifidobacterium BB-12* by emulsification/internal gelation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 216–221, 2017.
- HOLM, J. et al. Starch availability *in vitro* and *in vivo* after flaking, steam-cooking and popping of wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 3, p. 193–206, 1985.
- HOSSEINI, S. M. et al. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 573–580, 2014.
- HU, Y.; AZADI, G.; ARDEKANI, A. M. Microfluidic fabrication of shape-tunable alginate microgels: Effect of size and impact velocity. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 38–45, 2015.
- HUANG, J. et al. *In vitro* digestion properties of heterogeneous starch granules from high-amylose rice. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 10–22, 2016.
- JAFARI, S. M. et al. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816–835, 2008.

- JANE, J. Structure of Starch Granules. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 36, p. 31-36, 2007.
- JANE, J.; ROBYT, J. F. Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. **Carbohydrate Research**, v. 132, p. 105–118, 1984.
- JENKINS, P. J.; DONALD, A. M. Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. **Carbohydrate Research**, v. 308, n. 1, p. 133–147, 1998.
- KARACA, A. C.; LOW, N.; NICKERSON, M. Encapsulation of flaxseed oil using a benchtop spray dryer for legume protein-maltodextrin microcapsule preparation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5148–5155, 2013.
- KARADENIZ, M.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Enhancement of storage stability of wheat germ oil by encapsulation. **Industrial Crops & Products**, v. 114, p. 14–18, 2018.
- KARIM, A. A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, p. 9–36, 2000.
- KARIMIRAD, R.; BEHNAMIAN, M.; DEZHSETAN, S. Bitter orange oil incorporated into chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and their potential application on antioxidant and antimicrobial characteristics of white button mushroom. **Food Hydrocolloids**, v. 100, p. 105387, 2020.
- KASPRZAK, M. M. et al. Stabilisation of oil-in-water emulsions with non-chemical modified gelatinised starch. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 409–418, 2018.
- KAUR, A. et al. *In vitro* Batch Fecal Fermentation Comparison of Gas and Short-Chain Fatty Acid Production Using “ Slowly Fermentable ” Dietary Fibers. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. 137–142, 2011.
- KHLIBSUWAN, R.; TANSENA, W.; PONGJANYAKUL, T. Modification of alginate beads using gelatinized and ungelatinized arrowroot (*Tacca leontopetaloides* L. Kuntze) starch for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 683–692, 2018.
- KHOSRAVI ZANJANI, M. A. et al. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition . **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v. 13, n. 3, p. 843–852, fev. 2014.
- KUMAR, G. S.; KRISHNA, A. G. G. Studies on the nutraceuticals composition of wheat derived oils wheat bran oil and wheat germ oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 1145–1151, 2013.
- LAMPI, A. M.; KAMAL-ELDIN, A. Effect of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols on thermal polymerization of purified high-oleic sunflower triacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 12, p. 1699–1703, 1998.
- LAWRIE, G. et al. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533–2541, 2007.

- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate : properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.
- LEE, P. C. et al. Digestibility of Native and Modified Starches: *In vitro* Studies with Human and Rabbit Pancreatic Amylases and *in vivo* Studies in Rabbits. **The Journal of Nutrition**, v. 115, n. 1, p. 93–103, 1 jan. 1985.
- LEE, W. J. et al. Microencapsulation of red palm oil as an oil-in-water emulsion with supercritical carbon dioxide solution-enhanced dispersion. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 100–109, 2018.
- LI, S. et al. Rheological and textural insights into the blending of sweet potato and cassava starches: In hot and cooled pastes as well as in fresh and dried gels. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 901–911, 2019.
- LOBO, A. R.; LEMOS SILVA, G. M. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas - Resistant starch and its physicochemical properties. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 219–226, 2003.
- LUPO, B. et al. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 25–34, 2015.
- MA, J. et al. Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 119–128, 2014.
- MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1–21, 2006.
- MANNERS, D. J. Recent development in our understanding of amylopectin structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 11, p. 87–112, 1989.
- MARGARIÑO, M.; MATEO, C. M.; NOLASCO, S. M. Kinetics of Tocopherol Degradation During the Storage of Wheat Germ Oil. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, p. 1999–2004, 2015.
- MARTINSEN, A.; STORRØ, I.; SKJÅRK-BRAEK, G. Alginate as Immobilization Material: III. Diffusional Properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 186–194, 1992.
- MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, 2007.
- MEGAHAD, O. A.; EL KINAWY, O. S. Studies on the extraction of wheat germ oil by commercial hexane. **Grasas y Aceites**, v. 53, n. 4, p. 414–418, 2002.
- MENG, S. et al. Properties of starch-palmitic acid complexes prepared by high pressure homogenization. **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 1, p. 25–32, 2014.
- MENIN, A. et al. Effects of microencapsulation by ionic gelation on the oxidative stability of flaxseed oil. **Food Chemistry**, v. 269, p. 293–299, 2018.

- MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.
- MOHAMMADI, N.; EHSANI, M. R.; BAKHODA, H. Development of caffeine-encapsulated alginate-based matrix combined with different natural biopolymers, and evaluation of release in simulated mouth conditions. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 33, p. 357–366, 2018.
- MOHD AZEMI, M. N.; WOOTTON, M. *In vitro* digestibility of hydroxypropyl maize, waxy maize and high amylose maize starches. **Starch - Stärke**, v. 36, p. 273–275, 1984.
- MORRISON, W. R.; LAW, R. V.; SNAPE, C. E. Evidence for Inclusion Complexes of lipids with V-amylose in maize, rice and oat starches. **Journal of Cereal Science**, v. 18, p. 107–109, 1993.
- MOURA, S. C. S. R. 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.
- MUA, J. P.; JACKSON, D. S. Fines structure of corn amylose and amylopectin fractions with various molecular weights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 3840–3847, 1997.
- MUNOZ-IBANEZ, M. et al. Changes in oil-in-water emulsion size distribution during the atomization step in spray-drying encapsulation. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 122–132, 2015.
- NAYAK, A. K.; PAL, D. Formulation optimization and evaluation of jackfruit seed starch – alginate mucoadhesive beads of metformin HCl. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 264–272, 2013.
- NEELAM, K.; VIJAY, S.; LALIT, S. Various techniques for the modification of starch and the applications of its derivatives. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 25–31, 2012.
- NOGUEIRA, G. F.; PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. F. Alginate and whey protein based-multilayered particles: production, characterisation and resistance to pH, ionic strength and artificial gastric/intestinal fluid. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 2, p. 151–161, 2017.
- ODEKU, O. A. et al. Formulation of floating metronidazole microspheres using cassava starch (*Manihot esculenta*) as polymer. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 47, n. 5, p. 445–451, 2017.
- OKUNLOLA, A.; ADEWUSI, S. A. Development of Theophylline Microbeads Using Pregelatinized Breadfruit Starch (*Artocarpus altilis*) as a Novel Co-polymer for **Controlled Release**. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 1, p. 93–101, 2019.
- ONSOYEN, E. Alginates. In: IMESON, A. (Ed.). **Thickening and gelling agents for food**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 22–44.

- OTÁLORA, M. C. 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.
- OZCAN, M. M. et al. Quality of wheat germ oil obtained by cold pressing and supercritical carbon dioxide extraction. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 3, p. 236–240, 2013.
- PATIL, J. S. et al. 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**, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.
- PAXMAN, J. R. et al. Daily ingestion of alginate reduces energy intake in free-living subjects. **Appetite**, v. 51, p. 713–719, 2008.
- PEREIRA, A. DA S. et al. Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 621–630, 2019.
- PEREIRA, L. et al. Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 223–228, 2003.
- PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. Influence of pH on formation and properties of gellan gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 662–668, 2011.
- PONCELET, D. et al. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 39–45, 1992.
- PRECHA-ATSAWANAN, S.; UTTAPAP, D.; SAGIS, L. M. C. Linear and nonlinear rheological behavior of native and debranched waxy rice starch gels. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 1–9, 2018.
- PUGUAN, J. M. C.; YU, X.; KIM, H. Characterization of structure, physico-chemical properties and diffusion behavior of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 432, p. 109–116, 2014.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Atividade antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 15–20, 2006.
- REZENDE, R. A. et al. Rheological behavior of alginate solutions for biomanufacturing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 113, p. 3866–3871, 2009.
- ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 886–892, 2010.
- SARKER, B. et al. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 11, p. 1470, 2014.

- SARKER, B. et al. Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 72–78, 2015.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1 jan. 1993.
- SHI, X.; BEMILLER, J. N. Effects of food gums on viscosities of starch suspensions during pasting. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 7–18, 2002.
- SILVA, E. K. et al. Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Whey protein isolate versus modified starch. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 71–83, 2016.
- SILVA, K. C. G. et al. Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, n. November 2017, p. 503–509, 2018.
- SILVA, K. C. G.; SATO, A. C. K. Biopolymer gels containing fructooligosaccharides. **Food Research International**, v. 101, p. 88–95, 2017.
- SILVA, K. F. C. E et al. Sacha inchi oil encapsulation: Emulsion and alginate beads characterization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 116, p. 118–129, 2019.
- SINGH, B.; SHARMA, D. K.; GUPTA, A. A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch – alginate beads to control environmental and health hazards. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 208–216, 2009.
- SINGH, J.; DARTOIS, A.; KAUR, L. Starch digestibility in food matrix: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 4, p. 168–180, 2010.
- SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.
- SMRDEL, P. et al. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*, v. 25, n. 2, p. 90–105, 2008.
- SOBEL, R.; VERSIC, R.; GAONKAR, A. G. Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. In: GAONKAR, A. et al. (Eds.). **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 3–12.
- SOLIMAN, E. A. et al. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and *in vitro* Evaluation of Antifungal Activity. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 3, p. 48–55, 2013.
- SONG, X. et al. Particle-stabilizers modified from indica rice starches differing in amylose content. **Food Chemistry**, v. 153, p. 74–80, 2014.
- SONG, X. et al. The physical and oxidative stabilities of Pickering emulsion stabilized by starch particle and small molecular surfactant. **Food Chemistry**, v. 303, p. 125391, 2020.

- SOOTTITANTAWAT, A. et al. Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 7, p. 2256–2262, 2003.
- SOOTTITANTAWAT, A. et al. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. **Inovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 107–114, 2005.
- STANGE, U.; FÜHRLING, C.; GIESELER, H. Taste masking of naproxen sodium granules by fluid-bed coating. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 2, p. 137–147, 2014.
- STEFFE, J. F. Viscoelasticity. In: STEFFE, J. F. (Ed.). **Rheological Methods in Food Engineering**. 2. ed. East Lansing: Freeman Press, 2008. p. 294–349.
- SUVARNA, S. et al. Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. **Food Science Biotechnology**, v. 27, p. 745–753, 2018.
- TABASUM, S. et al. A review on blending of corn starch with natural and synthetic polymers, and inorganic nanoparticles with mathematical modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 969–996, 2019.
- TAKEDA, Y.; SHIBAHARA, S.; HANASHIRO, I. Examination of the structure of amylopectin molecules by fluorescent labeling. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 5, p. 471–475, 2003.
- TANEJA, A. et al. Behaviour of oils droplets during spray drying of milk-protein-stabilised oil-in-water emulsions. **International Dairy Journal**, v. 28, p. 15–23, 2013.
- TANGSRIANUGUL, N.; SUPHANTHARIKA, M.; MCCLEMENTS, D. J. Simulated gastrointestinal fate of lipids encapsulated in starch hydrogels: Impact of normal and high amylose corn starch. **Food Research International**, v. 78, p. 79–87, 2015.
- TELLO, F. et al. Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 670–678, 2015.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.
- TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 551–557, 1990.
- THORNE, M. J.; THOMPSON, L. U.; JENKINS, D. J. A. Factors affecting starch digestibility and the glycemic response with special reference to legumes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 38, p. 481–488, 1983.
- THU, B. et al. Alginate polycation microcapsules - I. Interaction between alginate and polycation. **Biomaterials**, v. 17, p. 1031–1040, 1996.

- URBAS, R. et al. Microcapsules application in graphic arts industry: a review on the state-of-the-art. **Iranian Polymer Journal**, v. 26, n. 7, p. 541–561, 2017.
- VASISHT, N. Factors and Mechanisms in Microencapsulation. In: GAONKAR, A. et al. (Eds.). **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 15–24.
- VILELA, J. A. P. et al. Preparation, characterization and *in vitro* digestibility of gellan and chitosan – gellan microgels. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 54–62, 2015.
- VILELA, J. A. P.; CAVALLIERI, Â. L. F.; CUNHA, R. L. The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate–gellan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 7, p. 1710–1718, 2011.
- VILLALOBOS-ESPINOSA, J. C. et al. Effect of two-fluid nozzles on the stability characteristics of emulsions prepared by a high-energy method (microfluidization). **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, p. 165–180, 2019.
- VILLAMONTE, G.; JURY, V.; DE LAMBALLERIE, M. Stabilizing emulsions using high-pressure-treated corn starch. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 581–589, 2016.
- VLACHOS, N. et al. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. **Analytica Chimica Acta**, v. 573–574, p. 459–465, 2006.
- VREEKER, R. et al. Drying and rehydration of calcium alginate gels. **Food Biophysics**, v. 3, n. 4, p. 361–369, 2008.
- WAIGH, T. A. et al. Analysis of the Native Structure of Starch Granules with X-ray Microfocus Diffraction. **Macromolecules**, v. 30, n. 13, p. 3813–3820, 1997.
- WANG, P.-P. et al. Effects of octenyl succinic anhydride groups distribution on the storage and shear stability of Pickering emulsions formulated by modified rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 228, p. 115389, 2020.
- WANG, Q. et al. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 842–847, 2010.
- WANG, T.; JOHNSON, L. A. Refining high-free fatty acid wheat germ oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 1, p. 71–76, 2001.
- WEISSENBORN, P. K. Behaviour of amylopectin and amylose components of starch in the selective flocculation of ultrafine iron ore. **International Journal of Mineral Processing**, v. 47, p. 197–211, 1996.
- WINDHAB, E. J. et al. Emulsion processing - From single-drop deformation to design of complex processes and products. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 2101–2113, 2005.
- WISSAM, Z.; SAMER, H. Encapsulation of flaxseed oil extract in alginate-salep system by ionic gelation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 1–9, 2019.



- XU, J. et al. Partially gelatinized corn starch as a potential environmentally friendly warpsizing agent. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 3195–3200, 2016.
- YAZICIOGLU, B.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Microencapsulation of wheat germ oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3590–3597, 2015.
- YOSHIDA, H.; TATSUMI, M.; KAJIMOTO, G. Relationship between oxidative stability of vitamin E and production of fatty acids in oils during microwave heating. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 8, p. 566–570, 1991.
- YULIANINGSIH, R.; GOHTANI, S. Dispersion characteristics of pregelatinized waxy rice starch and its performance as an emulsifier for oil-in-water emulsions: Effect of gelatinization temperature and starch concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 476–486, out. 2019.
- ZANGENBERG, N. H. et al. A dynamic *in vitro* lipolysis model: I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 115–122, 2001.
- ZHANG, G.; AO, Z.; HAMAKER, B. R. Slow Digestion Property of Native Cereal Starches. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3252–3258, 2006.
- ZHANG, G.; HAMAKER, B. R. Slowly Digestible Starch: concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 10, p. 852–867, 2009.
- ZHANG, H. et al. Responsive drug-delivery microcarriers based on the silk fibroin inverse opal scaffolds for controllable drug release. **Applied Materials Today**, v. 19, p. 100540, 2020.
- ZHOU, W. et al. Preparation of calcium alginate/polyethylene glycol acrylate double network fiber with excellent properties by dynamic molding method. **Carbohydrate Polymers**, v. 226, p. 115277, 2019.
- ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch - Stärke**, v. 40, n. 2, p. 44–50, 1988.

# APÊNDICES

---

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS DE MILHO

APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE GÉRMEN DE TRIGO

APÊNDICE C – CRISTALINIDADE DAS PARTÍCULAS (CAPÍTULO 4

## APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS DE MILHO

Além da caracterização dos amidos apresentada nos Capítulos 3 e 4, foram realizados ensaios de Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e de Difração de Raio-X para maior especificação dos diferentes tipos de amido utilizados.

### *Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)*

As curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas para determinação da temperatura de gelatinização dos amidos. Essa análise foi realizada em equipamento DSC TA 2010, controlado por módulo TA5000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, EUA). Cerca de 2 mg de amido foram acondicionadas em cápsulas juntamente com água, para que fosse obtida uma suspensão com aproximadamente 80% de umidade. As cápsulas foram fechadas hermeticamente e ficaram em repouso por 2 horas, para hidratação da amostra. As amostras foram aquecidas até 120°C (para o amido com alto teor de amilopectina), 160°C (para amido com médio teor de amilose) e 180°C (para o amido com alto teor de amilose), a uma taxa de 10 °C/min. O teor de umidade dos amidos foi determinado. As curvas obtidas são apresentadas nas Figuras A.1 (amido de milho comum), A.2 (amido de milho com alto teor de amilopectina) e A.3 (amido de milho com alto teor de amilose).

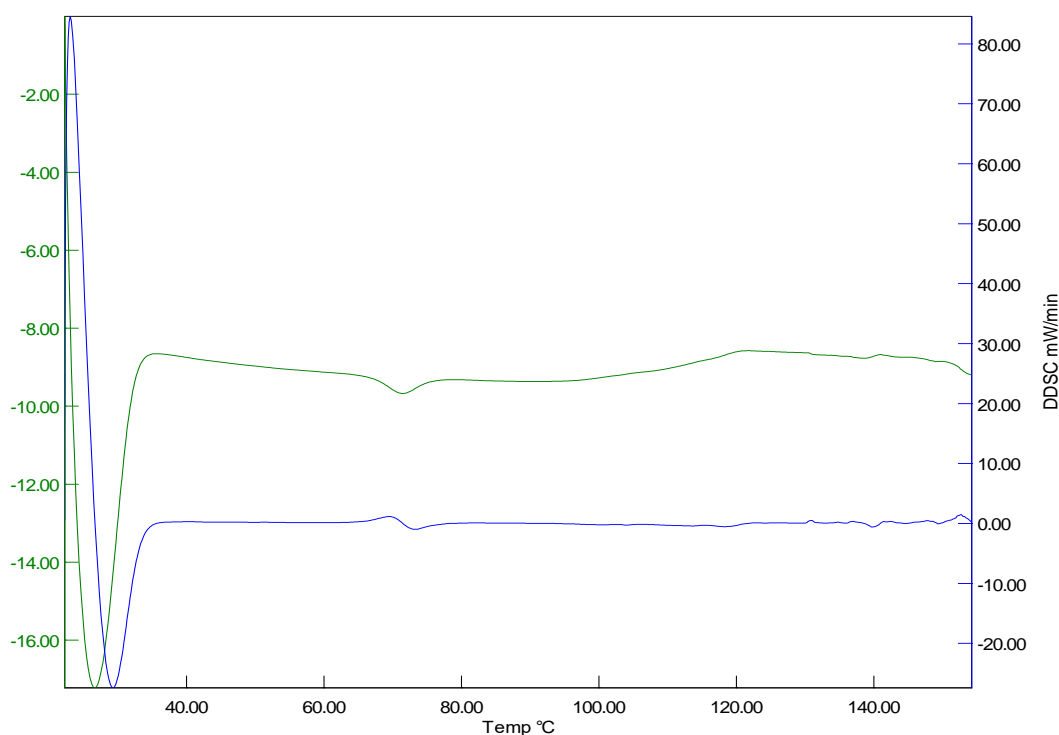


Figura A.1. Curva de DSC do amido de milho comum (28,46% de amilose).

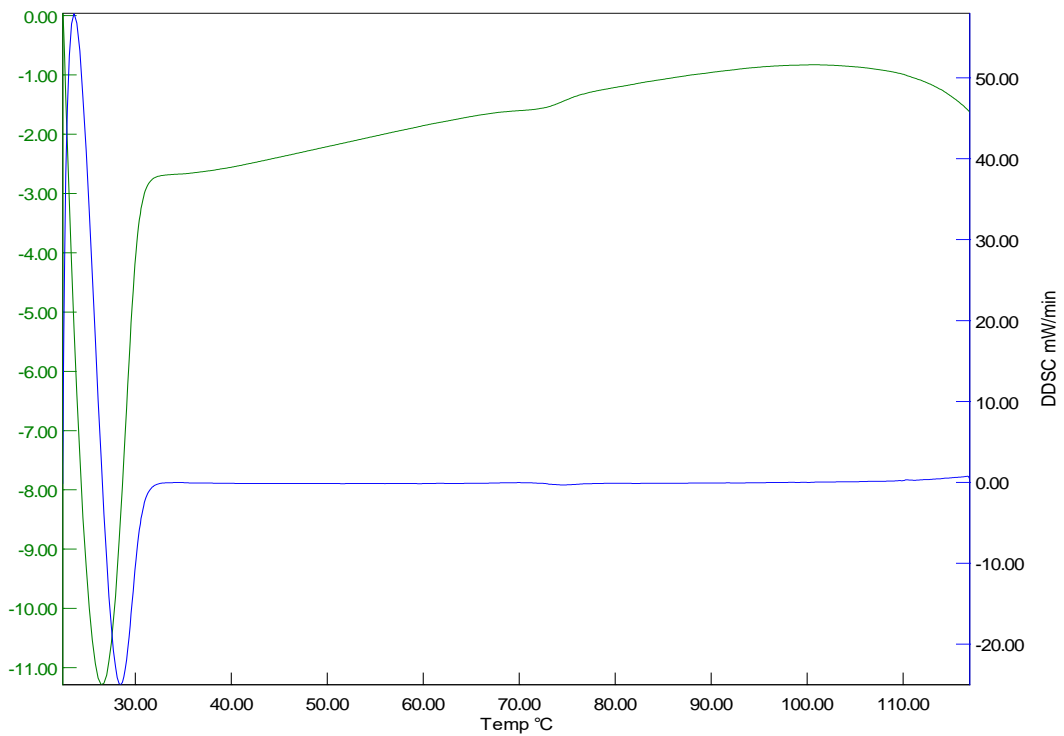


Figura A.2. Curva de DSC do amido de milho com alto teor de amilopectina (6,62% de amilose).

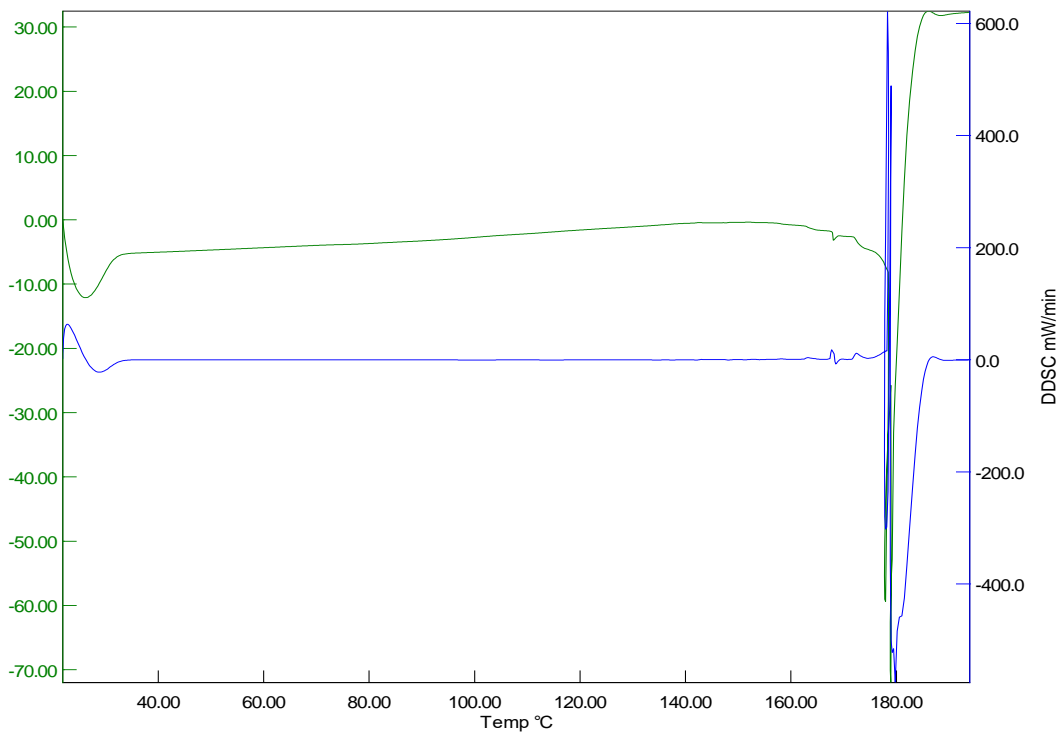


Figura A.3. Curva de DSC do amido de milho com alto teor de amilose (61,10% de amilose).

O amido comum, com 28,46% de amilose exibiu temperatura de gelatinização em torno de 70°C (Figura A.1), enquanto o amido com alto teor de amilopectina apresentou temperatura de gelatinização aproximadamente em 75 °C (Figura A.2). Já na curva de calorimetria do amido com alto teor de amilose, não é observado o efeito de gelatinização até aproximadamente 170 °C (Figura A.3). O alto teor de amilose nesse amido faz com que sua gelatinização aconteça a altas temperaturas, devido ao seu denso empacotamento dos grânulos. Essa análise ajuda a explicar o fato do amido com alto teor de amilose ter possuído grânulos intactos após o processo de gelatinização, que ocorreu em autoclave a 120°C, por 40 minutos (Capítulo 3). O processo de gelatinização realizado para a produção dos macrogéis permitiu a desestruturação de parte dos grânulos do amido com alto teor de amilose, mas sua gelatinização não foi completa.

#### *Difração de Raio-X*

A difração de raio-X é uma técnica importante para estudar o estado cristalino-amorfo dos produtos. Estruturas amorfas produzem padrões de pico amplos, devido à desordem molecular que gera difração de bandas dispersas. Picos estreitos são difratados por estruturas cristalinas, pois apresentam uma alta ordem de configuração (CAPARINO et al., 2012; SILVA et al., 2016). O padrão de cristalinidade do amido é fortemente dependendo do teor de amilose e do comprimento médio da cadeia de amilopectina (CHEETHAM; TAO, 1998). Os difratogramas dos amidos com diferentes teores de amilose são apresentados na Figura A.4.

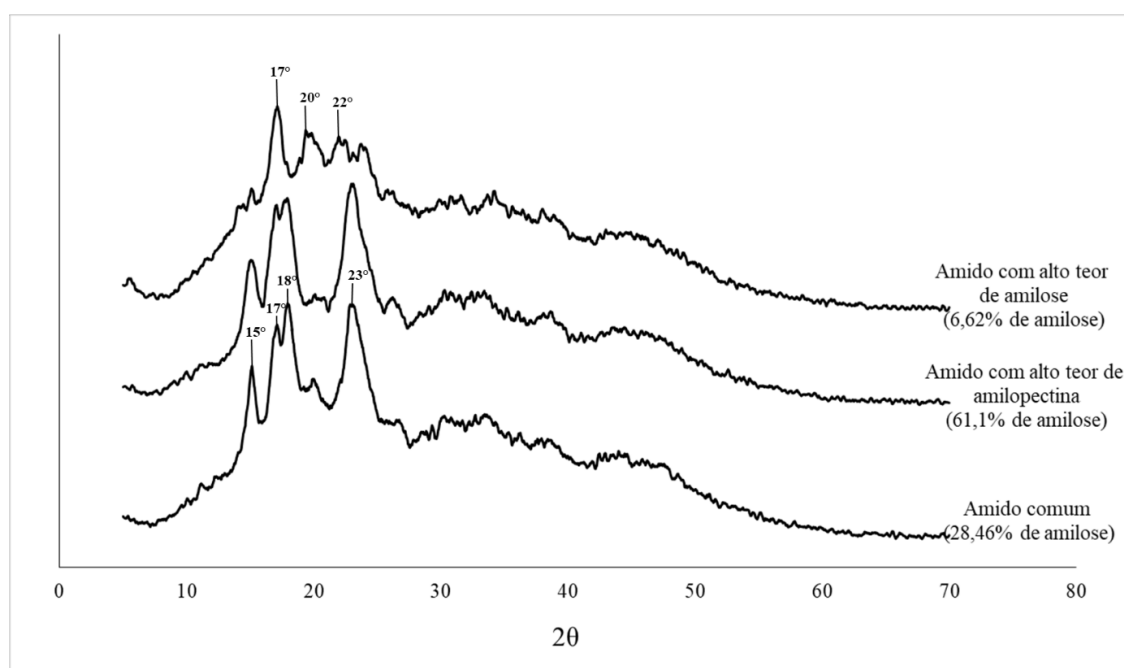


Figura A.4. Difração de raio-X dos amidos de milho com diferentes teores de amilose.

O amido de milho comum apresenta padrão do tipo A típico, com fortes reflexões em  $2\theta$  em  $15^\circ$  e  $23^\circ$ , além de um pico duplo em  $17^\circ$  e  $18^\circ$ . O amido com alto teor de amilopectina apresenta esses mesmos picos, com padrão bastante semelhante ao amido comum. O amido com alto teor de amilose apresenta um padrão diferente dos demais, com o pico entre  $17^\circ$  e  $18^\circ$  tornando-se um só. O espectro desse amido também apresenta os picos em  $20^\circ$  e  $22^\circ$  e originou-se um pico a  $5^\circ$ , característico de padrões tipo B. Segundo Cheetam e Tao (1998), o espectro do amido com aproximadamente 65% de amilose apresenta padrão igual ao amido de batata, que possui padrão tipo B.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

CAPARINO, O. A. et al. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (*Philippine “Carabao” var.*) powder. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 135–148, 2012.

CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules :an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 277–284, 1998.

SILVA, E. K. et al. Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Whey protein isolate versus modified starch. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 71–83, 2016.

## APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE GÉRME DE TRIGO

### *Composição de ácidos graxos do óleo de gérmen de trigo*

A composição de ácidos graxos do óleo de gérmen de trigo foi determinada por cromatografia gasosa, utilizando o método oficial da AOCS (AOCS, 2009). A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso capilar (CGC Agilent 68650 Series GC System, Sunnyvale, California, EUA), com coluna capilar de comprimento 30m, diâmetro interno 0,25mm e espessura do filme 0,25µm DB-23 (Agilent, Sunnyvale, California, EUA). As condições de operação foram: Gás de arraste Hélio, com fluxo de 1 mL/min e velocidade linear de 24 cm/seg, temperatura do detector de 280 °C, temperatura do injetor de 250 °C e rampa de aquecimento de 110 °C a 215 °C a 5 °C/min. O volume injetado foi de 1 µL. A análise foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras, da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP). A composição de ácidos graxos do óleo de gérmen de trigo é apresentada na Tabela B.1. Esse óleo apresenta alto teor de ácidos graxos polinsaturados, que podem ser rapidamente oxidados.

Tabela B.1. Composição de ácidos graxos do óleo de gérmen de trigo

<b>Ácido graxo</b>	<b>% (m/m)</b>
mirístico (C14:0)	0,16
pentadecanóico (C15:0)	0,03
palmítico (C16:0)	10,92
palmitoléico (C16:1)	0,1
margárico (C17:0)	0,09
cis-10-heptadecenóico (C17:1)	0,07
esteárico (C18:0)	3,61
oléico (C18:1)	26,44
trans t-linoléico (C18:2)	0,3
linoléico (C18:2)	51,08
trans t-linolênico (C18:3)	0,71
linolênico (C18:3)	5,17
araquídico (C20:0)	0,38
eicosenóico (C20:1)	0,24
behênico (C22:0)	0,48
lignocérico (C24:0)	0,22



*Índice de estabilidade do óleo de gérmen de trigo*

O índice de estabilidade do óleo de gérmen de trigo foi determinado utilizando o método de Rancimat, a 120°C, com taxa de escoamento de ar de 20 L/h, utilizando um equipamento Biodiesel Rancimat 893 (Metrohm, Herisau, Suíça). A análise foi realizada em quadruplicata. Os valores do tempo de indução do óleo podem ser relacionados com a estabilidade oxidativa. Maiores tempos de indução indicam maior estabilidade. O tempo de indução do óleo de gérmen de trigo foi de 4,56 h  $\pm$  0,06. Esse valor é baixo, quando comparado com outros óleos, como por exemplo o azeite de oliva. O baixo valor do tempo de indução indica que o óleo de gérmen de trigo apresenta baixa estabilidade oxidativa, devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados. A baixa estabilidade desse óleo justifica sua microencapsulação, com o objetivo de protegê-lo contra a oxidação lipídica e a degradação de compostos, como os tocoferóis.

### APÊNDICE C – CRISTALINIDADE DAS PARTÍCULAS (CAPÍTULO 4)

A cristalinidade das partículas produzidas no Capítulo 4, com proporções de alginato e amido de 2:0, 1:1, 1:2 e 1:4 foi avaliada com a análise de Difração de Raio-X (DRX). As curvas de DRX das partículas, do amido de milho e do alginato de sódio são apresentadas na Figura C.1.

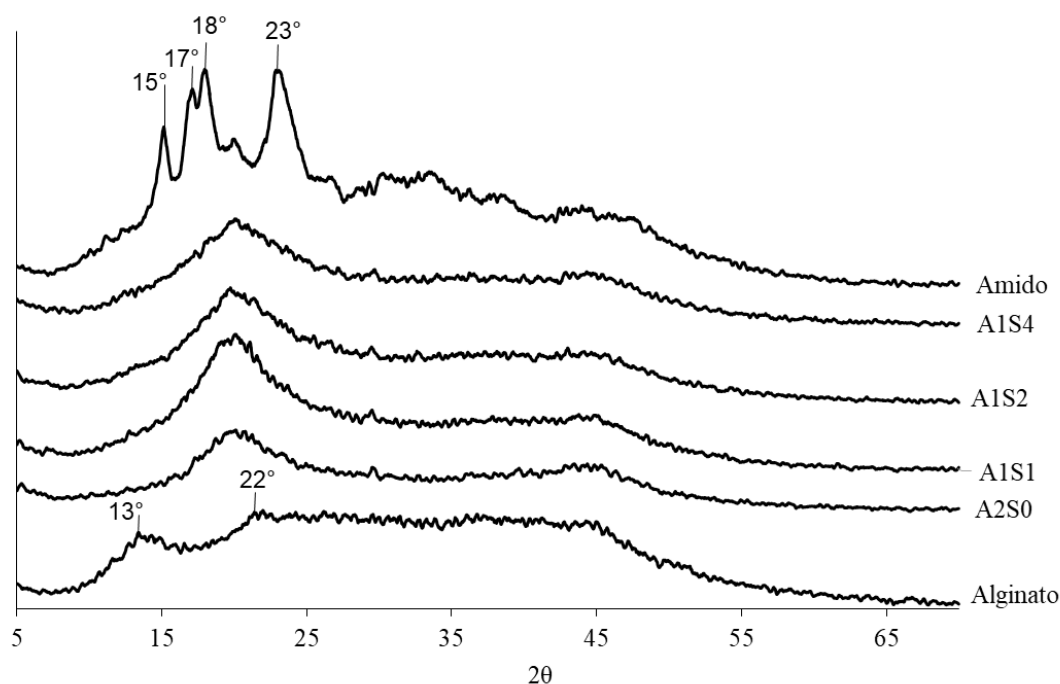


Figura C.1. Difração de raio-X das partículas produzidas com diferentes proporções de alginato e amido de milho gelatinizado. A2S0: 2:0; A1S1: 1:1; A1S2: 1:2; A1S4: 1:4.

O alginato exibiu dois picos cristalinos a  $2\theta = 13^\circ$  e  $22^\circ$  (WANG et al., 2010). O espectro de amido de milho nativo apresentou picos em  $2\theta = 15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $18^\circ$  e  $23^\circ$ , indicando que sua estrutura cristalina segue um padrão do tipo A (FERRINI et al., 2008). O padrão tipo A é característico dos amidos de cereais, exceto aqueles com alto teor de amilose (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998).

Os difratogramas de raio-X das partículas com e sem amido gelatinizado mostraram um pico amplo correspondente ao estado amorfo. Esse pico é característico do espectro de partículas de alginato de cálcio e resulta de um espaçamento regular ao longo do eixo da cadeia molecular, e não da reticulação intermolecular (VREEKER et al., 2008). Os picos cristalinos típicos do amido desapareceram nos padrões das partículas com diferentes concentrações de amido gelatinizado (A1S1, A1S2 e A1S4). Portanto, a gelatinização do amido usada para produzir as partículas foi eficiente. Quando os grânulos de amido estão na presença de um alto teor de água e alta temperatura, as ligações intermoleculares das moléculas de amido se

quebram, alterando sua estrutura granular, causando, assim, uma perda de cristalinidade (XU et al., 2016). Um estudo anterior mostrou que partículas de alginato de cálcio produzidas com amido de milho nativo, sem tratamento de gelatinização, apresentaram os picos cristalinos característicos do amido. A intensidade dos picos diminuiu com a redução na concentração de amido nas partículas (FELTRE et al., 2018).

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**


- AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochimica Acta**, v. 319, p. 17–25, 1998.
- FELTRE, G. et al. Production of Thermal-Resistant Cornstarch-Alginate Beads by Dripping Agglomeration. **International Journal of Food Engineering**, v. 14, n. 1, 2018.
- FERRINI, L. M. K. et al. Effect of acid-methanol treatment on the physicochemical and structural characteristics of cassava and maize starches. **Starch/Staerke**, v. 60, n. 8, p. 417–425, 2008.
- VREEKER, R. et al. Drying and rehydration of calcium alginate gels. **Food Biophysics**, v. 3, n. 4, p. 361–369, 2008.
- WANG, Q. et al. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 842–847, 2010.
- XU, J. et al. Partially gelatinized corn starch as a potential environmentally friendly warp-sizing agent. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 3195–3200, 2016.


# ANEXO

---


PERMISSÃO PARA USO DE ARTIGO

## PERMISSÃO PARA USO DE ARTIGO





[Home](#) [Help](#) [Email Support](#) [Sign In](#) [Create Account](#)



**Alginate and corn starch mixed gels: Effect of gelatinization and amylose content on the properties and in vitro digestibility**

Author: Gabriela Feltre, Flávia Souza Almeida, Ana Carla Kawazoe Sato, Gustavo Cesar Dacanal, Miriam Dupas Hubinger

Publication: Food Research International

Publisher: Elsevier

Date: June 2020

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)