

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**PERMEAÇÃO DE SOLUTOS DE DIFERENTES MASSAS
MOLECULARES EM MATRIZES COMPOSTAS DE ALGINATO DE
CÁLCIO E ACETOFITALATO DE CELULOSE**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Wânia Silveira da Rocha, aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de abril de 2001.

Campinas, 06 de abril de 2001



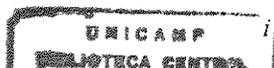
Prof. Dr. Carlos Raimundo F. Grosso
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência da Nutrição.

Wânia Silveira da Rocha
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Orientador

Campinas, março de 2001.



70/11/01

UNIDADE	DE
N.º CHAMADA:	TI UNICAMP
	R582p
V.	
TOMBO BC/	45208
PROG.	16.89.210/
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/07/02
N.º CPD	

CM00157749-0

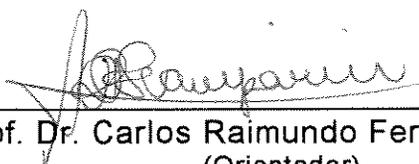
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R582p Rocha, Wânia Silveira da
Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose / Wânia Silveira da Rocha. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

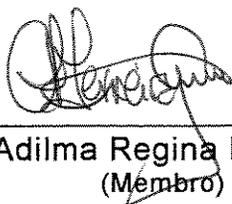
Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Polimerização. 2.Difusão em membrana. 3.Alginatos.
4.Celulose. 5.Encapsulado. 6.Processo de extrusão. 7.Cálcio.
I.Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. II.Título.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(Orientador)



Prof^a. Dr^a. Adilma Regina Pippa Scamparini
(Membro)



Prof^a. Dr^a. Flávia Maria Netto
(Membro)

Prof^a. Dr^a. Marisa de Nazaré Hoelz Jackix
(Membro)

Dedicatória

A Carlos Frederico, que permaneceu firme na conquista desse ser delicado e contraditório... Saiba que esta imperfeita criatura de Deus também te ama...

Agradecimentos

A Carlos Grosso que, independente do nome, foi muito amável e paciente comigo, um verdadeiro mestre, orientando, corrigindo e auxiliando sempre que necessário.

A Francisco Carraro, meu querido “tio” Chico, pelos ensinamentos e auxílio no manuseio e solução dos problemas com os equipamentos utilizados.

A Pascoal e Viviane, pela amizade e ajuda na análise dos dados estatísticos.

A Bete, Cidinha, Eliana, Fátima, Gustavo, Liana, Robson e Soeli, pelo apoio e auxílio nos laboratórios, secretaria, computadores, entre outros.

Aos demais funcionários, alunos e professores do DEPAN e DTA, que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, Renan e Nenza pelo apoio, amor e incentivo.

A Deus, pelo amor sem o qual nada se realiza.

*“O segredo da vida não está em fazer
o que queremos e sim gostar do que
fazemos”.*

Índice

Índice de Figuras e Tabelas	<i>xiii</i>
Resumo	<i>xvii</i>
Summary	<i>xxi</i>
1. Introdução	1
Objetivo	4
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Cápsulas	5
2.2. Alginato	14
2.3. Celulose e Acetato de Celulose	17
2.4. Difusão e Liberação Controlada	20
2.5. Óleos Essenciais	33
2.6. Glicose	34
2.7. Pepsina	35
3. Metodologia	37
3.1. Materiais	37
3.2. Equipamentos	37
3.3. Soluções de Polimerização e de Difusão dos Recheios	38

3.4.	Formação das Cápsulas Gelificadas de Glicose, Limoneno e Pepsina_____	39
3.5.	Medida de Tamanho das Cápsulas Gelificadas_____	41
3.6.	Teste de Difusão da Glicose_____	41
3.7.	Teste de Difusão do Limoneno_____	42
3.8.	Teste de Difusão da Pepsina_____	42
3.9.	Eletroforese_____	43
3.10.	Análise Estatística_____	43
4.	Resultados e Discussão_____	45
4.1.	Ensaio de Difusão da Glicose_____	49
4.2.	Ensaio de Difusão do Limoneno_____	52
4.3.	Ensaio de Difusão da Pepsina_____	56
5.	Conclusão_____	69
6.	Sugestões para Futuros Trabalhos_____	71
7.	Referência Bibliográfica_____	73

Índice de Figuras e Tabelas

Figuras

Figura 2.1.	Mecanismos de Imobilização de Enzimas _____	14
Figura 2.2.	Conformação dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico _____	15
Figura 2.3.	Estrutura do Acetofitalato de Celulose _____	20
Figura 2.4.	Estrutura química do limoneno _____	33
Figura 2.5.	Estrutura química da glicose _____	34
Figura 4.1.	Média das concentrações em mg de glicose difundida por ml de solução de HCl 0,1 N em função do tempo _____	51
Figura 4.2.	Média das concentrações em mg de limoneno difundido por ml de solução de Etanol em função do tempo _____	54

Figura 4.3.	Concentração média em mg de pepsina de cápsulas não lavadas por g de solução de difusão (HCl 0,1 N) em função do tempo	57
Figura 4.4.	Concentração média em mg de pepsina de cápsula lavada difundida por g de solução de difusão (HCl 0,1 N) em função do tempo	59
Figura 4.5.	Perfil eletroforético em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	61

Tabelas

Tabela 2.1.	Tamanho de partícula em relação ao método de encapsulação utilizado	9
Tabela 2.2.	Comparação entre os métodos de imobilização	13
Tabela 3.1.	Formulações dos géis utilizados nos ensaios de análise de difusão	40
Tabela 4.1.	Média dos diâmetros das cápsulas de Alginato e Alginato-AC e respectivos desvios-padrão antes da imersão na solução de difusão	48
Tabela 4.2.	Média dos diâmetros das cápsulas de Alginato e Alginato-AC e respectivos desvios-padrão após 6h de imersão na solução de difusão	49

Tabela 4.3.	Quantidade média em mg de glicose difundida por ml de solução de difusão (HCl 0,1N) em função do tempo_____	52
Tabela 4.4.	Quantidade média em mg de limoneno difundido por ml da solução de difusão (etanol anidro) em função do tempo_____	53
Tabela 4.5.	Quantidade média em mg de pepsina, de cápsulas não lavadas, difundida por g de solução de difusão (HCl 0,1N) em função do tempo e quantidade média em mg de pepsina por g de cápsula._____	58
Tabela 4.6.	Quantidade média em mg de pepsina, de cápsulas lavadas, difundida por g de solução de difusão (HCl 0,1N) em função do tempo e quantidade média em mg de pepsina por g de cápsula_____	60
Tabela 4.7.	Quantidade média em mg/g de cápsula ou solução de todos os tratamentos com pepsina em função do tempo_____	65
Tabela 4.8.	Quantidade média em mg de pepsina por g de água de lavagem utilizando a proporção de quantidade de cápsula para água de 1:2 (g/ml)_____	67

Resumo

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, microorganismos, aditivos alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica. No campo da bioencapsulação, muitas aplicações são baseadas nas propriedades de difusão de solutos para dentro e para fora de matrizes gelificadas. Uma alternativa para encapsulação sem uso de solventes orgânicos, temperaturas ou condições de pH extremas é a ligação iônica de polieletrólitos, onde o material é extrusado como gota dentro de uma solução formando uma gota gelificada. A matriz formada por solução de alginato de sódio devido suas características de porosidade pode determinar a difusão do recheio ao exterior e de solvente ao interior das cápsulas de gel formadas. Entretanto, a erosão dos géis de alginato é um problema importante, uma vez que pode ocorrer a aceleração na liberação do material de recheio.

Acetofitalato de celulose (AC) tem sido utilizada na fabricação de encapsulados entéricos devido a sua insolubilidade em soluções ácidas sendo solúveis a partir de pH 6 ou superiores. Esse material de cobertura também chamado filme entérico parece resistir ao contato prolongado com fluidos gástricos fortemente ácidos, mas incham e se desfazem facilmente em meio ácido fraco ou neutro, condições apresentadas pelo meio intestinal. Celulose tem sido adicionada ao alginato de sódio em uma

tentativa de modificar a liberação de material de recheio de cápsulas, pois a celulose e seus derivados aumentam o grau de aglomeração das cápsulas influenciando a permeação de solutos devido a natureza química e a viscosidade.

Nesse trabalho esferas gelificadas de alginato de cálcio e misturas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose (AC) contendo três diferentes tipos de recheio dissolvido, glicose (Massa Molar 180 Daltons), limoneno (Massa Molar 136 Daltons) e pepsina (Massa Molar 34500 Daltons) foram obtidas a partir da extrusão de solução polimérica em solução de cloreto de cálcio 1,5% puro ou acidificado com ácido clorídrico 0,75N ou com ácido cítrico 70%, tendo permanecido na solução de polimerização, contendo recheio para evitar migração do mesmo, por 30 minutos. As cápsulas assim formadas foram imersas em solução de ácido clorídrico 0,1N ou etanol anidro, no caso de cápsulas contendo limoneno, visando a avaliação do processo de difusão do recheio. A difusão foi acompanhada pela migração dos recheios ao solvente. A análise da concentração de recheio na solução solvente foi feita através de determinação enzimática, cromatográfica e Kjeldahl para glicose, limoneno e pepsina, respectivamente.

O diâmetro das cápsulas foi medido em micrômetro após a maturação e ao término do ensaio e apresentaram o mesmo diâmetro médio (2 mm) entre as medidas. Com relação ao experimento contendo glicose como recheio, as curvas de difusão não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), a migração do recheio para o solvente foi imediata em todos os sistemas estudados. Quando o limoneno foi utilizado como recheio, as curvas de difusão mostraram que o limoneno difundiu-se nos primeiros tempos de amostragem cerca de 50% da quantidade inicialmente adicionada, indicando fraca retenção da matriz do gel em todos

os sistemas estudados. Quando a pepsina foi utilizada como recheio, o estudo da difusão procedeu-se de duas formas, a primeira onde não se lavou as cápsulas e a segunda onde as cápsulas foram lavadas com quantidade de água de 1:2. As curvas de difusão médias mostraram perfis semelhantes em todos os sistemas estudados, sendo seus perfis coerentes com o sistema utilizando reposição de solvente. A quantificação da pepsina difundida indicou que a liberação de recheio variou de 100% para as cápsulas não lavadas a 38% para as cápsulas lavadas, nos primeiros 15 minutos, considerando a máxima concentração possível na solução. O sistema formado por cápsulas não lavadas de alginato de cálcio extrusado em solução de cloreto de cálcio foi o de menor retenção, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos sistemas formados por cápsulas não lavadas e lavadas de alginato de cálcio-AC extrusada em solução de cloreto de cálcio acidificado com ácido clorídrico 0,75N, que apresentaram maior retenção ($p < 0,05$). De um modo geral pode-se concluir que a adição de acetofitalato de celulose com a intenção de diminuir a porosidade das cápsulas de alginato de cálcio não surtiu o efeito desejado de aumentar a retenção do material de recheio nos sistemas com recheio de massa molar baixo como glicose e limoneno, porém com recheio de massa molar alta como pepsina o sistema alginato-AC polimerizado em CaCl_2 acidificado com HCl tanto para cápsulas não lavadas como lavadas obteve melhor retenção.

Summary

Natural and synthetic polymers are used as supports in the immobilization of innumerable types of core materials, including proteins, enzymes, microorganisms, food additives, pesticides and pharmacologically active compounds. In the bioencapsulation field, many applications are based on the diffusion properties of solutes from the inside to the outside of gelled networks. An alternative for encapsulation which avoids the use of organic solvents and extreme conditions of temperature and pH, is the ionic linking of polyelectrolytes, where the material is extruded as drops within a solution, forming a gelled drop. Due to its porosity characteristics, the matrix formed by a solution, forming a gelled drop. Due to its porosity characteristics, the matrix formed by a sodium alginate solutions can determine the diffusion of a core to the outside and of a solvent to the inside, of the gel capsules formed. Thus the erosion of alginate gels is an important problem, since it can result in an acceleration of the liberation of the core material. Cellulose acetate phthlate (CAP) has been used in the preparatin of enteric encapsulates on account of its insolubility in acid solutions, being soluble at pH 6.0 and above. This coating material, also known as enteric film, appears to resist prolonged contact with extremely acid gastric fluids, but swells and disintegrates easily in weakly acid or neutral mediums, conditions found in the intestinal medium. Cellulose has been added to sodium alginate in an attempt to modify the liberation of core

material from capsules, since cellulose and its derivatives increase the degree of agglomeration of the capsules, influencing solute permeation due to its chemical nature and viscosity.

In this research, gelled spheres of calcium alginate and of mixtures of calcium alginate and cellulose acetate phthalate (CAP), containing three different types of dissolved core material: glucose (MW 180 Daltons), limonene (MW 136 Daltons) and pepsin (MW 34500 Daltons), obtained by the extrusion of the polymeric solution in a 1.5% solution of calcium chloride, either pure or acidified with 0.75N hydrochloric acid or with 70% citric acid, containing the core material, remained in the curing solution for 30 minutes in order to avoid migration of core material. The capsules thus formed were immersed in a solution of 0.1N hydrochloric acid or in ethanol in the case of those containing limonene, with the objective of evaluating the process of diffusion of the core material. Diffusion was followed by determining migration of the core materials to the solvent. The concentration of the core material in the solvent solution was determined enzymatically, by chromatography and by Kjeldahl for glucose, limonene and pepsin, respectively.

The diameter of the capsules was measured in micrometer after maturation and at the end of the assay, presenting the same mean diameter of 2 mm on both occasions. With respect to the experiment with a core material of glucose, there was no significant difference ($p < 0.05$) between the various diffusion curves, migration of core material to solvent being immediate under all systems studied. With limonene as core material, the diffusion curves showed that about 50% of the original amount diffused out in the first sampling period, showing weak retention by the gel matrix in all systems studied. With pepsin as core material, diffusion was studied in two ways, firstly without a prior washing of the capsules, and secondly after washing with water in a proportion of 1:2. The mean diffusion curves

showed similar profiles in all systems studied, the profiles being coherent with the systems using solvent reposition. The quantification of diffused pepsin indicated that the liberation varied from 100% to 38% of core material in the first 15 minutes of sampling for the unwashed and washed samples respectively. The system consisting of unwashed capsules of calcium alginate extruded in a calcium chloride solution presented the lowest retention, showing a significant difference ($p < 0.05$) from those systems formed from unwashed and washed capsules of calcium alginate-CAP extruded in a solution of calcium chloride acidified with 0.75N hydrochloric acid, which gave the greatest retention ($p < 0.05$). In general it can be concluded that the addition of cellulose acetate phthalate with the intention of reducing the porosity of the calcium alginate capsules did not show the desired effect of increasing the retention of the core material with low molecular mass like glucose and limonene, although core material with high molecular mass like pepsin had a good retention in the system alginate-CAP.

1. Introdução

A encapsulação consiste na cobertura de partículas minúsculas de ingredientes com um material visando reduzir a reatividade do material encapsulado em relação às condições adversas do meio (como luz, oxigênio e umidade), regular a evaporação ou a taxa de transferência do material encapsulado para o meio; facilitar o manuseio do material encapsulado; controlar a liberação do material encapsulado; algumas vezes, mascarar sabores indesejáveis e também melhorar através da diluição a homogeneização do agente encapsulado em algumas preparações alimentícias (Shahidi e Han, 1993). As microesferas são partículas poliméricas esféricas cujo diâmetro varia de 1 a 250 μm e constituem um sistema matricial no qual uma substância está dissolvida, dispersa ou encapsulada. Outra vantagem destes sistemas reside no fato de poderem ser administrados por diferentes vias quando utilizados para encapsular agentes ativos com atividade farmacológica (Lima e Rodrigues Jr., 1999).

Por muitos anos hidrocolóides têm sido adicionados a alimentos processados atuando como espessantes, agentes modificadores de textura, estabilizantes de emulsões e espumas, gelificantes na suspensão de outros ingredientes, no controle de crescimento de cristais e para produzir a sensação de corpo na boca (Moirano, 1996).

Agentes espessantes/gelificantes apesar de serem em geral insípidos, podem exercer pronunciado efeito sobre outros agentes de sabor/odor nos alimentos onde estão presentes. Em geral, decrescem a doçura, efeito atribuído ao aumento da viscosidade e a alteração da taxa de difusão dos componentes responsáveis pelo sabor/odor (Godschall, 1997).

No campo da bioencapsulação, muitas aplicações são baseadas na propriedade de difusão de vários solutos pela matriz gelificada. Gotas gelificadas de policarboxilatos são normalmente usadas como matriz para encapsular moléculas de significância biológica. A elasticidade das gotas aumenta conforme a afinidade do cátion/poliíon e este parâmetro também é responsável pelo comportamento da sinérese. A concentração de cátion, a força iônica e o pH determinam a cinética da formação do gel bem como o volume e a estabilidade das gotas. O diâmetro do poro e sua distribuição influenciam a difusão de moléculas. Os coeficientes de partição são afetados pelo pH e/ou a força iônica do meio (Mestdagh e Axelos, 1998).

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, microorganismos, aditivos alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica (Tanaka et al., 1984).

Os principais polímeros encapsulantes e suas fontes se dividem em: goma agar, furcelana, carragena e alginato obtidas de plantas aquáticas (algas marinhas); goma arábica, goma karaya e goma tragacanto obtidas de exudados de plantas terrestres; goma guar, goma locusta e goma tara, obtidas de sementes de plantas; a pectina obtida de plantas terrestres; a carboximetil celulose (CMC), hidroxipropilcelulose e celulose cristalina obtida de derivados da celulose; a goma xantana obtida pela fermentação

microbiana. Outro agente muito utilizado é a gelatina, um produto aquo-solúvel obtido a partir de tecido colaginoso de ossos e pele de animais (Igoe, 1982; Dziezak, 1991). Outras alternativas recentes incluem a quitosana, extraída da casca de crustáceos e as proteínas do soro do leite.

Quanto à forma de obtenção das cápsulas, os métodos podem ser divididos em físicos, incluindo o *spray drying*, *spray chilling*, *spray cooling*, leite fluidizado, extrusão, co-cristalização e liofilização; químicos, através de inclusão molecular ou polimerização interfacial; e os físico-químicos incluindo coacervação, separação por fase orgânica e formação de lipossomos (Jackson e Lee, 1991).

Alguns polímeros gelificam por gelificação iônica, gelificação térmica ou por uma combinação destes dois mecanismos. A preparação de microcápsulas através da gelificação iônica envolve a gelificação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molar, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo (Thies, 1994). Nesta técnica o material de recheio é extrusado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada (Okhamafe et al., 1996).

Entre os hidrocolóides utilizados como barreira na proteção de alimentos, quer na forma de filmes ou microcápsulas, encontram-se pectina de baixo teor de esterificação, carragena e alginato de cálcio, todos requerendo um íon para a reticulação da matriz. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade de ser termo-estável podendo ser armazenado à temperatura ambiente.

A matriz formada, devido às suas características de porosidade, pode determinar a difusão do recheio ao exterior e de solvente ao interior das cápsulas de gel formadas. Entretanto, a erosão dos géis de alginato é

um problema importante, uma vez que pode ocorrer a aceleração na liberação do material de recheio (Sezer e Akbuga, 1998).

Acetofitalato de celulose (AC) tem sido utilizado na fabricação de encapsulados entéricos devido a sua insolubilidade em soluções ácidas sendo solúveis a partir de pH 6 ou superiores. Esse material de cobertura também chamado filme entérico parece resistir ao contato prolongado com fluidos gástricos fortemente ácidos, mas incham e se desfazem facilmente em meio de baixa acidez ou neutro, condições apresentadas pelo meio intestinal (Roxin et al., 1998). AC tem sido adicionado ao alginato de sódio em uma tentativa de modificar a liberação do material de recheio de micro-esferas, pois a celulose e seus derivados aumentam o grau de aglomeração das micro-esferas influenciando a permeação de solutos (Chan et al., 1997).

Objetivos

O objetivo desse trabalho foi estudar as características de difusão de matrizes esféricas de alginato de cálcio e misturas alginato-acetofitalato de celulose (AC) obtidas em meio contendo ácido clorídrico ou cítrico, utilizando recheios de diferentes características de polaridade e tamanho, incluindo glicose (MM 180 Daltons), limoneno (MM 136 Daltons) e pepsina (MM 34500 Daltons). As cápsulas gelificadas de alginato de cálcio e misturas de alginato-AC, obtidas em meio ácido foram avaliadas através das características de difusão dos recheios em função do tempo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Cápsulas

As micro-esferas poliméricas surgiram como alternativa de sistema de liberação controlada que pudesse ser administrado de maneira simples. São partículas poliméricas esféricas cujo diâmetro varia de 1 a 250 μm e constituem um sistema matricial no qual uma substância está dissolvida, dispersa ou encapsulada. Algumas vantagens destes sistemas incluem o fato de poderem ser administrados por diferentes vias (Lima e Rodrigues Jr., 1999) e apresentarem reversibilidade na imobilização de células além de condições suaves utilizadas para a imobilização, e como exemplo géis de alginato podem ser solubilizados por íons seqüestrantes de cálcio, liberando assim o recheio encapsulado (Sheu e Marshall, 1993).

A mesma formulação aplicada à produção de cápsulas pode ser utilizada para a fabricação de filmes comestíveis biodegradáveis, com pequenas modificações no espalhamento e secagem da solução polimérica. Um filme comestível é definido como uma fina camada de material comestível formado sobre o alimento como uma cobertura, com o propósito de inibir migração de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, aromas e lipídeos, dentre outros; carregar ingredientes alimentares (e.g.,

antioxidantes, antimicrobianos, sabores); e/ou aumentar a integridade mecânica ou características de manuseio do alimento. A substituição da embalagem sintética convencional por polímeros biodegradáveis pode reduzir o uso de recursos não renováveis e diminuir a quantidade de lixo através de reciclagem de material biológico pelo bio-sistema. O uso de polímeros biodegradáveis em substituição aos polímeros sintéticos à base de petróleo também permitem diminuir a introdução de derivados de dióxido de carbono na atmosfera (Krochta e Mulder-Johnston, 1997). Outros materiais polissacarídeos, tal como filmes de alginato são formados pela evaporação de solução aquosa de alginato seguida por ligação iônica com sais de cálcio. Estes filmes são impermeáveis ao óleo e à gordura, mas são pobres barreiras à umidade (Cottrell e Kovacs, 1980).

Filmes comestíveis preparados com polissacarídeos hidrocoloidais como amido, celulose, pectina, alginato e carragena formam filmes fortes, mas devido a sua natureza hidrofílica exibem baixa resistência ao vapor d'água (Kester e Fennema, 1986; Guilbert, 1986). Filmes de alginato exibem melhor propriedade de barreira ao vapor d'água que outros tipos de filmes preparados com pectina (Parris et al., 1995).

Muitos filmes comestíveis de polissacarídeos e proteínas não são adequados para uso em alimentos com alta atividade de água porque eles tendem a inchar, dissolver, e desintegrar em contato com a água (Guilbert, 1986). Um filme composto de um polissacarídeo e uma proteína pouco resistente à água pode ser melhorado pela incorporação de lipídeos. Entretanto, a adição de lipídeos pode afetar negativamente as propriedades sensoriais dos alimentos cobertos (Wong et al., 1996).

A interação entre surfactante e géis termorreversíveis foi estudada por Tanaka (1998), encontrando uma certa concentração de surfactante onde a gelificação é mais promovida, ocorrendo uma correlação entre a

micela crítica do gel e a concentração do surfactante. A habilidade do surfactante está em entrelaçar, através de interações hidrofóbicas, o polímero e o surfactante.

O plasticizante pode modificar as características físico-químicas e mecânicas do filme de acordo com sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, influenciando a permeabilidade do filme a certas moléculas (Jenkin et al., 1992, citados por Raffin et al., 1996).

Plasticizantes são incorporados em filmes ou cápsulas por vários motivos, incluindo a melhora na flexibilidade, redução da facilidade de quebra, aumentar a resistência e também melhorar a adesividade do filme a outras superfícies ou membranas. Os plasticizantes mais usados incluem ésteres fitalados e fosfatos, ésteres de ácidos graxos e derivados de glicol (Spitael e Kinget, 1977). A seleção de um plasticizante adequado bem como o ajuste de sua concentração tem uma forte influência sobre as propriedades mecânicas, bem como sobre as características de permeabilidade do agente ativo através da parede ou membrana (Crawford e Esmerian, 1971).

A influência de filmes formulados com acetofitalato de celulose sobre a permeabilidade de íons de hidrogênio foi estudada por Raffin et al. (1996), mensurando o coeficiente de permeabilidade de filmes livres em uma célula de difusão. Filmes aquosos e orgânicos à base de AC têm comportamentos distintos; onde os primeiros mostraram-se mais permeáveis. Os resultados demonstram que sob o mesmo pH do suco gástrico, os filmes desse polímero entérico comportaram-se como condutores de íons, devido à difusão de H^+ e Cl^- através do filme (Raffin et al., 1996).

As propriedades funcionais de alguns filmes foram avaliadas quanto à integridade entérica em solução de HCl 0,1 N e liberação do agente ativo em pH 6,8 em solução tampão fosfato e quanto à permeabilidade em água. Os resultados mostraram que filmes de acetofitalato de celulose utilizando como plasticizante o trietilcitrato liberou menos que 1% de ácido acetilsalicílico utilizado como recheio após 2 horas em solução de HCl 0,1 N e mais que 95% após 1 hora em solução tampão fosfato pH 6,8, demonstrando deste modo sua excelente propriedade funcional. Estes filmes têm alta permeabilidade à água e a ácidos o que os torna não apropriados a recheios instáveis a ácido uma vez que a água ou o ácido pode penetrar rapidamente através da membrana destes filmes (Bécharde et al., 1995).

Coberturas contendo carragena como componente principal, têm sido aplicadas em uma grande variedade de alimentos para transportar agentes antimicrobianos e reduzir a umidade, oxidação ou desintegração de produtos alimentícios (Krochta e Mulder-Johnston, 1997).

Géis de alginato usados como padrão de comparação no estudo de características físicas e de liberação de sulfato de sabutamol preparado com diferentes polissacarídeos foram determinados o diâmetro médio, e o conteúdo de material de recheio contido nas gotas. As gotas foram examinadas por microscópio eletrônico de varredura, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e difração em raios-X. A liberação do material de recheio das gotas foi estudada em solução de HCl 0,1 N (pH1,2), água destilada, e tampão fosfato (pH7,4). O exame físico das gotas indicou a presença de cristais do material de recheio sem interação entre este e os polímeros. A liberação foi dependente das propriedades iônicas dos polímeros e do pH do meio (Fattah et al., 1998).

O tamanho das cápsulas pode variar de décimos de microns até alguns milímetros dependendo dos materiais e métodos utilizados no seu processamento. Os intervalos de tamanho típicos para as cápsulas, dependendo do processo de obtenção utilizado, são apresentadas na **Tabela 2.1** (Southwest Research Institute, 1991).

Tabela 2.1. Tamanho de partícula em relação ao método de encapsulação utilizado.

Métodos de Encapsulação	Aplicação dos Materiais	Tamanho (μm)
Métodos Físicos		
Extrusão estacionária	Sólido/Líquido/Gás	1.000 – 6000
Bocal submerso	Sólido/Líquido/Gás	700 – 6000
Extrusão centrífuga	Sólido/Líquido/Gás	125 – 3000
Bocal vibrante	Sólido/Líquido/Gás	500 – 2000
Spray drying	Sólido/Líquido	5 – 150
Disco rotativo	Sólido/Líquido	5 – 1000
Pan coating	Sólido	> 500
Suspensão por ar	Sólido	50 – 10000
Métodos Químicos		
Coacervação	Sólido/Líquido	1 – 500
Polimerização interfacial	Sólido/Líquido	1 – 500
Evaporação do solvente	Sólido/Líquido	1 – 5000
Polimerização <i>in situ</i>	Sólido/Líquido	1 – 500

Fonte: Southwest Research Institute, 1991.

Métodos de microencapsulação tais como precipitação (Douglas e Sefton, 1990), polimerização interfacial (Dupuy et al., 1988) e secagem por atomização (Tanaka et al., 1984) estão bem estabelecidos. Entretanto, estes métodos não têm sido largamente utilizados no estudo de liberação de alguns tipos de recheios porque podem envolver a utilização de solventes orgânicos ou temperaturas extremas ou condições de pH que tornariam os mesmos inativos (Kwok, 1991). Uma alternativa para o uso de solventes orgânicos e/ou temperaturas ou pH extremos é a ligação iônica de polieletrólitos, onde o biomaterial é encapsulado como gota dentro de uma solução tornando-se um gel e essas gotas podem ser subseqüentemente cobertas com outro políon (Daly e Knorr, 1988, Bugarski et al., 1993, citados por Okhamafe et al., 1996).

Macromoléculas ou biopolímeros quando em suspensão aquosa formam soluções ou suspensão coloidal de maior ou menor fluidez. Dependendo da concentração e da natureza das macromoléculas esses colóides, tanto nas células vivas (animais e vegetais) como nos alimentos poderão se transformar em géis de maior rigidez de grande importância para as propriedades funcionais desses sistemas. Os géis, embora sejam rijos, em concentrações muito baixas, mantêm as propriedades dos solventes praticamente inalteradas, apresentando pressão de vapor e condutividade elétrica muito semelhante aos da água pura (Sgarbieri, 1996).

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, microorganismos, aditivos alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica (Tanaka et al., 1984).

A oclusão de um agente ativo em um gel envolve o aprisionamento do composto nos espaços intersticiais de géis poliméricos insolúveis em água, sendo os géis normalmente obtidos por polimerização em sistemas bi-

fásicos de forma a permitir o controle mecânico, por agitação, do tamanho da partícula. O grau de ligações cruzadas no polímero deve ser controlado de forma a conferir ao gel distribuição de tamanho de poros e propriedades mecânicas adequadas. As matrizes mais utilizadas incluem as naturais: colágeno, gelatina, carragenato, agar, alginato de cálcio e amido; e as sintéticas: poliacrilamida, polivinilálcool, polivinilpirolidona e poli 2-hidróximetilmatacrilato (Trevisan, 1990).

Encapsulação em gel com polímeros naturais é uma técnica branda, por não utilizar solventes orgânicos e pode minimizar os danos às células vivas. As desvantagens da encapsulação em gel são força mecânica pobre e a limitada longevidade da estrutura do gel (Willaert e Baron, 1996).

Encapsulação de microorganismos e outros substratos, tais como enzimas, em cápsulas esféricas de alginato de cálcio têm sido um dos métodos mais largamente utilizados para imobilização desse tipo de material biológico. O sucesso deste método é principalmente devido às várias condições sob as quais a imobilização é formada sendo uma técnica efetiva, rápida e simples. A suspensão de células é misturada com a solução de alginato de sódio, e a mistura é gotejada dentro de uma solução contendo cátions multivalentes (usualmente cálcio). As gotas formam esferas de gel instantaneamente, encapsulando células em um entrelaçado tridimensional de rede iônica de alginato. Íons Ca^{2+} também podem ser introduzidos *in situ* pela adição de sais de cálcio inorgânicos de baixa solubilidade (Johansen e Flink, 1986; Clark e Ross-Murphy, 1987). Após um tempo definido de cura, para endurecimento das gotas, em solução contendo o íon divalente, as mesmas são recuperadas, podendo ser usadas como tal ou sofrer um novo processo de cobertura ou tratamento adicional de secagem. O diâmetro dos suportes, geralmente esféricos, pode ser ajustado entre 1 e 5 mm (+/- 0,1mm) (Mestdagh e Axelos, 1999). Quando gotas de alginato de sódio

entram em contato com a solução de cátions divalentes, o suporte gelificado se forma imediatamente. Durante os primeiros minutos, o suporte permanece na superfície. Após algum tempo, dependendo do tipo de concentração do cátion, ele submerge devido ao aumento de densidade. Este período é conhecido como período de maturação. Esse sistema gelificado se desenvolve lentamente com o tempo porque ligações inter cruzadas ocorrem durante a formação do gel, processando-se progressivamente da superfície para o interior do suporte. Simultaneamente, uma perda de água (sinérese) ocorre. Assim, o sistema não representa um verdadeiro equilíbrio (Mestdagh e Axelos, 1999). O peso do suporte decresce com o tempo devido à contração da matriz e a expulsão da água. Um problema freqüente é a irregularidade das gotas, que geralmente apresenta pequenas caldas. Formação de cápsulas esféricas requer cuidadoso controle dos seguintes parâmetros: natureza e concentração da solução de alginato utilizada, do tipo de cátion, e do tamanho molecular do cátion (Lim e Moss, 1981).

As propriedades reológicas de géis de polissacarídeos na presença de ácido cítrico e carbonatos de cálcio e magnésio foram estudadas por Susheelamma et al. (1994). A baixo pH, as interações intermoleculares podem ser favorecidas, mas isto pode ser revertido pela força iônica, como aumento da concentração de ácido cítrico tendo apresentado baixos valores para os índices de força e consistência e alto comportamento de escoamento (fluxo). Íons cálcio mostraram ligações seletivas quando comparados aos íons de magnésio. Essas mudanças na constante reológica claramente indicam que o comportamento de gelificação pode diferenciar consideravelmente frente a diferentes valores de pH.

Na seleção de um suporte para a imobilização de compostos ativos os seguintes aspectos devem ser considerados: as propriedades mecânicas

das cápsulas; a forma física e o tamanho das partículas; a resistência a ataque químico e microbiano; as características de superfície (carga eletrostática, hidrofobicidade, possibilidade de adsorção de outras substâncias, área superficial, composição química); a morfologia do material; sua permeabilidade; a capacidade de ser derivatizado; preço e disponibilidade comercial e finalmente sua possibilidade de regeneração (Serere e Uyeda, 1976, citados em Trevisan, 1990).

Desta forma, a **Tabela 2.2** faz uma comparação entre os diversos métodos de imobilização de compostos biologicamente ativos em relação a vários aspectos importantes para o produto final encapsulado. No caso de imobilização enzimática, a **Figura 2.1** ilustra graficamente alguns mecanismos de imobilização.

Tabela 2.2. Comparação entre os métodos de imobilização

Característica	Ligações cruzadas	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Metálica	Ligação Covalente	Oclusão
Preparação	+ -	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força de Ligação	Forte	Fraca	+ -	+ -	Forte	+ -
Atividade	Baixa	+ -	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação de Suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo	+ -	Baixo	Baixo	+ -	Alto	+ -
Estabilidade	Alta	Baixa	+ -	+ -	Alta	Baixa
Aplicabilidade	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção Microbiana	+ -	Não	Não	Não	Não	Sim

Fonte: Scouten, 1983, citado em Trevisan, 1990.

Legenda: +/- → intermediário

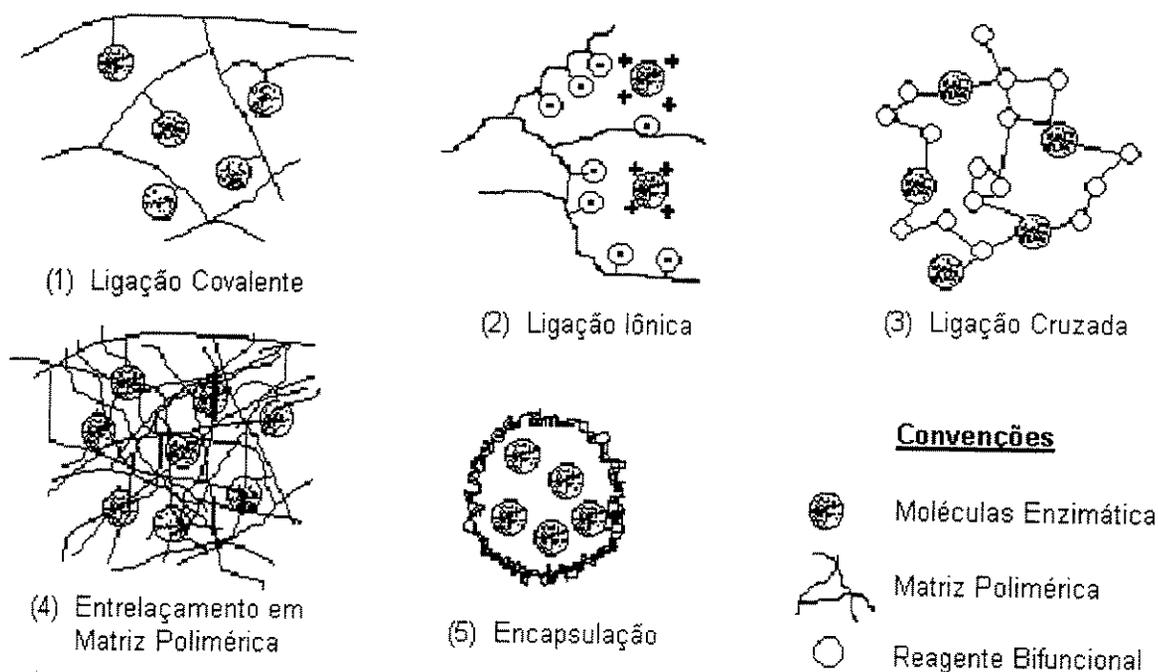


Figura 2.1. Mecanismos de Imobilização de Enzimas (fonte: Trevan, 1980, citado por Cardoso, 1988).

2.2. Alginato

Alginatos são polímeros lineares de alta massa molar com seções rígidas e regiões flexíveis, formados por monômeros de ácido β -D-Manurônico (M) e ácido α -L-Gulurônico (G), ligados de forma linear por ligações glicosídicas $\alpha(1,4)$ contendo três tipos de estruturas de blocos: blocos de ácido β -D-Manurônico (M), blocos de ácido α -L-Gulurônico (G), e uma mistura desses blocos (MG) (Cottrell & Kovacs, 1980). Conforme apresentado na **Figura 2.2**, a composição molecular específica de uma amostra de alginato depende da alga de onde o mesmo é extraído podendo ocorrer variações nas porcentagens de ácido manurônico (M) e gulurônico (G) (Thies, 1994).

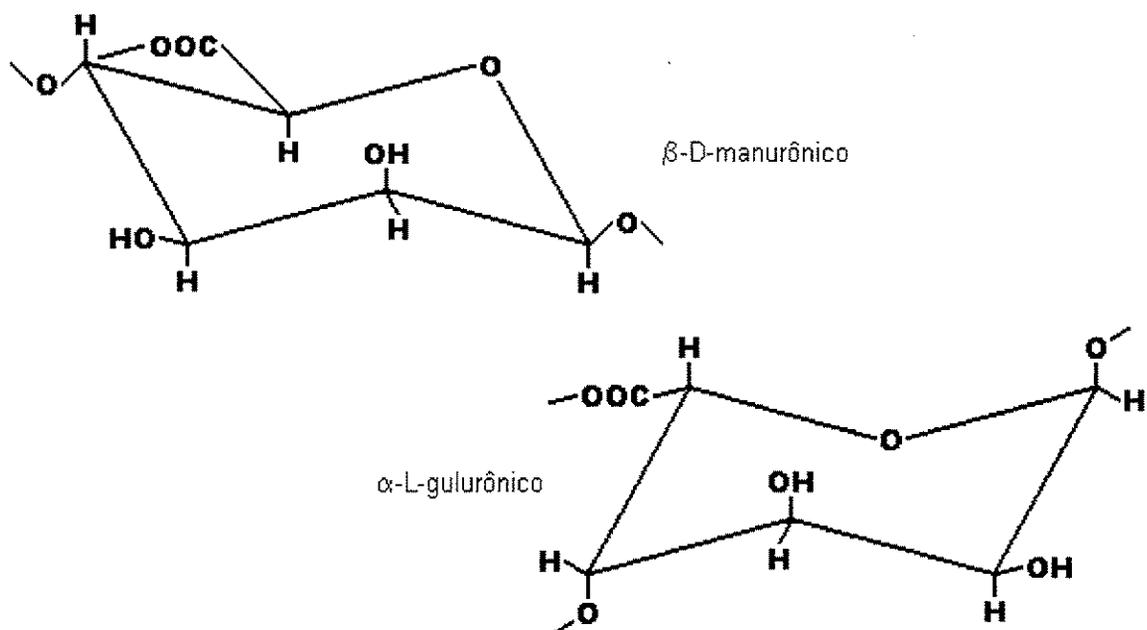


Figura 2.2. Conformação dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico (fonte Neau et al., 1993).

Os principais métodos para produção de géis de alginato são: gelificação por difusão a pH neutro e ácido; gelificação interna a pH ácido ou neutro; gelificação combinada e gelificação por esfriamento.

A aplicação comercial de alginato em alimentos é baseada na interação entre alginato de sódio e cátions para gerar ou modificar a reologia do alimento, usualmente pela formação de uma matriz de gel na presença de íons de cálcio. Os cátions divalentes de cálcio formam uma zona de junção com as moléculas polianiónicas de alginato possibilitando a formação da rede do gel à temperatura ambiente. A principal vantagem do gel de alginato é a sua habilidade de ser termo-estável podendo ser armazenado à temperatura ambiente. Uma vez formado, o gel de alginato mantém sua forma e propriedades reológicas através do processamento térmico, incluindo todo tipo de cozimento, de modo que a rede de alginato pode ser estável ao congelamento e descongelamento, uma propriedade requerida para

muitos alimentos. Através do controle da liberação de cálcio, o tempo de moldura do gel de alginato pode ser ajustado para poucos segundos até muitos minutos e a característica reológica ajustada para especificações particulares de produtos alimentares (Onsoyen, 1997).

Gelificação não é um fenômeno instantâneo; a maturação das gotas ocorre vagorosamente para alcançar e assegurar um estado de equilíbrio após aproximadamente 15 horas (Vellings et al., 1995, citado em Mestdagh e Axelos, 1999).

O mecanismo de formação do gel de alginato pode ser explicado pelo modelo “caixa de ovos” proposto por Grant (1973), para as interações de segmentos G com íons cálcio. As regiões de blocos G são alinhadas lado a lado, resultando na formação de uma cavidade, onde os íons cálcio fazem uma junção entre as cadeias, semelhante ao ovo numa caixa de ovos (Rees, 1969), formando uma rede tridimensional. A força do gel está diretamente relacionada com a quantidade de zonas de junção e a natureza das associações envolvidas nestas zonas (Oakenfull, 1987).

Estudos reológicos e de dispersão de luz com alginatos, sugerem que os blocos aumentam a rigidez na seqüência $G > M > MG$. Estudos de ligações de íons (Kohn, 1975) e estudos de gelificação (Morris et al., 1973; Kohn e Sticzay, 1977) sugerem a presença de 20 resíduos de ácido poli- α -L-gulurônico na formação do bloco G. Um polímero volumoso e rígido é encontrado nas regiões de blocos G e um polímero na forma de uma fita flexível nas regiões de blocos M, tendo as regiões MG rigidez intermediária (Smidsrød, 1972). A capacidade gel formadora e a resultante força do gel obtido está assim muito associada à quantidade de blocos G e ao comprimento desses blocos.

Alto conteúdo de blocos G e blocos G longos produzem alginatos com maior reatividade ao cálcio e mais forte potencial formador do gel (Onsoyen, 1997). O grau de polimerização é também importante na formação do gel, e de acordo com Smidsrød (1972) deve estar acima de 200 para se obter uma força ótima do gel.

Quando uma solução aquosa de alginato de sódio é adicionada por gotejamento a uma solução aquosa de cloreto de cálcio, um gel esférico com forma e tamanho regular pode ser formado. As gotas de alginato, tomadas oralmente, são atóxicas e tem sido reportado exercerem uma proteção efetiva sobre a membrana de mucosas do trato gastro-intestinal (Thies, 1987).

2.3. Celulose e Acetatos de Celulose

Celulose é o mais importante constituinte da parede celular de plantas. Em conjunto com alguns outros polissacarídeos inertes, a celulose é constituída de frações não digeríveis de carboidratos de plantas comestíveis referida como fibra dietética (Shahidi, 1993).

Celulose é um polímero linear polidisperso de origem vegetal e é composto por ligações β -1,4 de resíduos de D-glicose. Celulose é insolúvel em água, mas pode ser dissolvida em certos solventes orgânicos. Embora suporte de celulose tenha sido largamente usado para adsorção de células vivas, o encapsulamento em forma de gel é menos efetivo devido à perda de viabilidade das células devido ao

contato destas com o solvente orgânico. Células podem ser encapsuladas por um mecanismo de precipitação pela mudança de solvente: a suspensão célula-polímero é transferida de uma fase orgânica para uma fase aquosa. Todas as células têm sido imobilizadas com a intenção de reter somente a capacidade catalítica de certas enzimas. Linko et al. (1987) têm encapsulado numerosas bactérias e células de levedura dentro de cápsulas de celulose usando um sistema constituído de solvente de cloreto de N-etilpirimidina, dimetilformamina e sulfóxido. Técnicas similares têm sido desenvolvidas para encapsulamento de células em di e tri-acetato de celulose (Linko, 1982).

As propriedades dos derivados de celulose são fortemente dependentes do grau de substituição e, no caso de misturas de derivados, da razão molar dos substituintes (Olaru, et al., 1995).

Acetato de celulose é um material termoplástico, podendo-se obter filmes pela sua extrusão ou pelo uso de solventes. Filmes de acetato de celulose são cristalinos e resistentes. Sua propriedade de barreira contra umidade e gases não é boa, mas o filme de acetato de celulose é excelente para certos produtos que contém umidade elevada porque permite a troca de gases, como no processo de respiração, evitando a formação de depósitos de água dentro da embalagem (Hanlon, 1992). No entanto apesar de ser biodegradável o acetato de celulose não é comestível (Krochta e Mulder-Johnston, 1997).

Garcia et al (1989) reportaram a preparação de cápsulas de uso potencial terapêutico feitas de membranas de polímero de acetofitalato de celulose (AC) contendo um composto protetor encapsulado junto com uma enzima (invertase). Em pH similares ao do suco gástrico as

microcápsulas foram estáveis e ofereceram proteção a enzima. Em valores de pH similares ao do intestino as microcápsulas foram desintegradas e as enzimas foram liberadas para exercer sua ação catalítica.

Kim et al. (1988) descreveram um método de preparação de microcápsulas estáveis contendo bactérias ácido-lácticas e investigaram o uso de AC para outros recheios. AC foi usado com sucesso no preparo de microcápsulas contendo material antigênico ativo e outras proteínas para consumo oral.

Acetofitalato de Celulose (AC) tem sido largamente utilizada como cobertura entérica para tabletes e cápsulas (Beyger e Nairn, 1986). Esse produto é vendido em forma de pó branco seco, que pode ser disperso em água para criar um líquido para filme de cobertura entérica, tipicamente usada na concentração de 10 a 15% (FMC, 1998). AC tem uma viscosidade moderada, e é apropriado para uso na formação de filme pela adição de diferentes plasticizantes. A desintegração do polímero e subsequente liberação da droga ocorre em pH acima de 6.5 (Vera, et al., 1997).

Derivados de celulose foram adicionados ao alginato de sódio com o intuito de modificar a liberação de compostos ativos através da membrana de microesferas; estes derivados de celulose aumentaram o grau de aglomeração das microesferas. A eficiência de encapsulação e liberação dos compostos ativos foram influenciadas pela natureza química dos derivados de celulose bem como pela sua viscosidade (Chan et al., 1997). A estrutura química do acetofitalato de celulose é dada na **Figura 2.3**.

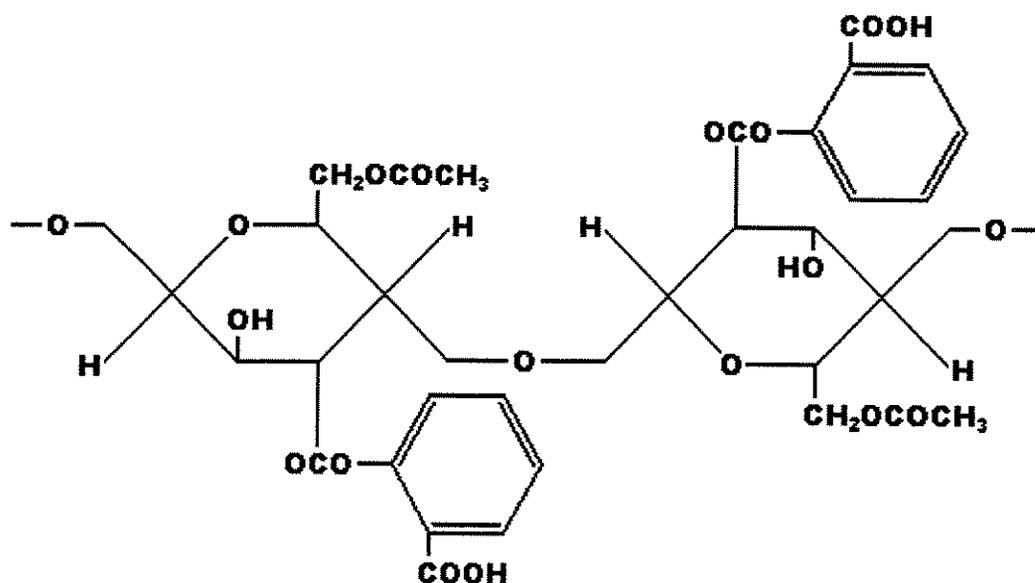


Figura 2.3. Estrutura do Acetofitalato de Celulose (fonte: Joaquim et al., 1990).

2.4. Difusão e Liberação Controlada

A difusão é um processo de permeação determinado pelo gradiente de concentração ou por forças atrativas intermoleculares (Mellenheim e Passy, 1985). A difusão é controlada pela solubilidade do componente na matriz e pela permeabilidade deste componente através da mesma, porém a pressão de vapor ou a concentração da substância dos dois lados da membrana é muito mais expressiva (Reineccius, 1995).

Em cápsulas com alto teor de umidade, a taxa de perda de um componente de uma solução que está sendo seca, depende principalmente da sua volatilidade, enquanto que em baixo conteúdo de umidade o

coeficiente de difusão do componente é o fator determinante (Thijssen et al., 1970).

A correlação entre difusividade, raio da molécula ou partícula que se difunde, a temperatura e a viscosidade do meio de difusão para moléculas grandes presentes em soluções diluídas é dada pela heterogeneidade da estrutura com a presença de membranas, redes, camadas, poros além dos fenômenos de sorção dos solutos pela água e pela ocorrência simultânea de transferência do soluto e da água, resultantes de gradiente de concentração e de forças osmóticas (Guilbert, 1985).

A cinética de liberação de materiais de recheio tanto de matrizes poliméricas hidrofílicas quanto hidrofóbicas tem sido estudada experimentalmente, e a quantidade liberada representada por uma cinética $t^{1/2}$ tem sido geralmente observada (Papadokostaki, et al., 1998).

De acordo com Koida et al. (1987) o mecanismo de transporte do agente ativo através da microcápsula pode ocorrer: a) através de uma fase polimérica contínua (Flynn et al., 1974); b) através de canais interconectados como poros minúsculos ou pequenos rompimentos (Deasy, 1984); ou c) paralelamente através da fase polimérica contínua e através de canais interconectados (Barrie, 1968) a partir do qual modelos matemáticos de fluxo através da cápsula podem ser estabelecidos.

De acordo com Thies (1995), a liberação do material de recheio pode ocorrer de diferentes formas, podendo-se representar quatro modelos teóricos de curvas de liberação. O primeiro considera a existência de um mecanismo de "disparo" que inicia a liberação. Geralmente a presença de uma força externa é responsável pelo início da liberação. Outros fatores, entretanto, podem ser responsáveis por este "disparo" tais como calor, luz,

pH e degradações químicas da cápsula. O segundo mecanismo assume que a parede da cápsula atua como um reservatório, supondo-se então, que a taxa de liberação é constante. O terceiro modelo pressupõe a migração através da parede, mas considera um efeito adicional de liberação ocasionado por pequenos rompimentos na estrutura da cápsula. O quarto modelo considera a parede como uma membrana semipermeável e seletiva a diferentes massas moleculares.

Não existe um único tipo de curva de liberação que satisfaça todas as necessidades. As cápsulas desenvolvidas para liberação controlada tendem a apresentar liberação de primeira ordem. A cinética de liberação de substâncias ativas de uma população de micro-partículas que, individualmente, liberam seus conteúdos a taxas constantes pode ter um perfil de ordem zero, primeira ordem, sigmóide ou bifásico. A equação de liberação depende da distribuição estatística dos parâmetros que determinam a liberação entre a população. Casos típicos são apresentados em termos da distribuição de dois parâmetros: a massa do recheio (m_{∞}) e o tempo para a total linearização do recheio (t_{∞}) que também definem uma constante da taxa de liberação (K). A heterogeneidade dos dois parâmetros geralmente leva a um comportamento de liberação de primeira ordem de uma população, enquanto que a heterogeneidade de um parâmetro somente pode levar a diferentes equações de liberação de uma população, i.e., ordem zero (m_{∞} heterogêneo) ou de primeira ordem (t_{∞} heterogêneo). Uma distribuição bifásica pode levar a um aparente efeito de ruptura da estrutura da microcápsula, com a mudança da cinética de liberação. A presença de um terceiro parâmetro heterogêneo, fase lag, apresenta uma curva de liberação sigmóide (Donbrow, 1988).

Em geral a razão de liberação encontrada para uma microcápsula considerada individualmente é de ordem zero, meia-ordem ou primeira

ordem. “Zero-ordem” ocorre quando o núcleo é um material puro que pode liberar-se através da parede da microcápsula com material puro. Se a cinética de liberação é de ordem zero, a velocidade de liberação é constante, o que, na prática, pode ser difícil de se obter. Atualmente, mecanismos utilizando bombas osmóticas (Wong, 1992) e géis reticulados apresentam liberação do agente ativo com este tipo de cinética. Liberação de “meia-ordem” geralmente ocorre com partículas da matriz. Liberação de “primeira-ordem” ocorre quando o material de núcleo é na verdade uma solução. Este tipo de processo é o mais comum e a cinética de liberação obedece ao modelo de Fick. Difusão depende do tamanho, forma e polaridade da molécula penetrante bem como da cadeia do polímero, que inclui forças de atrações intercadeias tais como pontes-de-hidrogênio e interações de Van-der-Waals, grau de ligações e quantidades de cristalinidade. É sabido que para o sucesso da encapsulação deve ocorrer a formação de uma estrutura amorfa meta estável. Redução do conteúdo de água aumenta a temperatura de transição vítrea, e resulta em uma matriz amorfa impermeável para compostos orgânicos bem como para o oxigênio. A permeabilidade à água mantém-se finita (Thies, 1994).

Considerando a difusão de solutos para dentro e para fora das gotas de um gel; para solutos de baixa massa molar em comparação com a porosidade das gotas (10 a 20nm), o coeficiente de difusão não foi afetado pelo pH ou força iônica do meio. O coeficiente de difusão decresce com a massa molar de certas moléculas, mas a variação do coeficiente de difusão nem sempre segue a lei de Stoke-Einstein. Ao contrário do coeficiente de difusão, o coeficiente de partição é afetado pelo pH e/ou força iônica do meio. Isto significa que certas forças atrativas ou repulsivas de interação podem existir entre as moléculas difundidas e as cadeias do gel de alginato (Mestdagh e Axelos, 1999).

A equação de Stokes-Einstein é a mais comumente utilizada na avaliação da difusão de solutos em líquidos e é dada pela **Equação 2.1** a seguir (Janolio, 1982, citado em Cabral, 1990).

$$D_{1,2} = \frac{K_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R_0} \quad \text{Eq. 2.1}$$

onde: $D_{1,2}$ → Difusividade do soluto (1) no solvente (2)
 K_B → Constante de Boltzmann
 μ → Viscosidade do solvente
 R_0 → raio do soluto
 T → temperatura absoluta (°K)

Outras correlações semi-empíricas são aplicadas para avaliação da difusão e entre elas, uma de bastante uso é a correlação de Wilke-Chang (Reid et al., 1988).

O método mais comum de determinação da difusividade em solução é através da utilização de uma célula de diafragma formada por dois compartimentos de solução com o soluto em estudo, e em concentrações diferentes, separadas por uma membrana porosa. Através da medida da variação das concentrações no tempo é possível a determinação do coeficiente de difusão. Para a determinação da difusividade efetiva, basta substituir o diafragma por uma membrana do gel em estudo (Furui, 1985).

Em outro estudo, Toda e Shoda (1975), utilizaram um tubo contendo o gel imerso em uma solução do soluto a ser difundido, mantendo o sistema sobre agitação e a temperatura controlada por um certo tempo. Após o tempo considerado o gel foi fatiado e a concentração do soluto determinada, obtendo-se um perfil de concentração. Os requisitos básicos

deste método são: a concentração do soluto no meio em agitação deve permanecer constante sendo o tempo fixado de forma que a frente de concentração não atinja a outra extremidade do sólido.

Difusividade efetiva de solutos em alginato de cálcio, utilizando-se estado não estacionário, em esferas de gel imersas em volume de líquido finito, foram medidas por Tanaka et al. (1984), utilizando equações estabelecidas por Crank (**Equação 2.2**), podendo-se considerar a difusão do interior ao exterior da cápsula ou do exterior ao interior da mesma.

$$C_P = \frac{\alpha \cdot C_{L0}}{1 + \alpha} \cdot \left[1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6 \cdot (1 + \alpha) \cdot e^{-D \cdot q_n^2 \cdot t / a^2}}{9 + 9 \cdot \alpha + q_n^2 \cdot \alpha^2} \cdot \frac{a}{r} \cdot \frac{\text{sen}(q_n \cdot r / a)}{\text{sen } q_n} \right] \quad \text{Eq. 2.2}$$

onde: C_P → Concentração de substrato

C_{L0} → Concentração inicial do substrato

a → Diâmetro da cápsula

r → Raio

t → Tempo

α → $\left(\frac{V}{n} \right) \cdot \left(\frac{4 \cdot \pi \cdot a^3}{3} \right)$

V → Volume da solução, excluído o espaço ocupado pelas cápsulas

N → Número de cápsulas

q_n → Termos de raiz positiva $\neq 0$.

A maioria dos efeitos de difusão relatada em géis pode ser explicados com base na mudança na tortuosidade τ ou porosidade ε ; mudança no coeficiente de partição; interação de moléculas grandes com a rede da matriz do gel; interação entre solutos de diferentes difusões; e efeitos da temperatura (Willaert e Baron, 1996).

A formação de géis ou emulsões pode restringir a difusão, embora não ocorra redução significativa da atividade de água. Quando pequenas concentrações dos agentes gelificantes são usadas, a difusividade de solutos com baixa massa molar pode não ser afetada enquanto a difusão de moléculas de alta massa molar com altas concentrações do agente gelificante ou quando existir alguma afinidade entre o agente gelificante e a molécula que se difunde pode ocorrer uma redução significativa na difusividade aparente (Guilbert et al., 1985).

Entre os sistemas poliméricos de liberação controlada de agentes ativos, cápsulas de gel de alginato de cálcio são consideradas como sendo sistema reservatório quando o material de recheio é dissolvido junto à solução de cálcio e esta solução é gotejada dentro da solução de alginato, formando uma película; enquanto a difusão através das cápsulas, quando cápsulas de alginato de cálcio são obtidas pelo gotejamento da solução de alginato de sódio contendo o material de recheio na solução de cloreto de cálcio, o modelo parece ser o de difusão controlada pela matriz do gel (Tomida et al., 1993).

Smidsrød (1974), estudou a porosidade de géis de alginato usando microscopia eletrônica de varredura e encontrou uma grande distribuição de diâmetros de poro variando de 5 a 200 nm. Proteínas globulares com raio de giro de 3 nm carregadas negativamente podem não ser encapsuladas dentro da malha de alginato, podendo difundir livremente no solvente (Martinsen et al., 1989). Klein et al. (1983) usaram cromatografia e dextranas de tamanhos conhecidos como padrão, para avaliar os diâmetros dos poros de géis de alginato de cálcio, observando que os mesmos foram uniformes. Os diâmetros de 6,8, 14,1 e 16,6 nm foram observados para o tamanho de poro de três alginatos diferentes. Pelos estudos da distribuição do tamanho do poro usando microscopia eletrônica foi sugerido que há uma maior constrição da superfície da cápsula do gel

que no seu interior (Andresen et al., 1977). Skjåk-Bræk et al. (1989), encontraram que a estrutura de alginato é governada não somente pela concentração e estrutura química do material do gel, mas também pela cinética de formação do gel.

O tamanho do poro do gel refletido pela viscosidade do encapsulante devido ao tamanho da molécula e/ou sua concentração pode afetar a difusão de substratos ou produtos e limitar as taxas de reação das células ou enzimas encapsuladas. Substratos de baixa massa molar podem facilmente difundir para dentro e para fora de uma matriz com poros grandes. Os principais fatores na seleção do sistema mais efetivo para a imobilização de células ou enzimas são o tamanho do poro definido pelo tamanho molecular e a estrutura do composto usado como carregador, bem como o tamanho do substrato que se queira difundir através da parede da cápsula (Tanaka et al., 1984).

O tamanho do poro distribuído pelo gel é um parâmetro crítico por causa de sua influência na difusão de moléculas tais como substratos e produtos através de imobilização de biocatalizadores. Além disso, adsorção de proteínas de baixa massa molar em gotas de gel de alginato pode ser controlada pelo ajuste do pH ou força iônica média. Uma liberação controlada de proteínas pré-adsorvidas pode também ser conseguida de maneira semelhante (Vellings et al., 1994, citado em Mestdagh e Axelos, 1999).

A concentração de cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética de formação do gel bem como o volume e a estabilidade do suporte. A distribuição dos tamanhos de poro variam e influenciam a difusão de moléculas. Os coeficientes de partição são afetados pelo pH e pela força iônica do meio. O peso das gotas/cápsulas formadas decresce

com o tempo devido à contração da matriz e expulsão da água (Mestdagh e Axelos, 1999).

As matrizes na forma de gotas de gel de alginato se contraem em grande extensão, conforme o pH do meio decresce por causa do decréscimo de solubilidade devido ao aumento da fração de grupos carboxílicos não ionizados com a consequente liberação de água, levando à possibilidade de formação das gotas, mesmo sem a adição de íons cálcio (Yotsuyanagi et al., 1991).

Ocorre influência do pH na difusão de substratos carregados porque a matriz de gel de alginato se encontra negativamente carregada. No estudo realizado por Martinsen et al. (1992), observou-se que a razão da difusão da proteína utilizada era aumentada com o aumento do pH devido ao acréscimo de cargas negativas da proteína.

A difusão de solutos em gel de alginato é também afetada pela composição química do alginato. O coeficiente de difusão de albumina em 4% de géis de alginato de cálcio provenientes de *Laminaria digitata*, *Macrocystis pyrifera* e *L. hyperborea* cresceu com o decréscimo do conteúdo do ácido gulurônico (Martinsen et al., 1992).

Ostberg e Graffuer (1994) observaram que a utilização de alginatos, contendo menores quantidades de resíduos G na matriz, apresentou mais baixa eficiência de encapsulação e também uma liberação do agente ativo mais rápida.

Valores de pH entre 4 e 10 não afetam o volume das gotas/cápsulas; protonação de grupos carboxilados abaixo de pH 4 reduz a repulsão eletrostática entre as cadeias de alginato e promovem uma redução das gotas/cápsulas. Em valores de pH muito baixo (pH<2) o alginato precipita e forma gotas/cápsulas brancas muito pequenas e

inelásticas. Acima de pH 10, Ca (OH)^+ e Ca (OH)_2 são formados; não permitindo ligações entre cadeias de alginato, mas aumentando o número de carboxilatos livres promovendo uma repulsão eletrostática e expansão do volume das gotas/cápsulas. As gotas/cápsulas são dissociadas a pH acima de 12. O volume hidrodinâmico do soluto tem uma influência sobre o coeficiente de difusão e seu valor decresce quando a massa molar aumenta. De modo contrário ao coeficiente de difusão, os coeficientes de partição são afetados pelo pH e/ou força iônica do meio. Isto significa que algumas forças de interação atrativas ou repulsivas podem existir entre as moléculas difundidas e as cadeias da matriz de alginato (Mestdagh e Axelos, 1999).

Cápsulas de alginato podem ser estabilizadas pela troca de íons cálcio por outros cátions divalentes de maior afinidade por alginato. A série de afinidades de outros cátions divalentes usados na imobilização de células encontrando-se na seguinte ordem, $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+}$ (Willaert e Baron, 1996). Smidsrød (1974) mostrou que a rigidez do gel aumentava conforme aumentava a afinidade pelo cátion.

Estabilidade mecânica da cápsula de alginato de cálcio pode ser consideravelmente aumentada pela secagem parcial do gel. O tamanho da cápsula esférica depende primariamente da superfície de tensão (viscosidade) da solução de sódio e da distância entre o gotejamento e a solução de CaCl_2 , e não do diâmetro interno da agulha (Matulovic et al., 1986; Smidsrød e Skjak-Braek, 1990).

A maior desvantagem do uso de cápsulas de alginato de cálcio é sua sensibilidade a compostos quelantes tais como fosfatos, citratos, EDTA e lactato, ou cátions antigelificantes como sódio ou magnésio (Mestdagh e Axelos, 1999).

Diferentes fatores que afetam a estabilidade de cápsulas de gel de alginato de cálcio na encapsulação de células viáveis durante a fermentação foram estudados por Ogbonna et al. (1989). Eles encontraram que entre outros fatores, a população inicial de células por ml de cápsulas de gel; o período de incubação em solução de cloreto de cálcio; e a concentração de alginato de sódio utilizada na imobilização foram os fatores mais importantes afetando a estabilidade das cápsulas de gel durante a fermentação. Eles recomendaram o uso de gotas/cápsulas recém preparadas incubadas em solução de cloreto de cálcio por 22 horas antes do uso.

Tanaka et al. (1984) demonstraram que a difusão do soluto com massa molar menor que 2×10^4 Daltons (glicose, L-triptofano e α -lactoalbumina) não foram perturbados pelo aumento da concentração de alginato (2-4% p/v) nem pela concentração de CaCl_2 usada na preparação do gel; o coeficiente de difusão destas substâncias encontrado foi comparável aos encontrados para difusão em água. Para moléculas grandes, tais como albumina, γ -globulina e fibrinogênio, a difusão no gel foi retardada dependendo da concentração de alginato e de cloreto de cálcio. Além disso, essas proteínas tiveram difusão para fora, mas não para dentro das cápsulas. Por esta razão, foi sugerido que a estrutura do gel de alginato de cálcio formado na presença de moléculas grandes de proteína era diferente dos géis formados na ausência destas.

Kierstan et al. (1982) estudaram o efeito da dimensão do gel, tipos de alginato e concentrações e extrusão dos íons sobre as propriedades de difusão dos géis de alginato com referência específica para seu uso em técnicas de cromatografia de difusão e separação de sólidos. Seus resultados demonstraram que as características de difusão de compostos de baixa massa-molecular, tal como ácido desóxidorribonucleico (DNA), não foram afetadas pela concentração do íon cálcio ou do gel de alginato.

Entretanto, no caso de compostos de alta massa-molecular, como a hemoglobina, as características de difusão embora não afetadas pela concentração de cálcio, foram significativamente afetadas pela concentração do gel de alginato. Contudo as características de difusão de ambos os compostos de baixa e alta massa molares foram afetadas pela dimensão do gel de alginato formado. O estudo demonstrou que géis de alginato polimanurônico possuem boas características de porosidade, enquanto alginatos poli-gulurônico formaram géis com baixa porosidade, especialmente com respeito a compostos de alta massa-molecular.

Embora a porosidade dos géis de alginato formadores de cápsulas permita a livre difusão de solutos aquosolúveis, materiais lipídicos irão ser mantidos dentro da matriz, mesmo sendo de baixa massa molar, quando a solução contendo as cápsulas for aquosa (King, 1988).

Microcápsulas utilizando misturas quitosana-alginato usadas no trabalho de Okhamafe et al. (1996) mostraram uma propriedade de liberação insatisfatória, perdendo 94% da proteína encapsulada (albumina bovina) em um período de 24 h a pH 1,2. A incorporação de um polímero pH sensível, acetato succinato de hidroxipropil metilcelulose (HPMCAS), nas microcápsulas, pela cobertura da membrana da cápsula bem como pela mistura com material polimérico do núcleo em várias concentrações, produziram mudanças significantes na liberação. A pH 1,2, as cápsulas modificadas retiveram mais de 60% da proteína encapsulada após 24h (Okhamafe et al., 1996).

Sezer e Akbuga (1999) observaram que a adição de quitosana aumentou a capacidade de preenchimento das gotas/cápsulas de alginato, sendo também maiores em tamanho. Por outro lado, a adição de quitosana na estrutura do gel de alginato, reduziu a liberação de drogas macromoleculares, tais como dextranas (MM 70000 Daltons), através da

parede da cápsula. Em outro trabalho subsequente eles estudaram a liberação de drogas de baixa massa molar e alta solubilidade, através de géis de alginato de cálcio tratado com quitosana, variando os parâmetros: de concentração de alginato, da droga, da quitosana, e do cloreto de cálcio, observando que os volumes da fase externa e interna afetaram as propriedades de retenção das gotas/cápsulas. A técnica de secagem também se apresentou importante para as propriedades de retenção das gotas/cápsulas. A razão de liberação foi avaliada cineticamente e eles concluíram que as gotas/cápsulas de alginato tratadas com quitosana poderiam ser utilizadas como um sistema de liberação controlada de drogas com baixa massa molar e alta solubilidade. Eles encontraram que a concentração de alginato não afetou o tamanho da gota/cápsula; isto pode ser devido à propriedade do alginato de apresentar alta viscosidade em solução, como reportado por Okhamafe et al. (1996); o decréscimo na liberação da droga foi obtido com a adição de quitosana dentro da fase externa; aumento na liberação da droga também ocorreu com aumento da concentração de cloreto de cálcio (Sezer e Akbuga, 1999 b).

Varshosaz, et al. (1997) estudaram o efeito de diferentes polímeros, entre eles acetofitalato de celulose (AC), utilizando o processo de extrusão para formação de micro esferas e para avaliar o efeito sobre as propriedades físicas e o comportamento de liberação do material de recheio, utilizando reposição de solvente a cada retirada de amostra ao longo do tempo. Obtiveram como resultado que o tipo de matriz contendo microesferas de AC e hidroxipropilmetil celulose fitalato (HPMCF) tinham seus núcleos desintegrados rapidamente tanto em condição ácida (pH 1,2) como alcalina (pH 7,4) enquanto esferas cobertas com esses mesmos polímeros passaram no teste. Eles encontraram que apesar das propriedades entéricas da AC e HPMCF usada para cobertura de materiais

como microesferas, elas não eram viáveis para obter o mesmo efeito quando incorporadas na matriz das microesferas.

2.5. Óleos Essenciais

Óleos essenciais podem ser definidos como óleos voláteis, odoríferos, de origem vegetal, obtidos por prensagem, destilação, destilação a vapor, extração por solventes e outros processos físicos e/ou químicos. São misturas de compostos, e em princípio, pouco solúveis em água, mas são solúveis em solventes orgânicos, e possuem uma coloração que vai do amarelo castanho até o incolor, possuem índices de refração elevados, em média 1,5 e ampla faixa de atividade ótica (Shreve e Brink, 1977).

Entre os óleos essenciais o limoneno pode ser classificado como um terpeno cíclico com função hidrocarboneto (Bauer, 1985). Possui massa molar de 136,2 Daltons e ponto de ebulição 175,5-176,5° (MERCK INDEX). Sua estrutura química pode ser observada na **Figura 2.4**.

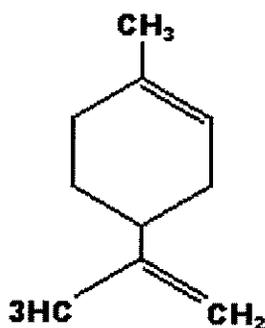


Figura 2.4. Estrutura química do limoneno.

2.6. Glicose

A glicose, uma das hexoses mais abundantes na natureza, apresenta fórmula química ($C_6H_{12}O_6$) e MM 180 Daltons, é um monossacarídeo de aspecto sólido cristalino, tem um suave poder edulcorante, solúvel em água e em álcool e desvia a luz polarizada para a direita. A glicose ou dextrose é o açúcar obtido de amido, refinado e cristalizado, suas características são máximas de: 2% de umidade; 0,25% de sais; 0,6% de maltose e mínimo de 98% de glicose calculada sobre matéria seca. Sua estrutura química é apresentada na **Figura 2.5** (Vicente et al., 1996 e Merck Index, 1996).

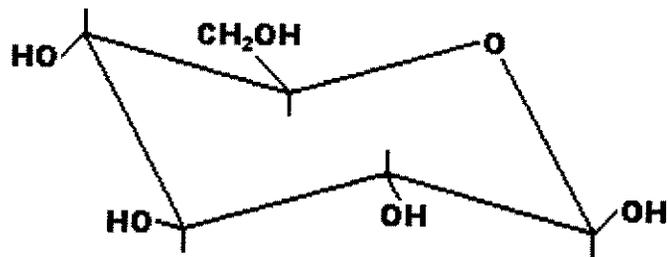


Figura 2.5. Estrutura química da glicose.

2.7. Pepsina

Pepsina é a principal enzima digestiva do suco gástrico; atuando sobre a proteína promovendo a sua hidrólise. Distingue-se das demais enzimas por ter um baixo ponto isoelétrico ($< \text{pH } 1.0$) e um pH ótimo baixo; é praticamente insolúvel em álcali, clorofórmio e éter; e muito estável em ácidos. Hidrolisa somente ligações peptídicas. É isolada do suco gástrico de bovinos e suínos. Pepsina em solução é destruída por aquecimento acima de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou por álcalis, enquanto a pepsina desidratada é resistente, quanto à atividade enzimática, sob aquecimento a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MERCK INDEX, 1996).

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

Kit enzimático para determinação de glicose, Laborlab S/A; alginato de sódio Manugel DMB, alta massa molar, alto conteúdo de grupos guluronato, lote 500771, marca Monsanto; celulose acetato fitalato da Eastman Kodak Chemical; glicerol P.A. da Synth; solução de Cloreto de Cálcio 1,5% e Etanol Anidro, ambos P.A. da Merck; pepsina da Sigma lote 25 H 0538 (MM 34500 Daltons, conforme catálogo Sigma); linalol sintético importado por Petit Marie Ind. e Com. de Prod. Químicos LTDA; óleo essencial de laranja contendo 95% de D-Limoneno, fornecido pela Citrosuco.

3.2. Equipamentos

Cromatógrafo Varian[®] 3600; espectrofotômetro Beckman DU[®] 70 Spectrophotometer; micrômetro Mitutoyo[®] Digimatic 293-521-30 MDC-25M CE; balança analítica; Ph-metro Tecnal[®]; bomba peristáltica, Cole-

Parmer; sistema de eletroforese Mini Protean BIORAD®, fonte Power Pac 3600; liquidificador doméstico.

3.3. Soluções de Polimerização e de Difusão dos recheios

Três soluções foram utilizadas para a polimerização das cápsulas: solução aquosa, solução ácida contendo HCl (0,75 N) e solução de ácido cítrico (70%), todas contendo 1,5 % de cálcio. A estas soluções foram adicionadas concentrações dos recheios nas mesmas porcentagens utilizadas para as cápsulas, evitando a difusão do recheio antes que as cápsulas estivessem totalmente formadas. Este procedimento foi utilizado quando os recheios foram glicose e pepsina; para o caso do limoneno a adição do recheio à solução de polimerização não foi necessária, uma vez que as polaridades eram antagônicas.

Para os ensaios de difusão de recheio foram utilizados soluções de HCl 0,1N, quando os recheios eram glicose ou pepsina, e solução de etanol anidro contendo de 2,5 mg de linalol por ml como padrão interno, quando o recheio utilizado era limoneno.

As soluções foram feitas em quantidades suficientes para a realização de todos os ensaios evitando-se assim erros de manipulação e diferenças de concentrações entre os ensaios. As mesmas foram armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz.

3.4. Formação das Cápsulas Gelificadas de Glicose, Limoneno e Pepsina

As quantidades utilizadas para a formulação de cada um dos ensaios analisados estão descritas na **Tabela 3.1**. Os ensaios descritos foram realizados em triplicata à temperatura ambiente, sendo a quantificação do recheio feita em triplicata.

A dissolução dos componentes da solução encapsulante foi feita em água destilada, em seguida o pH acertado para valores entre 7-8 para glicose e limoneno e entre 5-6 para pepsina, com HCl 0,1N ou NaOH 25%. A massa final foi acertada em balança analítica utilizando água destilada. A solução foi então agitada até completa dissolução e a saída de possíveis bolhas formadas. A seguir procedeu-se o gotejamento, à velocidade média de 5 ml/minuto e à distância de 15 cm, da solução encapsulante nas soluções de polimerização, mantendo-se as cápsulas gelificadas em repouso nessas soluções por 30 minutos para permitir a sua maturação. Para o limoneno foi feita uma homogeneização, em liquidificador por 1 minuto, antes do gotejamento.

Após a maturação as cápsulas foram recolhidas com uma peneira, sendo parte destinadas à medição de diâmetro e parte ao teste de difusão. Nos ensaios de difusão foram utilizadas as seguintes relações massa de cápsula/massa de solução (g/g): 1:19; 1:19 e 1:5 para glicose, limoneno e pepsina respectivamente.

Tabela 3.1. Formulações dos géis utilizados nos ensaios de análise de difusão (composição em massa A= 1% de alginato de sódio; 20% de glicerol; 1% de Tween 80 e B= 1% de alginato de sódio; 20% de glicerol; 1% de Tween 80; 20% de Acetofitalato de Celulose).

Solução Encapsulante	Recheio (em massa)	Solução Extrusora (em massa)
A	0,5% glicose	Cálcio 1,5%
A	0,5% glicose	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
A	0,5% glicose	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
B	0,5% glicose	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
B	0.5% glicose	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
A	10% limoneno	Cálcio 1,5%
A	10% limoneno	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
A	10% limoneno	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
B	10% limoneno	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
B	10% limoneno	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
A	1% pepsina	Cálcio 1,5%
A	1% pepsina	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
A	1% pepsina	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
B	1% pepsina	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
B	1% pepsina	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%

A adição de pepsina somente foi feita após a estabilização do pH e total dissolução da AC, para evitar sua desnaturação. Após a maturação as cápsulas contendo pepsina foram pesadas e parte delas lavada com água destilada na relação 1:2 (g de cápsula/ml de água), utilizando-as para a quantificação da proteína total e para os teste de difusão. A água de lavagem foi coletada para posterior quantificação da proteína total da superfície das cápsulas.

3.5. Medida de Tamanho das Cápsulas Gelificadas

Foram retiradas 3 porções de 20 cápsulas após o período de 30 minutos de cura na solução de cálcio medindo-se o diâmetro em micrômetro (Digimatic 293-521-30 MDC-25M CE, Mitutoyo, Japan) (Nussinovitch et al., 1997). Procedeu-se da mesma forma após o período de 6 horas, para recheios de glicose e limoneno e após 3 horas, quando pepsina foi utilizada como recheio.

3.6. Teste de Difusão da Glicose

A difusão foi acompanhada pela migração dos recheios ao solvente (HCl 0,1N) durante 6 horas com coletas em triplicatas em intervalos de uma hora. As cápsulas foram colocadas em contato com o solvente através de uma malha que protegia as mesmas da ação de fricção do agitador magnético permitindo a circulação do solvente sem danificá-las. O teor de glicose foi determinado utilizando-se um kit da LABORLAB e uma curva padrão colorométrica, em espectrofotômetro a 505 nm de acordo com

Henry (1974). O experimento foi realizado sem reposição de solvente.

3.7. Teste de Difusão do Limoneno

A difusão foi acompanhada pela migração dos recheios ao solvente durante 6 horas com coletas em triplicatas em intervalos de uma hora. Utilizou-se solução de etanol P.A., adicionado de 2,5 mg/ml de linalol como padrão interno. As cápsulas foram colocadas em contato com o solvente de forma idêntica ao item anterior. O teor de limoneno foi determinado através de cromatografia gasosa, com injeções de 2 µl diretamente do solvente exceto nos ensaios de mistura de alginato-AC a qual procedeu-se uma prévia filtragem do solvente antes da injeção. A determinação do limoneno foi realizada em cromatógrafo Varian® 3600 com coluna capilar de fase líquida DB-WAX filme 0,25 mm, dimensões da coluna 30m x 0,252mm, fluxo da fase móvel H₂ 1,2 ml/min a 70° C, detetor FID 250° C com atenuação 16 e range 10, condições do FID H₂ e N₂ 30 ml/min, ar sintético 300 ml/min, corrida de 11 minutos com injetor isotérmico a 200°C e a seguinte programação de temperatura: 70°C/2 min, até 100°C a 6°C/min, até 130°C a 10°C/min, utilizando padrão interno 2,5mg/ml de linalol. O experimento foi realizado sem reposição do solvente.

3.8. Teste de Difusão da Pepsina

A difusão foi acompanhada pela migração da pepsina para o solvente (ácido clorídrico 0,1 N) durante 210 minutos com coletas em intervalos de 30 minutos, seguindo procedimento anterior (3.6). A análise

de difusão foi feita, tanto nas cápsulas sem lavar como nas lavadas, utilizando-se reposição do solvente em volume igual ao retirado, conforme sugerido por Nussinovitch et al. (1997) e Fattah et al. (1998). A análise de proteína foi realizada através do método de Kjeldahl (AOAC , 1984), utilizando uma quantidade de amostra adequada a sensibilidade do método.

3.9. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12% de acrilamida, 120V) das proteínas livre e difundida foi determinada de acordo com o procedimento de LAEMMLI (1970). No preparo da amostra foram utilizados sódio dodecil sulfato (SDS) e β -mercapitoetanol. A amostra liofilizada teve seu pH ajustado até atingir a coloração azul.

3.10. Análise Estatística

Para verificar a existência de diferença significativa entre os valores obtidos foi utilizado a análise de diferença de médias a 5% de acordo com o teste de Tukey com auxílio do *software* STATISTICA® for Windows 5.0. Diferenças entre as medidas obtidas nos ensaios foram avaliadas para cada tempo.

4. Resultados e Discussão

A existência de poucos trabalhos na literatura sobre a difusão de substratos em géis de alginato de cálcio indica a necessidade de mais pesquisas para estender e otimizar esse tipo de matriz contendo diferentes agentes ativos. O conhecimento do processo de difusão poderá permitir o desenvolvimento de sistemas onde a liberação seja controlada.

Inicialmente testes preliminares indicaram que gotas de alginato fabricadas sem recheio se apresentaram translúcidas enquanto as que continham recheio se apresentaram opacas. Nos ensaios preliminares, inicialmente foi testada a quantificação da proteína (pepsina) pelo método do Biureto, mostrando-se este método inviável devido à alta turbidez da solução mesmo após filtragem e centrifugação.

Durante o processo de gotejamento foi mantida a distância de 15 cm entre a saída da bomba peristáltica e a solução de cloreto de cálcio, possibilitando assim a total imersão das gotas nas soluções de cálcio. O gotejamento da solução de alginato de sódio muito próximo à superfície da solução de cloreto de cálcio resulta na formação de gotas deformadas ou apresentando caudas como também observado por Lim e Moss (1981), podendo ainda ocorrer a gelificação do alginato de cálcio na saída da bomba de gotejamento, sendo, portanto, necessário manter-se uma distância mínima como recomendado por Neau et al. (1993). Após as gotas

de alginato de sódio entrarem em contato com a solução de cálcio ou cálcio acidificado com HCl 0,75 N, o suporte gelificado formou-se imediatamente. Durante os primeiros minutos, as cápsulas permaneceram na superfície. Após algum tempo, submergiram provavelmente devido ao aumento de densidade, como também observado por Mestdagh e Axelos (1999). Este comportamento não ocorreu na solução contendo ácido cítrico 70% e cálcio, onde as cápsulas permaneceram na superfície da solução durante todo o período de maturação, provavelmente devido à densidade desta solução ser maior do que a solução contendo ácido clorídrico.

O período de maturação durou 30 minutos, permitindo que as ligações intercruzadas para formação do gel ocorressem lentamente, processando-se progressivamente da superfície para o interior da cápsula (Mestdagh e Axelos, 1999). Imediatamente após a maturação, as cápsulas apresentaram-se frágeis e após o experimento de difusão, pode-se observar que as mesmas se apresentaram mais rígidas. Isto foi mais evidente nos ensaios onde a gota foi formada em solução de ácido cítrico 70% contendo cálcio.

As cápsulas formadas apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 2,0 mm com desvio padrão de 0,3 quando recém formadas (tempo 0) e 2 mm com desvio padrão de 0,2 após o período de 3 a 6 horas em solução de difusão.

O desvio padrão ligeiramente menor apresentado após o tempo de imersão deve-se provavelmente ao fato das cápsulas perderem água durante a permanência em solução, além do que o maior tempo em solução acarreta o aumento das ligações intercruzadas para a formação do gel aumentando sua rigidez e com isso facilitando as medidas de diâmetro, efeito também observado anteriormente por Lim e Moss (1981) e por

Mestdagh e Axelos (1999).

A análise da **Tabela 4.1** contendo os resultados das medidas de diâmetros efetuadas nos diversos tratamentos, antes do experimento de difusão, demonstra que entre os sistemas recheados com glicose, as cápsulas de alginato-AC polimerizadas com HCl contendo cálcio apresentaram maior diâmetro seguido das cápsulas fabricadas com alginato polimerizadas em solução de CaCl_2 . Ambas diferiram significativamente dos sistemas de cápsulas de alginato e alginato-AC polimerizados com ácido cítrico, que apresentaram menor diâmetro. As cápsulas de alginato contendo glicose polimerizada com HCl contendo cálcio apresentaram diâmetro intermediário, diferindo significativamente ($p < 0,05$) apenas das cápsulas de alginato-AC polimerizada em HCl contendo cálcio. Uma ordem crescente de diâmetro foi observada para os sistemas de cápsulas de alginato recheados com limoneno ou pepsina, sendo o maior diâmetro observado para as cápsulas polimerizada em HCl contendo cálcio, seguido das polimerizadas em soluções de cálcio e das polimerizadas em ácido cítrico, porém sem apresentar diferenças significativas ($p < 0,05$).

Quando a solução de polimerização continha apenas cálcio em solução, o ensaio efetuado para cápsulas contendo glicose ou limoneno envoltos por alginato, foram observadas diferenças significativas a $p < 0,05$ entre seus diâmetros.

As cápsulas contendo pepsina polimerizadas nas soluções ácidas de HCl e ácido cítrico, não apresentaram diferenças significativas entre as cápsulas contendo limoneno ou glicose para o sistema de polimerização contendo HCl e cálcio. Diferenças significativas foram observadas para a solução de ácido cítrico entre pepsina e glicose na matriz alginato. Para

esse mesmo sistema não foram observadas diferenças significativas entre os recheios limoneno e pepsina.

Tabela 4.1. Média dos diâmetros das cápsulas de Alginato e Alginato-AC (mm) e respectivos desvios-padrão antes da imersão na solução de difusão.

Cápsula	Recheio	Solução de Polimerização					
		CaCl ₂		CaCl ₂ + HCl		CaCl ₂ + Ácido Cítrico	
		Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Alginato	Glicose	2,373 ^{ab}	0,147	2,113 ^{bc}	0,248	2,085 ^c	0,214
Alginato acetato fitalato de celulose	Glicose	<i>Sem dados</i>		2,417 ^a	0,189	2,063 ^c	0,262
Alginato	Limoneno	2,036 ^{cd}	0,154	2,102 ^{bc}	0,223	2,001 ^{cd}	0,230
Alginato	Pepsina	<i>Sem dados</i>		2,102 ^{cd}	0,291	1,702 ^d	0,479

Na comparação entre tipos de cápsulas, recheio e solução de polimerização, as médias com letras em comum não diferem entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

A avaliação das diferenças entre os diâmetros foi também realizada nas matrizes após o tempo de difusão ter sido completado (**Tabela 4.2**). Foram observadas diferenças significativas entre cápsulas de alginato-AC contendo glicose polimerizada em cálcio acidificado com HCl em relação às cápsulas recheadas com limoneno ou pepsina, independente da solução de polimerização.

Foram também observadas diferenças significativas entre cápsulas de alginato contendo pepsina polimerizadas em ácido cítrico em relação a alginato e alginato-AC contendo glicose polimerizados em HCl ou ácido cítrico.

Menores diâmetros foram observados antes e após a difusão para pepsina encapsulada em alginato polimerizado em ácido cítrico.

Tabela 4.2. Média dos diâmetros das cápsulas de Alginato e Alginato-AC (mm) e respectivos desvios-padrão após 6h de imersão na solução de difusão.

Cápsula	Recheio	Solução de Polimerização					
		CaCl ₂		CaCl ₂ + HCl		CaCl ₂ + Ácido Cítrico	
		Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Alginato	Glicose	1,942 ^{bc}	0,127	2,130 ^{ab}	0,240	2,133 ^{ab}	0,247
Alginato acetato fitalato de celulose	Glicose	<i>sem dados</i>		2,328 ^a	0,184	2,142 ^{ab}	0,244
Alginato	Limoneno	2,019 ^{bc}	0,197	1,943 ^{bc}	0,216	2,025 ^{bc}	0,240
Alginato	Pepsina	<i>sem dados</i>		2,092 ^{bc}	0,192	1,755 ^c	0,277

Na comparação entre os tipos de cápsulas, recheio e solução de polimerização, as médias com letras em comum não diferem entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

Nas soluções ácidas contendo HCl foi observado um decréscimo no volume, provavelmente devido a sinérese* antes e após o estudo de difusão. Efeito contrário foi observado quando a solução de polimerização continha ácido cítrico. Ambos os efeitos independeram do recheio considerado.

4.1. Ensaio de Difusão da Glicose

Com relação ao experimento contendo glicose como recheio (**Figura 4.1**), as curvas de difusão obtidas para as diferentes situações ensaiadas não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), como se pode observar na **Figura 4.1** e na **Tabela 4.3** (difusão média dos

* *Sinérese* – Refere-se a expulsão de líquido do gel (Fennema, 1996).

ensaios contendo glicose como recheio). Estes resultados indicaram a livre migração da glicose para o solvente imediatamente após as esferas serem colocadas para difundir, em todos os sistemas estudados. As curvas da difusão da glicose apresentaram um perfil esperado, com a tendência de formar um patamar onde a concentração de glicose difundida é constante, considerando que o experimento foi realizado sem reposição do solvente. Os resultados obtidos estão em concordância com os anteriormente observados por Tanaka et al. (1983), onde a glicose difundia-se imediatamente após a imersão das cápsulas na solução e quase que totalmente nos primeiros 30 minutos de ensaio. Esses autores encontraram uma boa correlação dos resultados experimentais com o valor calculado através de modelagem matemática da difusão considerando que o substrato encontrou livre difusividade devido ao tamanho dos poros apresentados pelas cápsulas.

A acetofitalato de celulose foi adicionada às cápsulas de alginato no presente experimento com a finalidade de diminuir a porosidade das cápsulas, como reportado por Chan et al. (1997), no entanto, como observado na Tabela 4.3, a análise estatística dos resultados não apresentou diferença significativa em relação aos ensaios contendo somente cápsulas fabricadas com alginato de cálcio. Obteve-se novamente uma difusão imediata do recheio, indicando que a adição de AC não diminuiu suficientemente o tamanho dos poros, o que poderia funcionar como barreira à substratos de baixa massa molar como a glicose. Cheetham et al. (1979) determinaram o coeficiente de partição para a sacarose em alginato de cálcio, de 0,84, indicando que 84% do volume interno do gel foi acessível à sacarose quando a difusão ocorria de fora para dentro da matriz evidenciando a alta porosidade da matriz utilizada.

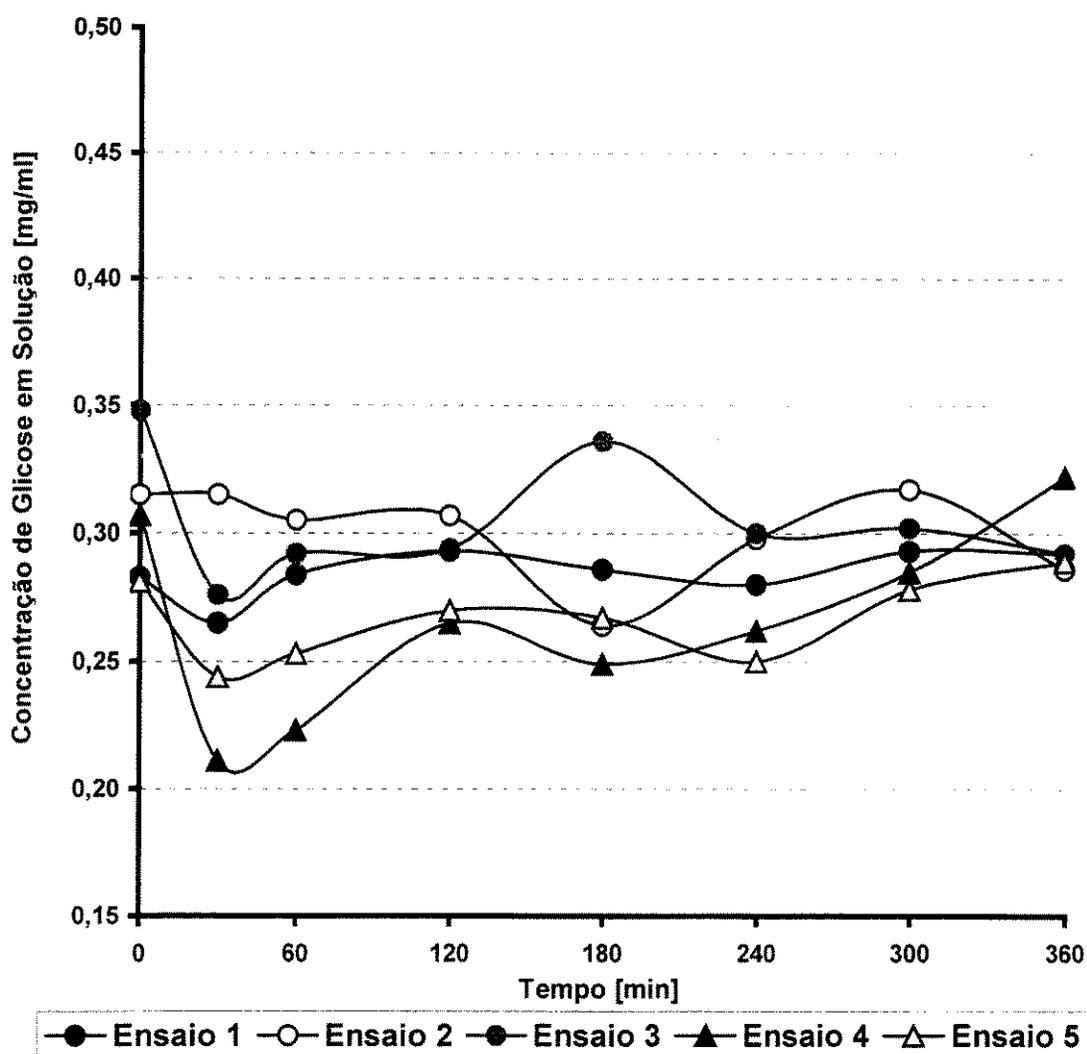


Figura 4.1. Média das concentrações em mg de glicose difundida por ml de solução de HCl 0,1 N em função do tempo (min).

Ensaio 1: Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5%; **Ensaio 2:** Cápsulas de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75N; **Ensaio 3:** Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%; **Ensaio 4:** Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75 N; **Ensaio 5:** Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%.

Tabela 4.3. Quantidade média em mg de glicose difundida por ml de solução de difusão (HCl 0,1N) em função do tempo (min).

Ensaio	Tempo (min)							
	0	30	60	120	180	240	300	360
Ensaio 1	0,283 ^a	0,265 ^a	0,284 ^a	0,293 ^a	0,286 ^a	0,280 ^a	0,293 ^a	0,292 ^a
Ensaio 2	0,315 ^a	0,315 ^a	0,305 ^a	0,307 ^a	0,264 ^a	0,298 ^a	0,317 ^a	0,286 ^a
Ensaio 3	0,348 ^a	0,276 ^a	0,292 ^a	0,294 ^a	0,336 ^a	0,300 ^a	0,302 ^a	0,292 ^a
Ensaio 4	0,307 ^a	0,211 ^a	0,223 ^a	0,265 ^a	0,249 ^a	0,262 ^a	0,285 ^a	0,322 ^a
Ensaio 5	0,281 ^a	0,244 ^a	0,253 ^a	0,270 ^a	0,267 ^a	0,250 ^a	0,278 ^a	0,289 ^a

Na comparação entre os ensaios para cada tempo, as médias com letra em comum indicam que os ensaios não diferiram entre si, ao nível de significância 5% ($p < 0,05$). Descrição dos ensaios: vide **Figura 4.1**.

4.2. Ensaio de Difusão de Limoneno

O etanol foi utilizado como solvente para a análise de difusão do limoneno devido ao caráter antagônico de polaridade entre o limoneno e a água. O limoneno é um monoterpene hidrofóbico (Bishop et al., 1998) e praticamente insolúvel em água, o que foi constatado durante os ensaios preliminares onde se utilizou uma solução aquosa, HCL 0,1N verificou-se a não ocorrência de difusão do recheio para a solução devido às diferenças de polaridade entre recheio e solução.

Quando limoneno foi utilizado como recheio o gráfico da difusão média (**Figura 4.2**), mostrou perfis semelhantes para as diversas combinações estudadas incluindo a utilização de alginato, mistura alginato-AC, curados em ácido clorídrico ou ácido cítrico. A quantificação do limoneno difundido indicou nos primeiros tempos de amostragem, após a primeira hora, a liberação de aproximadamente 50% do recheio inicialmente adicionado, indicando fraca retenção da matriz do gel em todos o sistema estudados. Apesar disso pode-se observar através da **Tabela 4.4** que excetuando o tempo 4 horas, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios. Foi também observado, através da **Figura 4.2** que o ensaio 7 (cápsulas de alginato de cálcio recheados com limoneno e extrusado em solução de cálcio adidificado com HCl 0,75N) apresentou a menor retenção durante o experimento de difusão.

Tabela 4.4. Quantidade média em mg de limoneno difundido por ml da solução de difusão (etanol anidro) em função do tempo (min).

Ensaio	Tempo (min)							
	0	30	60	120	180	240	300	360
Ensaio 6	0,280 ^a	4,56 ^{ab}	4,78 ^{ab}	4,57 ^b	4,62 ^{ab}	4,54 ^a	4,45 ^b	4,50 ^b
Ensaio 7	0,157 ^a	5,48 ^a	5,55 ^a	6,01 ^a	5,68 ^a	5,52 ^a	5,85 ^a	6,00 ^a
Ensaio 8	0,064 ^a	4,78 ^{ab}	4,98 ^{ab}	4,74 ^{ab}	4,73 ^{ab}	4,96 ^a	4,93 ^{ab}	4,87 ^{ab}
Ensaio 9	0,042 ^a	3,79 ^b	4,08 ^b	4,20 ^b	4,28 ^b	4,50 ^a	4,42 ^b	4,43 ^b
Ensaio 10	0,057 ^a	3,97 ^b	4,38 ^b	4,67 ^b	4,48 ^{ab}	4,51 ^a	4,72 ^{ab}	4,77 ^{ab}

Na comparação entre os ensaios para cada tempo, as médias com letra em comum indicam que os ensaios não diferiram entre si, ao nível de significância 5% ($p < 0,05$).
 Descrição dos ensaios: vide **Figura 4.2**.

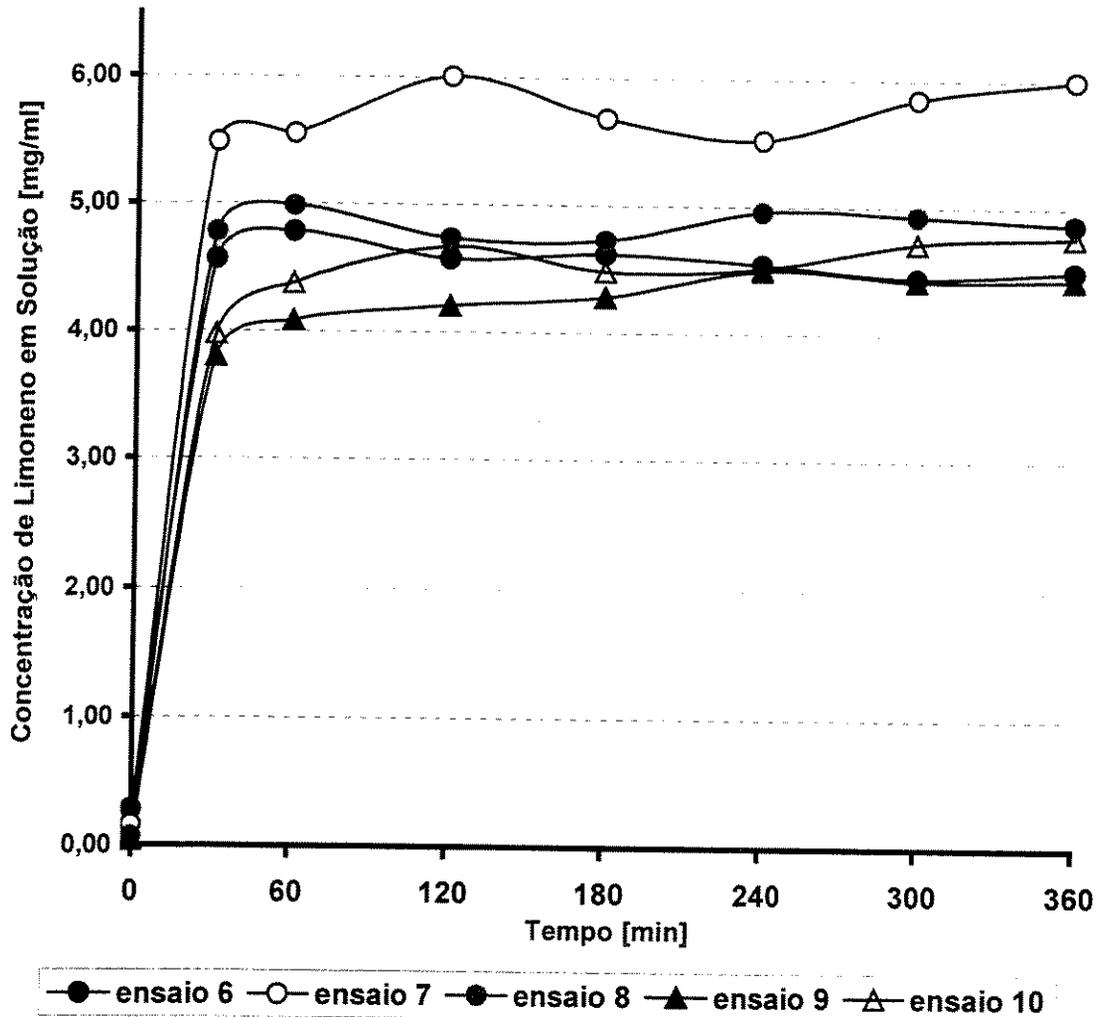


Figura 4.2. Média das concentrações em mg de limoneno difundido por ml de solução de etanol anidro em função do tempo (min).

Ensaio: 6. Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5%; **7.** Cápsulas de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75N; **8.** Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%; **9.** Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75 N; **10.** Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%.

Uma vez que o limoneno é um composto de baixa massa molar, os resultados obtidos indicaram que a porosidade das matrizes utilizadas não foram suficientes para evitar que este tamanho de molécula pudesse ser retido no interior da matriz. Durante a adição de AC à solução de etanol observou-se uma pequena precipitação de partículas brancas, fazendo-se necessário uma filtragem das amostras antes de submetê-las à análise cromatográfica. Isto ocorreu provavelmente devido à solubilização parcial do derivado de celulose no etanol. Independente do efeito de solubilização parcial, a adição de AC não provocou melhora na retenção do recheio utilizado.

A análise da **Tabela 4.4** confirma o resultado apresentado na **Figura 4.2**, onde o ensaio 7 (Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 acidificada com HCl 0,75N) é o que apresenta pior retenção, sendo portanto onde ocorre maior liberação do limoneno em todos os tempos estudados, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos ensaios 9 (Cápsulas de alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 acidificada com HCl 0,75N) e 10 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 acidificada com Ácido Cítrico 70%) nos tempos de 30, 60 e 120 minutos. Nesses tempos os ensaios 9 e 10 tiveram maior retenção, comparativamente aos demais ensaios.

Esses resultados indicam que a porosidade das matrizes foram suficientes para permitir a difusão do limoneno através das diversas formulações estudadas. O processo de difusão do limoneno parece ocorrer passivamente através da membrana do gel conforme também observado anteriormente por Bishop et al (1998).

4.3. Ensaio de difusão de Pepsina

Quando a pepsina foi utilizada como recheio duas séries de medidas de difusão foram realizadas, a primeira considerando as cápsulas diretamente removidas da solução de polimerização (sem lavar) cujos resultados de difusão se encontram na **Figura 4.3** e **Tabela 4.5** e a segunda onde as cápsulas retiradas da solução de polimerização foram lavadas com água destilada (lavadas), em seguida colocadas na solução de difusão, estando os resultados de difusão apresentados na **Figura 4.4** e **Tabela 4.6**. Os resultados obtidos mostraram perfis semelhantes para as curvas de difusão considerando as diversas combinações estudadas incluindo a utilização de alginato, mistura alginato-AC e a cura em ácido clorídrico ou ácido cítrico. Os perfis apresentados nos gráficos de difusão estão coerentes com o sistema que utiliza reposição do solvente durante o experimento de difusão.

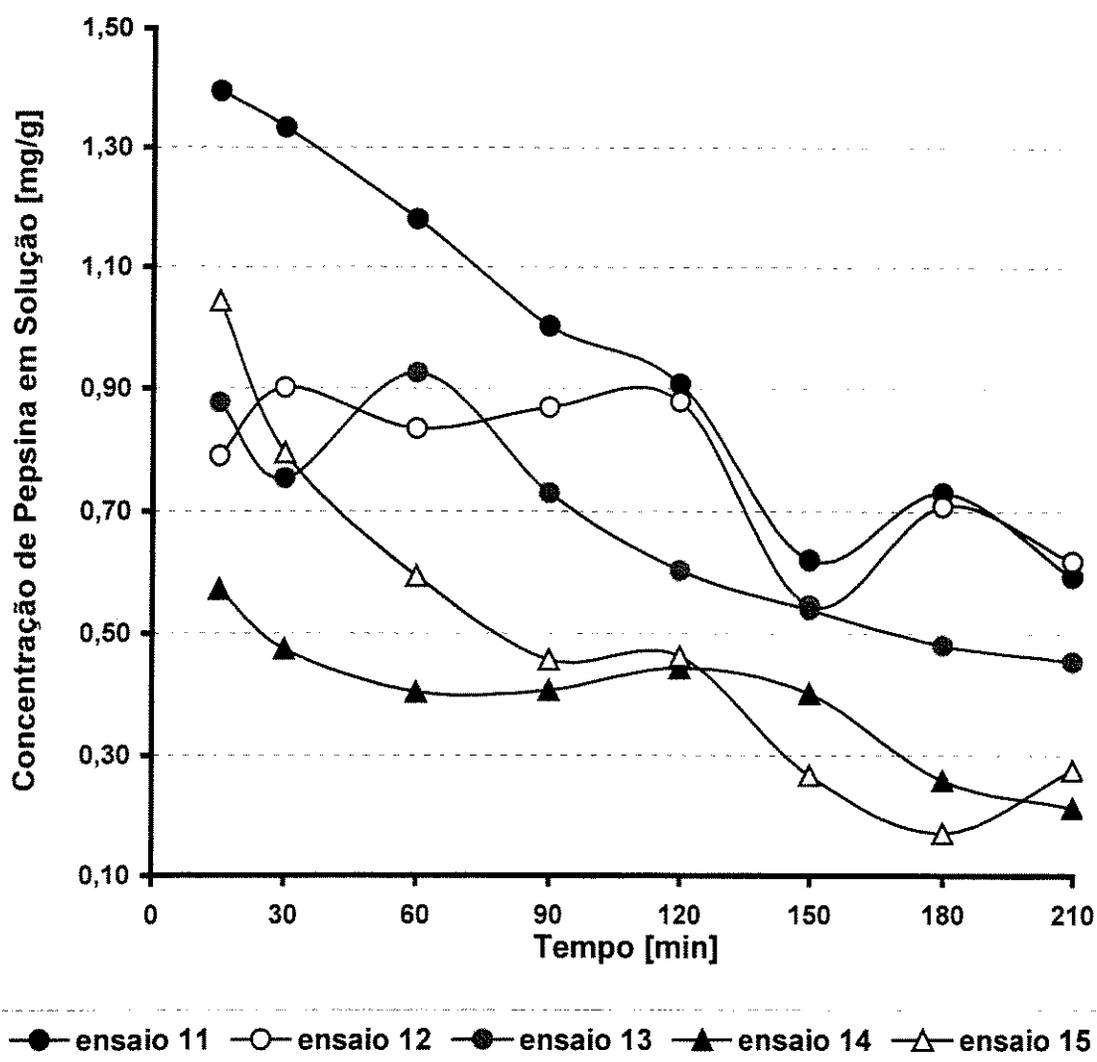


Figura 4.3. Concentração média em mg de pepsina de cápsulas não lavadas por g de solução de difusão (HCl 0,1 N) em função do tempo (min).

Ensaio 11. Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5 %; **12.** Cápsulas de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75 N; **13.** Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5 % acidificada com ácido cítrico 70%; **14.** Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5 % acidificada com HCl 0,75 N; **15.** Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5 % acidificada com ácido cítrico 70 %.

Tabela 4.5. Quantidade média em mg de pepsina, de cápsulas não lavadas, difundida por g de solução de difusão (HCl 0,1N) em função do tempo e quantidade média em mg de pepsina por g de cápsula. As concentrações calculadas levaram em consideração a quantidade de pepsina adicionada em relação a massa total da amostra.

Ensaio	Conc. Calculada		Tempo (min)									
	Cápsula [mg/g]	Cápsula Encontrada [mg/g]	Conc. Calculada	Conc. Para solução [mg/g]	15	30	60	90	120	150	180	210
11	M	9,70	7,63 ^a	1,37	1,39 ^a	1,33 ^a	1,18 ^a	1,00 ^a	0,908 ^a	0,620 ^a	0,730 ^a	0,594 ^a
	σ	1,11	0,333	0,291	0,286	0,336	0,355	0,137	0,457	0,098	0,106	0,138
12	M	10,0	7,48 ^a	1,43	0,790 ^{bc}	0,901 ^{ab}	0,834 ^{ab}	0,870 ^{ab}	0,879 ^a	0,547 ^a	0,709 ^a	0,619 ^a
	σ	1,07	0,216	0,076	0,452	0,314	0,314	0,415	0,354	0,420	0,287	0,348
13	M	6,94	8,38 ^a	1,55	0,877 ^{bc}	0,753 ^{ab}	0,926 ^{ab}	0,730 ^{ab}	0,604 ^a	0,539 ^a	0,481 ^{ab}	0,454 ^a
	σ	2,40	0,575	0,250	0,368	0,292	0,166	0,129	0,273	0,198	0,222	0,278
14	M	3,60	5,16 ^a	1,12	0,573 ^c	0,475 ^b	0,404 ^b	0,407 ^b	0,444 ^a	0,402 ^a	0,258 ^b	0,212 ^a
	σ	1,28	0,860	0,337	0,116	0,124	0,110	0,161	0,317	0,237	0,201	0,150
15	M	4,36	7,97 ^a	2,26	1,04 ^{ab}	0,794 ^{ab}	0,594 ^b	0,458 ^b	0,463 ^a	0,266 ^a	0,170 ^b	0,275 ^a
	σ	3,24	1,22	0,579	0,189	0,200	0,186	0,276	0,396	0,216	0,131	0,224

Na comparação entre os ensaios para cada tempo, as médias com letras em comum não diferem entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Legenda: **M** – média

σ – desvio padrão

Descrição dos ensaios: vide **Figura 4.3**.

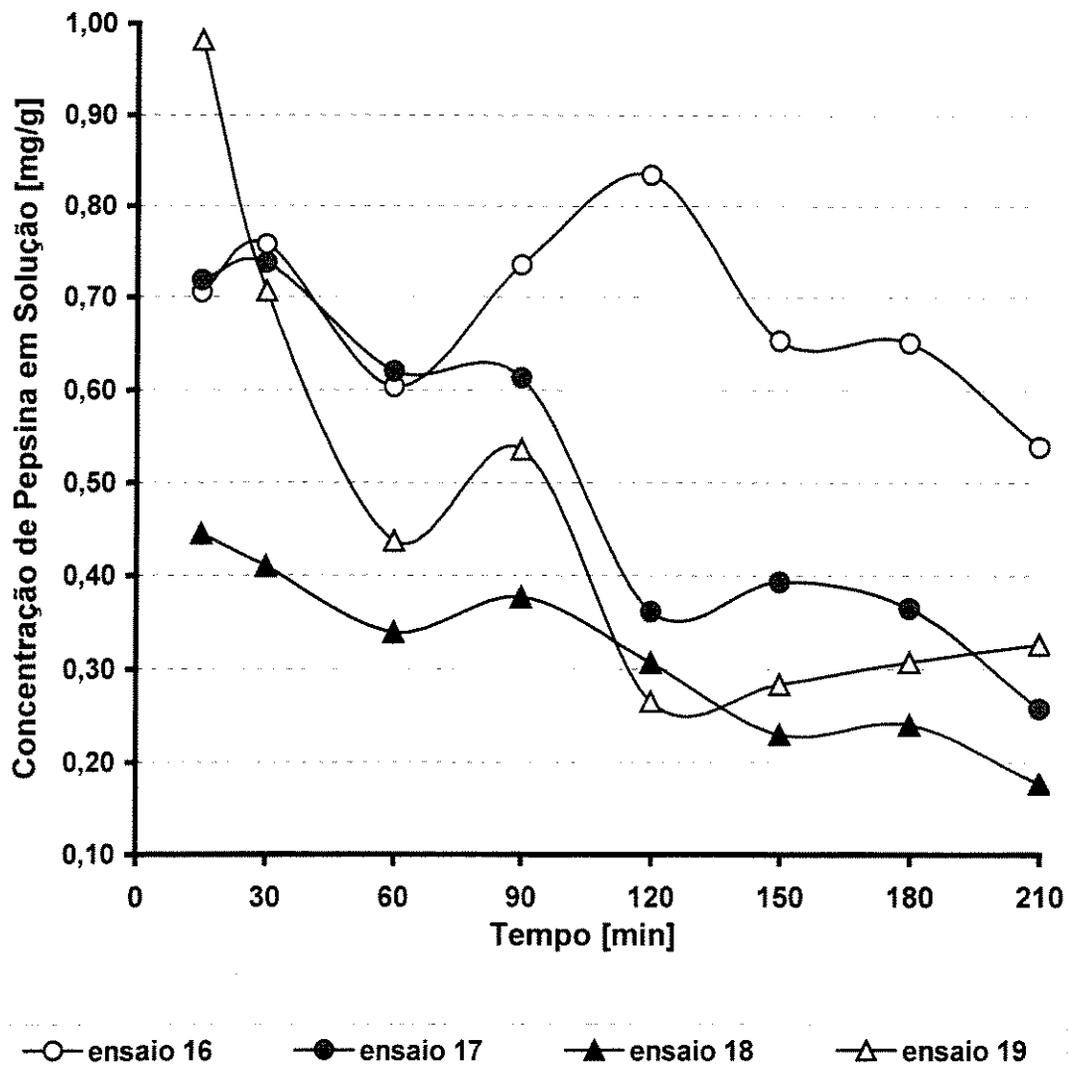


Figura 4.4. Concentração média em mg de pepsina de cápsula lavada difundida por g de solução de difusão (HCl 0,1 N) em função do tempo (min).

Ensaio: 16. Cápsulas de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75 N e lavada; **17.** Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% % acidificada com ácido cítrico 70 % e lavada; **18.** Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75 N e lavada; **19.** Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70 % e lavada.

Tabela 4.6. Quantidade média em mg de pepsina, de cápsulas lavadas, difundida por g de solução de difusão (HCl 0,1N) em função do tempo e quantidade média em mg de pepsina por g de cápsula. As concentrações calculadas levaram em consideração a quantidade de pepsina adicionada em relação a massa total da amostra.

		Tempo (min)										
		Calculada Encontrada Calculada										
		Cápsula	Cápsula	solução	15	30	60	90	120	150	180	210
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]								
Ensaio 16	M	7,50	5,70 ^{ab}	1,42	0,705 ^{ab}	0,757 ^a	0,603 ^a	0,735 ^a	0,834 ^a	0,653 ^a	0,651 ^a	0,539 ^a
	σ	4,05	1,94	0,073	0,292	0,310	0,355	0,271	0,118	0,103	0,235	0,243
Ensaio 17	M	8,54	7,35 ^a	1,50	0,718 ^{ab}	0,737 ^a	0,620 ^a	0,613 ^a	0,362 ^b	0,393 ^{ab}	0,365 ^{ab}	0,258 ^a
	σ	5,05	0,705	0,308	0,047	0,056	0,094	0,194	0,105	0,092	0,213	0,127
Ensaio 18	M	5,05	3,65 ^b	1,15	0,445 ^b	0,410 ^a	0,339 ^a	0,377 ^a	0,307 ^b	0,230 ^b	0,241 ^b	0,177 ^a
	σ	2,17	0,860	0,352	0,067	0,066	0,144	0,150	0,125	0,165	0,141	0,066
Ensaio 19	M	9,55	5,56 ^{ab}	2,24	0,982 ^a	0,706 ^a	0,437 ^a	0,536 ^a	0,266 ^b	0,284 ^{ab}	0,308 ^b	0,327 ^a
	σ	3,61	0,669	0,562	0,257	0,180	0,251	0,242	0,225	0,259	0,160	0,095

Na comparação entre os ensaios para cada tempo, as médias com letras em comum não diferem entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Legenda: **M** – média

σ – desvio padrão

Descrição dos ensaios: vide **Figura 4.4**

Embora a pepsina possa perder gradualmente sua atividade em soluções fortemente ácidas (pH 1,8 e 50 °C), a perda de atividade é paralela a perda de nitrogênio protéico e sob estas condições, a autólise provavelmente também contribui para a sua perda de atividade. Em ácidos muito fortes pode ocorrer primeiro a desnaturação, seguida da hidrólise de ligações peptídicas, sendo a razão ou taxa de inativação diretamente proporcional a concentração de íons de hidrogênio (Boyer et al., 1960). A hidrólise da pepsina poderia acarretar uma difusão mais acentuada dos peptídeos provenientes da hidrólise. Tal ocorrência, entretanto, não foi observada nas condições dos experimentos envolvendo a pepsina, conforme pode ser observado na **Figura 4.5**. A atividade enzimática não foi avaliada uma vez que o objetivo era observar apenas a capacidade de barreira das matrizes utilizadas.

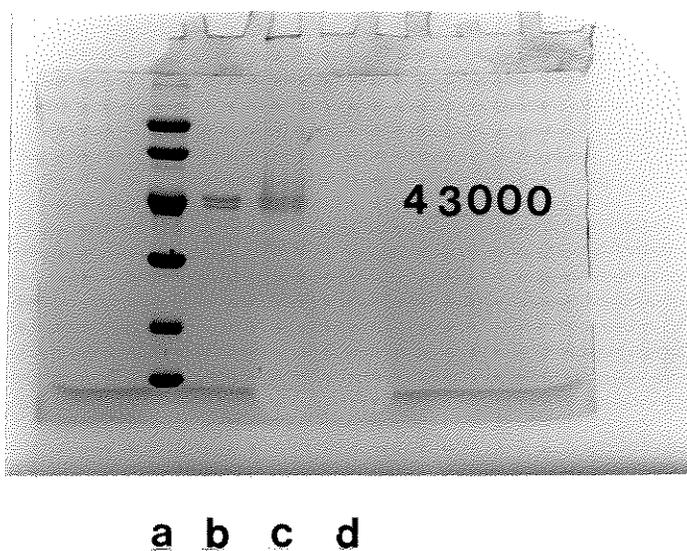


Figura 4.5. Perfil eletroforético em gel de Poliacrilamida SDS-PAGE: a) padrão contendo proteínas de diferentes MM; b) pepsina livre; c) pepsina difundida e liofilizada e d) solução de difusão a partir de cápsulas de alginato sem recheio

Observando a **Figura 4.3** pode-se verificar que a menor retenção ocorre para o ensaio 11 (cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5%) que liberou 100% do valor inicialmente encapsulado, enquanto a maior retenção ocorre no ensaio 14 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl) que liberou aproximadamente 51% do valor inicialmente encapsulado, uma retenção significativa.

Através da **Tabela 4.5** verifica-se que os ensaios mencionados diferem significativamente ($p < 0,05$) durante todo o tempo de amostragem exceto nos tempos de 120, 180 e 210 minutos onde não foi possível observar diferenças significativas entre os ensaios. O ensaio 14 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl) também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) do ensaio 15 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%) no primeiro tempo de amostragem (15 minutos).

Não foi possível observar diferenças significativas entre as concentrações encontradas no interior das cápsulas para qualquer um dos sistemas estudados (concentração encontrada – cápsula).

As concentrações de difusão entre os experimentos levou em consideração as concentrações efetivamente presentes nas cápsulas e determinadas experimentalmente, representadas nas tabelas como concentração encontrada – cápsula. A opção por este valor ao invés da concentração calculada a partir das massas de alginato e pepsina utilizadas, expressas nas **Tabelas 4.5** e **4.6** como concentração calculada – cápsula se deve ao fato das pequenas variações de massa das cápsulas ao longo do experimento causadas pela sinérese. Como a concentração encontrada parece menos sujeita a erros, esse valor foi considerado no cálculo das quantidades máximas possíveis de difundirem para a solução e expressas como concentração calculada para a solução.

Observando-se a **Figura 4.4** pode-se verificar que houve menor retenção no ensaio 16 (cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavadas) liberando aproximadamente 49% do valor inicialmente encapsulado, enquanto a maior retenção é observada no ensaio 18 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) que liberou cerca de 38% do valor inicialmente encapsulado (15 min).

Analisando-se a **Tabela 4.6**, verifica-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios nos tempos 15, 120, 150 e 180 minutos. Após 15 minutos de difusão os ensaios 18 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) e 19 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico e lavada) diferiram entre si ($p < 0,05$) não diferindo no entanto em relação aos demais ensaios.

Após 120 minutos o ensaio 16 (cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavadas) diferiu em relação aos demais ensaios ($p < 0,05$) apresentando a maior concentração média e portanto maior liberação.

Após 150 minutos os ensaios 16 (cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavadas) e 18 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavadas) diferiram entre si ($p < 0,05$) não diferindo em relação aos demais ensaios.

Após 180 minutos o ensaio 16 (cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavadas), diferiu do ensaio 18 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavadas) e do ensaio 19 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução

de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico e lavadas) porém nenhum deles diferiu em relação ao ensaio 17 (cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico e lavadas). A quantidade de proteína vai sendo reduzida com o tempo de amostragem devido à reposição de solvente.

Analisando a **Tabela 4.7** se observa que a concentração de pepsina encontrada no interior das cápsulas não lavadas e lavadas difere entre si ($p < 0,05$), sendo que o ensaio 13 (cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico) apresentou maior média, diferindo dos ensaios 14, 16, 18 e 19. Os ensaios 14 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl) e o ensaios 18 (cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) apresentaram menor média durante todo o experimento não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) entre si.

Após 30 minutos de difusão o ensaio 11 (cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5%) diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos ensaios 14 (cápsulas de alginato-AC gotejado em solução de cálcio acidificada com HCl), 18 (cápsulas de alginato-AC gotejado em solução de cálcio acidificada com HCl e lavada) e do ensaio 19 (cápsulas de alginato-AC gotejado em solução de cálcio acidificada com ácido cítrico e lavada).

De modo geral pode-se observar que em todos os tempos considerados os ensaios 14 (cápsulas de alginato-AC gotejado em solução de cálcio acidificada com HCl), e 18 (cápsulas de alginato-AC gotejado em solução de cálcio acidificada com HCl e lavada) diferiram significativamente ($p < 0,05$) do ensaio 11 (cápsulas de alginato gotejado em solução de cálcio). Os demais ensaios, com exceção do ensaio 15, nos tempos 60, 90 e 180 minutos, apresentaram valores de liberação intermediários não diferindo significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Tabela 4.7. Quantidade média em mg/g de cápsula ou solução de todos os tratamentos com pepsina em função do tempo. As concentrações calculadas levaram em consideração a quantidade de pepsina adicionada em relação a massa da amostra.

		Tempo (min)										
		Calculada Encontrada Calculada										
		Cápsula	Cápsula	Solução	15	30	60	90	120	150	180	210
ensaio 11	M	9,70	7,63 ^{abc}	1,37	1,39 ^a	1,33 ^a	1,18 ^a	1,00 ^a	0,908 ^a	0,620 ^a	0,730 ^a	0,594 ^a
	σ	1,11	0,333	0,291	0,286	0,336	0,355	0,137	0,457	0,098	0,106	0,138
ensaio 12	M	10,0	7,48 ^{abcd}	1,43	0,790 ^{bcd}	0,901 ^{ab}	0,834 ^{ab}	0,870 ^{ab}	0,879 ^a	0,547 ^a	0,709 ^a	0,619 ^a
	σ	1,07	0,216	0,076	0,452	0,314	0,314	0,415	0,354	0,420	0,287	0,348
ensaio 13	M	6,94	8,38 ^a	1,55	0,877 ^{bcd}	0,753 ^{ab}	0,926 ^{ab}	0,730 ^{ab}	0,604 ^a	0,539 ^a	0,481 ^{abc}	0,454 ^a
	σ	2,40	0,575	0,250	0,368	0,292	0,166	0,129	0,273	0,198	0,222	0,278
ensaio 14	M	3,60	5,16 ^{de}	1,12	0,573 ^{cd}	0,475 ^b	0,404 ^b	0,407 ^b	0,444 ^a	0,402 ^a	0,258 ^{bc}	0,212 ^a
	σ	1,28	0,860	0,337	0,116	0,124	0,110	0,161	0,317	0,237	0,201	0,150
ensaio 15	M	4,36	7,97 ^{ab}	2,26	1,04 ^{ab}	0,794 ^{ab}	0,594 ^b	0,458 ^b	0,463 ^a	0,266 ^a	0,170 ^c	0,275 ^a
	σ	3,24	1,22	0,579	0,189	0,200	0,186	0,276	0,396	0,216	0,131	0,224
ensaio 16	M	7,5	5,7 ^{bcd}	1,42	0,705 ^{bcd}	0,757 ^{ab}	0,603 ^b	0,735 ^{ab}	0,834 ^a	0,653 ^a	0,651 ^{ab}	0,539 ^a
	σ	4,05	1,94	0,073	0,292	0,31	0,355	0,271	0,118	0,103	0,235	0,243
ensaio 17	M	8,54	7,35 ^{abcd}	1,5	0,718 ^{bcd}	0,737 ^{ab}	0,62 ^{ab}	0,613 ^{ab}	0,362 ^a	0,393 ^a	0,365 ^{abc}	0,258 ^a
	σ	5,05	0,705	0,308	0,047	0,056	0,094	0,194	0,105	0,092	0,213	0,127
ensaio 18	M	5,05	3,65 ^e	1,15	0,445 ^d	0,410 ^b	0,339 ^b	0,377 ^b	0,307 ^a	0,230 ^a	0,241 ^c	0,177 ^a
	σ	2,17	0,860	0,352	0,067	0,066	0,144	0,15	0,125	0,165	0,141	0,066
ensaio 19	M	9,55	5,56 ^{cde}	2,24	0,982 ^{abc}	0,706 ^b	0,437 ^b	0,536 ^{ab}	0,266 ^a	0,284 ^a	0,308 ^{bc}	0,327 ^a
	σ	3,61	0,669	0,562	0,257	0,18	0,251	0,242	0,225	0,259	0,16	0,095

Na comparação entre os ensaios para cada tempo, as médias com letras em comum não diferem entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Legenda: M – média σ – desvio padrão. Descrição dos ensaios: vide **Figura 4.3 e 4.4**

Embora sem diferenças significativas entre si pode-se observar através da **Tabela 4.7** que os ensaios 14 (cápsulas de alginato-AC gotejado em solução de cálcio acidificada com HCl), e seu equivalente lavado, o ensaio 18 (cápsulas de alginato de cálcio-AC recheadas com pepsina gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl e lavada) apresentaram menor liberação do recheio sugerindo para esses sistemas a melhor retenção entre todos os sistemas estudados.

A **Tabela 4.7** permite ainda observar que a lavagem das cápsulas levou a uma diminuição na concentração de proteína encontradas experimentalmente e que pode ser visto comparando-se os ensaios 12 – 16, 13 – 17, 14 – 18 e 15 – 19. A lavagem superficial das cápsulas foi efetuada para permitir a avaliação da difusão de forma a garantir que o recheio liberado fora proveniente do interior da cápsula e não de sua superfície. Parte da pepsina a ser encapsulada pode ter ficado na parte externa da cápsula e ter sido facilmente solubilizada durante a lavagem. A análise das águas de lavagem e suas respectivas concentrações de proteína dadas na **Tabela 4.8** reforçam a hipótese.

A acetofitalato de celulose adicionada ao alginato de sódio com o intuito de modificar a liberação de compostos ativos mostrou-se efetiva para o caso da pepsina. As curvas de liberação, embora tenham apresentado formas semelhantes, após 15 minutos de difusão indicaram que os sistemas compostos pela mistura alginato-AC polimerizado em solução de cálcio acidificada com HCl retiveram 50% da quantidade de pepsina inicialmente encapsulada enquanto o sistema composto por alginato polimerizado em solução de cálcio liberaram 100%. O mesmo foi observado para os sistemas lavados, porém em menor porcentagem.

Tabela 4.8. Quantidade média em mg de pepsina por g de água de lavagem utilizando a proporção de quantidade de cápsula para água de 1:2 (g/ml).

	Média	Concentrações Encontradas
	Desvio	(mg/g)
Água de lavagem das cápsulas do ensaio 12	M	1,1 ^a
	σ	0,38
Água de lavagem das cápsulas do ensaio 13	M	0,52 ^b
	σ	0,16
Água de lavagem das cápsulas do ensaio 14	M	0,31 ^b
	σ	0,21
Água de lavagem das cápsulas do ensaio 15	M	0,63 ^b
	σ	0,13

Na comparação entre os ensaios, as médias com letras em comum não diferem entre si, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Legenda: **M** – média

σ – desvio

Descrição dos ensaios: vide Figura 4.3.

Apesar do alginato ser insolúvel em meio ácido (HCl 0,1 N), Fattah et al. (1998) observaram maior liberação em meio ácido do que em meio aquoso, sendo a rápida liberação do recheio das cápsulas de alginato em meio ácido explicada pela mudança na propriedade da matriz ao contato com o ácido. Yotsuyanagi et al. (1990), observaram que os íons de cálcio das cápsulas de alginato estavam totalmente descarregados em meio ácido enquanto os grupos carboxílicos se encontravam na forma não-ionizada, o que poderia alterar a propriedade da matriz, inclusive com relação às características de liberação de material de recheio. Fattah et al. (1998) concluíram que o comportamento de liberação de recheios de cápsulas não dependia unicamente das características iônicas do polímero e pH do meio, mas também do tipo de cátion conjugado ao polímero.

De acordo com King (1988) géis ou filmes de alginato de cálcio são permeáveis a moléculas solúveis em água e com massa molar menores que 5000 Daltons, como as moléculas de glicose e limoneno utilizadas em nossos ensaios. Segundo eles moléculas com maior massa molar (MM) também podem difundir-se lentamente através do gel, enquanto que moléculas com MM acima de 10000 ou maior não poderiam difundir-se, porém isso não foi observado no presente trabalho, onde a pepsina com Massa Molar de 34500 D foi utilizada como recheio, foi parcialmente liberada das cápsulas.

A aplicação dos modelos matemáticos citados anteriormente na revisão para representar a difusão dos recheios utilizados através da cápsula não foi possível devido a liberação ocorrer quase que instantaneamente, após 15 minutos de permanência das cápsulas em solução de difusão.

De modo geral a adição de acetofitalato de celulose com a intenção de diminuir a porosidade das cápsulas de alginato de sódio não surtiu o efeito desejado de aumentar a retenção do material de recheio de baixa massa molar em nenhum dos sistemas estudados. Porém o uso de alginato-AC com recheios de alta massa molar, como pepsina, permitiu a retenção de quantidades consideráveis nos estudos de difusão (50% de retenção considerando a primeira retirada de amostra aos 15 minutos).

5. Conclusão

O uso de acetofitalato de celulose com a intenção de diminuir a porosidade das cápsulas de alginato de sódio não surtiu o efeito desejado de aumentar a retenção do material de recheio com baixa massa molar como glicose e limoneno, com algumas poucas ressalvas sem diferença estatística nos ensaios 9 (cápsulas de alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl) e 10 (cápsulas de alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico) recheados com limoneno. Já para recheios com massa molar alta, como pepsina, a adição de AC mostrou-se efetiva, uma vez que as curvas de liberação, embora tenham apresentado formas semelhantes para todos os sistemas, após 15 minutos de difusão demonstraram que os sistemas compostos pela mistura alginato-AC gotejado em solução de cálcio acidificada com HCl retiveram 50% da quantidade de pepsina inicialmente encapsulada enquanto os sistemas compostos por alginato gotejado em solução de cálcio liberaram 100%, o mesmo tendo sido observado para os sistemas lavados porém em menor porcentagem. A adição de AC parece ter diminuído a porosidade da matriz de alginato influenciando assim na retenção de compostos de mais alta massa molecular.

A quantidade de recheio dos sistemas com cápsulas não-lavadas foi maior que os sistemas correspondentes com cápsulas lavadas, indicando

que parte da pepsina se encontrava sobre a superfície das cápsulas e que o processo de encapsulação ainda pode ser otimizado.

A aplicação dos modelos matemáticos para representar a difusão dos recheios utilizados através da cápsula não foi possível devido à liberação ocorrer quase que instantaneamente, após 15 minutos de permanência das cápsulas em solução de difusão na maioria dos sistemas utilizados.

6. Sugestões para Futuros Trabalhos

1ª. As matrizes utilizadas a base de alginato de cálcio sofrem um processo de sinérese durante os experimentos de difusão o que acarreta pequenas variações de massa das cápsulas contendo o recheio. Esse fato dificulta consideravelmente a quantificação do recheio a partir da cápsula. Maior investigação sobre o processo de sinérese e conseqüente variação de massa é necessária para que a quantidade difundida possa ser quantificada tanto na solução de difusão como diretamente na cápsula, o que permitirá um adequado balanço de massa.

2ª. A quantificação da proteína (pepsina) através do método de biureto se mostrou inadequada, enquanto a determinação pelo método Kjeldahl se mostrou extremamente trabalhosa, requerendo um longo tempo para digestão. A investigação de métodos espectrofotométricos poderá permitir a quantificação de forma mais rápida sem perda da sensibilidade analítica.

3ª. A matriz de alginato de cálcio tem a capacidade de retenção de um grande volume de água. Experimentos envolvendo a desidratação parcial das cápsulas contendo os recheios poderão alterar consideravelmente a porosidade da matriz e, portanto, devem ser investigados. Novas misturas poliméricas também necessitam ser avaliadas quanto a possibilidade de melhorar as propriedades de barreira da matriz de alginato de cálcio.

7. Referências Bibliográficas

- ANDRESEN, I. L.; SKIPNES, O.; SMIDSRØD, O.; ØSTGAARD, K.;
HEMMER, P.C. Some Biological Functions of Matrix Components in Bentic
Algae in Relation to Chemistry of their Polysaccharides and Composition of
Sea-water. **American Chemical Society Symposium**. v. 48. p. 361. 1977.
- ASPINALL, G.O. **The Carbohydrates - Chemistry and Biochemistry**. 2^a
ed. v.11B xvi. p. 471-853. 1970.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official
Methods of Analysis**. Ed William Horwitz. 14th ed. 1984. 1141p.
- BARRIE, J. A. **Diffusion in Polymers**. New York: ed by J. Crank and G.
S. Park. Academic Press. p. 280-283. 1968.
- BAUER, K.; GARBE, D. **Common Fragrance and Flavor Materials:
Preparation, Properties and Uses**. Imprenta Weinheim: VCH
Verlagsgesellschaft. 1985. 213p.
- BÉCHARD, S. R.; LEVY, L.; CLAS, S.-D. Thermal, Mecanical and
Functional Properties of Cellulose Acetate Phtalate (CAP) Coatings
Obtained from Neutralized Aqueous Solutions. **International Journal of
Phamaceutics**. v.114. p. 205-213. 1995.

- BEYGER, J. W.; NAIRN, J. G. Some Factors Affecting the Microencapsulation of Pharmaceuticals with Cellulose Acetate Phthalate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 75. p. 573-578. 1986.
- BISHOP, J. R. P.; NELSON, G.; LAMB, J. Microencapsulation in Yeast Cells. **Journal of Microencapsulation**. v.15 (6). p. 761-773. 1998.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2ªed. São Paulo: Varela. 1992.
- BOYER, P. D.; LARDY, H.; MYRBÄK, K. **The Enzymes**. v. 4. Academic Press. New York and London. 1960. 256p.
- BROWN, W.E; DAUCHEL, C.; WAKELING, I. Influence of Chewing Efficiency on Texture and Flavour Perceptions of Food. **Journal of Texture Studies**. v.27. p. 433-450. 1996.
- BUGARSKI, B.; SMITH, J.; WU, J.; GOOSEN, M.. F. A. Methods for Animal-Cell Immobilization Using Electrostatic Droplet Generation. **Biotechnology Techniques**. v. 7. p. 677-682. 1993. *Apud:* OKHAMAFE, A. O.; AMSDEN, B.; CHU, W.; GOOSEN, M. F. A. Modulation of Protein Release from Chitosan-alginate Microcapsules Using the pH-sensitive Polimer Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate. **Journal of Microencapsulation**. v. 13 (5). p. 497-508. 1996.
- CABRAL, F. A. **Estudo Cinético da Invertase Livre e Imobilizada em Alginato de Cálcio**. Campinas. 1989. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas.

- CARDOSO, V. L. **Síntese e Estudo do Desempenho de Suportes na Imobilização de Enzimas**. Campinas. 1988. Tese (Mestre em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas.
- CHAN, L.W.; HENG, P. W. S.; WAN, L.S.C. Effect of Cellulose Derivatives on Alginate Microspheres Prepared by Emulsification. **Journal Microencapsulation**. v. 14(5). p. 545-555. 1997.
- CHEETHAM, P. S. J.; BLUNT, K. W.; e BUCKE, C. Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium alginate Gels. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 21. p. 2155-2168. 1979.
- CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. **Advances of Polymer Sciences**. v.83. p.57. Springer-Verlag. Berlin. 1987.
- COTTRELL, I.W.; KOVACS, P. In: **Handbook of Water Soluble Gums and Resins**. New York: Ed. McGrawHill. 1980.
- CRAWFORD, R. R.; ESMERIAN, O. K. Effect of Plasticizers on Some Physical Properties of Cellulose Acetate Phtalate Films. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 60. p. 312-314. 1971.
- DALY, M. M.; KNORR, D. Chitosan-Alginate Complex Coarcevate capsules: Effects of Calcium Chorife, Plasticizers, and Polyelectrolytes on Mecanical Stability. **Biotechnology Progress**. v. 4. p.76. 1988. **Apud:** OKHAMAFE, A. O.; AMSDEN, B.; CHU, W.; GOOSEN, M. F. A. Modulation of Protein Release from Chitosan-alginate Microcapsules Using the pH-sensitive Polimer Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate. **Journal of Microencapsulation**. v. 13 (5). p. 497-508. 1996.

DEASY, P. B. **Microencapsulation and Related Drug Processes**. Marcel Dekker. Inc. New York and Basel. p.289-319. 1984.

DONBROW, M.; HOFFAMAN, A.; BENITA, S. Variation of Population Release Kinetics in Polydisperse Multiparticulate Systems (Microcapsules, Microspheres, Droplets, Cells) with Heterogeneity of One, Two or Three Parameters in Population of Individuals. **Journal Pharmaceuticals Pharmacology**. v.40. p. 93-96. 1988.

DOUGLAS, J. A.; SEFTON, M. V. Permeability of EUDRAGIT RL and HEMA-MMA Microcapsules to Glucose and Inuli. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 36(7). p. 653-664. 1990.

DUPUY, B.; GIN, H.; DUCASSOU, D.; AUBERTIN, J. Insitu Polymerization of a Microencapsulating Medium Round Living Cells. **Journal Biomedical Materials Research**. v. 22. p.1061-1070. 1988.

FATTAH, E. A.; GRANT, D. J. W.; GABR, K.E.; MESHALI, M. M. Physical Characteristics and Release Behavior of Salbutamol Sulfate Beads Prepared with Different Ionic Polysaccharides. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.24 (6). p. 541-547. 1998.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3^a ed. New York. 1996. 1069p.

FINK, D. J.; NA, T.; SCHULTZ, J. S. Effectiveness Factor calculations for Immobilized Enzyme Catalysis. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 15. p. 879-888. 1973.

- FLYNN, G. L.; YALKOWSKY, S. H.; ROSEMAN, T. Y. Mass-transport Phenomena and Models-theoretical Concepts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 63. p. 479-510. 1974.
- FURUI, M.; YAMASHITA, K. Diffusion Coefficients of Solutes in Immobilized Cell Catalysts. **Journal of Fermentation and TechnologyJournal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 63 (2). p. 167-173. 1985.
- GARCIA, I.; AISINA, R. B.; ANCHETA, O.; PASCUAL, C. Action of Gastric Juice on Microencapsulated Invertase. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 11. p. 247-251. 1989.
- GODSHALL, M. A. How Carbohydrates Influence Food Flavor. **Food Technology**. v. 51 (1). p. 63-67. 1997.
- GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: the Egg-box Model. **FEBS Letters**. v. 32. p. 195-198. 1973.
- GUILBERT, B.; GIANNAKOPOULOS, A.; CHEFTEL, J. C. Diffusivity of Sorbic Acid in Food Gels at High and Intermediate Water Activities. **In: Properties of Water in Foods in Relation to Quality and Stability**. Dordrecht, Boston: Lancaster. Ed. D. Simatos and J. L. Multon eds, Nijhoff publ. p. 343-356. 1985.
- HANLON, J. F. Films and Foils. Capítulo 3. **In: Handbook of Package Engineering**. Ed. Technomic Publishing Co. Lancasters. PA. p. 1-59. 1992.

HENRY, R.J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. **Clinical Chemistry Principles and Techniques**. 2^{ed}. New York: Harper and Row Publishers Inc. 1288p. 1974.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and The Food Industry. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. Londres. v. 24 (4). p. 289-297. 1991.

JENKIN, M. R.; SARABIA, R.E.; LIEBOWITZ, S. M.; MCGINITY, J. W. Relationship of Film Properties to Drug Release from Monolithic Films Containing Adjuvants. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 81. p. 983-989. 1992. *Apud*: RAFFIN, F.; DURU, C.; JACOB, M. Permeability to Hydrogen Ions of an Enteric Coating Polymer and Interaction of Film Formulation Factors. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 145. p. 247-252. 1996.

JOAQUIM, J.; BENHALIMA, N.; DELARBE, J.L.; RAMBAUD, J.; JOAQUIM, G.; MAURY, L. Etude Comparative de Deux Filmogènes: Acétophthalate de cellulose es Aquatéric®. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 65 (11). P. 311-314. 1990.

JOHANSEN, A.; FLINK, J. M. A New Principle for Immobilized Yeast Reactors Based on Internal Gelation of Alginate. **Biotechnology Letters**. v. 8(2). p.121-126. 1986.

JOHANSEN, A.; FLINK, J. M. Influence of Alginate Properties and Gel Reinforcement in Fermentation Characteristics of Immobilized Yeast-Cells. **Enzyme Microbiological Technology**. v. 8(12). p. 737-748. 1986.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible Films and Coatings: a Review. **Food Technology**. v. 40(12). p.47-59. 1986.

KIERSTAN, M.; DARCY, G.; REILLY, J. Studies on the Characteristics of Alginate Gels in Relation to their Use in Separation and Immobilization Applications. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 24. p. 1507-1517. 1982.

KIM, Y. D.; CHANG, H. N.; LIU, J. R. Plant Cell Immobilization of Enzymes and Cells. **Biotechnological Techniques**. v. 3(2). P. 139-144. 1988.

KING, A. H. Flavor Encapsulation with Alginates. Chapter 13. p.122-125. **In: Flavor Encapsulation**. Washington (DC): Risch S. J. and Reineccius G. A Eds. American Chemical Society. 1988.

KLEIN, J.; STOCK, J.; VORLOP, K. D. Pore-Size and Properties of Spherical Ca-Alginate Biocatalysis. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. v.18(2). p. 86-91. 1983.

KOHN, R. Ion Binding on Polyuronate-alginate and Pectin. **Pure and Applied Chemistry**. v. 42 (3). p. 371-397. 1975.

KOIDA, Y.; TAKAHATA, H.; KOBAYASHI, M.; SAMEJIMA, M. Studies on Dissolution Mechanism of Drugs from Ethylcellulose Mmicrocapsules. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 35(4). p. 1558-1545. 1987.

KORR, D.; KLEIN, J. Production and Conversion of Chitosan with Cultures of *Mucor Rouxii* or *Phycomyces blaksleeanus*. **Biotechnology Letters**. v. 8(10). p. 691-694. 1986.

- KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. The Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. **Food Technology**, v. 51(2). p. 61-74. 1997.
- KWOK, K. K.; GROVES, M. J.; BORGES, D. J. Production of 5-15 μm Diameter Alginate-Polylysine Microcapsules by an Air-Atomization Technique. **Pharmaceutical Research**. v.8 (3). p.341-344. 1991.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**. v. 227. p. 680-685. 1970.
- LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. Great Britain: TJ Press (Padstow) Ltda. 1995. 620p.
- LIM, F.; MOSS, R. D. Microencapsulation of Living Cells and Tissues. **Journal of Pharmaceutical Science**. v.70(4). p.351-354. 1981.
- LIMA, K. M.; RODRIGUES JÚNIOR, J. M. Poly-DL-lactice-co-glycolide microspheres as a controlled delivery system. **Brazilian Journal of Medicin and Biological Research**. v.32 (2). p. 171-180. 1999.
- LINKO, Y. Y.; LINKO, P. Entrapment of Microbial-cells in Cellulose Gel. **Methods in Enzymology**. v.135. p. 268-282. 1987.
- MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. (Capítulo I) Os Alimentos: Definição, Classificação, Composição e Valor Nutritivo. In: **Manual de Indústria dos Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela. 599p. 1996.

- MARTINSEN, A.; STORRØD, I.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as Immobilization Material II: Diffusion Properties. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 39(2). p.186-194. 1992.
- MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate as Immobilization Material I. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 33(1). p.79-89. 1989.
- MATULOVIC, U.; RASCH, D.; WAGNER, F. New Equipment for the Scaled up Production for Small Spherical Biocatalists. **Biotechnology Letters**. v.8(7). p.485-489. 1986.
- MAY, C. D. Pectins **In: Thickening and Gelling Agents for Food**. 2nd edition. London UK: Ed. Alan Imeson. 1997. 320p.
- MELLENHEIM, C.; PASSY, N. Choice of Packages for Foods with Specific Consideration of Water Activity. **In: Properties of Water in Foods**. Simatos, D., Multon, J. L. Dordrecht. (Eds) The Netherlands: Edif Martinus Nijhoff. 1985.
- MERCHANT, F. J. A.; MARGARITIS, A.; WALLACE, J. B. A Novel Technique for Measuring Solute Diffusivities in Entrapment Matrices Used in Immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 30. p.936-945. 1987.
- MERCK INDEX: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Published by Merck Research Laboratories, Whitehouse Station. NJ. 1996.

- MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical Properties of Polycarboxylate Gel Phase and their Incidence on the Retention/release of Solutes. **Biopolymer science: Food and Non-food Applications**. n°91. p. 303-314. 1999.
- MOIRANO, A. Hidrocolloids in Dietetic Foods. **Food Technology**. v. 20. p. 55-7. 1996.
- NEAU, S. H.; GOSKONDA, S.R.; UPADRASHTA, S.M.; THIES, C. A. TRIPP, S.I. Encapsulation of a Volatile Oil by Ionic Gelation of Alginate. **American Journal of Pharmaceutical Education**. v. 57. p. 126-129. 1993.
- OAKENFULL, M. Gelling Agents. **CRC – Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.26(1). p.1-25. USA. 1987.
- OGBONNA, J. C; AMANO, Y.; NAKAMURA, K. Elucidation of Optimum Conditions for Immobilization of Viable Cells by Using Calcium Alginate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 67 (2). p. 92-96. 1989.
- OKHAMAFE, A. O.; AMSDEN, B.; CHU, W.; GOOSEN, M. F. A. Modulation of Protein Release from Chitosan-alginate Microcapsules Using the pH-sensitive Polimer Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate. **Journal of Microencapsulation**. v. 13 (5). p. 497-508. 1996.
- OLARU, N.; OLARU, L.; LEANCĂ, M. On Thermal Degradation of Cellulose Acetate Phthalate. **Cellulose Chemistry and Technology**. v.29. p. 253-260. 1995.

- ONSOYEN, E. Alginates In: **Thickening and Gelling Agents for Food**. second edition. London: Ed. Alan Imeson. 1997. 320p.
- OSTBERG, T.; GRAFFUER, C. Calcium Alginate for Oral Multiple Unit Administration: III. Influence of Calcium Concentration, Amount of Drug Added and Alginate Characteristics Mon Drug Release. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 111. p. 271-282. 1994.
- PAPADOKOSTAKI, K.G.; AMARANTOS, S.G.; PETROPOULOS, J.H. Kinetics of Release of Particulate Solutes Incorporated in Cellulosic Polymer Matrices as a Function of Solute Solubility and Polymer Swellability. I. Sparingly Soluble Solutes **Journal of Applied Polymer Science**. v. 67. p. 277-287. 1998.
- PARRIS, N.; COFFIN, D. R.; JOUBRAN, R. F.; PESSEN, H. Composition Factors Affeting the Water Vapor Permeability and Tensile Properties of Hydrophilic Films. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 43. p. 1432-1435. 1995.
- RAFFIN, F.; DURU, C.; JACOB, M. Permeability to Hydrogen Ions of an Enteric Coating Polymer and Interation of Film Formulation Factors. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 145. p. 247-252. 1996.
- RAO, A.V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, I. Survival of Microencapsulated *Bifidobacterium Pseudolongum* in Simulates Gastric and Intestinal Juices. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. v. 22(4). p. 345-349. 1989.

- RAO, P. R.; DIWAN, P. V. Permeability Studies of Cellulose Acetate Free Films for Transdermal Use: Influence of Plasticizers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v.72. p. 47-51. 1997.
- REES, D. A. Structure, Conformation and Mechanism in the formation of Polysaccharide Gels and Networks. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v.24. p. 267-282 eds. Wolfrom M. L. e Tipson R. S. New York: Academic Press. 1969.
- REID, R. R.; PRAUSNITZ, J. M.; POULING, B. E. **The Properties of Gases and Liquids**. New York: Mc Grawhill. 1988.
- REINECCIUS, G. A. Controlled Release Techniques in Food Industry. **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. Reineccius, G. A., Risch, S. J. Washington. DC: ed ACS Symposium Series nº 370. American Chemical Society. 1988.
- ROXIN, P.; KARLSSON, A.; SINGH, S. K. Characterisation of Cellulose Acetate Phthalate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 24 (11). p. 1025-1041. 1998.
- SERERE, P. A.; UYEDA, K. **Methods In Enzymology**. New York: Academic Press. p.44. 1976. **Apud**: TREVISAN, H. C. **Imobilização de Glicose Oxidase em Suportes Silícicos**. Campinas. 1990. Tese (Mestre em Engenharia Química) – Faculdades de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas.
- SEZER, A. D.; AKBUGA, J. Release Characteristics of Chitosan Treated Alginate Beads: II. Sustained Release of a Low Molecular Drug from

- Chitosan Treated Alginate Beads. **Journal of Microencapsulation**. v.16 (6). p. 687-696. 1999.
- SEZER, A. D.; AKBUGA, J. Release Characteristics of Chitosan Treated Alginate Beads: I. Sustained Release of a Macromolecular Drug from Chitosan Treated Alginate Beads. **Journal of Microencapsulation**. v.16 (2). p. 195-203. 1999.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. São Paulo: Livraria Varela. p. 287-290. 1996.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of Food Ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 33(6). p. 501-547. 1993.
- SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of *Lactobacilli* in Calcium Alginate Gels. **Journal of Food Science**. v. 54(3). p.557-561. 1993.
- SHREVE, R. N.; BRINK Jr., J. A. Perfumes, Aromatizantes e Aditivos Alimentares. In: **Indústrias de Processos Químicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois. 1980. 717p.
- SKJÅK-BRÆK, G.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Inhomogeneous Polysaccharide Ionic Gels. **Carbohydrate Polimers**. v. 10. p. 31. 1989.
- SMIDSRØD, O. Molecular Basis for some Physical Properties of Alginates of Alginates in the Gel State. **Faraday Discuss. Chemical society**. v. 57. p. 263-274. 1974.

- SOCUTEN, W. H. Solid Phase Biochemistry. In: **Chemical Analysis**. 66 p. ed. John Wiley & Sons. 1983. *Apud*: TREVISAN, H. C. **Imobilização de Glicose Oxidase em Suportes Silícicos**. Campinas. 1990. Tese (Mestre em Engenharia Química) – Faculdades de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas.
- SOUTHWEST Research Institute. **A Capability Statement for Microencapsulation**. San Antonio. 31p. 1991.
- SPITAEEL, J.; KINGET, R. Preparation and Evaluation of Free Films – Influence of Plasticizers and Filler Upon Permeability **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 52(5). p. 106-108. 1977.
- SUSHEELAMMA, N. S.; CHAND, N.; RAJALAKSHMI, D. Modelling the Gelling Behaviour of Linseed Polysaccharide: Effect of Salts and pH. **Journal of Texture Studies**. v.25. p. 437-454. 1994.
- TANAKA, F. Polymer – Surfactant Interaction in Thermoreversible Gels. **Macromolecules**. v.31. p. 384-393. 1998.
- TANAKA, H.; MATSUMURA, M.; VELIKY, I. A. Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-alginate Gel Beads. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 26. p. 53-58. 1984.
- THIES, C. Chapter 8: Gelation. How to Make Microcapsules Combined Lecture and Laboratory Manual. In: **Thies Technology**. Saint Louis. Missouri. p. 1-51. 1994.
- THIES, C. Microencapsulation. In: **Encyclopedia of Polymer Sciences and Engineering**. v. 9. 2^a ed. Ed. John Wiley & Sons. New York. p. 714-745. 1987.

- THIJSSSEN, H. A. C.; MENTING, L. C.; HOOGSTAD, B. Aroma Retention During the Drying of Liquid Foods. **Journal of Food Technology**. Chicago: v.5. p.127-139. 1970.
- THOMAS, W.R. Carrageenan. In: **Thickening and Gelling Agents for Food**. 2ª ed. Lodon, UK.: By Alan Imeson. 1997. 320p.
- TODA, K.; SHODA, M. Sucrose Inversion by Immobilized Yeast-Cells in a Complete Mixing Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 17 (4). p. 481. 1975.
- TOMIDA, H.; NAKAMURA, C.; YOSHITOMI, H.; KIRYU, S. Preparation of Theophylline – Loaded Calcium Alginate Gel Capsules and Evaluation of their Drug Release Characteristics. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.41 (12). p.2161-2165. 1993.
- TREVAN, M. D. **Immobilized Enzymes – An Introduction and Applications in Biotechnology**. New York: John Wiley. 1980. *Apud*: CARDOSO, V. L. **Síntese e Estudo do Desempenho de Suportes na Imobilização de Enzimas**. Campinas. 1988. Tese (Mestre em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas.
- TREVISAN, H. C. **Imobilização de Glicose Oxidase em Suportes Silícicos**. Campinas. 1990. Tese (Mestre em Engenharia Química) – Faculdades de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas.
- VARSHOSAZ, J.; KENNEDY, R. A.; GIPPS, E. M. Use of Enteric Polymers for Production of Microspheres by Extrusion-spheronization. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 72. p. 145-152. 1997.