

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

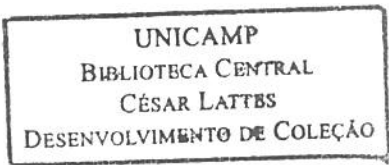
**UTILIZAÇÃO DE SURFACTANTES NA PRODUÇÃO DE
MICROENCAPSULADOS DE ÓLEO RICO EM ÔMEGA 3 POR COACERVAÇÃO
COMPLEXA COM APLICAÇÃO EM EMULSÕES**

Maria Cristina Chiarinelli Nucci Mascarenhas
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas - 2010



UNIDADE BC
Nº CHAMADA
T/UNICAMP m 373u
V
TOMBO BC/ 88068
PROC 16.134.30
C 8 D
PREÇO R\$ 20,00
DATA 06-10-10
CÓD 'T' 774240

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M373u Mascarenhas, Maria Cristina Chiarinelli Nucci
Utilização de surfactantes na produção de microencapsulados de
óleo rico em ômega 3 por coacervação complexa com aplicação em
emulsões / Maria Cristina Chiarinelli Nucci Mascarenhas. --
Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Coacervação complexa. 2. Surfactantes. 3. Óleo de linhaça.
4. Emulsões. I. Gonçalves, Lireny Aparecida Guaraldo. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

cars/bibfca

Título em inglês: Production of omega 3 microencapsulated with surfactants and
application in emulsion

Palavras-chave em inglês (Keywords): Complex coacervation, Surfactants, Flaxseed oil,
Emulsions

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

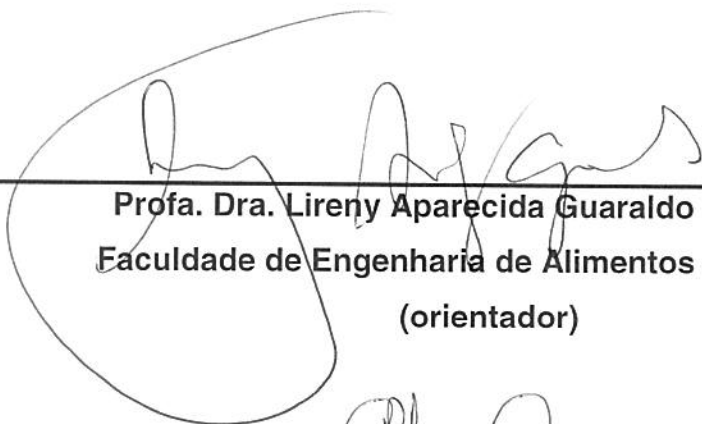
Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Denise Fabiana Silvestre Becker de Almeida

Data da Defesa: 27/08/2010

Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos

RS E
Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em 27/08/2010 por Maria Cristina Chiarinelli Nucci Mascarenhas aprovada pela comissão julgadora em 27/08/2010.



Profa. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(orientador)



Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)



Dra. Denise Fabiana Silvestre Becker de Almeida
(membro)

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP
(membro)

*"Why has not Man a microscopic eye?
For this plain reason, Man is not a fly.
Say what the use, were finer optics giv'n,
T'inspect a mite, not comprehend the heav'n?"
Alexander Pope*

*"Por que não tem o homem um olho microscópico?
Pela simples razão, o homem não é uma mosca.
Qual seria o uso, se tivéssemos olhos mais agudos,
inspecionar o minúsculo e não compreender os céus?"
Tradução de Fabio Mascarenhas Nolasco*

*Dedico este trabalho
aos meus pais, filhos e marido,
por todo apoio, incentivo e amor.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter me dado a chance de passar por esta experiência e me dar saúde, força e apoio de pessoas especiais.

Ao meu marido Henrique pelo apoio, compreensão e ajuda para enfrentar esta etapa de minha vida e aos meus filhos Matheus e Lucas que mesmo não entendendo ainda o contexto me dão muito carinho e força.

Ao meu filho Matheus por me lembrar da frase de uma fada dos desenhos animados: “Não desista, não desista!”

À minha família, pais e sogros, irmãos e cunhados, pelo apoio emocional e logístico com os meninos, para que eu pudesse desenvolver o trabalho da melhor maneira possível.

À profa Lirenny Aparecida Guaraldo Gonçalves pela confiança em meu trabalho me dando a oportunidade de desenvolver um trabalho de tema inovador no departamento, pelo carinho e compreensão.

Ao prof. Carlos Grosso pelas inúmeras informações e sugestões que direcionaram o trabalho, sempre com muito interesse e disponibilidade.

Ao amigo Chiu Chih Ming pelo carinho, interesse e ajuda nas realizações experimentais e troca de idéias e informações.

Aos colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras, Denise Becker, Andrea Guedes, Aliciane Fontenele, Luciene Campos, Marilene Ribeiro, Julice Modolo, Rodrigo Basso, Renato Grimaldi, Kelly Gandra, Oscar, Paula, que me auxiliaram desde informações necessárias básicas até sugestões valiosas na realização do trabalho.

Às meninas do laboratório, Katrina, Ingrid, Priscila, Alaíde, Rosana e especialmente Marcela, que me auxiliaram muito na realização das análises.

À equipe do DEPAN do prof. Carlos Grosso, Fernando Tello, Gláucia Rocha e em especial Yara Honório pela confiança, ajuda prestativa nas análises e realizações de testes nos laboratórios do departamento.

Aos professores das disciplinas que realizei neste período de pós graduação: Profa. Dra. Lirenny Aparecida Guaraldo Gonçalves, Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore, Profa. Dra. Adriana Z. Mecadante, Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano, Prof. Dr. Expedito Tadeu Facco Silveira, Profa. Dra. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio, Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício, por terem me auxiliado na visão acadêmica e de pesquisa.

Ao Thomás Crespo e Laboratório de Extração do Departamento de Engenharia de Alimentos da FEA-UNICAMP pela oportunidade de utilização de equipamento de Karl Fisher para determinação de umidade.

À profa. Maria Helena Santana da FEQ e equipe de seu laboratório, Gilson, por permitir o uso do equipamento Zeta Master, de grande importância para avaliações do trabalho.

À Kelly Palma da FEQ por ter se comprometido nas análises de MEV mesmo em cronogramas apertados.

A Ana Koon pelo auxílio na utilização do Liofilizador do departamento de Tecnologia de Alimentos.

Ao Sr. Eduardo Caritá da Funcional Mikron pelo incentivo e apoio nesta linha de trabalho em microencapsulados e colaborando com ensinamentos especiais.

À empresa Cisbra Alimentos pelo fornecimento de óleo de linhaça, CNI Colloides Naturais Brasil, pelo fornecimento da goma arábica, Gelita do Brasil pelo fornecimento da gelatina, Croda do Brasil pelo fornecimento dos surfactantes, Kienast & Kratschmer Ltda pelo fornecimento da oleoresina de páprica, Ajinomoto Interamericana Ind. E Com, Ltda pelo fornecimento da enzima transglutaminase, empresas Quest, Genecor e Novozymes pelo fornecimento de enzimas, Pepsi Co. pelo fornecimento de óleo de girassol alto oléico.

À Diretoria da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela confiança e apoio na obtenção de matéria prima junto à empresa.

À Banca Examinadora pela disponibilidade em corrigir este trabalho dando sugestões importantes para seu enriquecimento e em participar da defesa da dissertação.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa de estudos.

À Universidade Estadual de Campinas.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABELAS	xviii
ÍNDICE DE QUADROS	xx
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT	xxvii
INTRODUÇÃO GERAL	29
CAPÍTULO 1	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
1 Lipídios e ácidos graxos	32
1.1 Ácidos graxos polinsaturados	32
1.2 Digestão e absorção de lipídios	33
1.3 Metabolismo dos ácidos graxos ômega 3 e ômega 6	34
1.4 Ácidos graxos polinsaturados e saúde	35
2 Microencapsulação	37
2.1 Microencapsulação por coacervação complexa	39
2.1.1 Interações na coacervação complexa.....	43
2.1.2. Morfologia do complexo coacervado	47
2.2 Material de Parede	48
2.2.1 Gelatina	49
2.2.2 Goma Arábica	51
2.3 Material de recheio	53
2.3.1 Óleo de Linhaça.....	53
2.3.2 Oleoresina de Páprica	55
2.4 Reticulação	56
2.4.1 Transglutaminase	56
2.5 Caracterização das microcápsulas	57
2.6 Estudo da liberação do recheio da microcápsula	58

3 Emulsões.....	59
3.1 Surfactantes.....	61
3.2 Potencial Zeta.....	63
4 Desemulsificação	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
CAPÍTULO 2	
Estudo da dosagem de surfactantes e valores de HLB (<i>“Hidrophilic Lipophilic Balance”</i>) em emulsões de óleo de linhaça e goma arábica para produção de microcápsulas por coacervação complexa.....	75
1 Introdução	76
2 Material e Métodos	81
2.1 Material	81
2.2 Equipamentos.....	81
2.2.1 Equipamentos utilizados nos processo e determinações analíticas	81
2.3. Métodos	82
2.3.1 Metodologia para elaboração das emulsões e avaliação da estabilidade.....	82
2.3.2 Avaliação da influência do sal de cálcio no potencial zeta.....	84
3 Resultados e discussão.....	84
3.1 Elaboração das emulsões e avaliação da estabilidade	84
3.2 Avaliação do potencial zeta das emulsões	88
4 Conclusões.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CAPÍTULO 3	
Produção de microcápsulas de óleo de linhaça por coacervação complexa com uso de surfactantes	93
1 Introdução	94
2 Material e Métodos.....	100
2.1 Material	100
2.2 Equipamentos.....	101
2.2.1 Equipamentos utilizados na produção das microcápsulas.....	101

2.2.2 Equipamentos utilizados para determinações analíticas	101
2.3. Métodos	102
2.3.1 Caracterização físico –química das matérias primas.....	102
2.3.1.1 Determinação de umidade	102
2.3.1.2 Determinação de proteína	102
2.3.1.3 Identificação do material de recheio	102
2.3.2. Produção das microcápsulas.....	103
2.3.2.1. Processos preliminares.....	106
2.3.2.2. Processo de produção	107
2.3.3 Caracterização das microcápsulas	108
2.3.3.1 Determinação da umidade das microcápsulas	108
2.3.3.2 Rendimento de processo de encapsulação	109
2.3.3.3 Eficiência de encapsulação (EE)	109
2.3.3.4 Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das micropartículas	110
2.3.3.5 Microscopia óptica e eletrônica de varredura	111
2.3.4 Análise da estabilidade oxidativa do material de recheio.....	111
2.3.5 Análise estatística	112
3. Resultados e discussão.....	112
3.1 Caracterização físico –química das matérias primas.....	112
3.2. Produção das microcápsulas.....	113
3.2.1 Testes preliminares.....	113
3.2.2 Processo de produção	115
3.2.3 Caracterização das micropartículas.....	116
3.2.3.1 Microscopia ótica (MO) e eletrônica de varredura (MEV)	121
3.2.3.2 Análise da estabilidade oxidativa do material de recheio.....	126
4 CONCLUSÕES	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
CAPÍTULO 4	
Liberação de recheio hidrofóbico rico em ômega 3 de microcápsulas produzidas com e sem surfactante aplicadas em emulsões padrão O/A e A/O135	

1 Introdução	136
2 Material e Métodos.....	139
2.1 Material	139
2.2 Equipamentos.....	140
2.2.1 Equipamentos utilizados nos processo e determinações analíticas ..	140
2.3 Métodos	140
2.3.1 Identificação dos óleos	140
2.3.2 Elaboração das emulsões com microcápsulas	141
2.3.3 Caracterização das emulsões.....	142
2.3.4 Processo de desemulsificação	143
2.3.5 Avaliação da liberação do recheio	144
2.3.5.1 Curva de calibração com padrão interno (P.I.)	144
2.3.5.2 Determinação da quantidade de recheio liberado	145
2.3.6 Análise estatística	146
3 Resultados e discussão.....	146
3.1 Identificação dos óleos	146
3.2. Elaboração das emulsões com microcápsulas	147
3.3 Caracterização das emulsões.....	147
3.4 Desemulsificação das emulsões.....	148
3.5 Curva de calibração com padrão interno (P.I.)	149
3.6 Avaliação das liberações de recheio	150
4 Conclusões.....	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
Conclusões Gerais	158
Anexo	161

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Estruturas das moléculas de ácidos graxos. (a) α -linolênico (C18:3 <i>n</i> -3 - ALA); (b) linoléico (C18:2 <i>n</i> -6 - LA)	33
Figura 2: Metabolismo de ácidos graxos ômega 6 (<i>n</i> -6) e ômega 3 (<i>n</i> -3)	34
Figura 3: Tipos de estruturas de micropartículas	39
Figura 4: Etapas da coacervação complexa. (a) dispersão; (b) formação das três fases imiscíveis; (c) deposição do material de parede; (d) solidificação do material de parede	42
Figura 5 : Interações entre proteínas e polissacarídeos.....	45
Figura 6. Estrutura da fase esponja dos coacervados	47
Figura 7. Etapa intermediária entre fase lamelar e fase esponja	48
Figura 8: Esquema de aminoácidos em diferentes pH. (a): pH > pI, forma aniônica; (b): pH < pI, forma catiônica.....	50
Figura 9: Estrutura molecular da goma arábica.....	52
Figura 10: Representação esquemática da estrutura da dupla camada elétrica.....	64
Figura 11: Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões O/A.....	65

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estrutura química do Tween 80 (C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆).....	79
Figura 2 : Estrutura química de Monoesteres de sorbitana - SPAN.	79

CAPÍTULO 3

Figura 1: Processo de microencapsulação por Coacervação Complexa	105
Figura 2. Histogramas da distribuição do tamanho de partículas das microcápsulas. (a) amostra padrão PCAL sem surfactante, 20.000 rpm, pH reticulação 6; (b) amostra 4CAL com surfactante HLB 4,3, 20.000 rpm, pH reticulação 6. Foram medidas 300 microcápsulas de cada.....	114

Figura 3. Histogramas da distribuição do tamanho de partículas das microcápsulas padrão no processo de resfriamento com banho de gelo e banho controlado. (a) amostra padrão PG em banho de gelo, 20.000 rpm, pH reticulação 6; (b) amostra padrão PB em banho controlado, 20.000 rpm, pH reticulação 6	115
Figura 4: Microcápsulas vazias produzidas com surfactante HLB 6,45. (a): 6SAD: microcápsula com surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4; (b): 6CAD: microcápsula com surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6. Barras Microscopia óptica = 100 μ m	116
Figura 5: Histograma da distribuição do tamanho de partículas das microcápsulas. PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6; 4CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6; PSAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4; 4SAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 4	119
Figura 6: Imagens de microcápsulas rachadas. (a): 4CAD antes do acerto de pH e da adição enzima; (b): 4CAD após a lavagem; (c): PCAD após a lavagem. Barras Microscopia óptica = 100 μ m	121
Figura 7: Imagens de microscopia ótica e de varredura de amostras úmidas, liofilizadas e reidratadas. Imagem ótica úmida: (a) PCAD e (d) 4CAD; Imagem MEV seca: (b) PCAD e (e) 4CAD; Imagem ótica reidratada: (c) PCAD e (f) 4CAD. Barras Microscopia óptica = 100 μ m e MEV=3 μ m	123
Figura 8: Imagens de microscopia ótica (MO) e de varredura (MEV) de amostras úmidas, liofilizadas e reidratadas. Úmidas - MO: (g) PSAD e (j) 4SAD; Liofilizadas – MEV: (h) PSAD e (k) 4SAD; Reidratadas – MO: (i) PSAD e (l) 4SAD. Barras Microscopia óptica = 100 μ m e MEV=3 μ m	124
Figura 9: Imagens de microcápsulas úmidas para avaliação de oxidação do recheio expostas ao ar. Tempo 0: (a) PCAD; (b) 4CAD; (c) PSAD; (d) 4SAD. Tempo 15 dias: (e) PCAD; (f) 4CAD; (g) PSAD; (h) 4SAD.....	127

Figura 10: Imagens de microcápsulas secas para avaliação de oxidação do recheio expostas ao ar. Tempo 0: (a) PCAD; (b) 4CAD; (c) PSAD; (d) 4SAD. Tempo 3 dias: (e) PCAD; (f) 4CAD; (g) PSAD; (h) 4SAD..... 127

Figura 11: Imagens de microcápsulas secas reidratadas para avaliação de oxidação do recheio expostas ao ar. Tempo 0: (a) PCAD; (b) 4CAD; (c) PSAD; (d) 4SAD. Tempo 8 dias: (e) PCAD; (f) 4CAD; (g) PSAD; (h) 4SAD. . 128

CAPÍTULO 4

Figura 1: Microscopia ótica das emulsões sem microcápsulas: (a): O/A (EOA); (b): A/O (EAO). Barras Microscopia ótica = 50 μ m 148

Figura 2: Microcápsulas inteiras após processo de desemulsificação da emulsão em que foi aplicada. Barra Microscopia ótica = 50 μ m..... 149

Figura 3. Curva de calibração para quantificação do ácido graxo α - linolênico (C 18:3). A: área obtida na análise de composição; m: massa adicionada 150

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes do delineamento estatístico para avaliação da estabilidade das emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça.....	82
Tabela 2. Resultados de volume da fase separada e de espuma do primeiro delineamento de emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça.....	85
Tabela 3: Resultados de volume da fase separada e de espuma do segundo delineamento de emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça.....	86
Tabela 4: Resultados de volume da fase separada e de espuma de emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça com sistemas de surfactantes definidos	86
Tabela 5: Resultados de volume da fase separada e de espuma de emulsões de solução de goma arábica e diversos óleos, com cloreto de cálcio e sem surfactantes.....	87
Tabela 6: Potencial zeta e condutividade para as emulsões.....	88

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Condições pré-determinadas das matérias primas para as produções de microcápsulas por coacervação complexa.....	104
Tabela 2: Descrição das amostras e condições adicionais de processo - 1ºProcesso	106
Tabela 3: Descrição das amostras e condições adicionais de processo - 2ºProcesso	107
Tabela 4: Descrição das amostras e condições adicionais de processo - 3ºProcesso	108
Tabela 5: Composição em ácidos graxos (%) dos materiais de recheio	113
Tabela 6. Caracterização das microcápsulas Padrão e com surfactante.....	117
Tabela 7: Dados de tamanho de partículas das amostras com diferentes condições de processo – velocidade de agitação da emulsão.....	120

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Valores teóricos das quantidades de $n-6$ e $n-3$ e relação $n-6/n-3$ para emulsões óleo em água (EOA) e água em óleo (EAO) com microcápsulas	142
Tabela 2. Composição de ácidos graxos (%) de Óleo de girassol alto oléico (OGAO) e recheio de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1)	146
Tabela 3. Caracterização das emulsões sem microcápsulas.....	147
Tabela 4: Composição em ácidos graxos (%) fase oleosa separada pela desemulsificação das emulsões EAO com microcápsulas, tempos 0 e 24 horas	151
Tabela 5. Composição em ácidos graxos (%) fase oleosa separada pela desemulsificação das emulsões EOA com microcápsulas, tempos 0 e 24 horas	152
Tabela 6. Quantidade de recheio liberado na aplicação de microcápsulas em emulsões padrão EAO e EAO	153

ÍNDICE DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1: Famílias de Ácidos Graxos Polinsaturados32

Quadro 2 : Trabalhos recentes em microencapsulação por coacervação
complexa41

Quadro 3: Parâmetros analíticos das principais espécies de goma arábica52

Quadro 4 : Classificação de alguns surfactantes em função do HLB62

CAPÍTULO 2

Quadro 1: Valores de HLB e aplicações adequadas77

Quadro 2: Surfactantes não iônicos permitidos para uso em alimentos78

CAPÍTULO 3

Quadro 1: Composição em ácidos graxos do óleo de linhaça (% , m/m)97

LISTA DE ABREVIATURAS

et al - e outros

n° - número

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

n-3 - ômega 3

n-6 - ômega 6

O/A – emulsão óleo em água

A/O – emulsão água em óleo

PUFA - ácidos graxos polinsaturado

ALA – ácido graxo α - linolênico

EPA - ácido graxo Eicosapentaenóico

DHA - ácido graxo Docosaheptaenóico

LA - ácido graxo linoleico

FAO - Food and Agricultural Organization

P/S – ácidos graxos poliinsaturados/ ácidos graxos saturados

Δ GM - Energia Livre de Gibbs da mistura

Δ HM - variação da entalpia da mistura

Δ SM - variação da entropia da mistura

T - temperatura absoluta

pKa - potencial de dissociação

pI - ponto isoelétrico

MEV – microscopia eletrônica de varredura

HLB - Hydrophilic Lipophilic Balance ou balanço hidrofílico lipofílico (BHL)

INS: International Numbering System

EAO- 80% de óleo de girassol alto oléico, 20% de água e 0,4% Span 80

EOA - 20% de óleo de girassol alto oléico, 80% de água e 0,4% Tween 80

C 16:0 - Ácido graxo palmítico

C 18:0 - Ácido graxo esteárico

C 18:1 - Ácido graxo oléico

C 18:2 - Ácido graxo linoléico

C 18:3 - Ácido graxo linolênico

C 20:0 - Ácido graxo araquídico

C 20:1 - Ácido graxo gadoléico

C 22:0 - Ácido graxo behênico

C 24:0 - Ácido graxo lignocérico

C 19:0 - Ácido graxo nonadecanóico

P.I. – padrão interno

MO - microscopia ótica

MEV - microscopia eletrônica de varredura

PCAL – microcápsula padrão produzida sem surfactante por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina; 20.000 rpm; pH reticulação 6

4CAL – microcápsula produzida com surfactante HLB 4,3 por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina; 20.000 rpm; pH reticulação 6

PCAD – microcápsula padrão produzida sem surfactante por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina; 14.000 rpm; pH reticulação 6

4CAD – microcápsula produzida com surfactante HLB 4,3 por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina; 14.000 rpm; pH reticulação 6

PSAD - microcápsula padrão produzida sem surfactante por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina; 14.000 rpm; pH reticulação 4

4SAD: microcápsula produzida com surfactante HLB 4,3 por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina; 14.000 rpm; pH reticulação 4

PB - amostra padrão produzida em banho controlado por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina; 20.000 rpm; pH reticulação 6

PG - amostra padrão produzida em banho de gelo por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina; 20.000 rpm; pH reticulação 6

RESUMO

Óleos e gorduras são importantes na alimentação humana como fonte de energia e alguns são essenciais ao funcionamento do organismo, como os ácidos graxos linoléico (ômega 6) e α -linolênico (ômega 3) tendo benefícios à saúde se ingeridos adequadamente com balanço de $n-6/n-3$ baixo. O óleo de linhaça é fonte de α -linolênico e a microencapsulação deste óleo é adequada por motivos de proteção contra alterações durante aplicação, modulação da liberação e extensão de aplicabilidade, sendo a coacervação complexa um dos métodos mais adequados. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do uso de surfactante na produção das microcápsulas e, após aplicá-las em emulsões padrão dos tipos O/A e A/O, avaliar a liberação do material de recheio encapsulado. Em estudos preliminares, utilizando os surfactantes Tween 80 e Span 80, foram selecionados dois sistemas adequados para produção das microcápsulas com HLB 4,3 e HLB 6,45. Também ficou definido o uso de carbonato de cálcio para reduzir a formação de espuma. Como materiais de recheio foram utilizados o óleo de linhaça adicionado à oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica (2,5%) e gelatina (2,5%) na proporção de 2:1 de parede e recheio. Todas as microcápsulas produzidas foram reticuladas com enzima transglutaminase na proporção gelatina:enzima de 1,95:1 e liofilizadas. Foram realizados diferentes processos e os sistemas contendo surfactante com valor de HLB 6,45 afetou negativamente a produção, resultando em microcápsulas vazias em todos os tratamentos. Foram avaliadas algumas alterações no processo como velocidade de agitação, processo de resfriamento e foram realizadas produções com pH de reticulação de 4 (pH de coacervação) e 6 (valor ótimo para a enzima). Alguns resultados obtidos dos processos foram a redução de tamanho de partículas com o aumento da velocidade de emulsificação de 14.000 para 20.000 rpm, amostra padrão 134,37 μm e 66,00 μm respectivamente, e menor dispersão na distribuição de tamanho de partícula em processo com controle da taxa de resfriamento. O sistema contendo o surfactante com valor de HLB 4,3 foi adequado. As microcápsulas com melhor desempenho

foram as produzidas sem surfactante e com surfactante de HLB 4,3 em pH de reticulação 4 com eficiências de encapsulação de 60,03% e 76,31%, respectivamente. O processo de liofilização mostrou-se muito drástico alterando a morfologia das microcápsulas e tornando a estrutura frágil à oxidação. Foram produzidas emulsões de O/A (20% óleo/ 80% água) e A/O (20% água/ 80% óleo) com homogeneização de 20.000 rpm por 1 minuto com aplicação de 6% destas microcápsulas. A liberação foi acompanhada através da quantificação do ácido graxo α -linolênico (C18:3) da fase oleosa separada por desemulsificação das emulsões por cromatografia em fase gasosa em tempos de 0 e 24 horas . A liberação foi maior em sistema A/O para as duas amostras e não houve diferença significativa entre os dois tempos (0 e 24 horas). Em relação à liberação das amostras com e sem surfactante, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas aplicações em emulsões de O/A, porém os valores para HLB 4,3 foram menores. A utilização de surfactante de HLB 4,3 parece ser favorável na produção e na redução da liberação em aplicações em emulsões e interessante para uso de microcápsulas com recheio hidrofóbico em alimentos como molho de salada (O/A).

Palavras Chave: coacervação complexa, surfactantes, óleo de linhaça, liberação do material de recheio, emulsões.

ABSTRACT

Oils and fats are important to human dietary as energy source and some of them are essentials to body functions, like the fatty acids linoleic (omega 6 – *n*-6) e α -linolenic (omega 3 – *n*-3) with health benefits accordingly to diet with low balance *n*-6/*n*-3. The flaxseed oil is rich in α -linolenic and the microencapsulation is appropriate to protect against alteration during application, modulation of core material release and to extend the applicability, being the complex coacervation the most appropriated method. The aim of this work was to study the influence of the use of surfactant in production of microcapsules and then, their application in emulsions O/W and W/O, to evaluate the core material release. Two surfactant systems were defined to production (HLB 4,3 and HLB 6,45) and calcium carbonate was used to avoid foam. The core material were flaxseed oil with paprika oleoresin oil (10:1) and the coating materials were acacia gum (2,5%) and pig gelatin (2,5%). The proportion of coating material and core material was 2:1. The transglutaminase enzyme was used as cross-linking agent (gelatin:enzyme – 1,95:1) and the liofilization was the dryer process. Several process were done and the HLB 6,45 system affected negatively on production, resulting in empty microcapsules. Some process alterations were studied: agitation rate, cooling process and cross-linking pH, one with pH coacervation and other with change pH to 6 (pH optimum). The results of process were the particle size reduction with agitation velocity increase (14.000 to 20.000 rpm resulted in microcapsules with 134,37 μ m e 66,00 μ m respectively), and low size particle dispersion with cooling rate control. The HLB 4,3 system was suitable and the best microcapsules were the standard and HLB 4,3 with cross-linking pH at 4, with encapsulation efficiency to 60,03% and 76,31%, respectively. The liofilization process changed the structure of microcapsules and the oxidation happened quickly. These particles were used (6%) in emulsions production: O/W (20% oil/ 80% water) and W/O (20% water/ 80%oil) using 20.000 rpm per 1 minute. The release of core material was evaluated with measures of fatty acid α -linolenic (C18:3) of oil phase resulted of emulsions desmulsification by gas chromatography, along of the time (0 and 24

hours). In emulsion W/O the release was higher than emulsion O/W, for standard (43% and 30%) and 4,3 HLB (41% and 27%) samples. The results were not significantly different between times. The results of core material release between standard and 4,3 HLB showed no significantly difference in all emulsions, but the result of 4,3 HLB sample was smaller than standard sample. The use of surfactant HLB 4,3 may be favorable to production and to avoid the core material release in emulsions and interesting to use hydrophobic material microencapsulated in food, for example dressing salad (O/W).

Keywords: complex coacervation, surfactants, flaxseed oil, emulsions, core material release.

INTRODUÇÃO GERAL

Óleos e gorduras fazem parte da alimentação humana e tem uma grande importância para o funcionamento do organismo como fonte de energia e compostos essenciais. Alguns óleos possuem, em sua composição, ácidos graxos α -linolênico da família do ômega 3 ($n-3$). Este tipo de ácido graxo está sendo muito estudado com vários benefícios à saúde relacionados. O óleo de linhaça é uma ótima fonte deste tipo de ácido graxo e é obtido da semente da linhaça por extração a frio.

Por motivos de proteção contra alterações durante aplicação, modulação da liberação e extensão de aplicabilidade, a tecnologia de microencapsulação de óleos está sendo muito estudada na área de alimentos e um dos métodos mais adequados para este tipo de recheio é a coacervação complexa.

Esta técnica consiste na separação de duas fases imiscíveis, líquido/líquido, a partir de dois ou mais solutos de cargas polieletrólíticas opostas misturados em meio aquoso, formando uma fase de coacervado (alta concentração de soluto) e uma de equilíbrio (rica em solvente). Ao ocorrer a separação, a fase coacervada se deposita em volta do componente ativo a ser encapsulado (recheio) suspenso no mesmo meio de reação.

Muitos estudos estão sendo realizados em relação ao processo de produção e estabilidade das microcápsulas nas áreas farmacêutica e de alimentos. O desenvolvimento dos estudos farmacêuticos mostra resultados mais avançados em relação à área de alimentos, principalmente no que se refere à liberação do recheio em sistemas modelo de alimentos.

Existe uma linha de estudos relacionada ao uso de surfactantes na produção de microcápsulas por coacervação complexa com efeitos diversos nos parâmetros de processo e nas características e comportamentos das microcápsulas. Como surfactantes são compostos com características lipofílicas e hidrofílicas, auxiliam na estabilidade da emulsão na produção da microcápsula e influenciam nas interações entre o recheio e a microcápsula, como também em relação ao meio dispersante (alimento). Estas interações podem influenciar

positiva ou negativamente na retenção do recheio à microcápsula e na taxa de liberação em meios dispersantes emulsionados.

De maneira geral este trabalho visou o estudo do uso de surfactantes na produção de microcápsulas de óleo de linhaça por coacervação complexa e a avaliação da liberação em sistemas modelo de emulsões O/A e A/O. O trabalho está dividido em capítulos conforme descrição a seguir.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica contendo as informações científicas que formaram a base para o desenvolvimento do trabalho.

O Capítulo 2 apresenta o estudo do uso de surfactantes e escolha do sistema mais adequado e eficiente para a posterior produção das microcápsulas. Em emulsão de solução de goma arábica e óleo de linhaça foi avaliado o uso de vários surfactantes com diferentes HLB em diferentes concentrações com o intuito de obter a emulsão mais estável até 15 minutos e com menor quantidade de espuma formada.

O Capítulo 3 se refere à produção de microcápsulas de óleo de linhaça com oleoresina de páprica por coacervação complexa de goma arábica e gelatina, à caracterização em relação à morfologia, rendimento e eficiência de encapsulação, tamanho de partículas e distribuição de tamanho de partículas. Com estes resultados foram escolhidas as mais eficientes e padronizadas para aplicação em sistemas modelo de emulsões O/A e A/O.

Na produção das microcápsulas os parâmetros de processo foram baseados em estudos da literatura com o intuito de obter as microcápsulas mais estáveis e resistentes, incluindo uma amostra padrão (ausente de surfactante) e uma com o uso de surfactante.

O Capítulo 4 aborda a liberação do recheio das microcápsulas escolhidas aplicadas em sistemas modelo de emulsões primárias dos tipos óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). As emulsões com microcápsulas aplicadas sofreram o processo de desmulsificação com a separação das fases oleosa e aquosa. A quantidade de recheio liberado das microcápsulas foi calculada pela quantificação do ácido graxo α -linolênico (C18:3) em análise de quantificação em ácidos graxos da fase oleosa por cromatografia gasosa.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS

Os óleos e gorduras pertencem à classe dos lipídios. Em relação à estrutura química são triacilgliceróis ou ésteres de glicerol e ácidos graxos que possuem diferentes propriedades devido à composição destes ácidos graxos na molécula, podendo ser em relação ao tamanho da cadeia, à presença e posição de duplas ligações e à posição de cada ácido graxo na molécula de glicerol. Existem os ácidos graxos saturados que são quimicamente mais estáveis e possuem altos pontos de fusão e os ácidos graxos insaturados que possuem uma ou mais duplas ligações, sendo mais instáveis e com menores pontos de fusão. A característica de cada ácido graxo e a estrutura na molécula de glicerol afetam química e fisicamente as propriedades do triacilglicerol (O'BRIEN, 2004).

1.1 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS

O termo ácido graxo polinsaturado (PUFA) se refere aos ácidos graxos cujas moléculas possuem de 18 a 22 carbonos e duas ou mais duplas ligações, sendo denominados de *w* ou *n*. Pertencem a este grupo as famílias de ômega 3 e ômega 6 (Quadro 1) que são denominados pela posição do carbono que se encontra a primeira dupla ligação (insaturação), iniciando a contagem do terminal metil ($-\text{CH}_3$), conforme estruturas químicas da Figura 1 (MARTIN et al, 2006; GAN; CHENG; EASA, 2008; SANT'ANA, 2004).

Quadro 1: Famílias de Ácidos Graxos Polinsaturados

Família	Ácido Graxo	Estrutura	Fontes
Ômega 3 ($\omega 3$)	α - linolênico - ALA	18:3 <i>n</i> -3	Vegetais: óleo de linhaça
	Eicosapentaenóico – EPA	20:5 <i>n</i> -3	Pescado
	Docosahexaenóico – DHA	22:6 <i>n</i> -3	Pescado
Ômega 6 ($\omega 6$)	Linoleico – LA	18:2 <i>n</i> -6	Vegetais: óleo de girassol e milho
	Araquidônico	20:4 <i>n</i> -6	Animais

Fonte: MARTIN et al, 2006; GAN; CHENG; EASA, 2008

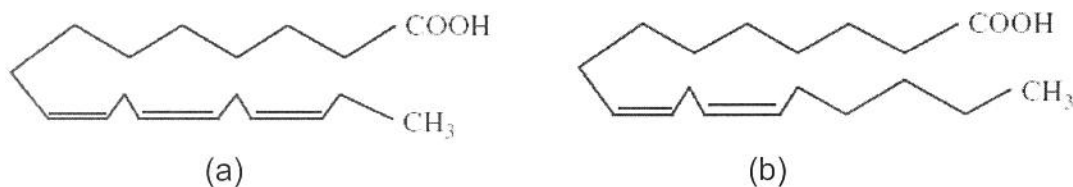


Figura 1: Estruturas das moléculas de ácidos graxos. (a) α -linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA); (b) linoléico (C18:2 *n*-6 - LA)

Fonte: NICHOLS; SANDERSON, 2003

Os ácidos graxos linoléico (C18:2 *n*-6 - LA) e α -linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA) não podem ser sintetizados pelo organismo animal, sendo necessária a oferta por meio da dieta, e por isso são denominados de ácidos graxos essenciais (NAWAR, 1996; SANT'ANA, 2004; NICHOLS; SANDERSON, 2003).

O ácido graxo α -linolênico (*n*-3) está presente em altas concentrações em alguns vegetais como perilla (*Perilla* L.) e chia (60-70%), linhaça (55-60%), canola (10%), soja (7%) e nozes (13%) (Li *et al*, 2003).

1.2 DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE LIPÍDIOS

A digestão dos lipídios se inicia na boca e no trato digestivo com a diminuição física de tamanho transformando em gotas menores e assim permitindo a ação das enzimas. No estômago ainda 70% dos lipídios estão indigeridos e necessitam dos sais biliares que os emulsificam no intestino delgado formando micelas menores. A lipólise dos lipídios é efetuada por enzimas lipases pancreáticas que são secretadas pelo pâncreas e quebram os triacilgliceróis liberando ácidos graxos livres e glicerol. O glicerol passa livremente para o sangue e os ácidos graxos livres de cadeia longa (>12 carbonos) são absorvidos pelos enterócitos, principalmente no jejuno e íleo, onde são reesterificados como triacilgliceróis e transportados para o sangue (BORGSTRÖM, 1960; SANT'ANA, 2004; AMAYA-FARFAN, 2001).

1.3 METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 E ÔMEGA 6

Existem dois mecanismos que ocorrem no retículo endoplasmático, predominantemente nas células hepáticas, responsáveis por converterem os ácidos graxos essenciais linoléico (C18:2 n-6 - LA) e α -linolênico (C18:3 n-3 - ALA) em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa chamados de eicosanóides com atividades imunomoduladoras. Um mecanismo é denominado dessaturação, reação catalisada por enzimas dessaturases que agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração cis. E o outro mecanismo denominado de elongação, reação catalisada por enzimas elongases que atuam nestes ácidos adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia. Estas reações estão esquematizadas na Figura 2 (MARTIN *et al*, 2006; SANT'ANA, 2004; WIESENFELD *et al*, 2003; SCHMITZ; ECKER, 2008).

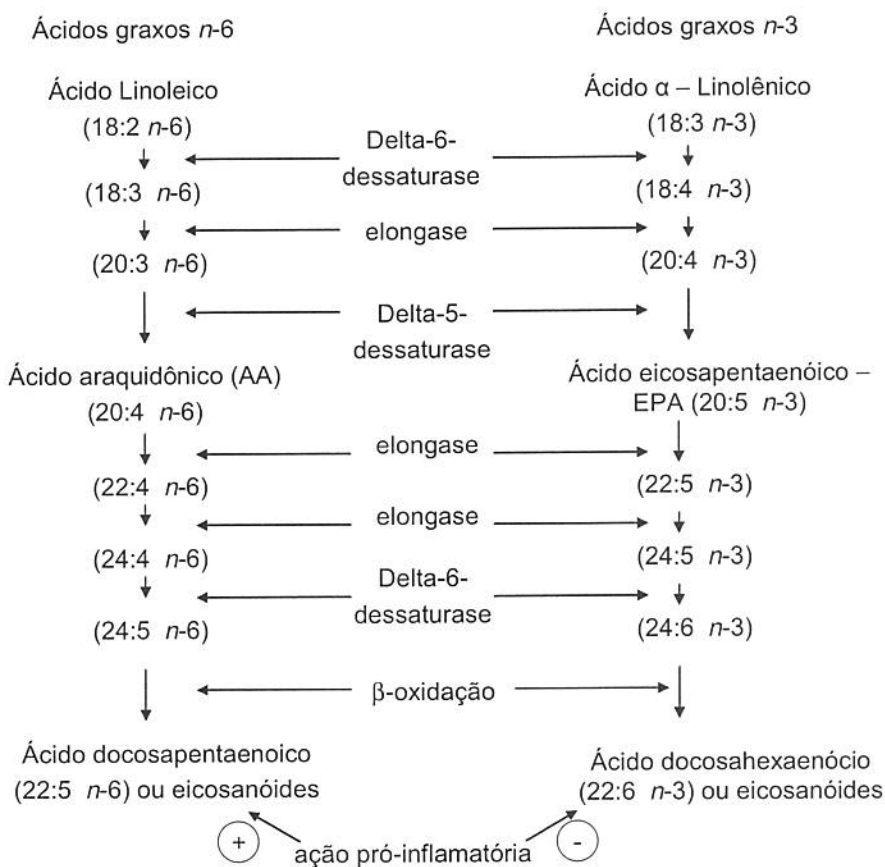


Figura 2: Metabolismo de ácidos graxos ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3)

Fonte: Adaptado de SCHMITZ; ECKER, 2008

Os ácidos graxos linoléico (C18:2 *n*-6 - LA) e α - linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA) formam os eicosanóides, sendo que os associados ao *n*-3 tem ação pró-inflamatória menos potentes e influenciam na atividade das enzimas e proteínas relacionadas à sinalização intracelular e à proliferação celular. (CIBEIRA; GUARAGNA, 2006; MARTIN *et al*, 2006; SANT'ANA, 2004).

1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS E SAÚDE

No organismo como um todo, as membranas celulares necessitam de ácidos graxos insaturados para manutenção de suas estruturas, funções e integridade. Os ácidos graxos insaturados linoléico e α - linolênico possuem alto valor energético e atuam em reações inflamatórias estando relacionados à resistência imunológica, distúrbios metabólicos, processos trombóticos e doenças neoplásicas, sendo responsáveis por regular a pressão arterial, frequência cardíaca, coagulação, dilatação vascular e lipólise (SANT'ANA, 2004; MARTIN *et al*, 2006; Li *et al*, 2003).

Vários são os benefícios da ingestão de ácidos graxos da família ômega 3 (*n*-3), pois são importantes para o crescimento, desenvolvimento ocular e do cérebro, auxiliam na regulação da coagulação e pressão sanguínea reduzindo hipertensão, possuem propriedades antiinflamatórias, antitrombóticas, antiarrítmicas e vasodilatadoras, melhorando a resposta imunológica, diminuindo a proliferação dos linfócitos e inibindo crescimento tumoral. Estudos clínicos realizados em diversos países, como Holanda, Noruega, Japão, EUA e outros, comprovam que a administração de ácidos graxos *n*-3 reduz os níveis de LDL e VLDL (mau colesterol), colesterol e triglicerídeos no sangue e aumentam os níveis de HDL (bom colesterol) (GAN; CHENG; EASA, 2008; AMAYA-FARFÁN, 2001; TEIXEIRA; PELUZIO, 2006; VASCONCELOS, 2004).

No entanto, a ingestão em excesso do ácido graxo linoléico (*n*-6), consequentemente alta relação *n*-6/*n*-3, resulta na superprodução de eicosanóides associados ao *n*-6 que são pró-inflamatórios, aumentando isquemia, inflamação e modificações nas células favorecendo o desenvolvimento de quadros patológicos,

tais como doenças cardiovasculares, cânceres, doenças auto-imunes e doenças inflamatórias. Como as mesmas enzimas fazem as conversões das famílias $n-3$ e $n-6$, tem-se como resultado uma competição metabólica entre os dois grupos sendo necessário um equilíbrio entre a ingestão destes ácidos graxos pela dieta (CIBIEIRA; GUARAGNA, 2006; MARTIN *et al*, 2006; SANT'ANA, 2004; WIESENFELD *et al*, 2003; SIMOPOULOS, 2008).

As dietas das populações ocidentais possuíam há 100 - 150 anos uma relação de $n-6/n-3$ de aproximadamente 1:1 e atualmente esta relação é de 10:1 e em alguns países de até 25:1, mostrando que em um período relativamente curto houve uma mudança drástica no perfil do consumo de ácidos graxos polinsaturados. Existem muitas evidências que uma razão de $n-6/n-3$ oferecida pela dieta de 5:1 fornece uma ótima razão, entretanto, as recomendações atuais variam bastante. Alguns países, como a Suécia e a Alemanha têm estabelecido recomendações para uma ingestão por meio da dieta de $n-6$ e $n-3$ na razão de 5:1, enquanto o Japão é mais rigoroso e estabelece uma ingestão na razão de $n-6$ e $n-3$ de 2:1. A Food and Agricultural Organization (FAO) é menos exigente e estabelece uma ingestão de $n-6$ e $n-3$ na razão de menos que 10:1. Uma razão $n-6$ e $n-3$ ótima, entretanto, varia de indivíduo para indivíduo e de acordo com o seu quadro de saúde (SANT'ANA, 2004; FAO, 1993; SIMOPOULOS, 2008).

Nutricionalmente, a qualidade da fração lipídica dos alimentos tem dois aspectos importantes que devem ser considerados na alimentação humana, a razão entre polinsaturados e saturados (P/S) e a razão $n-6/n-3$. De acordo com autoridades americanas, a recomendação é para consumo de produtos ricos em ácidos graxos polinsaturados $n-3$, para se obter razões de $n-6/n-3$ menores que 4 e razão P/S maiores que 0,4 (WOOD *et al*, 2004).

As evidências mostradas apontam a necessidade urgente de equilibrar o consumo de ácidos graxos das famílias $n-6$ e $n-3$, buscando alternativas para a modificação do perfil lipídico dos alimentos industrializados, reduzindo os riscos à saúde da população. Diante da busca dos consumidores por dietas mais equilibradas, a indústria de alimentos está investindo na elaboração de produtos saudáveis e buscando os alimentos funcionais. Como o mercado de produtos

funcionais tem crescido muito nos últimos tempos, produtos com estas alegações também são muito consumidos e as empresas estão em crescente desenvolvimento para atendê-lo (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007; SIMOPOULOS, 2008).

2 MICROENCAPSULAÇÃO

Microencapsulação é uma tecnologia usada como estratégia para proteção e modulação da liberação de pequenas gotas de líquido, gás ou partículas sólidas (denominadas por núcleo, ativo, recheio ou fase interna) cobertas ou aprisionadas por uma cápsula protetora (denominada parede, cobertura ou encapsulante).

Atualmente, estudos na área de micropartículas e liberação controlada estão bastante avançados e uma variedade de técnicas está disponível. São destacados os processos através de métodos físicos (spray drying, spray cooling, leite fluidizado, extrusão, centrifugação em múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização), métodos químicos (inclusão molecular e polimerização interfacial) e métodos físico-químicos (coacervação simples e complexa, incorporação em lipossomas) (THIES, 1994; JACKSON; LEE, 1991; RÉ, 1998; GIBBS *et al*, 1999; LEE; YING, 2008).

O modelo celular serviu para idealização do conceito de microcápsula, pois a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material na célula (RÉ, 1998).

A microencapsulação é uma técnica utilizada em diversas áreas, como a de alimentos, a farmacêutica (odor e sabor, liberação controlada e direcionada) e a agrícola (pesticidas, insumos, sêmen, alimentação animal) e tem inúmeras finalidades como carregar o ingrediente funcional até o local onde o ativo deverá agir, proteger o ingrediente funcional de degradações químicas e biológicas (ex. oxidação), mascarar as propriedades indesejáveis do componente ativo (ex. odor, sabor) e controlar a liberação do ativo (THIES, 1994; BUENO, 2008; GAN; CHENG; EASA, 2008).

Na indústria de alimentos, a tecnologia de microencapsulação tem como objetivos principais a redução da reatividade do recheio ao meio externo (ex. luz, oxigênio, água); minimizar a evaporação ou taxa de transferência do material de recheio para o meio externo; facilitar o manuseio do material de recheio, como no caso de converter um líquido em sólido; controlar a liberação do material de recheio até a ocorrência de um estímulo; mascarar sabores indesejáveis; diluir o material de recheio quando usado em pequenas concentrações, para atingir dispersão uniforme durante a formulação; aumentar vida de prateleira do recheio (SHAHIDI; HAN, 1993; JACKSON; LEE, 1991).

Entre os materiais a serem protegidos pela encapsulação, estão flavorizantes, como óleos, ervas, condimentos, lipídios, enzimas ou microrganismos, edulcorantes, antioxidantes, conservantes, corantes, substâncias de sabor e odor indesejável, óleos essenciais, aminoácidos, vitaminas e minerais, sendo que desde 1930 esta tecnologia tem sido utilizada em aromas (GIBBS *et al*, 1999; GOUIN, 2004; SHAHIDI; HAN, 1993).

A escolha do método depende de fatores econômicos, das propriedades do recheio (sensibilidade, solubilidade), tamanho de partícula desejada, propriedades físico-químicas do recheio e do material de parede, aplicabilidade como ingrediente em alimentos e mecanismos de liberação (SHAHIDI; HAN, 1993; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

De acordo com parâmetros morfológicos de tamanho e distribuição do material de recheio, as partículas obtidas recebem o prefixo micro quando possuem tamanho entre 1 a 100 μm . Podem assumir diferentes formas como uma simples membrana de cobertura, uma membrana esférica ou de forma irregular, apresentar paredes múltiplas de mesma ou diferentes composições ou numerosos núcleos em uma mesma estrutura (Figura 3) (GIBBS *et al*, 1999; THIES, 1994).

A distribuição do recheio classifica a micropartícula em microesferas ou microcápsulas. Quando o recheio se distribui no volume de uma matriz, tipo “reservatório”, podendo ser mononucleada ou multinucleada, com uma quantidade de recheio envolvida por uma película de parede, a denominação é de microcápsulas. Quando se tem uma matriz com partículas de recheio dispersas

uniformemente em sua totalidade, a denominação é de microesferas. O tipo de micropartícula produzida influi na quantidade de recheio encapsulado e no comportamento de liberação do mesmo (GIBBS *et al*, 1999; THIES, 1994).

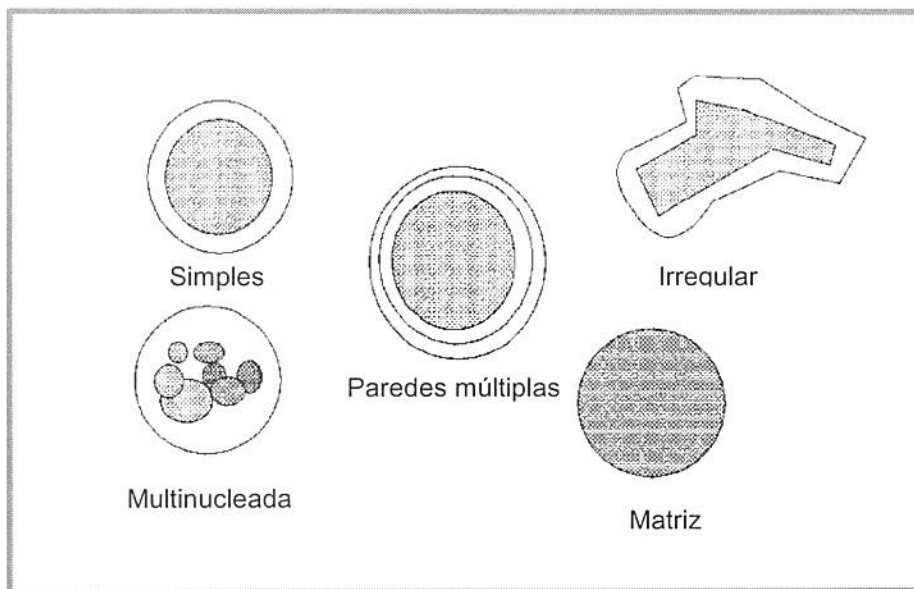


Figura 3: Tipos de estruturas de micropartículas

Fonte: Adaptado de GHARSALLAOUI *et al*, 2007

2.1 MICROENCAPSULAÇÃO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

A palavra coacervação deriva do latim *co-* junto e *acerv-* massa amorfa para indicar a agregação das partículas coloidais e o termo coacervação complexa foi introduzido por Bungenberg de Jong, um químico alemão que iniciou os estudos em coacervados em 1930 (MENDER; SYKES, 1998; MENDER *et al*, 2000; PRATA, 2006).

A microencapsulação por coacervação pode ser realizada pela técnica simples utilizando somente um soluto ou a técnica complexa utilizando dois ou mais solutos (SHAHIDI; HAN, 1993).

A técnica de coacervação complexa consiste na separação de fases líquido/líquido de dois ou mais solutos de cargas polieletrólíticas opostas misturadas em meio aquoso. Ocorre a formação de duas fases imiscíveis e a subsequente deposição do coacervado recém formado em volta do ingrediente

ativo (recheio) suspenso ou emulsificado no mesmo meio de reação. Formam-se duas fases, uma de coacervado com os solutos e o ativo encapsulado e fase de equilíbrio com baixas concentrações de soluto. A coacervação ocorre em uma pequena faixa de pH e a intensidade aumenta com a diluição, sendo suprimida pela presença de microíons (THIES, 1994; GOUIN, 2004; SILVA *et al*, 2003; SHAHIDI; HAN, 1993).

A encapsulação por coacervação é considerada a formação real de uma microcápsula onde o material de recheio (ativo) fica totalmente envolto pelo material de parede, formando uma cápsula fechada (LEE; YING, 2008; VAN OSS, 2006).

Quando são encapsulados materiais lipofílicos, como óleos vegetais e vitamina A, em cobertura hidrofílica como gelatina ou gelatina-goma arábica, podem resultar em microcápsulas contendo de 85 a 90% de recheio (GOUIN, 2004; SHAHIDI; HAN, 1993).

Muitos trabalhos estão sendo feitos na área de alimentos utilizando esta técnica, alguns descritos no Quadro 2.

O processo da coacervação complexa consiste de quatro etapas realizadas sob agitação contínua (Figura 4): a) *Dispersão*: a substância a ser encapsulada (recheio) é dispersa em uma solução contendo o material de parede; b) *Formação das três fases imiscíveis*: ocorre a redução da solubilidade do material de parede por abaixamento do pH, formando gotículas de coacervado, correspondendo a um sistema de três fases imiscíveis quimicamente; (c) *Deposição do material de parede*: com a mistura contínua dos materiais de parede e recheio, as gotículas de coacervado adsorvem-se às partículas de recheio dispersas devido à tensão superficial extremamente baixa da água residual no material de parede, formando gradualmente um envoltório em fase líquida, o que garante um revestimento uniforme do núcleo. d) *Solidificação do material de parede*: pelos métodos de gelificação (abaixamento de temperatura), da reticulação química (ligações cruzadas) ou da polimerização do envoltório líquido ocorre a solidificação do coacervado. As microcápsulas produzidas são retiradas do sistema por centrifugação ou filtração, são lavadas e sofrem posterior secagem por técnicas

padrões, como spray-drying, liofilização ou leite fluidizado para produzir partículas pequenas e com fluidez (SHAHIDI ; HAN, 1993; OLIVEIRA, 2007; GOUIN, 2004; DONG *et al*, 2007).

Quadro 2 : Trabalhos recentes em microencapsulação por coacervação complexa

Material de parede	Recheio	Autores
Gelatina : Goma arábica	Óleo de soja, azeite de oliva e óleo de amendoim	RABIŠKOVÁ; VALÁŠKOVÁ, 1998
Gelatina : Goma arábica	EPA	LAMPRECHT;SCHÄFER; LEHR, 2000
Gelatina : Goma arábica	EPA	LAMPRECHT;SCHÄFER; LEHR, 2001
Gelatina : Goma arábica	Óleo de peixe	JOUZEL <i>et al</i> , 2003
Proteína de soro e Goma Arábica	Óleo de girassol, óleo essencial de limão e de laranja	WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004
Gelatina : Goma arábica	Óleoresina e óleo de soja	ALVIM, 2005
Gelatina: pectina / goma arábica	Óleos	PRATA, 2006
Gelatina : Goma arábica	Óleo de menta	DONG <i>et al</i> , 2007
Gelatina	Estigmasterol	OLIVEIRA, 2007
Gelatina de peixe: Goma arábica	Óleo de salmão	BUENO, 2008
Proteína de soja hidrolisada/Pectina (BM)	Hidrolisado de caseína	MEDANHA <i>et al</i> , 2009
Bovine b-Lg isolate e Pectina (BM)	DHA	ZIMET; LIVNEY, 2009
Gelatina : Goma arábica	Substâncias aromáticas	LECLERCQ; MILO; REINECCIUS, 2009
Gelatina : Goma arábica	Óleo de soja e oleoresina de páprica	CÉLIS, 2009
Gelatina : Goma arábica	1-Dodecanol (C ₁₂ OH)	KONG <i>et a</i> , 2009
Mistura de HPMC, NaCMC e SDS (*)	Óleo de girassol	KATONA; SOVILJ; PETROVIC, 2010

(*): hidroxipropilmetil celulose (HPMC), carboximetil celulose de sódio (NaCMC) e Dodecil sulfato de sódio (SDS)

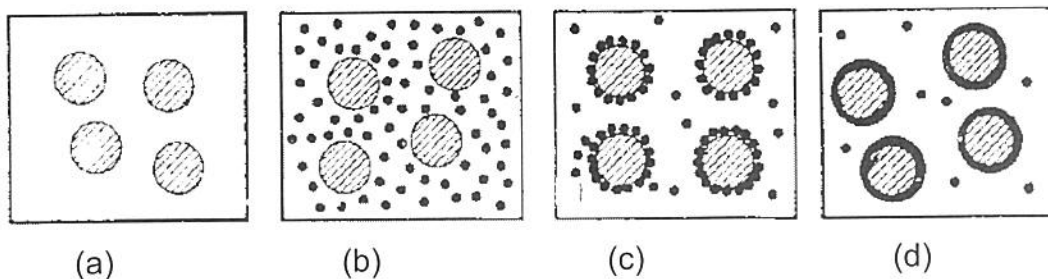


Figura 4: Etapas da coacervação complexa. (a) dispersão; (b) formação das três fases imiscíveis; (c) deposição do material de parede; (d) solidificação do material de parede

Fonte: OLIVEIRA, 2007

Microcápsulas produzidas por coacervação são divididas em dois grupos: mononucleadas e multinucleadas de acordo com sua estrutura interna. As mononucleadas são formadas quando uma gota de óleo é encapsulada por coacervação e as multinucleadas são formadas através da agregação de várias microcápsulas mononucleadas. Por terem características diferentes, possuem propriedade de liberação diversa. As microcápsulas multinucleadas possuem estrutura tipo matriz e podem liberar recheio lentamente a não ser que a parede tenha sido rompida. Pelo contrário, as microcápsulas mononucleadas possuem estrutura tipo reservatório e liberam todo o recheio muito rápido, além do material de parede não ser distribuído uniformemente pela superfície da gota de recheio. A parte mais fina da camada de parede estará mais susceptível ao rompimento e liberação do recheio. Por isto, as microcápsulas multinucleadas possuem maior controle de liberação e são facilmente produzidas, sendo mais interessante para produção industrial e aplicação (DONG *et al*, 2007).

Algumas vantagens da coacervação complexa são condições brandas de processo, variedade de biopolímeros como possíveis materiais de parede (gelatina, albumina, goma arábica, celulose, alginato, caseinato, carragena, amido, pectina), porém ainda é uma técnica com muitas informações não comprovadas sobre o mecanismo e sistemas de liberação de hidrofóbicos.

Para contornar as dificuldades envolvidas nesta tecnologia, tem-se desenvolvido diversos processos, como a coacervação complexa mediante

controle de pH e rápido abaixamento de temperatura, ou a microencapsulação por coacervação em camadas múltiplas (GOIUN, 2004). Outro problema a ser superado é a obtenção de microcápsulas sem a necessidade de se utilizar agentes reticulantes não permitidos para o uso alimentício para as ligações cruzadas (reticulação), como o glutaraldeído. Já existem alguns estudos sobre a utilização de outros agentes como a enzima transglutaminase, o gliceraldeído e outros processos como o uso da reação de Maillard na presença de ribose e sacarose (ALVIM, 2005; GAN; CHENG; EASA, 2008).

2.1.1 Interações na coacervação complexa

O entendimento da interação de um sistema contendo biopolímeros do tipo polissacarídeo e proteína é de fundamental importância para a compreensão dos efeitos na produção por coacervação complexa e propriedades das microcápsulas, já que este par de biopolímeros é o mais utilizado como material de parede desta técnica (SCHMITT *et al*, 1998).

As microcápsulas são formadas através da interação dos biopolímeros de cargas opostas (proteínas e polissacarídeos) em água e na presença de lipídios (material de recheio), da mesma forma que a maioria dos sistemas alimentícios. Para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos é necessário o estudo do comportamento das fases das misturas de biopolímeros. Cada fase apresenta uma característica e as alterações ocorridas implicam no entendimento dos elementos estruturais que formam a rede contínua do gel, dentro e nas interfaces do sistema coloidal, bem como a natureza das interações entre os biopolímeros e as partículas dispersas cobertas pelos biopolímeros (TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007; PRATA, 2006).

As interações entre os biopolímeros (proteínas e polissacarídeos) estão em constante estudo sendo bastante complexas e ainda existem questões a serem confirmadas.

Em relação à termodinâmica, a formação do complexo proteína-polissacarídeo se torna espontânea quando a Energia Livre de Gibbs (ΔG) é negativa, ou seja, $\Delta G < 0$, sem levar em conta a energia livre acumulada pelo

contato direto molecular entre as macromoléculas associadas. Pela Lei de Gibbs na Equação 1, um delicado balanço entre alta entropia favorável ($-T\Delta S$) e alta entalpia desfavorável (ΔH) contribuem para determinar o valor de ΔG , avaliando a possibilidade de formação do complexo entre os biopolímeros.

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M \quad (\text{Equação 1})$$

onde: ΔG_M : Energia Livre de Gibbs da mistura; ΔH_M : variação da entalpia da mistura ; ΔS_M : variação da entropia da mistura; T: temperatura absoluta.

O favorecimento da entropia pode ocorrer pela liberação de contra-íons ou moléculas de água e o desfavorecimento da entalpia pela diminuição da mobilidade dos biopolímeros e ordenação da água na interface do complexo (TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007).

Em um sistema de mistura de dois biopolímeros com estrutura e propriedades diferentes, a tendência é de separar as fases. Se as soluções forem bastante diluídas, o sistema poderá ficar estável desde que não ocorra alteração da entropia. Dependendo dos biopolímeros e condições do solvente, as interações de proteínas e polissacarídeos podem ser guiadas para separação de fase por segregação (incompatibilidade termodinâmica) ou associação (complexação), conforme Figura 5. Com o aumento da concentração dos biopolímeros o sistema começa se tornar instável e, como regra, tende a ocorrer segregação. O fenômeno de segregação ocorre quando os biopolímeros estão carregados com similar quantidade de cargas repulsivas e formam duas fases, uma com alta concentração de proteína e outra de polissacarídeo. (KRUIF; TUINIER, 2001; LIU *et al*, 2010b; PRATA, 2006).

No caso da coacervação complexa, a separação que ocorre é a associativa, fenômeno que ocorre quando os biopolímeros estão carregados com cargas opostas formando uma fase com alta concentração de biopolímeros e outra de solvente. Dependendo das características dos biopolímeros (tipo, grupos reativos, tamanho da cadeia, ramificações, flexibilidade, hidrofobicidade, razão e concentração) e condições do solvente (pH, sais), varia o grau das interações podendo até ocorrer precipitação (LIU *et al*, 2010a).

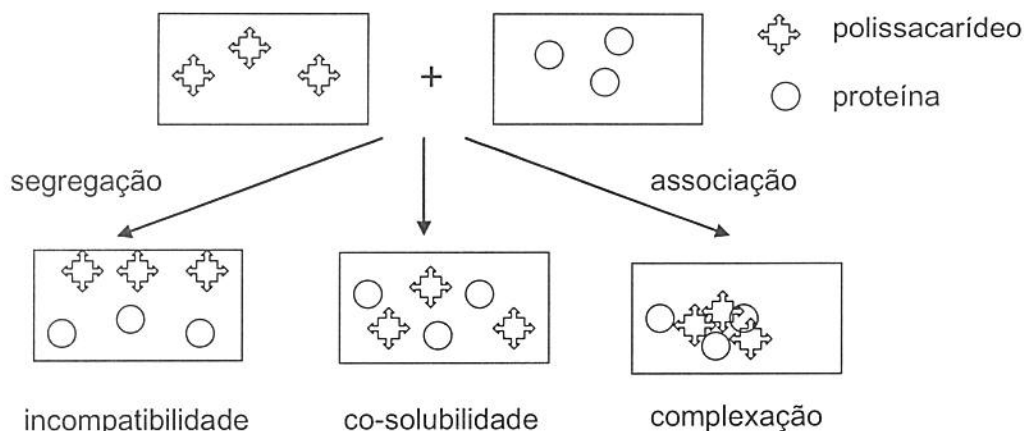


Figura 5 : Interações entre proteínas e polissacarídeos.

Fonte: adaptado de KRUIF; TUINIER, 2001

Devido à diminuição da energia eletrostática livre do sistema, em pH de coacervação, alguns autores afirmam que a complexação entre proteínas e polissacarídeos é principalmente dirigida pela entalpia. Entretanto, outros indicam que a complexação é dirigida principalmente pela entropia, devido à liberação de contra-íons e moléculas de água que contribuem para o ganho entrópico no sistema (PRATA, 2006).

Para a modelagem teórica da coacervação complexa, estudos das interações entre os biopolímeros tem sido realizados por muitos anos e várias teorias surgiram baseadas na Lei de Gibbs e Teoria de Flory-Huggins, uma adaptação da Lei de Gibbs adequada às misturas e soluções de biopolímeros. Apesar de não descrever precisamente as propriedades termodinâmicas das soluções, esta Teoria de Flory-Huggins prediz a estabilidade de uma solução de macromoléculas em relação à observada numa solução de moléculas simples (BURGESS, 1990; PRATA, 2006; VEIS; ARANYI, 1960; BURGESS; CARLESS, 1985; NAKAJIMA; SATO, 1972; OVERBEEK; VOORN, 1957).

Dependendo das características das interações biopolímero - biopolímero e biopolímero - solvente, ocorrem diferentes alterações no perfil de solubilidade das proteínas. A solubilidade é altamente dependente da carga de superfície do complexo formado, dependente dos níveis de hidrofobicidade da superfície, razão de biopolímeros e condições do solvente. Geralmente, polissacarídeos altamente

carregados, com baixo nível de hidrofobicidade de superfície ou misturas de biopolímeros longe de suas razões de equivalentes elétricos, podem formar uma rede de carga negativa no complexo aumentando sua solubilidade relativa à proteína sozinha. Entretanto, dependendo do biopolímero envolvido e condições de complexação, podem ocorrer desvios de comportamento da proteína (LIU *et al*, 2010a).

Para o par gelatina / goma arábica, a relação estequiométrica entre os componentes é similar, pois os dois polieletrólitos têm densidade de carga iônica baixa e similar. No pH ótimo de interação polieletrólítica, o complexo tende a ser muito concentrado e muito viscoso para encapsulação, sendo indicado utilizar pH maior que o ótimo, em valores próximos (THIES, 1994).

O pH é um fator muito importante para a coacervação complexa. A maior eficiência de encapsulação ocorre em uma pequena faixa de pH situada entre o potencial de dissociação (pK_a) dos grupos reativos da estrutura dos polissacarídeos e o ponto isoelétrico (pI) da proteína. A formação de complexo solúvel significa a primeira interação não covalente entre biopolímeros detectada experimentalmente e é caracterizada por leve aumento da turbidez do sistema durante a titulação ácida. Pelo abaixamento do pH, complexos solúveis aumentam em número e tamanho como resultado da nucleação e crescimento, resultado gradual da diminuição das forças repulsivas eletrostáticas entre as moléculas de proteína e associação das mesmas. O crescimento do complexo e a turbidez alcançam o máximo no pH em que a reação de interação entre os biopolímeros atinge o ponto de equivalência elétrica (pH ótimo) (LIU *et al*, 2010b).

Em relação ao pH e força iônica, tem-se um aumento da auto-associação das moléculas de proteínas conforme o pH se aproxima do pI das proteínas, ou na presença de altas concentrações de sais (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997). A influência da adição de sal na compatibilidade dos sistemas pode ser explicada através dos efeitos de “salting in” e “salting out”. Em baixas concentrações de sal (ou baixa força iônica), os íons dos sais interagem com as cargas das proteínas, resultando em um aumento da solubilidade das mesmas (“salting in”). Entretanto, quando são adicionadas maiores concentrações de sal, existe uma competição

entre a proteína e os íons de sal pelas moléculas de água, reduzindo a água disponível como solvente e portanto, diminuição da solubilidade protéica ("salting out") favorecendo a auto-associação das mesmas (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1996). Assim, geralmente espera-se que exista um aumento da incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos à medida que a força iônica aumenta e o pH se aproxima do pI das proteínas (PERRECHIL, 2008).

2.1.2. Morfologia do complexo coacervado

O complexo coacervado possui característica morfológica de micela denominada esponja ou fase L_3 ou fase cúbica (Figura 6). A formação desta estrutura ocorre em função da entropia na desestabilização da estrutura lamelar (organizada) para a fase esponja. A energia e a configuração entrópica do sistema influenciam na estrutura da micela que através de uma fase intermediária instável (Figura 7) permite a transição entre as fases lamelar e esponja (STREY et al, 1990; MENDER et al, 2000).

Estas estruturas foram investigadas por Hoffmann, Thunig, Munkert, (1992) através de microscopia eletrônica de varredura com preparo da amostra através da técnica de fratura por congelamento (FFEM) e as imagens obtidas mostraram que duplas camadas são multiconectadas e possuem a estrutura no formato de cela com curvaturas Gaussianas negativas.

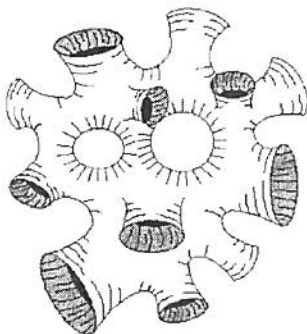


Figura 6. Estrutura da fase esponja dos coacervados

Fonte: STREY *et al*, 1990

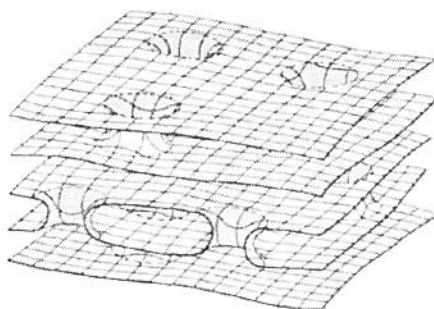


Figura 7. Etapa intermediária entre fase lamelar e fase esponja

Fonte: STREY *et al*, 1990

2.2 MATERIAL DE PAREDE

Os requisitos para a escolha de um material de parede são vários e o material de parede ideal seria insolúvel e não reativo com o material a ser encapsulado, ter boas propriedades emulsificantes, formar filmes facilmente, ter baixa viscosidade mesmo em soluções com alto teor de sólidos, apresentar baixa higroscopicidade, baixo custo, não possuir sabor desagradável, ser estável e oferecer boa proteção ao ingrediente encapsulado (LEE; YING, 2008; SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007).

Dentre os vários materiais utilizados encontra-se na literatura as gomas (goma arábica, alginato de sódio, carragena), os carboidratos (amido, dextrina, açúcar, xarope de milho), as celuloses (carboximetilcelulose, etilcelulose, metilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose). Como proteínas, encontramos estudos com glúten, caseína, gelatina, proteína de soja, pectina e albumina (SHAHIDI; HAN, 1993; GOIUN, 2004; MCCLEMENTS, 2005).

Pela sua capacidade de adsorver voláteis do ambiente ou retê-los fortemente durante o processo de secagem, os carboidratos são os materiais de parede mais comumente usados para microencapsulação.

Como os solutos precisam ter cargas opostas para coacervar, normalmente utiliza-se uma proteína e um polissacarídeo. Na técnica de coacervação complexa, dentre os diversos pares de hidrocolóides para a produção de microcápsulas, o mais estudado é o sistema gelatina/goma arábica (GOIUN, 2004).

Hidrocolóides são polímeros hidrofílicos que geralmente contêm muitos grupos hidroxílicos. Os polissacarídeos possuem ampla aplicação na modificação das propriedades dos alimentos incluindo reologia, ligação com água, estabilidade de emulsão, adesividade, suspensão, floculação, estabilização de espuma e formação de filmes. A propriedade de formação de partículas de gel é responsável pelo uso crescente destes materiais na formação de micropartículas encapsuladas. As proteínas são formadas por aminoácidos e sua estrutura de tríplice hélice é responsável por formar a cadeia tridimensional na formação do gel (BUREY *et al*, 2008).

2.2.1 Gelatina

A gelatina é uma proteína obtida industrialmente a partir do colágeno de ossos, cartilagens e peles de animais e é obtida industrialmente pela hidrólise controlada do colágeno, obtendo-se uma gelatina solúvel através de um pré-tratamento ácido ou alcalino da matéria-prima (POPPE, 1997).

A extração da gelatina a partir do colágeno é realizada com diferentes temperaturas (de 60°C a 90°C) e é pH-dependente, sendo que a seleção do pH é feita visando a maximização da taxa de extração e a manutenção de suas propriedades físicas (CARVALHO, 2002).

A gelatina é muito utilizada para a microencapsulação por coacervação complexa e pode conseguir partículas de 50 – 400 µm. O gel termoreversível da gelatina é formado por gelificação a frio, após dissolver em água em alta temperatura e resfriamento. A típica gelatina possui 14% de umidade, 84% de proteína e 2 % de cinzas (BUREY *et al*, 2008).

O ponto isoelétrico (pI) da gelatina pode variar em função da sua forma de obtenção, em torno de 4,5 a 5,3 para gelatinas tipo B, obtida de hidrólise alcalina (carbonato de sódio) de ossos, com um grupo funcional ácido (ácido succínico, ftálico) e entre 7,0 a 9,4 na gelatina tipo A, originada da hidrólise ácida (ácido clorídrico, sulfúrico) de pele suína (grupos reativos os grupos amino) (POPPE, 1997; THIES, 1994).

As gelatinas são utilizadas na encapsulação pelas propriedades de formação de filme e emulsificação. As propriedades de um gel de gelatina como a força, ponto de fusão e viscosidade vão depender da fonte, das condições de processamento, da matéria-prima, da concentração da gelatina, do pH, do tempo e temperatura de maturação (KOLODZIEJSKA *et al*, 2004; CHOI; REGENSTEIN, 2000; BUREY *et al*, 2008).

Possuem boa solubilidade em água, o que é interessante para o processo de coacervação e se torna um material de parede resistente e que não libera o recheio em meio aquoso com a promoção de sua coagulação através de temperatura ou pH. As proteínas dissociadas em água possuem cargas elétricas dependentes do pH da solução e do seu *pI* (Figura 8), por isso a necessidade de controle de pH no processo da coacervação e *pI* alto da gelatina, garantindo grande quantidade de cargas positivas para a coacervação com polissacarídeos carregados negativamente (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007).

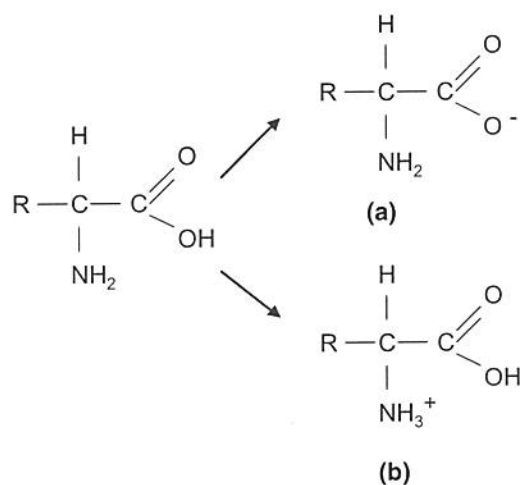


Figura 8: Esquema de aminoácidos em diferentes pH. (a): pH > *pI*, forma aniônica; (b): pH < *pI*, forma catiônica

Fonte: Adaptado de ESTRUTURA, 2010

2.2.2 Goma Arábica

As gomas são normalmente utilizadas na indústria de alimentos e a goma arábica tem sido muito utilizada para encapsular óleos e substâncias voláteis devido às boas propriedades emulsificantes, formação de filme e desidratante (LEE; YING, 2008).

O termo goma é utilizado para referir-se a polissacarídeos ou seus derivados, obtidos a partir de plantas (exsudados, sementes, algas). A obtenção da goma arábica de plantas do gênero *Acácia* ocorre a partir da exsudação das árvores como resposta a algum dano à planta. A goma arábica, também denominada por goma indiana ou goma acácia, é a mais antiga das gomas conhecidas (2.650 a.C.) (BUENO, 2008; PRATA, 2006; CÉLIS, 2009).

Com sua estrutura ramificada (Figura 9), este polissacarídeo ácido possui a cadeia principal formada por unidades de D-galactopirranose unidas por ligações glicosídicas em β -D(1 $\rightarrow$ 3), à qual estão ligadas cadeias laterais com diferentes estruturas químicas. Essas são formadas por D-galactopirranose, L-ramnose, L-arabinose e ácido D-glucurônico, ligadas à cadeia principal por ligações β (1 $\rightarrow$ 6). O polissacarídeo natural está na forma de sal, que por acidificação é transformado no ácido correspondente, ácido arábico. Mesmo sendo bastante hidrossolúvel, devido ao baixa massa molecular (aproximadamente 250.000 Da) e estrutura ramificada forma soluções pouco viscosas e emulsões aquosas muito estáveis (SHAHIDI; HAN, 1993; BOBBIO; BOBBIO, 1992b).

A goma arábica possui duas frações com estruturas químicas diferentes, sendo uma principal (70%) composta por cadeias de polissacarídeos com pouco ou nenhum material nitrogenado e a segunda fração, relacionada às propriedades emulsificantes e estabilizantes sendo formada por aproximadamente 2% de proteína ligada covalentemente ao polissacarídeo. Em pH acima de 2,2 é negativamente carregada e a baixos pH (< 2,2) a dissociação dos grupos carboxila é suprimida (BUENO, 2008; PRATA, 2006; CÉLIS, 2009).

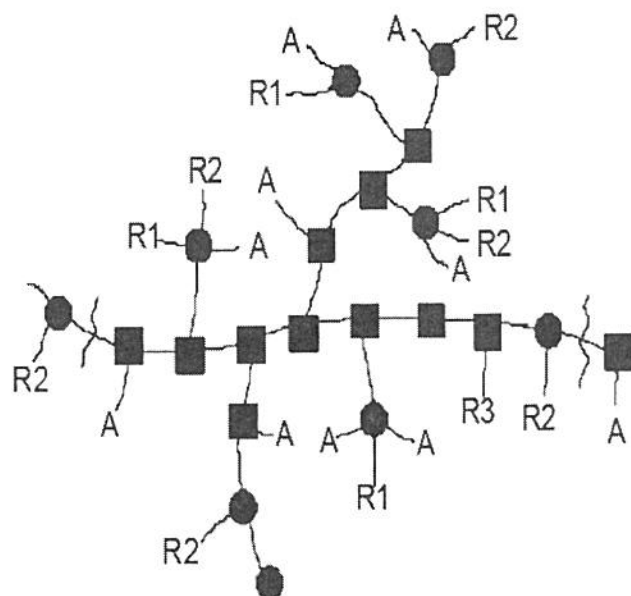


Figura 9: Estrutura molecular da goma arábica.

● :galactose $\beta(1\rightarrow6)$; ■: galactose $\beta(1\rightarrow3)$; A: arabinose; R1:ramnose - ácido glucurônico – arabinose - ácido metilglucurônico; R2: galactose - arabinose; R3: arabinose - arabinose. Fonte: CELIS, 2009

As principais espécies produzidas são *Acácia senegal*, *Acácia seyal* e *Acacia laeta*. Elas possuem composição química e propriedades físicas diferentes e alguns parâmetros analíticos importantes estão no Quadro 3. A espécie mais utilizada para microencapsulação é a *Acácia senegal*.

Quadro 3: Parâmetros analíticos das principais espécies de goma arábica

Parâmetros	<i>Acácia senegal</i>	<i>Acácia seyal</i>	<i>Acácia laeta</i>
Nitrogênio (%)	0,29	0,14	0,65
Metoxila (%)	0,25	0,94	0,35
<i>Composição sacarídica após a hidrólise (%)</i>			
Galactose	44	38	44
Arabinose	27	46	29
Rhamnose	13	4	13
Ácidos Glucurônicos	14,5	6,5	10,5
4-0- Ácidos Metilglucurônicos	1,5	5,5	3,5

Fonte: GLICKSMAN, 1983

Como a maioria dos materiais de recheio é insolúvel em soluções aquosas, a formação de emulsões é necessária e se torna uma propriedade significativa para levar em consideração na seleção de um material de cobertura adequado. A goma arábica possui vantagens por ter esta propriedade emulsificante em ampla faixa de pH, além de outras como texturização, formação de filme ao redor das gotículas de óleo e propriedades ligantes (LEE; YING, 2008; SHAHIDI; HAN, 1993; PRATA, 2006; GHARSALLAOUI *et al*, 2007).

2.3 MATERIAL DE RECHEIO

O material de recheio é qualquer material que necessite de proteção, isolamento do meio e/ou liberação modulada em determinado local desejado. Na técnica de microencapsulação por coacervação complexa, as características para um material de recheio são bastante amplas, podendo estar em qualquer estado físico: líquido, sólido, gasoso, ser uma dispersão ou uma emulsão complexa. Muitos materiais de recheio na área farmacêutica têm recorrido a esta técnica. Na área de alimentos existem trabalhos realizados sempre com materiais mais sensíveis como acidulantes, aromatizantes, corantes naturais, temperos, adoçantes, vitaminas e minerais, lipídios, enzimas e microrganismos (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007).

2.3.1 Óleo de Linhaça

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L.), em inglês “flaxseed”, é um grão oleaginoso de cor marrom ou amarelo dourado típico do sul do Canadá e norte dos EUA. O óleo da linhaça possui grande teor de ácidos graxos ômega 3 (*n*-3), em torno de 57% na forma de ácido graxo α -linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA) (AMAYA-FARFAN, 2001).

O grão de linhaça tem aproximadamente 40% do seu peso composto por óleo sendo que o α -linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA) compõe cerca de 20% e o α -linoléico (C18:2 *n*-6 - AL) aproximadamente 6% do peso do grão. O grão também

contém ácidos graxos monoinsaturados (oléico, gadoléico) e saturados (palmítico, esteárico, araquídico, behênico e lignocérico) (CHOO; BIRCH; DUFOUR, 2007).

A ação da linhaça como alimento funcional há tempos vem sendo investigada pelo balanço interessante de $n-6/n-3$, possuindo grande quantidade de ALA ($n-3$) e pequena quantidade de AL ($n-6$), permitindo alterar o perfil lipídico dos alimentos contendo o óleo de linhaça como ingrediente.

Como todos os óleos, o óleo de linhaça não se mistura em água sendo a microencapsulação uma solução interessante no intuito de transformar um ingrediente não miscível em água em um ingrediente miscível por estar em partículas bem pequenas 10 – 500 μm , desta forma ampliando os produtos para aplicação e incremento nutricional (LI *et al*, 2003).

O óleo de linhaça utilizado em produtos funcionais é obtido por extração a frio, utilizando prensagem das sementes. Os microencapsulados de óleo de linhaça são dispersíveis em água fria e estáveis (OOMAH; MAZZA, 1998).

A microencapsulação do óleo de linhaça apresenta vantagens tecnológicas em relação ao uso direto do óleo em aplicações em produtos alimentícios. A proteção à oxidação pelo encapsulamento permite uma maior vida de prateleira dos produtos e a alteração de estado físico para pó amplia a linha de produtos para aplicação. Com isto, uma vasta linha de produtos funcionais com balanço $n-6/n-3$ adequado nutricionalmente pode ser produzida. Pelsner *et al* (2007), obtiveram resultados de rancidez do óleo de linhaça encapsulado menores que do óleo não encapsulado. A firmeza da salsicha com óleo de linhaça ficou menor e com encapsulado de óleo de linhaça, maior que padrão, devido à presença de carboidratos da parede das microcápsulas. Em relação à avaliação sensorial, obtiveram ótimos resultados com o uso de óleo de girassol e microencapsulado de óleo de linhaça na substituição de 20% de gordura de porco na fabricação de salsicha.

Segundo Li *et al* (2003), pães com adição de ácidos graxos $n-3$ de cadeia longa microencapsulados não tiveram diferença em relação à biodisponibilidade dos pães utilizando a forma não microencapsulada. E estudos com baixa dose de

ácidos graxos *n*-3 de cadeia longa microencapsulados (98 mg/dia) presentes em pães, mostraram uma melhoria significativa nos níveis plasmáticos.

2.3.2 Oleoresina de Páprica

Oleoresina de páprica é o extrato líquido obtido em forma de óleo viscoso do pigmento do pimentão de cor vermelha forte e brilhante, obtido a partir de frutos secos da espécie *Capsicum annum* L. (BORGES; PINO; FERNANDEZ, 1997; SANTOS, 2003).

É utilizado como corante natural em muitos produtos alimentícios sendo os pigmentos responsáveis pela coloração β -caroteno, criptoxantina, zeaxantina e luteína (amarelos) e capxantina e capsorubina (vermelhos) que compreendem de 70 a 80% do total de carotenóides da páprica (SANTOS, 2003).

Por sua característica física (líquido) tem maior aplicabilidade, maior uniformidade da coloração nos produtos, maior estabilidade e intensidade da cor em relação ao corante em pó, pois o teor de pigmentos totais pode ser até dez vezes superior ao encontrado na páprica moída (BORGES; PINO; FERNANDEZ, 1997; SANTOS, 2003).

Por ser um material hidrofóbico do tipo lipídio, pode ser facilmente diluído em outro lipídio e servir como corante de um recheio hidrofóbico de microcápsula. Uma pequena quantidade é suficiente para se conseguir transformar a coloração amarelada do lipídio em alaranjada. Esta coloração ao recheio lipídico auxilia no controle de processo e nas análises microscópicas além de ser um parâmetro para avaliação da oxidação das microcápsulas.

A oleoresina de páprica como os corantes naturais são muito sensíveis à oxidação, necessitando proteção contra fatores como luz, oxigênio e temperatura que se reflete em perda ou alteração da cor original, diminuindo sua vida útil (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000).

2.4 RETICULAÇÃO

Após a formação das microcápsulas por coacervação complexa, a parede do biopolímero pode receber um tratamento chamado reticulação ou “*cross-linking*” com o intuito de deixá-la mais rígida, evitando a liberação do recheio. Ocorrem ligações cruzadas, geralmente entre a proteína e o agente reticulante que alteram a rede polimérica e as propriedades de barreira das paredes das microcápsulas, proporcionando o controle da liberação do recheio. A formação de ligações covalentes podem ser intra e intermoleculares, os agentes reticulantes podem ser químicos ou enzimáticos e os processos de reticulação podem ser químicos, físicos e enzimáticos (SHAHIDI; HAN, 1993; LECLERCQ; MILO; REINECCIUS, 2009).

Segundo Cristiano (2009), mesmo um pequeno número de ligações cruzadas entre as cadeias de polímeros é suficiente para impedir a separação destas e sua dissolução.

Na composição das proteínas, entre os grupos de aminoácidos, os resíduos das aminas usualmente estão expostos e são muito reativos, sendo estes os mais utilizados pelos agentes reticulantes (CÉLIS, 2009).

Os agentes químicos utilizados para reticulação com proteínas são glutaraldeído (bastante eficiente), gliceraldeído, formaldeído e o glioxal, porém não são permitidos para uso em alimentos. Os tratamentos físicos podem ser dehidrotérmico (DHT), fotoxidação, microondas e irradiação ultravioleta. Entre as enzimas, a transglutaminase (TG) está sendo estudada como opção de uso em produtos alimentícios. Entretanto há poucos resultados favoráveis de agentes reticulantes para alimentos (LEE; YING, 2008; CÉLIS, 2009; CRISTIANO, 2009).

2.4.1 Transglutaminase

Uma opção com muito progresso nos estudos como agente reticulante de proteína permitido para uso em alimentos é a enzima transglutaminase (TG), contudo há poucos trabalhos na literatura que utilizam esta enzima para alterar propriedades de barreira de micropartículas para efeito de liberação controlada.

Um processo de obtenção desta enzima foi desenvolvido por fermentação microbiana (*Streptoverticillium* sp. e *Streptomyces* sp), tornando mais acessível para escala industrial e consequentemente mais adequada para uso, em relação ao custo de aplicação (CARVALHO; GROSSO, 2004).

A transglutaminase (TG) (E.C. 2.3.2.13; R-glutamyl-peptídeo: amina g-glutamyl transferase) catalisa reações de acil transferência, formando ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, peptídeos e aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina. Dependendo da molécula receptora, três reações diferentes podem ocorrer. Primeiro, os grupos ϵ -amino de resíduos de lisina podem servir como substratos para formar ligações isopeptídicas intermoleculares ou intramoleculares. Na segunda reação, outras aminas primárias podem servir como receptores acil. A terceira reação é a deaminação da glutamina, onde as moléculas de água são usadas como receptoras resultando na conversão de glutamina em ácido glutâmico. A taxa de ligações cruzadas pela TG é dependente da estrutura macromolecular de cada substrato de proteína, uma vez que os resíduos reativos estão inseridos em regiões flexíveis da cadeia (CÉLIS, 2009; CARVALHO; GROSSO, 2004; CHAMBI; GROSSO, 2006; MACEDO; SATO, 2005).

A enzima transglutaminase, obtida a partir de microorganismos apresenta uma faixa ampla de pH para ação (4 - 9), sendo valor de ótima atividade entre pH 5-8 e temperatura de 50°C (CÉLIS, 2009).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

A composição quali-quantitativa e o método de preparação das micropartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão. Através de monitoramento das mudanças na distribuição de tamanho de partículas pode-se avaliar a tendência à agregação e sedimentação das micropartículas dispersas, em função do tempo (SCHAFFAZICK; GUTERRESS, 2003).

Para que seja feita uma avaliação global do processo de caracterização morfológica das microcápsulas, o uso de microscopia ótica é um método de

análise fundamental. Analisa a eficiência do processo de encapsulação, ou seja, a real formação das microcápsulas, a integridade da parede e o tamanho das partículas. Variações nos parâmetros do processamento podem acarretar mudanças na morfologia das microcápsulas, que por sua vez podem interferir nas características do produto final e na estabilidade (SANTOS, 2003).

Além das propriedades estruturais, distribuição de tamanho de partícula, composição de parede e recheio são estudados o comportamento de liberação, as propriedades físicas e a estabilidade desejadas para sua aplicação específica. Estes estudos são realizados por meio de análises microscópicas (microscopias ótica (MO) e eletrônica de varredura (MEV), térmicas, de raio-X, cromatográficas e espectroscopia (composição da parede, composição e liberação de recheio, estabilidade), compressão estática e resistência ao cisalhamento, entre outras (THIES, 1994).

2.6 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO RECHEIO DA MICROCÁPSULA

Em relação à liberação do material de recheio de uma microcápsula, esta pode ocorrer de diferentes formas e não existe um tipo de curva de liberação que satisfaça todas as necessidades. Além disso, os dados reais de liberação tendem a se desviar das curvas de liberação idealizadas. A liberação pode ocorrer de diferentes formas, podendo-se representar quatro modelos teóricos de liberação: o primeiro considera a existência de um mecanismo de disparo que inicia a liberação. Este disparo se dá pela presença de uma força externa, como luz, calor, pH e degradações químicas da cápsula; o segundo mecanismo assume que a parede da cápsula atua como reservatório, supondo 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, seletiva a diferentes massas moleculares (THIES, 1994; SANTOS, 2003).

Em cada uma destas teorias, dependendo do mecanismo, a liberação dos componentes pode ocorrer por fratura, difusão, dissolução ou por biodegradação. A parede da microcápsula pode ser fraturada ou quebrada por pressão, cisalhamento e ultrassom, ou pela permeabilidade. A difusão ocorre por gradiente de concentração dos meios ou forças atrativas entre cadeias. A dissolução ocorre pela ação de um solvente ou por calor. E a biodegradação ocorre quando o material é susceptível a mecanismos degradativos, como por exemplo, a ação de enzimas. Portanto, a liberação ocorre em algum local específico e/ou em resposta a estímulos ambientais específicos (pH, força iônica ou temperatura) (MCCLEMENTS; 2005; SHAHIDI; HAN, 1993).

3 EMULSÕES

A grande maioria dos alimentos é formada por dois ou mais componentes imiscíveis que possuem uma camada limite entre as duas fases, a fase dispersa (pequenas gotículas ou partículas) e a fase contínua (onde estão dispersas), formando sistemas monofásicos (soluções verdadeiras) ou sistemas polifásicos (suspensões e dispersões coloidais). Sistemas polifásicos com partículas dispersas com tamanhos maiores que 10^{-4} cm denominam-se suspensões e entre 10^{-6} e 10^{-4} cm, dispersões coloidais. As emulsões são dispersões coloidais líquido/líquido podendo ser tipo óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) e são encontradas em produtos alimentícios de grande importância como leite, creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada, salsicha, bolos e sorvetes (BOBBIO; BOBBIO, 1992a; FELLOWS, 2006).

Mesmo que a emulsificação leve à formação de uma emulsão estável pela mistura íntima de dois ou mais líquidos imiscíveis, de forma que um (a fase dispersa) é transformado em gotículas muito pequenas no interior do segundo (a fase contínua), as emulsões são termodinamicamente instáveis e com o tempo podem apresentar alguma separação (FELLOWS, 2006).

A estabilidade das emulsões é determinada pelo tipo e quantidade do agente emulsificante, pelo tamanho dos glóbulos na fase dispersa, pelas forças

interfaciais das superfícies dos glóbulos, pela viscosidade do sistema, pela diferença entre as densidades das fases dispersa e contínua e pela relação entre os volumes das fases (BOBBIO; BOBBIO, 1992a; FELLOWS, 2006).

A alteração na relação das densidades das fases pode levar à separação de uma fase pela coalescência das partículas dispersas formando agregados de dimensões crescentes que podem vir a se precipitar. A velocidade de precipitação dependerá da viscosidade do sistema, das densidades das fases e das dimensões das partículas dispersas, seguindo a equação de Stokes (Equação 2), que descreve a velocidade de sedimentação das partículas dispersas:

$$V = \frac{2}{9} \frac{r^2 (d - d_o) g}{\eta} \quad (\text{Equação 2})$$

η = viscosidade da fase contínua

r = raio médio das partículas

d e d_o = densidades da fase dispersa e da fase contínua

g = aceleração da gravidade

Sendo assim, quanto mais viscoso o sistema e mais próximas as densidades das fases, mais demorada a separação das fases. Observa-se que, de acordo com a Equação de Stokes (Equação 2), a velocidade de sedimentação é diretamente proporcional ao tamanho das partículas na fase. Portanto, a redução do tamanho das gotículas é de grande importância para a manutenção da estabilidade física de um sistema emulsionado (FELLOWS, 2006; SOUZA, 2003).

A força interfacial das superfícies dos glóbulos com a fase contínua chamada de tensão interfacial é de grande importância para o entendimento da estabilidade das emulsões. Para uma maior estabilidade do sistema, é necessária maior área superficial da fase dispersa em contato com a fase contínua, ou seja, introduzir energia no sistema e reduzir o tamanho das partículas dispersas utilizando homogeneizadores. Os agentes emulsificantes formam micelas ao redor de cada gotícula, desta maneira reduzem a tensão interfacial entre as fases e evitam a coalescência das partículas (quanto maior a tensão interfacial entre as fases, mais difícil formar e manter a emulsão estável) (FELLOWS, 2006).

3.1 SURFACTANTES

Os compostos químicos que reduzem a tensão superficial de um líquido são conhecidos como “surfactantes”, “emulsificantes” ou “detergentes” e existem na forma natural como álcoois, fosfolipídios e proteínas, porém os sintéticos possuem atividade superficial maior e são utilizados em quantidades muito pequenas para criar emulsões. Possuem moléculas polares (ou hidrofílicas) em uma extremidade e não-polares (ou lipofílica) na outra, portanto em uma emulsão, as moléculas se posicionam na superfície das partículas dispersas, com a terminação polar na fase aquosa e a não-polar na fase oleosa (FELLOWS, 2006).

Os surfactantes atuam na formação das emulsões através de três mecanismos como: a redução da tensão interfacial objetivando a estabilização termodinâmica; a formação de um filme rígido interfacial, com propriedades eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna, sendo uma barreira mecânica para a coalescência; e a formação de uma dupla camada elétrica sendo uma barreira contra a aproximação dos glóbulos (SOUZA, 2003; MORAIS, 2008).

O tipo de emulsão que se formará com a adição de um surfactante depende do equilíbrio entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas. A escolha dos agentes surfactantes para o preparo de emulsões foi realizada durante muito tempo por métodos empíricos e experimentais. Para sistematizar esta escolha, Griffin (1949), desenvolveu um processo caracterizado pelo equilíbrio hidrofílico – lipofílico (Hydrophilic Lipophilic Balance - HLB) (SOUZA, 2003).

A razão entre as porcentagens em peso de cada grupo (hidrofílico e lipofílico) na molécula é que se determina o valor de HLB do surfactante, sendo classificado segundo o Quadro 4 (BOBBIO; BOBBIO, 1992a; FELLOWS, 2006).

Os agentes surfactantes são classificados em polares, pois possuem grupos polares que se ligam à água produzindo emulsão O/A e não-polares que são absorvidos em óleo produzindo emulsão A/O. Entre os polares também são classificados em iônicos e não-iônicos. Os do tipo iônico possuem diferentes atividades superficiais em diferentes pH devido à diferença em seu comportamento de dissociação e podem ser aniônicos, catiônicos e anfóteros. A

atividade dos emulsificantes não-iônicos é independente do pH pois possuem grupo polarizado, mas não ionizável. A porção hidrofóbica pode ser um grupo alquil e a porção hidrofílica da molécula pode ser representada por grupos álcool ou polióis, como glicerol ou sorbitol, amidoglicol, como dietalonamina ou poliglicol, como o polietileno glicol ou polipropileno glicol (FELLOWS, 2006; SOUZA, 2003).

Quadro 4 : Classificação de alguns surfactantes em função do HLB

Surfactante	Valor HLB	Características	Utilização
<i>Iônicos</i>	> 11	Hidrofílicos	Emulsão
Fosfolipídios	18-20		O/A
Sais de potássio/sódio do ácido oléico			
Proteína			
<i>Não-iônicos</i>			
Monoestearato de glicerol	< 8	Hidrofóbicos	Emulsão
Monooleato de sorbitana (span 80)	2,8		A/O
Monooleato de polioxietileno (20)	4,3		
sorbitana (tween 80)			
<i>Hidrocolóides</i>	15,0	Hidrofílicos	O/A
Alginatos			
Metilcelulose	8 - 12	Intermediários	Umectantes
Goma arábica			
Goma guar			
Carragena			

Fonte: FELLOWS, 2006; BOBBIO; BOBBIO,1992a.

No caso dos surfactantes aniônicos, o grupo polar é constituído por ânions e o grupo apolar por cadeia alifática, ramificada ou linear (sabões, aquil-sulfatos e fosfatos). No caso dos catiônicos, o grupo polar é formado por um cátion e o grupo apolar por uma cadeia alifática, linear ou ramificada. E no caso dos anfóteros, seu poder tensoativo e emulsificante são dependentes do pH do meio. No ponto isoelétrico estes compostos anfóteros apresentam comportamento não-iônico e dependendo do pH do meio exibem as propriedades de grupo polar catiônico ou aniônico (SOUZA, 2003).

3.2 POTENCIAL ZETA

Em uma partícula dispersa, a carga elétrica se origina dos grupos ionizáveis presentes do tipo $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_2$ dependendo das condições de dissociação no sistema e também da adsorção de íons ou de moléculas polares sobre a partícula. Os ânions são menos hidratados que os cátions tornando-os com menores volumes e conseqüentemente maior facilidade de serem adsorvidos (BOBBIO; BOBBIO,1992a).

A partícula dispersa carregada atrairá íons de carga contrária (contra-íons) que poderão ser adsorvidos na superfície formando uma camada correspondente, em sua espessura máxima, ao raio desses íons hidratados. Esses íons formam camadas densas (Camada de Stern) e à medida que se afastam da superfície da partícula ionizada vão diminuindo a intensidade. Ao sofrer qualquer movimentação por ação de um campo elétrico ou por agitação, esta partícula ionizada irá levar uma parte dos íons adsorvidos e esta interface é chamada de plano de ruptura ou cisalhamento, conforme Figura 10. A diferença de potencial entre a superfície da partícula dispersa e a superfície do plano de ruptura é o potencial zeta (ξ) (BOBBIO; BOBBIO,1992a). O potencial zeta é uma medida da estabilidade de uma dispersão sendo valores altos (negativo ou positivo) indicam dispersões mais estáveis e valores baixos indicam instabilidade coloidal que pode levar à agregação (SALOPEK; KRASIC; FILIPOVIC, 1992).

A medida do potencial zeta é feita através de uma medida indireta, a técnica de mobilidade eletroforética. A suspensão coloidal diluída a ser analisada é introduzida em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida se deslocam na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado. O quociente da velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade eletroforética, expressa em $\text{m}^2/\text{V.s}$. Através de equação matemática esse valor se transforma em potencial zeta. Aparelhos de concepção mais moderna usam um laser modulado e medem o deslocamento doppler na luz espalhada pelas partículas (HOBECO, 2004).

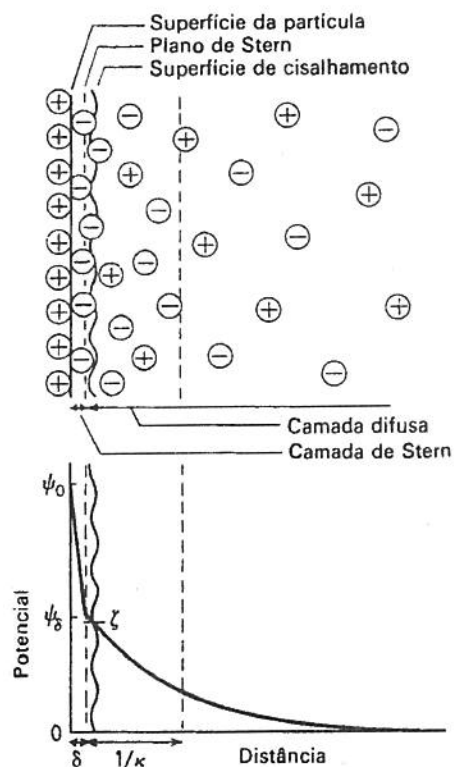


Figura 10: Representação esquemática da estrutura da dupla camada elétrica

Fonte: SHAW, 1975

Segundo Souza (2003), a estabilidade de uma emulsão é consequência da dupla camada elétrica (Camada de Stern) na superfície das partículas dispersas. Se duas partículas de um material insolúvel não possuem dupla camada, estas podem se aproximar o suficiente para que a força atrativa de Van der Waals possibilite a sua junção. Mas se as duas partículas tiverem dupla camada, elas se repelem a grandes distâncias de separação, uma vez que, à medida que elas se aproximam, a distância entre as cargas iguais é menor do que a distância entre as cargas diferentes. Esta repulsão impede uma proximidade maior das partículas e estabiliza o sistema.

Neste sentido, como os surfactantes formam uma película que envolve as partículas dispersas, podem atrair cargas positivas ou negativas, dependendo de suas características, ou seja, a presença de surfactante irá interferir nas características da dupla camada formada.

4 DESEMULSIFICAÇÃO

Todas as emulsões são termodinamicamente instáveis e tendem a se romper com o tempo, resultando em duas fases líquidas separadas. Existem diversos mecanismos de desestabilização, sendo os principais a *cremeação* gravitacional, *sedimentação*, *floculação* e *coalescência* das gotas (Figura 11).

A *floculação* é um processo de adesão mútua entre os glóbulos da fase dispersa, formando flocos sem a destruição das gotas individuais, mantendo o filme interfacial e formando uma rede bidimensional. Quando as paredes das gotas são destruídas existe a formação de gotas maiores, perdendo a individualidade das gotas iniciais, trata-se do processo conhecido como *coalescência*, um processo irreversível.

A *cremeação* é o fenômeno em que as partículas da emulsão tendem a se separar do corpo da emulsão, por ação da gravidade e pela diferença de densidade entre a fase dispersa e dispersante da emulsão. Já na *sedimentação*, as gotas são mais densas do que o meio contínuo então sedimentam (PERRECHIL, 2008; SOUZA, 2003; MORAIS, 2008).

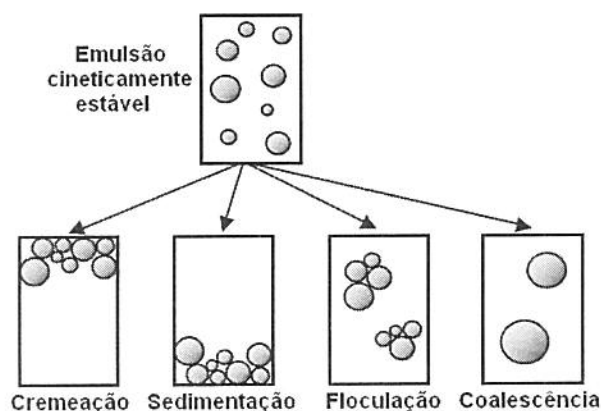


Figura 11: Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões O/A.

Fonte: MCCLEMENTS, 2005; PERRECHIL, 2008

Além da camada de Stern, existe a água de hidratação que dificulta a aproximação entre as partículas. Para *partículas dispersas hidrofílicas*, a água de hidratação pode deixá-las estáveis a menos que um sal com suficiente força iônica para reduzir o potencial zeta e com capacidade de competir pela água de desidratação seja adicionado, causando a precipitação da partícula, desestabilizando o sistema. No caso de *partícula dispersa lipofílica*, a desestabilização e precipitação só dependerão da alteração do potencial zeta (BOBBIO; BOBBIO, 1992a).

A desemulsificação é necessária em muitas aplicações tecnológicas como em tintas, indústria do petróleo e de tratamento de efluentes. Alguns métodos utilizados são classificados como físico-químicos, eletro-mecânicos, ou a combinação deles, como o uso de aditivos químicos para quebrar a emulsão, separação gravimétrica, coalescência eletrostática, centrifugação, filtração, aquecimento, congelamento e agitação intensa. O aumento da frequência de contato das gotículas dispersas e a alteração das propriedades interfaciais das camadas adsorvidas nas superfícies das gotículas, resulta no aumento da taxa de coalescência dos dispersados (ABDURAHMAN; YUNUS; JEMAAT, 2007; SOUZA, 2003; CHEN *et al*, 2000).

O aumento da concentração de eletrólito (desemulsificador) em uma emulsão aumenta o efeito de afastamento e faz com que a camada difusa se torne mais compacta, diminuindo rapidamente o potencial zeta (SHAW, 1975). A concentração de eletrólitos necessária para vencer a repulsão e permitir a coagulação depende, primariamente, da valência dos íons de carga oposta. Eletrólitos contendo íons trivalentes requerem baixa concentração para induzirem a coagulação, enquanto que, para íons bivalentes e monovalentes, a concentração é maior (SOUZA, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDURAHMAN, H N.; YUNUS R. M.; JEMAAT Z. Chemical Demulsification of Water-in-Crude Oil Emulsions. **Journal of Applied Sciences**, v.7, n.2, p. 196-201, 2007.

ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes**. 2005. 243f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2005.

AMAYA-FARFAN, J. **Alimentos, Nutrientes e Nutrição**, abril, 2001. p.1-26. Apostila do programa sobre nutrição das disciplinas TA-015, TA-071 e TA-840 - Faculdade de Engenharia de Alimentos , Universidade Estadual de Campinas.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO F. O. (Ed.). Dispersões e Reologia. In. **Química do Processamento de Alimentos**, 2 ed., Varela, São Paulo, 1992a, p.27-37.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO F. O. (Ed.). **Introdução à Química de Alimentos**, 2 ed., Varela, São Paulo, 1992b.

BORGES, P.; PINO, J.A.; FERNANDEZ, N. Obtención de oleoresina de pimentón dulce. Evaluación de solventes de extracción. **Alimentaria**, p.59-60, 1997.

BORGSTRÖM B. Metabolism of Glycerides. In: BLOCH, K. (Ed.). **Lipide Metabolism**. John Wiley & Sons Inc., NY, 1960.

BUENO, C. M. M. **Extração e caracterização de gelatina de pele de tilápia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa**. 2008. 133f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

BUREY, P.; BHANDARI, B.R.; HOWES, T. ; GIDLEY, M.J. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization and Application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, n.5, p.361-377, 2008.

BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 27, n.1, p.61-70, 1985.

BURGESS, D.J. Practical analysis of complex coacervate systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 140, n.1, p. 227-238, 1990.

CARVALHO, R. A. **Elaboração e caracterização de filmes a base de gelatina modificada enzimática e quimicamente**. 2002. 249f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, 2002.

CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Characterization of gelatin-based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.5, p.717-726, 2004.

CÉLIS, F.T. **Efeito da reticulação induzida pela transglutaminase e o glutaraldeído sobre as propriedades das micropartículas obtidas por coacervação complexa**. 2009. 148f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

CHAMBI, H.; GROSSO, C.R.F. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, v.39, n.4, p.458-466, 2006.

CHEN, C., LU, C., CHANG, C., YANG, Y., MAA, J. Influence of on the pH on the stability of oil-in-water emulsions stabilized by a Splittable Surfactant. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 170, p.173–179, 2000.

CHEFTEL, J.C., CUQ, J.L., LORIENT, D. Aminoácidos, peptídeos y proteínas. In: Fennema O.R. (Ed.), **Química de los alimentos**, Editorial Acribia, Zaragoza, p. 275-414, 1996.

CHOI S. S.; REGENSTEIN J. M.; Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 194-199, 2000.

CHOO, W.S.; BIRCH, E.J.; DUFOUR, J.P. Physicochemical and Stability Characteristics of Flaxseed Oils During Pan-heating. **J.American Oil Chem. Soc.**, v. 84, p.735–740, 2007.

CIBEIRA, G. H.; GUARAGNA, R.M. Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. **Revista Nutrição**, Campinas, v.19, n.1, p.65-75, jan/fev, 2006.

CRISTIANO, C. M. Z. **Blendas formadas por caseína e gelatina: efeito da adição de plastificante e de agente reticulante e interações com copolímeros**. 2009. 139p. Tese (Doutorado em Química ,Área de concentração: Físico-Química). Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2009.

DONG, Z. J.; TOURE, A.; JIA, C. S.; ZHANG, X. M.; XU, S. Y. Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n.7, p.634–646, 2007.

ESTRUTURA química de aminoácidos e proteínas. 2010. Disponível em: <<http://www.fisiologia.kit.net/bioquimica/proteinas/2.htm>>. Acesso em: maio/2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization Rome (Org.). **Fats and oils in human nutrition**, Publications Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italy, 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/V4700E/V4700E00.htm>>. Acesso em: março de 2010.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.11, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FELLOWS, P.J. (Ed.). **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípio e Prática**, 2 ed., Artmed Ed.São Paulo, 2006.

GAN, C-Y.; CHENG, L-H; EASA, A.M. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 563-569, 2008.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v.40, p.1107-1121, 2007.

GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999.

GLICKSMAN, M. (Ed.) **Food Hydrocolloids**. v. 2, CRC Press Inc. NY, 1983.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 2, p. 145-158, 1997.

GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". **Journal of The Society of Cosmetic Chemists**, v.1, p. 311-326, 1949.

HOBECO. Corrente de Fluxo. 2004. Disponível em: <www.hobeco.net>. Acesso em: maio 2010.

HOFFMANN, H.; THUNIG, C.; MUNKERT, U. From Vesicles to the L3 (Sponge) Phase in Alkyldimethylamine Oxide/Heptanol Systems. **Langmuir**, v.8, p. 2629-2638, 1992.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Technology Food Science & Tecnology**, v. 24, p.289-297, 1991.

JOUZEL, B.; PENNARUN, A. L.; PROST, C.; RENARD, D.; PONCELET, D.; DEMAÏMAY, M. Encapsulation of a lipid precursor, the eicosapentaenoic acid, to study the development of the *Crassostrea gigas* oyster flavours. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 1, p. 35–46, 2003.

KATONA, J. M.; SOVILJ, V. J.; PETROVIC, L. B. Microencapsulation of oil by polymer mixture–ionic surfactant interaction induced coacervation. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 563–570, 2010.

KOLANOWSKI, W.; LAUFENBERG, G.; KUNZ, B. Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 4, p.333-343, 2004.

KOŁODZIEJSKA, I., KACZOROWSKI, K.; PIOTROWSKA, B.; SADOWSKA, M. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod with transglutaminase. **Food Chemistry**, v. 86, p. 203-209, 2004

KONG, X.Z. ; GU, X.; ZHU, X.; ZHANG, Z. Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component molecule. **Biomed Microdevices**, v. 11, p. 275–285, 2009.

KRUIF, C.G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, v.15, p. 555-563, 2001.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 1-9, 2000.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for O - 3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 3, p. 347-357, 2001.

LECLERCQ, S.; MILO, C.; REINECCIUS, G.A. Effects of Cross-Linking, Capsule Wall Thickness, and Compound Hydrophobicity on Aroma Release from Complex Coacervate Microcapsules. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 1426–1432, 2009.

LEE, S. J.; YING, D.Y. Encapsulation of fish oils. In: GARTI, N. **Delivery and controlled release of bioactives food nutraceuticals**. CRC Press, 2008. p.370-403.

LI, D.; BODE, O.; DRUMMOND, H.; SINCLAIR, A. Omega-3 (n-3)fatty acids. In. GUNSTONE, F. D. (Ed.). **Lipids for functional foods and nutraceuticals**, Oily Press Lipid Library, UK, 2003. p. 225-262.

LIU., S; ELMER, C.; LOW, N.H.; NICKERSON, M.T. Effect of pH on the functional behavior of pea protein isolate-gum Arabic complexes. **Food Research International**, v. 43, p. 489-495, 2010a.

LIU., S; CAO, Y-L.; GHOSH, S.; ROUSSEAU, D.; LOW, N. H.; NICKERSON, M.T. Intermolecular interactions during Complex Coacervation of pea protein isolate and Gum Arabic. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 552-556, 2010b.

MACEDO, J.A.; SATO, H.H. Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.4, p.413-419, out./dez. 2005

MARTIN, C. A.; ALMEIDA V. V.; RUIZ M. R.; VISENTAINER J. E. L.; MATSHUSHITA M.; SOUZA N. E.; VISENTAINER J. V. Ácidos graxos polinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista da Nutrição**, Campinas. v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MCCLEMENTS, D.J. (Ed.). **Food emulsions: principles, practice and techniques**. CRC Press, 2005.

MEDANHA, D.V.; ORTIZ, S.E.M.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; MAURI, A. MONTERREY-QUINTERO, E.S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v.42, p. 1099-1104, 2009.

MENGER, F.M.; SYKES, B.M. Anatomy of a coacervate. **Langmuir**, v.14, p. 4131-4137, 1998.

MENGER, F. M.; PERESYPKIN, A. V.; CARAN, K. L.; APKARIAN, R. P. A Sponge Morphology in an Elementary Coacervate. **Langmuir**, v. 16, p. 9113-9116, 2000.

MORAIS, J.M. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. 2008. 216f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, SP, 2008.

NAKAJIMA, A.; SATO, H. Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyninyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. **Biopolymers**, v. 10, p. 1345-1355, 1972.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Química de los alimentos**, Editorial Acribia, Zaragoza, 1996.

NICHOLS, D.S; SANDERSON, K. The Nomenclature, Structure, and Properties os Food Lipids. In. SIKORSKI Z.E.; KOLAKOWSKA,A. (Ed.). **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**, CRC Press, 2003.

O'BRIEN, R. D. (Ed.). Fats and Oils Formulating. In. **Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications**, 2. Ed. CRC Press, 2004.

OLIVEIRA, A.B.**Microencapsulamento de Estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae.** 2007. 132f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2007.

OOMAH, B.D.; MAZZA, G. Flaxseed Products for Disease Prevention. In. MAZZA, G. (Ed.). **Functional Foods**. Biochemical & Processing Aspects. CRC Press, 1998, p.91-127.

OVERBEEK, J. T. G.; VOORN, M. J. Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of Complex Coacervation. **J. Cell. Comp. Physiology**, v.49, n.1, p. 7-26, 1957.

PELSER, W. M. ; LINSEN, J. P. H.; LEGGER, A.; HOUBEN, J. H. Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. **Meat Science**. v. 75, p.1-11, 2007.

PERRECHIL, F.A. **Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí.** 2008. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2008.

POPPE, J. Gelatin, In: **Thickening and gelling agents for food**, New York, Ed.Incompatibility of proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 171-180, 1997.

PRATA, A.S. **Estudos dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa.** 2006. 267f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

RABIŠKOVÁ, M.; VALÁŠKOVÁ, J. The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation.. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 6, p. 747-751. 1998.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, p.1195 - 1236, 1998.

SALOPEK, B.; KRASIC, D.; FILIPOVIC, S. Measurement and Application of Zeta-Potential. **Rudarsko-geološko-naftni zbornik**, v.4,p. 147-151,1992.

SANGUANSRI, L.; AUGUSTIN, M.A. Microencapsulation and delivery of omega-3 fatty acids. In. SHI.J.(Ed.). **Funcional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technologies**. CRC Press, 2007. p. 297-327.

SANT'ANA, L.S. Mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão, absorção e metabolismo dos ácidos graxos ômega. **RBPS**. v. 17,n.4, p.211-216, 2004.

SANTOS, A.B. **Encapsulação de oleoresina de páprica por atomização em goma arábica e em aglomerados porosos de amido/gelatina:estabilidade e aplicação**. 2003. 196f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas: Uma alternativa viável - Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação: óleo-resina de páprica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 3, n. 16, p. 26-30. 2000.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES,S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003

SCHMITT, C.; SANCHES, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of *n*-3 and *n*-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v.47, p. 147-155, 2008.

SIMOPOULOS, A.P. The omega-6/omega-3 fatty acids ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.17, p. 131-134, 2008.

SHAHIDI, F; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHAW, D.J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. Ed.Edgard Blücher Ltda,São Paulo, SP, 1975.185p.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D. e VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 1, 2003.

SOUZA, M.A. **Desemulsificação e purificação de resíduos gordurosos provenientes de esgotos domésticos**. 2003. 156p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, 2003.

STREY R.; JAHN, W.; PORTE, G.; BASSEREAU, P. Freeze Fracture Electron Microscopy of Dilute Lamellar and Anomalous Isotropic (L3) Phases. **Langmuir**, v. 6, p. 1635-1639, 1990.

TEIXEIRA, T.F.S. e PELUZIO M.C.G. Vitamina E, ácidos graxos essenciais e ômega-3 na prevenção do câncer de cólon - evidências e controvérsias. **Nutrição Brasil**. v.5, n.2, p.105-110, 2006.

THIES, C. (Ed.). Complex Coacervation; Characterization. In. **How to make microcapsules: combined lecture and laboratory manual**, Thies Technology, St. Louis, Missouri, 1994.

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

VASCONCELOS, M.I.L. Gorduras vegetais e animais, aminoácidos e câncer. In: WAITZBERG, D.L. **Dieta, Nutrição e Câncer**, São Paulo, Ed. Atheneu, 2004, p.179-184.

VEIS, A.; ARANYI, C. Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. **Journal of Physic. Chemistry**, v.64, p.1203-1210, 1960.

WEINBRECK, F.; MINOR, M.; DE KRUIF, C.G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation**, v.21, n.6, p. 667-679, 2004.

WIESENFELD, P.W.; BABU, U.S.; COLLINS, T.F.X.; SPRANDO, R.; O'DONNELL, M.W.; FLYNN, T.J.; BLACK, T.; OLEJNIK, N. Flaxseed increased α -linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. **Food Chem. Toxicol.** v.41, n.6, p.841-855, 2003

WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I.; NUTE, G. R.; FISHER, A. V.; CAMPO, M. M.; KASAPIDOU, E.; SHEARD, P.R.; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality: A review. **Meat Science**, v. 66, p. 21-32, 2004.

ZIMET, P.; LIVNEY Y. D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1120-1126, 2009.

CAPÍTULO 2

**ESTUDO DA DOSAGEM DE SURFACTANTES E VALORES DE HLB
 (“*HIDROPHILIC LIPOPHILIC BALANCE*”) EM EMULSÕES DE ÓLEO DE
LINHAÇA E GOMA ARÁBICA PARA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS POR
COACERVAÇÃO COMPLEXA**

1 INTRODUÇÃO

O processo de coacervação complexa se inicia com a formação de uma emulsão óleo em água (O/A) com a adição do material de recheio (óleo) a uma das partes do material de parede (solução aquosa de goma arábica ou gelatina) (THIES, 1994; SHAHIDI; HAN, 1993; OLIVEIRA, 2007; GOUIN, 2004; DONG *et al*, 2007).

Por isto, a caracterização das propriedades do sistema de emulsão O/A antes da coacervação complexa é necessária para entender o processo de encapsulação. Segundo Rabiskova *et al* (1994), a propriedade de superfície dos óleos, particularmente a hidrofobicidade, influencia significativamente na absorção do óleo no coacervado, ou seja, a relação hidrofiliicidade/ lipofiliicidade da interface das gotas de óleo irá afetar a absorção das gotas de óleo pelo sistema coacervado.

A redução da energia livre interfacial (ΔE) é considerada a força motriz na interação da fase coacervada e o material de recheio, e é influenciada pela variação da área interfacial (ΔA) e a variação de energia interfacial ($\Delta \gamma$), de acordo com a Equação 1.

$$\Delta E = \Delta \gamma \Delta A \quad (\text{Equação 1})$$

De acordo com a equação, o aumento na área interfacial do material de recheio irá aumentar sua absorção no coacervado, ou seja, menor tamanho das gotas de recheio mais absorção pelo coacervado. A fase coacervada (rica em polímeros) deve ter uma maior afinidade pelo material de recheio que a fase equilíbrio (diluída). Esta absorção será afetada pela tensão interfacial e o ângulo de contato entre a interface do material de recheio com as duas fases (coacervada e equilíbrio), conforme equação de Young, Equação 2 (RABISKOVA *et al*, 1994).

$$\gamma_{CL1} = \gamma_{CL2} + \gamma_{L1L2} \cos \theta \quad (\text{Equação 2})$$

onde: γ_{CL1} : tensão interfacial entre material de recheio e fase de equilíbrio; γ_{CL2} : tensão interfacial entre material de recheio e fase coacervada; γ_{L1L2} : tensão interfacial entre fase de equilíbrio e fase coacervada.

A tensão superficial de um líquido é a responsável pela forma da gota do líquido, que terá suas moléculas com maior tendência a estarem juntas quanto maior a tensão superficial. A tensão superficial de um líquido puro pode ser reduzida pela adição de uma substância conhecida como surfactantes ou emulsificantes (PRATA, 2006).

Os surfactantes, quando utilizados, serão adsorvidos à interface das gotas de óleo e alteram a relação de hidrofobicidade/lipofilicidade na interface, alterando o valor de γ da Equação 1. Deste modo, a presença de surfactante pode alterar a produção de microcápsulas por coacervação complexa e suas características (RABISKOVA et al, 1994).

Os surfactantes não iônicos são os mais comumente utilizados em alimentos por questão de segurança alimentar e por seu uso ser permitido (KOGA et al, 2002). São obtidos acoplando-se a porção apolar a uma função não ionizável com características polares e não apresentam grupos ionizáveis em soluções aquosas (PRATA, 2006).

Para classificar os surfactantes não iônicos em grupos dentro dos quais eles desempenham a mesma função existe o valor de HLB (hydrophilic lipophilic balance ou balanço hidrofílico lipofílico (BHL)) mostrado no Quadro 1, que é a determinação quantitativa da relação entre a porção polar (hidrofílica) e apolar (lipofílica), definida por Griffin (1949).

Quadro 1: Valores de HLB e aplicações adequadas

HLB	Aplicação
3-6	Emulsificantes em emulsões A/O
7-9	Agentes molhantes
8-18	Emulsificantes em emulsões O/A
13-15	Detergentes
15-18	Solubilizantes

Fonte: Adaptado de KOGA et al, 2002

Na área de alimentos os surfactantes são mais conhecidos como emulsificantes e estão classificados na lista de aditivos. Segundo a legislação brasileira, ANVISA - RDC 23, (BRASIL, 2005), específica para categoria de alimentos óleos e gorduras, subcategoria creme vegetal e margarina, a dosagem máxima para emulsificantes como Span 80 e Tween 80 é de 1,0 %. Para categoria de alimentos 13: Molhos e Condimentos, ANVISA - RDC nº 4, (BRASIL, 2007), a dosagem máxima para emulsificantes como Span 80 é de 1% e Tween 80 de 0,5 %. Alguns permitidos para uso em alimentos estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2: Surfactantes não iônicos permitidos para uso em alimentos

Surfactante não ionico	Nome	INS (*)	HLB
Monooleato de sorbitana	Span 80	494	4,3 A/O
Monoestearato de sorbitana	Span 60	491	4,7 A/O
Monopalmitato de sorbitana	Span 40	495	6,7 A/O
Monolaurato de sorbitana	Span 20	493	8,6 O/A
Triestearato de polioxietileno (20) sorbitana	Tween 65 polisorbato 65	436	10,5 O/A
Monoestearato de polioxietileno (20) sorbitana	Tween 60 polisorbato 60	435	14,9 O/A
Monooleato de polioxietileno (20) sorbitana	Tween 80 polisorbato 80	433	15,0 O/A
Monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitana	Tween 40 polisorbato 40	434	15,6 O/A
Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana	Tween 20 polisorbato 20	432	16,7 O/A

Fonte: Adaptado de KOGA et al, 2002

(*): INS: International Numbering System

Os compostos do grupo Tween são ésteres de sorbitana etoxilados e agem como tensoativos hidrofílicos, diferenciando-se com respeito ao ácido graxo presente em sua estrutura. O ácido graxo presente na estrutura do Tween 80 é um

oleato. Este surfactante é um líquido amarelo, solúvel em água e viscoso, com densidade de $1,064 \text{ g cm}^{-3}$, massa molecular 1310 g/mol e sua estrutura química está mostrada na Figura 1 (ANDREANI, 2008).

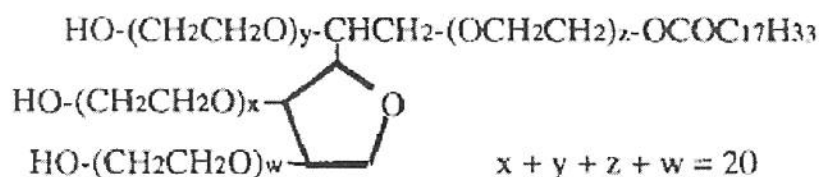


Figura 1. Estrutura química do Tween 80 ($\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$)

Fonte: HARA *et al*, 1997

Os monoésteres de sorbitana, conhecidos como Span, são representados de acordo com a estrutura mostrada na Figura 2 e se diferenciam pelo radical R. São compostos derivados da reação do sorbitol com um ácido graxo e estes compostos, assim como os Tweens se diferenciam-se em relação ao ácido graxo presente em sua estrutura. O Span 80 é um tensoativo lipofílico, sendo desta forma solúvel ou dispersível em óleo. O ácido graxo presente em sua estrutura também é um oleato, e este surfactante não-iônico apresenta-se como um líquido amarelo claro, de densidade $0,840 \text{ g cm}^{-3}$ e massa molecular 428,61 g/mol (ANDREANI, 2008).

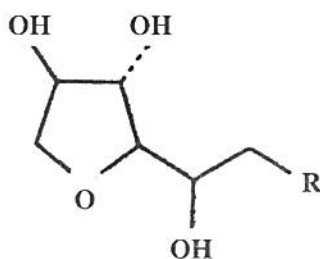


Figura 2 : Estrutura química de Monoésteres de sorbitana - SPAN.

Span 20 – R:OOC($\text{C}_{11}\text{H}_{23}$) – Monolaurato de sorbitana; Span 40 - R: OOC($\text{C}_{15}\text{H}_{31}$) – Monopalmitato de sorbitana; Span 60 – R: OOC($\text{C}_{17}\text{H}_{35}$) – Monoestearato de sorbitana; Span 80 – R: OOC($\text{C}_{17}\text{H}_{33}$) – Monooleato de sorbitana ($\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_6$)

Fonte: PELTONEN; YLIRUUSI, 2000

Segundo estudos realizados por Koga *et al* (2002), existe uma relação entre o HLB do surfactante e a quantidade de água solubilizada ou tamanho de partículas emulsionadas, sendo que partículas menores contribuem para condições melhores de emulsificação.

Na busca por valores específicos de HLB, a mistura de surfactante de baixo e alto valor de HLB pode originar sistemas mais perfeitos, formando película interfacial mais compacta e estável, dando à emulsão maior consistência. Porém a mistura de um emulsificante com valor muito alto de HLB e outro muito baixo pode resultar em emulsões instáveis.

Além da importância do valor de HLB para a estabilidade, a afinidade química entre os componentes da fase oleosa e os surfactantes presentes também deve ser analisada. Neste sentido, surfactantes com a mesma origem da fase oleosa serão mais afins quimicamente (SOUZA, 2003).

O uso de surfactantes em emulsões com maior quantidade de água e maiores valores de HLB provoca a formação de espuma, que não é um efeito desejável, já que ocorre uma perda de rendimento no processo de coacervação complexa devido ao aprisionamento na superfície de partículas coacervadas pela espuma formada. Muitos agentes surfactantes são em geral bons agentes espumantes, já que os fatores que influenciam a estabilidade da emulsão e a estabilidade da espumas são semelhantes (SHAW, 1975).

Sais de cálcio e magnésio presentes em água dura são responsáveis por reduzir a formação de espuma de detergentes através dos cátions de cálcio e/ou magnésio que reagem com o sal orgânico dos detergentes/ surfactantes formando compostos pouco solúveis que precipitam e assim diminuem sua concentração e seu poder de espumar. A composição dos detergentes, surfactantes e do óleo presente na emulsão diferenciam o comportamento de formação de espuma assim como as respostas ao uso do cálcio (MÓL; BARBOSA; SILVA, 1995; LIM, 2009).

O cloreto de cálcio (CaCl_2) é indicado como aditivo permitido pela ANVISA – RDC nº 386 (BRASIL, 1999) e seu uso é de acordo com a quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem limites definidos. Existem vários tipos de

antiespumantes como óleo mineral, silicone e algumas resinas, porém com restrições de uso em sistemas alimentícios (TRACTON, 2007).

Neste trabalho o objetivo foi estudar algumas concentrações de diferentes surfactantes utilizados na emulsão inicial do preparo da microcápsula por coacervação complexa, fixada como emulsão de solução de goma arábica e óleo de linhaça. O intuito foi definir os surfactantes (uma opção de HLB alto e outra de baixo) e a concentração ideal para se obter emulsões estáveis a serem utilizadas na produção das microcápsulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Goma arábica INSTATGUM AB (*Acácia Senegal*) – CNI Colloides Naturais Brasil; óleo de buriti – Chemyunion; óleo de linhaça - Cisbra Alimentos; óleo de peixe comercial (ROPUFA ®, 75 óleo de peixe de origem marinha - DSM Nutritional Products – (42% EPA e 22% DHA); surfactantes - Croda do Brasil dos seguintes tipos: Monooleato de polioxietileno de sorbitana – polisorbato 80 ou Tween 80 (HLB 15), Monoestearato de polioxietileno de sorbitana – polisorbato 60 ou Tween 60 (HLB 14,9), monooleato de sorbitana - Span 80 (HLB 4,3), Monopalmitato de sorbitana - Span 40 (HLB 6,7); Cloreto de cálcio Dehidratado Nuclear - PAACS ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – PM 147,02).

2.2 EQUIPAMENTOS

2.2.1 Equipamentos utilizados nos processo e determinações analíticas

Para a elaboração das emulsões foi utilizado homogeneizador Ultraturrax TP 18 - IKA-WERK (velocidade de agitação fixa de 20.000 rpm), Balança Analítica Ohaus modelo Adventurer. Para a determinação do potencial zeta e condutividade das emulsões foi utilizado Zeta Sizer Nano Series Nano ZS – Malvern Instruments

(Inglaterra). Este equipamento foi utilizado na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

2.3. MÉTODOS

2.3.1 Metodologia para elaboração das emulsões e avaliação da estabilidade

A emulsão (O/A) definida foi uma solução de goma arábica (2,5%, m/m) adicionada ao óleo de linhaça (2,4%, m/m) com o sistema de surfactantes, homogeneizados em Ultraturrax a 20.000 rpm durante 1 minuto, condições semelhantes à primeira etapa do processo de coacervação complexa.

Para se determinar sistemas adequados de emulsões estáveis utilizando surfactantes, com baixo HLB e com alto HLB foi utilizado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 2 variáveis, $\alpha = 1,41$ e 3 pontos centrais, com os níveis expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes do delineamento estatístico para avaliação da estabilidade das emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça

Codificação	Variáveis Independentes	Níveis				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
x_1	Concentração de surfactante (%)	0,10	0,38	1,05	1,72	2,00
x_2	Valor de HLB	4,30	4,93	6,45	7,97	8,60

$\pm |\alpha|=1,41$.

Em testes preliminares com Span 80, Span 40, Tween 80 e Tween 60 definiu-se a utilização somente de Span 80 (HLB 4,3) e Tween 80 (HLB 15) para a composição dos diferentes valores de HLB através de balanço de massa, Equação 3. Os outros surfactantes formaram muita espuma interferindo negativamente no sistema.

$$x_1 * HLB_1 + x_2 * HLB_2 = HLB_{req} \quad (\text{Equação 3})$$

onde: x_1 : % de surfactante Span 80; HLB_1 : HLB Span 80; x_2 : % de surfactante Tween 80; HLB_2 : HLB Tween 80; HLB_{req} : valor de HLB requerido

As concentrações foram pré-definidas de acordo com trabalhos de Vanichtanunkul; Vayumhasuwan; Nimmannit (1998), Zanin *et al* (2002), Gan; Cheng; Easa (2008), Vaziri; Warburton (1994) e Kong *et al* (2009) e os valores da faixa de HLB foram baseados nos melhores resultados de Rabiskova; Valaskova (1998).

A adição dos surfactantes foi feita de acordo com estudos de Lin (1968) seguindo a afinidade do emulsificante à fase a ser adicionado, sendo assim, o Span 80 foi adicionado ao óleo e o Tween 80 à solução de goma arábica, antes da formação da emulsão.

Com adequações da metodologia de avaliação de estabilidade de emulsão de Leonel (2008) e Ribeiro (2010), as emulsões foram colocadas em tubos de ensaio e avaliadas como resposta do delineamento: estabilidade no tempo de 15 minutos (tempo suficiente antes da etapa de coacervação na produção das microcápsulas) através do cálculo de volume (mL) da fase separada e volume (mL) de espuma formada.

Para comparação e verificação da influência do óleo utilizado na estabilidade da emulsão e formação de espuma, o óleo de linhaça, óleo de peixe e óleo de buriti foram testados sem a adição de surfactantes.

Com a finalidade de reduzir a formação de espuma ocorrida em todas as emulsões com surfactante, foi adotado o uso de sal cálcio na forma de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) em concentração de 0,05% (m/m). A influência da presença de sal de cálcio na emulsão foi avaliada através da estabilidade da emulsão e formação de espuma. Em estudos de Lim (2009), o uso de 0,03% de Ca^{+2} como $CaCO_3$ permitiu a redução da espuma nas emulsões mesmo que o comportamento da formação de espuma tenha sido diferenciado para cada tipo de emulsificante e do óleo presentes na emulsão.

2.3.2 Avaliação da influência do sal de cálcio no potencial zeta

Para avaliar a interferência nas cargas do novo sistema que seria utilizado na coacervação complexa para produção das microcápsulas, ou seja, presença de surfactante e cloreto de cálcio, foi medido o potencial zeta das emulsões. Esta determinação foi realizada partindo-se de uma solução de goma arábica (2,5%) pura, uma de solução de goma arábica (2,5%) e óleo de linhaça (2,4%) e outra solução de goma arábica (2,5%), óleo de linhaça (2,4%), cloreto de cálcio (0,05%) e surfactante Span 80 (0,013%), sendo todas %, m/m.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ELABORAÇÃO DAS EMULSÕES E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

Na Tabela 2 são apresentados os resultados do primeiro ensaio realizado por DCCR. Houve problemas de formação da emulsão em alguns ensaios nas faixas escolhidas de % de surfactante e valor de HLB. Em função disto, não foi possível elaborar modelo estatístico e superfície de resposta.

Com base nos melhores resultados do primeiro delineamento, foi estabelecido outro delineamento experimental com faixas mais baixas de % de surfactante (0,06% a 1,02%) e valores de HLB de 5,94 a 9,05. Iniciando os ensaios já foi possível perceber que acima de 0,2% de surfactante não estava ocorrendo formação de emulsão (Tabela 3), não sendo possível elaborar modelo estatístico novamente.

A partir destes testes verificou-se que uma correlação entre HLB e concentração de surfactante seria bastante complexa sendo adequado fixar uma concentração do surfactante e variar valores de HLB.

Tabela 2. Resultados de volume da fase separada e de espuma do primeiro delineamento de emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça

Ensaio	Variáveis		Resposta	
	Surfactante (%)	HLB	Volume fase separada (mL)	Volume espuma (mL)
1	0,38	4,93	*	*
2	1,72	4,93	*	*
3	0,38	7,97	2,94	7,36
4	1,72	7,97	4,91	12,27
5	0,10	6,45	0,98	9,82
6	2,00	6,45	4,95	17,67
7	1,05	4,30	*	*
8	1,05	8,60	3,93	24,54
9	1,05	6,45	3,44	11,29
10	1,05	6,45	2,94	14,73
11	1,05	6,45	3,44	14,73

(*) : estes ensaios não formaram emulsões, não sendo avaliados.

Emulsões produzidas em 20.000 rpm durante 1 minuto.

Surfactantes utilizados: Tween 80 e Span 80

Avaliações das amostras estáticas em temperatura ambiente, tempo: 15 minutos.

Para alcançar o objetivo de obter dois sistemas estáveis com surfactantes de alto e baixo HLB, foram selecionados resultados dos delineamentos realizados (ensaio 5 do primeiro delineamento e ensaio 3 do segundo delineamento) e resultados de estudos de Vanichtanunkul, Vayumhasuwan, Nimmannit (1998) e Duquemin, Nixon (1986). Com estas informações foi possível definir alguns sistemas a serem avaliados e os resultados estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 3: Resultados de volume da fase separada e de espuma do segundo delineamento de emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça

Ensaio	Variáveis		Resposta	
	Surfactante (%)	HLB	Volume fase separada (mL)	Volume espuma (mL)
1	0,20	6,40	*	*
2	0,88	6,40	*	*
3	0,20	8,60	1,26	3,46
4	0,88	8,60	*	*
5	0,06	7,50	1,52	0,00
6	1,02	7,50	1,52	19,01
7	0,54	5,94	*	*
8	0,54	9,05	1,52	5,70
9	0,54	7,50	1,96	6,38
10	0,54	7,50	*	*
11	0,54	7,50	*	*

(*) : estes ensaios não formaram emulsões, não sendo avaliados.

Emulsões produzidas em 20.000 rpm durante 1 minuto.

Surfactantes utilizados: Tween 80 e Span 80

Avaliações das amostras estáticas em temperatura ambiente, tempo: 15 minutos.

Tabela 4: Resultados de volume da fase separada e de espuma de emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça com sistemas de surfactantes definidos

Ensaio	HLB	Surfactante (%)	Volume fase separada (mL)	Volume espuma (mL)
1 *	6,45	0,1	0,98	9,82
2 **	8,60	0,2	1,26	3,46
3	4,30	0,013	0,76	0,00
4	8,60	0,013	0,38	0,76

*: ensaio 5 da Tabela 2

** : ensaio 3 da Tabela 3

Emulsões produzidas em 20.000 rpm durante 1 minuto.

Surfactantes utilizados: Tween 80 e Span 80

Avaliações das amostras estáticas em temperatura ambiente, tempo: 15 minutos.

Os resultados dos ensaios 2 e 4 da Tabela 4, com o mesmo valor de HLB, mostram que o aumento da concentração de surfactante interferiu negativamente na formação da emulsão e positivamente na formação de espuma. Os resultados dos ensaios 3 e 4 foram os mais adequados para HLB baixo (4,30) e alto (8,60).

Na Tabela 5 estão os resultados de volume da fase separada e de espuma para emulsões obtidas com diferentes tipos de óleo (linhaça, buriti e de peixe), sem a presença de surfactante, para a avaliação da influência do óleo na estabilidade da emulsão e formação de espuma. Também foi realizado ensaio com emulsão água e óleo de linhaça com 0,05% de cloreto de cálcio, sem surfactante para avaliar a diminuição da espuma indesejada, com resultados relatados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados de volume da fase separada e de espuma de emulsões de solução de goma arábica e diversos óleos, com cloreto de cálcio e sem surfactantes

Ensaio	Descrição	Volume fase separada (mL)	Volume espuma (mL)
1	Óleo de linhaça	2,83	11,78
2	Óleo de buriti	3,44	7,85
3	Óleo de peixe	3,93	11,78
4	Óleo de linhaça e 0,05% CaCl ₂	2,45	4,71

Emulsões produzidas em 20.000 rpm durante 1 minuto.

Avaliações das amostras estáticas em temperatura ambiente, tempo: 15 minutos.

Em relação ao volume da fase separada, o óleo de linhaça obteve uma melhor estabilidade, seguido por óleo de buriti e óleo de peixe. A formação de espuma, sem surfactante, foi igual para óleo de linhaça e óleo de peixe sendo que o óleo de buriti obteve um volume de espuma menor.

Para avaliar a atuação do cloreto de cálcio evitando a formação de espuma foram comparados os resultados dos ensaios 1 e 4 da Tabela 5 que estão em condições semelhantes diferenciando apenas na presença de íons de Ca⁺² no

ensaio 4. Os resultados de volume de fase separada do ensaio 4 foram próximos ao ensaio 1 e de volume de espuma, 60% menor, demonstrando realmente a eficácia da presença de Ca^{+2} na redução da formação de espuma.

3.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DAS EMULSÕES

A adição de íons de Ca^{+2} poderia influenciar a coacervação complexa que é um processo dependente da carga iônica do meio modificando o ponto de equilíbrio das cargas para a coacervação. Os resultados do potencial zeta estão descritos na Tabela 6 e mostram que não houve interferência do uso de surfactante e cloreto de cálcio nas cargas da emulsão.

Tabela 6: Potencial zeta e condutividade para as emulsões

Amostras	Potencial zeta (mV)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Sol. Goma arábica	$-17,6 \pm 3,34$	0,831
Sol. Goma arábica + óleo de linhaça	$-6,93 \pm 110$	0,771
Sol. Goma arábica + óleo de linhaça + Span 80 + cloreto de cálcio	$-6,18 \pm 95,5$	1,48

Emulsões produzidas em 20.000 rpm durante 1 minuto.
Gráficos mostrados no Anexo A

De acordo com Souza (2003), um surfactante não-iônico não apresenta grupos ionizáveis em soluções aquosas, o que não influenciaria no potencial zeta, porém o cloreto de cálcio poderia estar dissociado e influenciar. As emulsões não foram estáveis por muito tempo, levando a coeficiente de variação alto. Pode-se interpretar que a diferença de 11% do potencial zeta entre as duas emulsões analisadas se torna pequeno diante da instabilidade da amostra.

Conforme classificação feita por Salopek; Krasic; Filipovic (1992), valores de potencial zeta de +5 a -5 mV correspondem a sistemas de emulsões com alta aglomeração e precipitação, não sendo emulsões estáveis. Valores de potencial

zeta maiores que +60 mV e menores que -60 mV correspondem à emulsões estáveis. Os valores da Tabela 6 comprovam a instabilidade das emulsões. A estabilidade das emulsões é mais baixa quanto mais próxima de potencial zeta 0, ou seja, se a intenção for estabilizar a emulsão, deve-se aumentar a eletronegatividade das partículas para que o potencial zeta aumente. As emulsões devem ser preparadas no mesmo local da análise pois a estabilidade destas emulsões é de apenas 15 minutos.

4 CONCLUSÕES

O uso de surfactante altera as características das emulsões de solução de goma arábica e óleo de linhaça. Os surfactantes utilizados (valor de HLB) e a concentração podem influenciar positivamente ou negativamente na estabilidade das emulsões.

A adição de 0,05% (m/m) de cloreto de cálcio foi suficiente para reduzir formação de espuma. Os resultados de potencial zeta das emulsões indicam que não houve influência da presença de íons de cálcio, porém as análises devem ser realizadas com as emulsões mais estáveis.

A utilização dos óleos de peixe, buriti e linhaça tiveram comportamentos semelhantes na estabilidade de emulsão e formação de espuma.

Como o objetivo era obter um sistema de emulsão estável com surfactante de alto HLB e outro de baixo HLB para a produção das microcápsulas por coacervação complexa, as condições consideradas mais adequadas foram a dosagem de 0,013% (m/m) de surfactante com valores de HLB 8,6 e 4,3.

O sistema de HLB 6,45 também foi uma opção adequada podendo ser testado em concentração de 0,013% (m/m) de surfactante.

Estes sistemas considerados adequados produziram emulsões estáveis por até 15 minutos, tempo maior que o tempo de processo da coacervação complexa, garantindo assim, que no momento da adição da solução de gelatina e coacervação, a emulsão esteja estável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREANI, L. **Desenvolvimento e Caracterização de Microesferas de Glúten de Trigo para Utilização em Sistemas de Liberação Controlada**. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2008.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **Resolução nº 386, de 05 de agosto de 1999**. Regulamento Técnico sobre Aditivos Utilizados segundo Boas Práticas de Fabricação e suas Funções, contendo os Procedimentos para Consulta da Tabela e a Tabela de ADITIVOS Utilizados Segundo as Boas Práticas de Fabricação.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005**. Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos Óleos e Gorduras – Subcategoria Creme Vegetal e Margarinas.

BRASIL. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **Resolução RDC nº 4, de 15 de janeiro de 2007**. Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 13: Molhos e Condimentos.

DONG, Z. J.; TOURE, A.; JIA, C. S.; ZHANG, X. M.; XU, S. Y. Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n.7, p.634–646, 2007.

DUQUEMIN, S-J.; NIXON, J. R. The effect of surfactants on the microencapsulation and release of phenobarbitone from gelatin-acacia complex coacervate microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, v.3, n.2, p.89-93, 1986.

GAN, C-Y.; CHENG, L-H; EASA, A.M. EVALUATION OF MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE AND RIBOSE CROSS-LINKED SOY PROTEIN ISOLATE-BASED MICROCAPSULES CONTAINING FISH OIL. **INNOVATIVE FOOD SCIENCE AND EMERGING TECHNOLOGIES**, v. 9, P. 563-569, 2008.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by “HLB”. **Journal of The Society of Cosmetic Chemists**, v.1, p. 311-326, 1949.

GUO, H.; ZHAO, X. Preparation of microcapsules with narrow-size distribution by complex coacervation: Effect of sodium dodecyl sulphate concentration and agitation rate. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n.4, p.221-227, 2008.

HARA, T.; LIUB, F.; LIUB, D.; HUANG, L. Emulsion formulations as a vector for gene delivery in vitro and in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 24, p. 265-271, 1997.

KOGA, K.; ISHITOBI, Y.; IWATA, M.; MURAKAMI, M.; KAWASHIMA, S. A Simple Method for the Selection of a Suitable Emulsifier Based on Color Difference. **Biol. Pharm. Bull.**, v.25, n.12, p.1642—1644, 2002.

KONG, X.Z. ; GU, X.; ZHU, X.; ZHANG, Z. Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component molecule. **Biomed Microdevices**, v. 11, p. 275–285, 2009.

LEONEL, A.J. **Produção e caracterização de partículas lipídicas constituídas por ácidos graxos, gordura vegetal hidrogenada e lecitina na encapsulação de um composto hidrofílico de baixa massa molar.** Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2008. Campinas, SP, 2006.

LIM, J.C. Effect of formation of calcium carbonate on foam stability in Neodol 25-3S anionic surfactant systems. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.15, p. 257–264, 2009.

LIN, T.J. Effect of Initial Surfactant Locations on the viscosity of Emulsions. **J. Soc. Cosmetic Chemists**, v.19, p. 683-697, 1968.

MOL, G. S.; BARBOSA, A.B.; SILVA, R.R. Água Dura em Sabão Mole. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**. n. 2, novembro, 1995.

OLIVEIRA, A.B. **Microencapsulamento de Estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae.** 2007. 132f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2007.

PELTONEN, L.J.; YLIRUUSI, J. Surface Pressure, Hysteresis, Interfacial Tension, and CMC of Four Sorbitan Monoesters at Water–Air, Water–Hexane and Hexane–Air Interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**.v.227,p.1–6, 2000.

PRATA, A.S. **Estudos dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa.** 2006. 267f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

RABIŠKOVÁ, M.; VALÁŠKOVÁ, J. The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation.. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 6, p. 747-751. 1998.

RABISKOVA, M.; SONG, J.; OPAWALE, F.O.; BURGESS, D.J. The Influence of Surface Properties on Uptake of Oil into Complex Coacervate Microcapsules. **J.Pharm. Pharmacol**, v. 46, p. 631-635, 1994.

RIBEIRO, M.M.M. **Comportamento de misturas binárias lipídicas na produção de micropartículas por *spray chilling* e sua influência na liberação de recheio hidrofílico**.2010. 137f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

SALOPEK, B.; KRASIC, D.; FILIPOVIC, S. Measurement and Application of Zeta-Potential. **Rudarsko-geoloiko-naftni zbornik**, v.4,p. 147-151,1992.

SHAHIDI, F; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHAW, D.J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. Ed.Edgard Blücher Ltda,São Paulo, SP, 1975.185p.

SOUZA, M.A. **Desemulsificação e purificação de resíduos gordurosos provenientes de esgotos domésticos**. 2003. 156p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, 2003.

TIRKKONEN, S., TURAKKA, L.; PARONEN, P. Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in the presence of surfactants. **Journal of Microencapsulation**, v.11, n.6, p. 615-626, 1994.

THIES, C. (Ed.). Complex Coacervation; Caracterization. In. **How to make microcapsules: combined lecture and laboratory manual**, Thies Technology, St. Louis, Missouri, 1994.

TRACTON, A.A. **Coatings Materials and Surface Coatings**. Ed. CRC Press. 2007.

VANICHTANUNKUL, D.; VAYUMHASUWAN, P.; NIMMANNIT, U. The effect of core-to-wall ratio and Span 80 concentration on the properties of ascorbic acid microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n.6, p.753-759, 1998.

VAZIRI, A.; WARBURTON, B. Some preparative variables influencing the properties of W/O/W multiple emulsions. **J. Microencapsulation**, v. 11, n. 6, p. 649-656, 1994.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal.**Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 13-18, 2002

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE ÓLEO DE LINHAÇA POR COACERVAÇÃO COMPLEXA COM USO DE SURFACTANTES

1 INTRODUÇÃO

A encapsulação de óleos tem sido bastante estudada pela função de protegê-los da oxidação e instabilidades ao meio (umidade, luz, calor e oxidação), alterar seu estado físico de líquido para sólido, ampliando a aplicação e auxiliando na dispersão em água, além de vantagens como a possibilidade de liberação controlada e mascaramento de sabores indesejáveis (RABISKOVA *et al*, 1994).

Um dos métodos mais adequados para encapsulação de óleo é a coacervação complexa. Este método se baseia na separação de fases associativa de um sistema de mistura de biopolímeros e ocorre sob uma estreita faixa de pH, dependendo das características dos biopolímeros (distribuição dos grupos reativos, solubilidade e peso molecular), da concentração dos biopolímeros, da massa molecular, da proporção entre os biopolímeros e das condições do solvente (pH, sal, força iônica, temperatura). Todos estes fatores podem influenciar a formação, eficiência de encapsulação e as características do coacervado e precisam ser otimizados (VANOSS, 2006; LIU *et al*, 2010a).

Para a produção de microcápsulas por coacervação complexa, muitos parâmetros referentes à matéria prima e ao processo precisam ser estudados no intuito de produzir com alto rendimento e alta eficiência de encapsulação. O estudo das matérias primas inclui desde a escolha dos materiais de parede e recheio até a avaliação dos efeitos de concentração dos biopolímeros, razão recheio/material de parede, adição de surfactantes e/ou eletrólitos e uso de agentes de reticulação. O estudo das condições de processo inclui todas as etapas: emulsificação (tempo e velocidade de agitação, ordem de adição dos ingredientes); coacervação (maneira de adição dos ingredientes, pH, temperatura e velocidade de agitação); resfriamento (temperatura, velocidade de agitação, tempo ou taxa de resfriamento); reticulação (pH, temperatura, tempo, velocidade de agitação); secagem das microcápsulas (congelamento lento, congelamento rápido, liofilização, estufa, temperatura ambiente) (LAMPRECHT; SCHAFER; LEHR, 2000, 2001; OLIVEIRA, 2007; CÉLIS, 2009; ALVIM, 2005; BUENO, 2008; LIU *et al*, 2010b; JOUZEL *et al*, 2003; PRATA *et al*, 2007; JEGAT; TAVERDET,

2000; RABISOVA *et al*, 1994; DUQUEMIN; NIXON, 1986; GUO; ZHAO, 2008; TIRKKONEN; TURAKKA; PARONEN, 1994; RABISOVA; VALASKOVA, 1998; DONG *et al*, 2007).

Em relação às matérias primas, pesquisas mostraram que na microencapsulação por coacervação complexa utilizando o par goma arábica e gelatina como material de parede a razão ideal entre eles é de 1:1 e a faixa de concentração dos biopolímeros se encontra entre 0,75 e 3,75%, sendo que as concentrações menores permitem uma melhor dispersão dos íons (DUQUEMIN; NIXON, 1986; GUO; ZHAO, 2008; TIRKKONEN; TURAKKA; PARONEN, 1994; RABISOVA; VALASKOVA, 1998; JOUZEL *et al*, 2003; RABISOVA *et al*, 1993; JÉGAT; TAVERDET, 2000; PRATA *et al*, 2007; KONG *et al*, 2009; CÉLIS, 2009; BUENO, 2008; ALVIM, 2005; DONG *et al*, 2007). A quantidade de recheio é bastante ampla nos estudos sendo que para óleos a razão 1:2 (recheio: material de parede) é bastante adequada (KONG *et al*, 2009; PRATA *et al*, 2007, MEDANHA *et al*, 2009; CÉLIS, 2009; BUENO, 2008; ALVIM, 2005; DONG *et al*, 2007).

Ainda em relação às matérias primas o uso de surfactante é aplicado em vários trabalhos sendo bastante amplo os tipos de surfactantes estudados, desde os aniônicos, catiônicos e não iônicos. Para a área de alimentos, os tipos de surfactantes permitidos são restritos e a maioria são os não iônicos.

Tirkkonen, Turakka e Paronen (1994) testaram surfactantes catiônico (cloreto de benzalcônio), aniônico (SLS – lauril sulfato de sódio) e não iônico (Tween 20 – HLB 16,7) para coacervação complexa de fenobarbitona com gelatina e goma arábica. As eficiências de encapsulação com uso de surfactante catiônico e Tween 20 foram superiores à amostra padrão.

Duquemin e Nixon (1986) testaram também surfactantes catiônico (cetrimida), aniônico (SLS – lauril sulfato de sódio) e não iônico (Tween 20 – HLB 16,7). A avaliação da eficiência de encapsulação foi feita através da liberação do recheio em meio a pH 2 e pH 9. Apenas com cetrimida a eficiência foi superior ao padrão e no caso de Tween 20, quanto menor a quantidade do surfactante melhor a eficiência de encapsulação.

Rabiskova *et al* (1994) verificaram que a adição de surfactantes pode afetar a absorção do óleo por dois diferentes mecanismos: melhorar a estabilidade da emulsão água/óleo resultando em altas quantidades de gotas de óleo disponíveis para absorção; alterar a tensão interfacial entre a gota de óleo e a fase coacervada e a relação interfacial de hidrofiliicidade/ hidrofobicidade das gotas de óleo. Foram testados surfactantes com valores de HLB de 1,8 a 15 na coacervação complexa de esqualeno com goma arábica e gelatina. Na adição de surfactantes de HLB 2,5 a 6 os resultados de eficiência de encapsulação foram altos (93,2 – 99,6%) e maiores que esqualeno sem adição de surfactante (73%). Houve uma queda na eficiência de encapsulação com adição de surfactantes com valores de HLB maiores que 6 e menores que 2,5 e a adição de surfactante com valor de HLB 15 não ocorreu a encapsulação. Estes dados são, provavelmente, consequência da alteração das afinidades superficiais das gotas de óleo na presença de surfactantes, pois a tendência da fase coacervada absorver as gotas de óleo reduz conforme aumenta a hidrofiliicidade da superfície das gotas. Desta forma o uso de surfactante de alto HLB resulta em baixa eficiência de encapsulação. Os estudos mostraram que a relação de hidrofiliicidade/ hidrofobicidade da interface influi mais na absorção do recheio pela fase coacervada que na redução da tensão interfacial.

Rabiskova e Valaskova (1998) testaram vários tipos de Span e Tween para obter diferentes valores de HLB a serem testados na coacervação complexa de óleo de soja, azeite de oliva e óleo de amendoim com gelatina e goma arábica. Testaram valores de HLB de 1,8 a 15 e obtiveram melhores resultados de eficiência de encapsulação na faixa de 1,8 a 6,7 (65-85%). Em HLB 10 e HLB 15 não ocorreu a encapsulação dos óleos. Isto confirmou a dependência da hidrofobicidade do recheio e o HLB do surfactante utilizado.

Em relação aos agentes reticulantes, a área de alimentos ainda está em fase de estudos, pois o melhor reticulante, o glutaraldeído, é uma substância proibida para uso em alimentos. Alguns estudos estão sendo realizados com a enzima transglutaminase obtendo resultados positivos, porém não adequados o bastante como o glutaraldeído, considerando custo e eficiência de reticulação. Na

coacervação complexa a reticulação oferece uma estabilidade melhor às cápsulas e é bastante necessária (CÉLIS, 2009; SOPER; THOMAS, 2001; DONG *et al*, 2007).

Uma utilização importante da microencapsulação é proteger ingredientes funcionais e ampliar sua aplicabilidade. O óleo de linhaça é uma fonte de ácido α -linolênico da família ômega 3 (Quadro 1) sendo intensamente estudado com resultados benéficos à saúde. Uma das linhas de estudos científicos na área da saúde é o balanço ômega 6 (n -6) / ômega 3 (n -3) na dieta. A grande parte dos alimentos possui na sua composição lipídica ômega 6, então a relação n -6 / n -3 tem sido alta, resultando em danos à saúde. A utilização de um ingrediente funcional rico em ômega 3 nos alimentos com base lipídica pode melhorar este balanço (SANTÁNA, 2004; SIMOPOULOS, 2008; WIESENFELD *et al*, 2003)

Quadro 1: Composição em ácidos graxos do óleo de linhaça (% , m/m)

Ácido Graxo	% ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	% ⁽³⁾	% ⁽⁴⁾
C16:0 ácido palmítico	5	5,7 – 7,0	4,75	5,3
C18:0 ácido esteárico	3	3,0 – 4,0	3,86	4,1
C18:1 n -9 ácido oléico	17	20 – 20,3	18,18	20,20
C18:2 n - 6 ácido linoléico	15	17 -17,3	15,38	12,70
C18:3 n -3 ácido α -linolênico	59	52 - 54	57,52	53,30
C 20:0 Ácido araquídico		< 0,1	0,15	
C 20:1 Ácido gadoleico			0,16	

Fontes: (1): OOMAH; MAZZA, 1998; (2): AOCS, 2006; (3): PELSER *et al*, 2007; (4): USDA, 2009

Devido ao alto grau de insaturação, o óleo de linhaça é bastante susceptível à oxidação sendo interessante sua encapsulação, além de se tornar um pó ampliando sua aplicabilidade.

Em relação ao processo, as condições de emulsificação da emulsão primária (material de parede com recheio hidrofóbico) são muito variadas. Tempos e velocidades de agitação são variados e muitos estudos mostram que quanto

maior a velocidade de agitação menor o tamanho das partículas, com eficiência de encapsulação maiores (TIRKKONEN; TURAKKA; PARONEN, 1994; ALVIM, 2005; BUENO, 2008; JÉGAT; TAVERDET, 2000). Em relação à ordem de adição dos ingredientes, existem algumas divergências. Vários trabalhos colocam a emulsão primária como sendo do recheio com a solução de goma arábica (RABISKOVA *et al*, 1994; CÉLIS, 2009; JÉGAT; TAVERDET, 2000; RABISKOVA; VALASKOVA, 1998; DUQUEMIN; NIXON, 1986; TIRKKONEN; TURAKKA; PARONEN, 1994; WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004). A goma arábica é um agente emulsionante pois possui uma parte protéica em sua estrutura, facilitando a emulsão. Segundo estudos de Célis (2009), a utilização da goma arábica emulsionada com o recheio hidrofóbico e posterior adição de gelatina foi mais eficiente (liberação 25% menor) comparada à emulsão primária preparada com gelatina e recheio hidrofóbico.

As condições de coacervação são extensamente avaliadas e variadas. Existem muitos estudos em relação ao melhor pH de coacervação e para o par gelatina e goma arábica o pH 4 é sempre um valor com eficiência de encapsulação alta. As temperaturas de trabalho ficam em torno de 40 e 50°C, para garantir que a gelatina esteja líquida não podendo ser muito alta para não interferir na qualidade do material de recheio. As velocidades do processo de coacervação também são variadas, em uma faixa de agitação baixa (200 - 600 rpm) apenas para garantir a não sedimentação da fase coacervada o que dificultaria a encapsulação do óleo. Velocidades muito altas são evitadas para não danificar as microcápsulas formadas. As condições de resfriamento são pouco detalhadas nos trabalhos, porém, após coacervação, a temperatura do sistema deve abaixar para 5–10°C garantindo a gelificação total da parede e a estabilidade estrutural da microcápsula quando o par gelatina e goma arábica é utilizado (TIRKKONEN; TURAKKA; PARONEN, 1994; DUQUEMIN; NIXON, 1986; JOUZEL *et al*, 2003; ALVIM, 2005; MEDANHA *et al*, 2009; BUENO, 2008; RABISKOVA; VALASKOVA, 1998; RABISKOVA *et al*, 1994; PRATA, 2007; JÉGAT; TAVERDET, 2000; KONG *et al*, 2009; DONG *et al*, 2007).

As condições de reticulação são dependentes dos agentes reticulantes e são necessárias parâmetros de processo adequados às condições ótimas de atividade de cada um. Soper e Thomas (2001) produziram microcápsulas de óleos essenciais (aromáticos) estáveis termicamente usando transglutaminase (TG) como agente reticulante e otimizaram as condições de processo da reação enzimática, em pH 7, temperatura de 5 a 10°C para manter a estabilidade estrutural do coacervado e relação gelatina:TG de 80:1, m/m. Dong *et al* (2007) utilizaram na reticulação de encapsulados de óleo de menta com gelatina e goma arábica a enzima transglutaminase em pH 6, temperatura de 10°C e relação gelatina:TG de 5:1, m/m. Célis (2009) estudou a adição de transglutaminase na reticulação de microencapsulados de óleo de girassol com oleoresina de páprica em gelatina e goma arábica utilizando pH 4, temperatura ambiente e alterando a concentração da enzima. Os resultados mais favoráveis foram para quantidade de enzima na concentração de 50U enzima/ g de proteína, ou seja, uma relação de gelatina:TG de 1,95:1, m/m.

Após a lavagem das microcápsulas, estas são filtradas e muitas vezes avaliadas somente nesta forma úmida. A secagem das microcápsulas pode ser feita em temperatura ambiente, por congelamento lento (congelador), congelamento rápido (nitrogênio), liofilização ou em estufa. De acordo com Alvim (2005), o processo de secagem por liofilização é um dos mais adequados e com melhores resultados comparado com métodos de spray dryer e estufa. Esta técnica consiste na saída de água através da sublimação dos cristais de gelo, e quanto mais rápido o congelamento, menor serão os cristais de gelo formados e, consequentemente, menores serão os poros formados (OZÓRIO, 2007). Segundo Prata (2006), antes da liofilização é necessário o congelamento lento em freezer, pois em estudos com congelamento rápido utilizando nitrogênio líquido, a morfologia das micropartículas foi totalmente alterada, resultando em estruturas mais frágeis e com muitos poros.

A avaliação dos processos de coacervação é feita através da caracterização morfológica das microcápsulas, eficiência e rendimento de

encapsulação, tamanho e distribuição do tamanho das partículas e liberação do material de recheio.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do uso de surfactantes com diferentes valores de HLB na produção de microcápsulas por coacervação complexa de óleo de linhaça em goma arábica e gelatina. Os parâmetros do processo foram baseados em estudos da literatura com o intuito de obter as microcápsulas com melhores características produzidas com surfactantes (dois valores de HLB) para posterior aplicação em emulsões. A avaliação foi feita através de eficiência e rendimento de encapsulação, morfologia das microcápsulas, tamanho de partículas e distribuição do tamanho de partículas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Goma arábica INSTATGUM AB (*Acácia Senegal*) – CNI Colloides Naturais Brasil; óleo de linhaça - Cisbra Alimentos, de Panambi, RS, Brasil; gelatina suína tipo A (P.I.: 7 – 9) - Gelita do Brasil; surfactantes Tween 80 (HLB 15) e Span 80 (HLB 4,3) – Croda do Brasil; Oleoresina de páprica – Kienast & Kratschmer Ltda ; Cloreto de cálcio Dehidratado - Nuclear -PAACS ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – PM 147,02); enzima Transglutaminase (MTG) de origem microbiana Ativa TG-S (78–126U/g) – Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda; enzimas protease bacteriana líquida Protex 6L - Genencor - Danisco , protease em pó Orientase 90N - Quest Int., alfa-amilase bacteriana líquida Thermamyl 2X, protease Alcalase e alfa-amilase BAN – Novozymes. água deionizada, Solução HCl 0,5 M e 0,1M; Solução NaOH 0,1M;

2.2 EQUIPAMENTOS

2.2.1 Equipamentos utilizados na produção das microcápsulas

Foram utilizados equipamentos de dois locais de trabalho, sendo designados a seguir:

I. Homogeneizador Ultraturrax TP 18– IKA-WERK (velocidade de agitação fixa de 20.000 rpm); pHmetro Schott Titroline; Banho Maria FANEM Modelo 100; agitadores magnéticos com aquecimento IKA RCT sem visor digital; balança analítica Ohaus modelo Adventurer.

II. Homogeneizador Ultraturrax TP 18 - IKA-WERK (velocidades variadas com possibilidade de ajuste); pHmetro Digimed mod. AS200C; Banho-maria Marconi; agitadores magnéticos digitais com aquecimento IKA RCT e com controle IKA RH KT/C; balança semi-analítica Marte mod. AS2000c.

Outros equipamentos em comum: peneira Granutest abertura $\phi 25 \mu\text{m}$ - Telastem Peneiras para Análises Ltda.; Liofilizador Supermodulyo 12 KFreeze Dryer –EDWARDS ; sistema de banho controlado Banho RC 20 e controle PM 351 Lauda E200; sistema de agitação Marconi.

2.2.2 Equipamentos utilizados para determinações analíticas

Microscópio ótico Jenaval - Carl Zeiss, Alemanha; Microscópio eletrônico de varredura Leo Electron Microscopy Ltda mod. 440i, e Polaron SC 7620 Sputter Coater, Inglaterra; Estufa Memmert; Destilador de nitrogênio Tecnal TE-036/1; bloco digestor Tecnal, Karl Fisher 832 KF Thermoprep - Metrohm e 701 KF Tritino e 703 Ti Stand.; Cromatógrafo Gasoso Capilar CGC Agilent 6850 Series GC System.

2.3. MÉTODOS

2.3.1 Caracterização físico –química das matérias primas

2.3.1.1 Determinação de umidade

A umidade da gelatina e da goma arábica foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 4 horas, segundo metodologia AOAC 954.10 (2005).

A umidade do recheio, mistura de oleoresina de páprica e óleo de linhaça (1:10) foi determinada segundo metodologia AOCS Ca 2c-25 (2004). Em todas as análises de umidade foram feitas triplicatas.

2.3.1.2 Determinação de proteína

O percentual de proteína contido na gelatina e goma arábica foi determinado através do método AACC 46-12 (1995), usando-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio para proteína. As análises foram feitas em triplicatas.

2.3.1.3 Identificação do material de recheio

A utilização da oleoresina de páprica juntamente com o óleo de linhaça foi definida para auxiliar nas imagens da microscopia ótica e na visualização do processo de produção das microcápsulas.

A identificação dos óleos e da mistura 1:10 de oleoresina de páprica e óleo de linhaça foi feita através da composição em ácidos graxos: Método AOCS Ce 2-66 (2004), sendo o preparo dos ésteres metílicos realizado conforme Hartman e Lago (1973). As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Gasoso Capilar CGC Agilent 6850 Series GC System, dotado de coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropyl – methylpolysiloxane), dimensões 60m, Ø int: 0,25mm, 0,25µm filme; fluxo na coluna de 1,00mL/min; velocidade linear de 24cm/seg; temperatura do detector 280°C; temperatura do injetor 250°C. Temperatura do forno: 110°C – 5

minutos, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 34 minutos; gás de arraste hélio; volume injetado 1,0µL, split 1:50.

2.3.2. Produção das microcápsulas

Para a produção de microcápsulas multinucleadas por coacervação complexa foram pré-determinadas as condições em relação às matérias primas e ao processo conforme Tabela 1.

As etapas de processo estão apresentadas na Figura 1 e descritas a seguir, sendo os parâmetros de processos adaptados de Thies (1994), Lamprecht, Schafer e Lehr (2000, 2001), Célis (2009), Alvim (2005), Prata (2006), Oliveira (2007), Bueno (2008), Jouzel et al (2003), Jegat e Taverdet (2000); Duquemin e Nixon (1986), Guo e Zhao (2008); Tirkkonen, Turakka e Paronen (1994); Dong *et al* (2007).

1- A primeira emulsão foi feita em Ultraturrax de 2,5 g de recheio com surfactante Span 80 em 100mL de solução de goma arábica (2,5%) com surfactante Tween 80 e cloreto de cálcio;

2- A emulsão formada foi adicionada em 100 mL de solução de gelatina e 400 mL de água deionizada sob agitação magnética;

3- Acerto do pH de coacervação foi feito com adição de soluções de HCl 0,5 M e 0,1M sob agitação magnética;

4- O sistema coacervado foi resfriado em banho de gelo com agitação magnética até 10°C, em aproximadamente 3 horas;

5- O sistema foi mantido em agitação até atingir temperatura de 20 - 25°C;

6- O processo de reticulação foi feito sob agitação magnética com acerto de pH, caso necessário, adicionando solução de NaOH 0,1M. A enzima MTransglutaminase foi dissolvida em 1 mL de água deionizada e adicionada ao sistema, mantido por 15h sob agitação;

7- Após reticulação os sistemas foram desligados e decantados;

8- Três lavagens com água deionizada foram feitas e as microcápsulas foram filtradas em peneira abertura $\phi 25 \mu\text{m}$;

9- As microcápsulas ficaram no mínimo 24h em congelador (-18°C) e posteriormente liofilizadas;

As soluções foram preparadas com água deionizada e a agitação mantida durante todo o processo. As produções foram feitas em triplicatas.

Tabela 1: Condições pré-determinadas das matérias primas para as produções de microcápsulas por coacervação complexa

Matérias primas (MP)	Condição
Solução goma arábica	2,5% (m/m)
Solução gelatina	2,5% (m/m)
Proporção gelatina : goma arábica	1 : 1
Proporção recheio: material de parede	1 : 2
Proporção gelatina : enzima TG	1,95 : 1
Proporção do recheio: oleoresina de páprica : óleo de linhaça	1 : 10
Processo	Condição
Emulsão primária	Solução de goma arábica + recheio
Tempo de emulsificação	1 min
Adição de Tween 80	Solução de goma arábica
Adição de Cloreto de cálcio	Solução de goma arábica
Adição de Span 80	recheio
pH de coacervação	4,0
Temperatura de processo	50°C
Agitação magnética na coacervação	380 rpm
Agitação magnética no resfriamento	450 rpm
Taxa de resfriamento (°C/ h)	12
Temperatura de reticulação	20-25°C
Tempo de reticulação	15 h

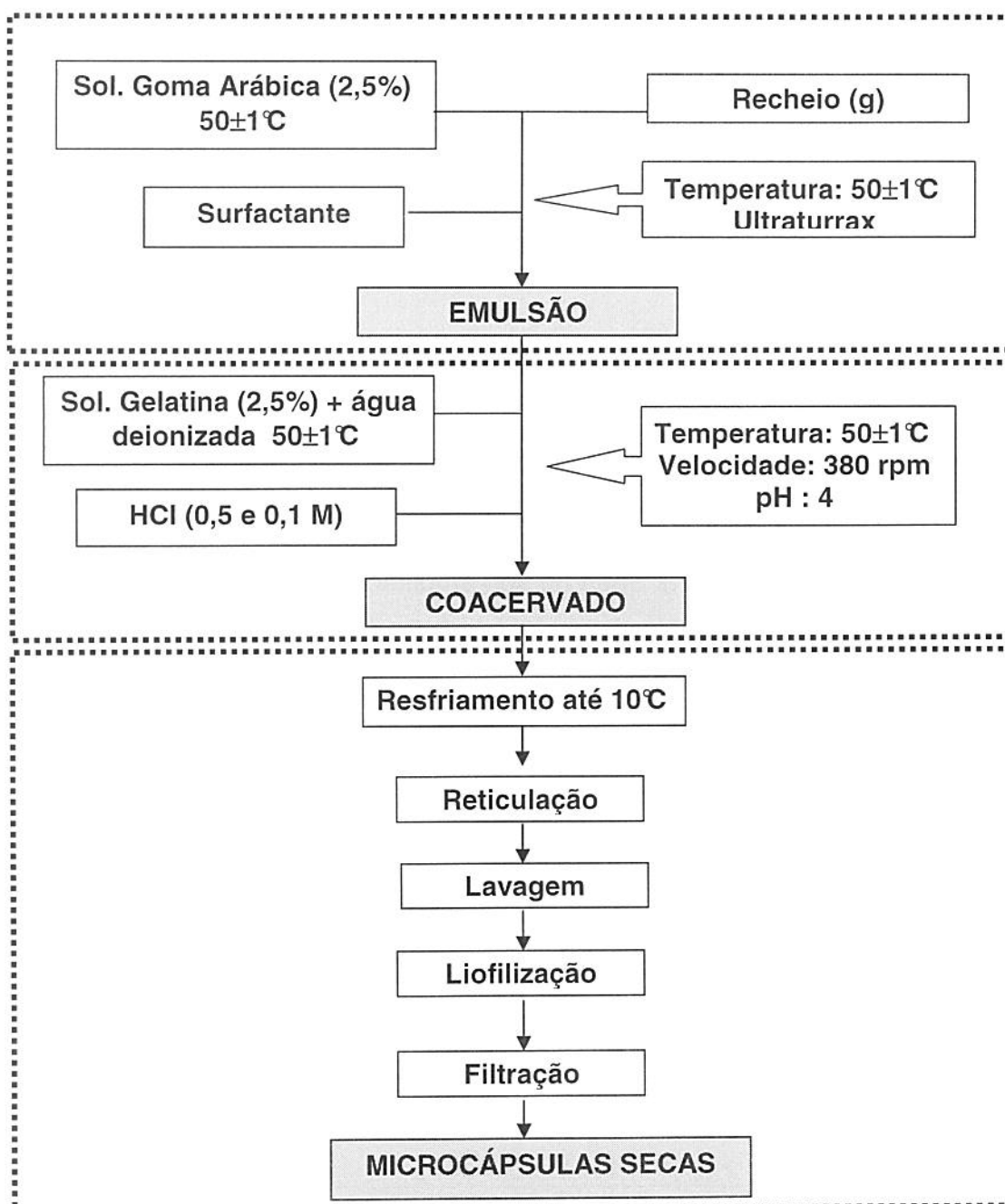


Figura 1: Processo de microencapsulação por Coacervação Complexa

2.3.2.1. Processos preliminares

Para a primeira produção os melhores sistemas de surfactantes obtidos no Capítulo 2 foram testados e foi avaliada a influência na encapsulação. As produções seguiram as condições descritas na Tabela 1, condições adicionais descritas na Tabela 2 e foram feitas em triplicatas independentes.

Tabela 2: Descrição das amostras e condições adicionais de processo - 1º Processo

Amostra	Condição	
Padrão (PCAL)	sem surfactante	sem cloreto de cálcio
HLB 4,3 (4CAL)	0,013% Span 80 sob emulsão	0,05% cloreto de cálcio sob emulsão
HLB 8,6 (8CAL)	0,008% Span 80 0,005% Tween 80 sob emulsão	0,08% cloreto de cálcio sob emulsão
HLB 6,45 (6CAL) (*)	0,010% Span 80 0,003% Tween 80 sob emulsão	0,05% cloreto de cálcio sob emulsão
MP e Processo	Condição	
Gelatina	Tipo A – Suína	
Material de recheio	Óleo de linhaça	
Equipamentos	Item 2.2.1 I	
Velocidade de agitação da emulsão	20.000 rpm	
pH reticulação	6,0	

(*): opção alternativa à HLB 8,6

A condição de HLB 8,6 não encapsulou, não formando as duas fases e com muito óleo aparente. Conforme capítulo 2, a condição de HLB 6,45 era uma opção adequada para emulsão, então foi utilizada como valor alto de HLB. Nas demais opções foi possível a coacervação analisada visualmente.

Para a avaliação do processo de resfriamento de forma mais controlada foram feitas duas produções simultâneas da condição padrão conforme descritos na Tabela 1 e adicionais da Tabela 3. Uma produção com resfriamento em banho de gelo (adição controlada de gelo) e outra opção utilizando um sistema de resfriamento controlado composto por um reator de vidro encamisado com circulação de água e sistema controlador que resfria a água até deixar o sistema em 10°C no tempo determinado de 3 horas. A velocidade de agitação foi alterada, pois o reator possui sistema de agitação por hélice com agitação mínima de 550 rpm, superior à utilizada de 450 rpm.

Tabela 3: Descrição das amostras e condições adicionais de processo - 2º Processo

Amostra	Condição
Padrão (PG e PB)	sem surfactante sem cloreto de cálcio
MP e Processo	Condição
Gelatina	tipo A – Suína
Material de recheio	Óleo de linhaça com oleoresina de páprica
Equipamentos	Item 2.2.1 I
Velocidade de agitação da emulsão	20.000 rpm
pH reticulação	6,0

PB: Amostra padrão em sistema de resfriamento com banho controlado

PG: Amostra padrão em sistema de resfriamento com banho de gelo

2.3.2.2. Processo de produção

Visando um processo padrão eficiente e com as avaliações de testes preliminares demonstrando necessidade de rigoroso controle das velocidades de agitação, foi alterado o sistema de produção para um mais controlado, descrito no item 2.2.1 II. Para avaliar a reticulação foram testadas duas condições, uma de pH 6 (próximo ao pH ótimo da transglutaminase) e outra de pH 4 (pH da coacervação)

(DONG *ET AL*, 2007; SOPER; THOMAS, 2001; CÉLIS, 2009; PRATA, 2006). A Tabela 4 apresenta a descrição das amostras e condições adicionais destes processos.

Tabela 4: Descrição das amostras e condições adicionais de processo - 3º Processo

Amostra	Condição	
Padrão (PCAD) *	sem surfactante	sem cloreto de cálcio
Padrão (PSAD)**		
HLB 4,3 (4CAD)*	0,013% Span 80 sob emulsão	0,05% cloreto de cálcio
HLB 4,3 (4SAD)**		sob emulsão
HLB 6,45 (6CAD)*	0,010% Span 80	0,05% cloreto de cálcio
HLB 6,45 (6SAD)**	0,003% Tween 80 sob emulsão	sob emulsão
MP e Processo	Condição	
Gelatina	tipo A – Suína	
Material de recheio	óleo de linhaça com oleoresina de páprica	
Equipamentos	Item 2.2.1 II	
Velocidade agitação da emulsão	14.000 RPM	
pH reticulação	pH 6 – PCAD* / 4CAD* / 6CAD* pH 4 – PSAD** / 4SAD** / 6SAD**	

2.3.3 Caracterização das microcápsulas

2.3.3.1 Determinação da umidade das microcápsulas

A umidade foi feita seguindo o método de Karl Fisher AOAC 977.10 (2005), utilizando aproximadamente 0,06g de amostra em equipamento 832 KF Thermoprep Metrohm, em triplicata.

2.3.3.2 Rendimento de processo de encapsulação

Para o cálculo de rendimento foi utilizada a Equação 1, considerando as microcápsulas secas .

$$\text{Rendimento (\%): } \frac{\text{g de micropartículas}}{\text{g material utilizado}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

2.3.3.3 Eficiência de encapsulação (EE)

A Eficiência de Encapsulação (EE) é definida como a razão entre a quantidade do recheio nas micropartículas e a adicionada durante a preparação, expressa em porcentagem, em base seca (b.s.) conforme Equação 2.

$$\text{EE (\%): } \frac{\text{óleo (mg) / microcápsulas em b.s.(mg)}}{\text{óleo inicial (mg) / massa inicial b.s. (mg)}} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Segundo resultado de Célis (2009), a degradação total da microcápsula para liberação total do recheio e avaliação da eficiência de encapsulação foi realizada através do uso de enzimas. Porém, com o intuito de não danificar o material de recheio foram testadas apenas enzimas do tipo proteases e amilases e não as lipases.

Foram feitos testes preliminares utilizando Protease Protex 6L (T: 50°C; pH 8,0; 0,5% por 1 h), alfa-amilase Thermamyl (T: 50°C; pH 6,4; 0,5% por 1 h), Protease Orientase (T: 50°C; pH 7,0; 0,25% por 1 h), Protease alcalase (T: 60°C; pH 7,0; 0,04% por 4 h) e alfa-amilase BAN (T: 60°C; pH 7,0; 0,04% por 4 h) (WU; JOHNSON; JUNG, 2009; FAN *et al*, 2003; NOVOZYMES, 2003).

Com estes testes e combinações deles foi definido como melhor desempenho a combinação de protease Protex 6L com alfa-amilase Thermamyl. A amostra foi avaliada em microscopia ótica e se comprovou a total degradação das microcápsulas. A partir disto, definiu-se o procedimento para a determinação da eficiência de encapsulação.

Foram preparadas soluções de enzimas protease Protex 6L (0,5%, m/m) e alfa amilase Thermamyl (0,5%, m/m) com água em pH 8 e colocadas em banho maria até obter temperatura de 50°C. Foram pesadas aproximadamente 100 mg de microcápsulas e adicionados 4 mL de cada solução. Estes sistemas permaneceram em banho maria a 50°C por 1 hora, sendo que a cada 10 minutos os tubos eram agitados por 20 s. Após este processo, os sistemas foram transportados para funis de separação, e com a adição de 10 mL de éter de petróleo e 10 mL de água deionizada iniciou-se a separação de fases. Após 15 horas foi possível separar a fase aquosa com os resíduos de material de parede. A fase oleosa foi colocada em balões tarados e por evaporação em rotoevaporador o solvente éter de petróleo foi removido. Os balões abertos foram colocados em estufa a 100°C/ 30 minutos. Por diferença de peso se obteve a quantidade de óleo das microcápsulas e calculou-se a eficiência de encapsulação pela Equação 2.

2.3.3.4 Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das micropartículas

A determinação de tamanho médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram feitas por microscopia ótica utilizando-se um microscópio ótico Jenaval – Zeiss (Alemanha) com captação de imagens através de uma câmera digital H1 1606, usando lente auxiliar optovar de 1,25 x e objetiva 12,5x. O programa de aquisição de imagens foi EDN-2 Microscopy Image Processing System o qual fez a captação e medidas das micropartículas. Foram medidas 500 micropartículas para cada amostra nas imagens captadas. As médias, desvio padrão e os gráficos destas medidas foram obtidos com auxílio do programa Microcal Origin Pro 8.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

2.3.3.5 Microscopia óptica e eletrônica de varredura

A avaliação morfológica das microcápsulas úmidas foi feita por microscopia ótica (MO), verificando a forma e estrutura interna utilizando o microscópio ótico Jenaval Carl Zeiss (Alemanha) com captação de imagens através de uma câmera digital H1 1606, usando lente auxiliar optovar de 1,25x e objetiva 12,5x. O programa de aquisição de imagens foi EDN-2 Microscopy Image Processing System.

A morfologia externa das microcápsulas liofilizadas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em pequenos pedaços de fita adesiva metálica de cobre dupla face, presas em *stubs* de alumínio de 1 cm de diâmetro por 1cm de altura. Esses conjuntos foram recobertos por uma camada de ouro em um evaporador Polaron SC 7620 - Sputter Coater. As imagens foram observadas posteriormente em microscópio eletrônico de varredura Leo Electron Microscopy Ltda mod. 440i.

2.3.4 Análise da estabilidade oxidativa do material de recheio

A análise da estabilidade oxidativa do material de recheio foi realizada das amostras secas e úmidas. A análise foi fundamentada na oxidação e degradação dos carotenóides presentes na fase oleosa da oleoresina de páprica, visualmente perceptível através da descoloração do pigmento. Os carotenóides sofrem autooxidação rapidamente e em presença de oxigênio, funcionam como pró-oxidantes, acelerando a oxidação (PÉREZ-GÁLVEZA; MINGUEZ-MOSQUERA, 2004). Conforme estudos de Santos, Ferreira e Grosso, 2000, a presença de luz e temperaturas altas também foram responsáveis pela oxidação e alteração da coloração da oleoresina de páprica, porém o oxigênio afeta mais rapidamente.

Todas as amostras foram deixadas em contato direto com o ar, sendo que as secas ficaram em temperatura ambiente e as úmidas em geladeira para que não ocorresse o crescimento de fungos. Foram registradas imagens fotográficas em diferentes tempos, 0 e 3 dias para amostras secas, 0 e 15 dias para amostras

úmidas e 0 e 7 dias para as amostras reidratadas. Estas imagens foram feitas após 4 meses de produção das microcápsulas.

2.3.5 Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios experimentais foram avaliados estatisticamente por meio do programa estatístico Statistica 5.0 - Statsoft, USA (STATISTICA, 1995) com nível de significância de 5% para teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO –QUÍMICA DAS MATÉRIAS PRIMAS

A goma arábica apresentou umidade de $10,17 \pm 0,24$ % e 2,91% de proteína e a gelatina umidade de $10,80 \pm 0,04$ % e 92,6 % de proteína.

O material de recheio na proporção de 1:10 de oleoresina de páprica e óleo de linhaça obteve $0,07 \pm 0,01$ % de umidade e a composição de ácidos graxos do óleo de linhaça, oleoresina de páprica e do recheio (oleoresina de páprica e óleo de linhaça na proporção 1:10) estão descritas na Tabela 5.

Os valores de composição em ácidos graxos obtidos para linhaça seguiram valores próximos aos definidos por Oomah e Mazza (1998) e AOCS (2006). Para oleoresina de páprica, segundo Pérez-Gálvez *et al* (1999), sua composição em ácidos graxos é predominante de ácido linoléico, com 77%, podendo variar entre as diferentes espécies.

Tabela 5: Composição em ácidos graxos (%) dos materiais de recheio

Ácidos Graxos	Óleo de linhaça	Oleoresina de páprica	Recheio 1:10 (*)
Ácido Palmítico (C 16:0)	6,21	17,73	7,00
Ácido Estearico (C 18:0)	5,54	3,09	5,33
Ácido Oléico (C 18:1)	21,86	10,13	20,98
Ácido Linoleico (C 18:2)	14,93	62,07	18,08
Ácido Linolênico (C 18:3)	50,82	5,34	47,90
Ácido Araquídico (C 20:0)	0,19	0,57	0,22
Ácido Gadoléico (C 20:1)	0,13	0,11	0,12
Ácido behênico (C 22:0)	0,18	0,52	0,21
Ácido lignocérico (C 24:0)	0,13	0,44	0,15

(*): composição do recheio: oleoresina de páprica e óleo de linhaça na proporção de 1:10

3.2. PRODUÇÃO DAS MICROCAPSULAS

3.2.1 Testes preliminares

Como em testes preliminares a condição de utilização de surfactante com HLB 8,6 não conseguiu encapsular o recheio, optou-se por utilizar um surfactante com HLB 6,45 na mesma concentração, conforme opção dos resultados do capítulo 2. A eficiência foi feita para PCAL (padrão) e 4CAL (HLB 4,3), obtendo valores de 68% e 93%, respectivamente. Para as microcapsulas 6CAL (HLB 6,45) a eficiência de encapsulação não foi feita, pois houve muito óleo sobrenadante após reticulação e na microscopia ótica foi possível verificar as microcapsulas vazias.

As medidas de tamanho de partículas e sua distribuição em forma de histogramas das amostras PCAL e 4CAL estão mostradas na Figura 2. Para

avaliar a dispersão dos resultados de tamanho de partículas, que podem ser atribuídos à imprecisão do controle da taxa de resfriamento do banho de gelo e da velocidade de agitação, surgiu a necessidade de avaliar o controle do resfriamento.

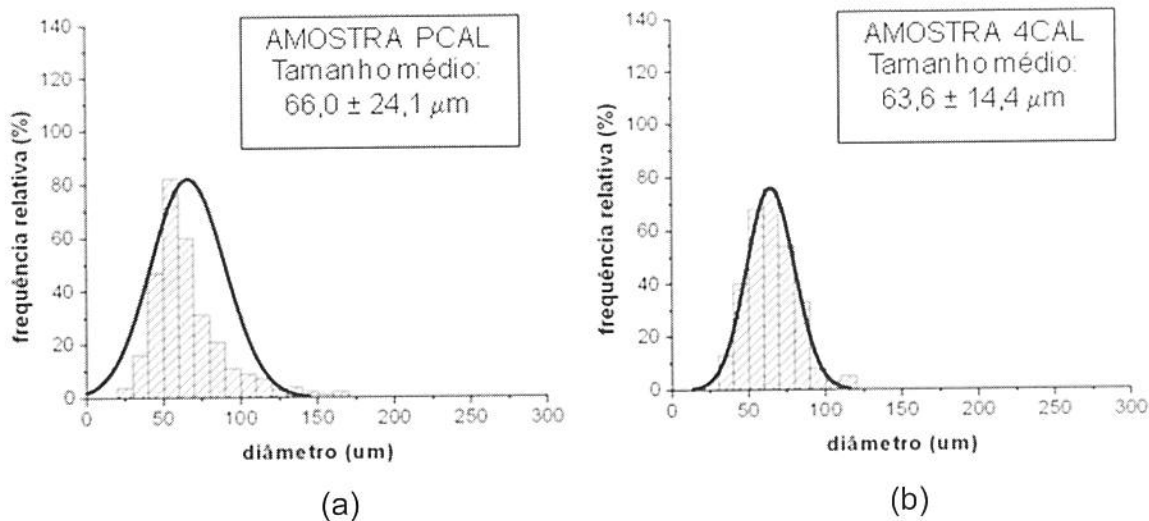


Figura 2. Histogramas da distribuição do tamanho de partículas das microcápsulas. (a) amostra padrão PCAL sem surfactante, 20.000 rpm, pH reticulação 6; (b) amostra 4CAL com surfactante HLB 4,3, 20.000 rpm, pH reticulação 6. Foram medidas 300 microcápsulas de cada.

Em relação aos testes com banho controlado foram observados dois resultados que podem ser verificados na Figura 3. Confirmando os estudos de Jegat e Taverdet (2000), Alvim (2005), Prata (2006), Célis (2009), Jouzel *et al* (2003) e Dong *et al* (2007), o aumento da velocidade de agitação proporciona menores tamanhos de partículas observadas nas amostras PB (550rpm) em comparação com PG (450 rpm).

Outro resultado verificado foi a menor dispersão relativa do tamanho das partículas produzidas no banho controlado em relação ao banho de gelo, ou seja, o controle da taxa de resfriamento proporcionou partículas com uma uniformidade maior de tamanho entre elas. Este tipo de processo se torna interessante para escala piloto de produção.

A partir destes testes observou-se a necessidade de produção das microcápsulas em condições mais controladas, alterando os processos seguintes para a utilização dos equipamentos descritos no item 2.2.1 II.

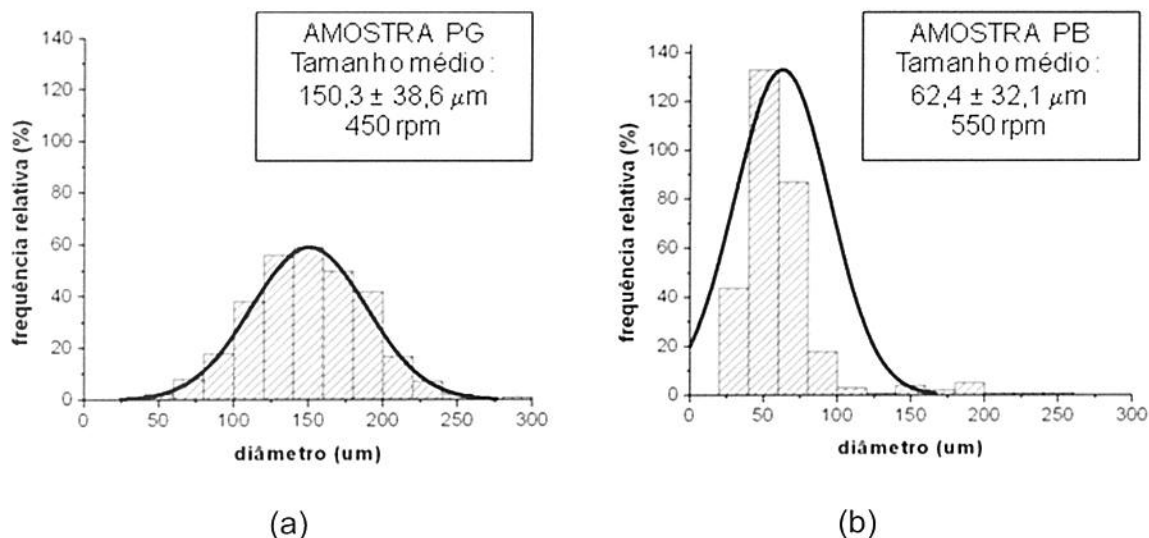


Figura 3. Histogramas da distribuição do tamanho de partículas das microcápsulas padrão no processo de resfriamento com banho de gelo e banho controlado. (a) amostra padrão PG em banho de gelo, 20.000 rpm, pH reticulação 6; (b) amostra padrão PB em banho controlado, 20.000 rpm, pH reticulação 6

3.2.2 Processo de produção

Foram produzidas as amostras PCAD (padrão), 4CAD (HLB 4,3), 6CAD (HLB 6,45), PSAD (padrão), 4SAD (HLB 4,3), 6SAD (HLB 6,45), porém as produções das amostras com HLB 6,45 resultaram em microcápsulas vazias e muito óleo sobrenadante, demonstradas na Figura 4. No caso das amostras 6SAD foi observada a presença de menor número de microcápsulas vazias que 6CAD, porém as gotas de recheio estão concentradas na borda da parede, facilitando sua liberação da microcápsula. Com estes resultados as análises seguintes foram feitas apenas para as amostras padrão e com HLB 4,3. Como Rabiskova *et al* (1994), as emulsões de goma arábica, óleo e surfactante ficaram relativamente instáveis, porém até a coacervação mantiveram-se estáveis.

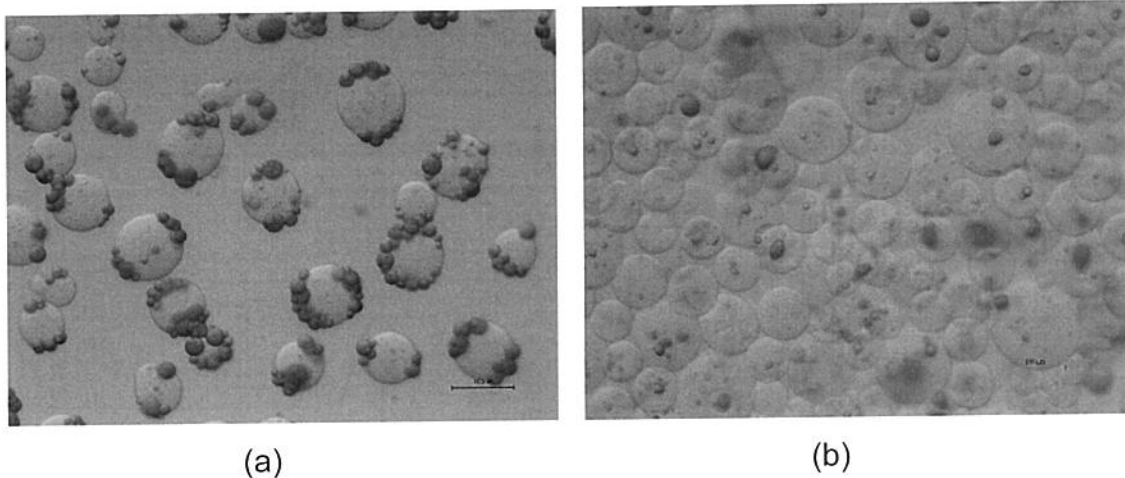


Figura 4: Microcápsulas vazias produzidas com surfactante HLB 6,45. (a): 6SAD: microcápsula com surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4; (b): 6CAD: microcápsula com surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6. Barras Microscopia óptica = 100 μ m

3.2.3 Caracterização das micropartículas

A Tabela 6 e a Figura 5 apresentam os valores encontrados na caracterização das microcápsulas.

Avaliando os resultados, os valores de rendimento não foram altos mas, no processo existem vários pontos críticos de controle onde ocorrem perdas não monitoradas. Isto pode ser melhorado com um eficiente controle de processo. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, portanto o uso de surfactante não influenciou no rendimento do processo. Valores de rendimento são muito variados em processos de coacervação, segundo Prata *et al*, (2007) podendo variar de 32 – 84%.

Tabela 6. Caracterização das microcápsulas Padrão e com surfactante

Amostra	Umidade (%)	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Tamanho médio (μm)
PCAD	$6,37 \pm 0,77^{(a)}$	$67,09 \pm 9,58^{(a)}$	$62,25 \pm 7,19^{(a)}$	$134,37 \pm 32,70^{(a)}$
4CAD	$6,60 \pm 2,13^{(a)}$	$65,85 \pm 9,68^{(a)}$	$70,15 \pm 9,99^{(a)}$	$121,43 \pm 35,60^{(a)}$
PSAD	$4,80 \pm 0,34^{(a)}$	$61,58 \pm 5,32^{(a)}$	$60,03 \pm 11,88^{(a)}$	$96,68 \pm 19,44^{(b)}$
4SAD	$7,47 \pm 0,53^{(a)}$	$62,69 \pm 2,83^{(a)}$	$76,31 \pm 2,64^{(a)}$	$88,99 \pm 17,16^{(b)}$

Média com as mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6

4CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6

PSAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4

4SAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 4

Em relação à eficiência, os valores das médias não diferem entre si ao nível de significância de 5%, porém existe diferença significativa ao nível de significância de 10% entre as amostras padrão e com surfactante HLB 4,3 no processo sem a alteração de pH de reticulação. Isto indica uma melhoria de eficiência com uso de surfactante HLB 4,3.

As eficiências de encapsulação das amostras com surfactante foram de 60 e 76%, sendo próximo de valores encontrados por Rabiskova e Valaskova (1998) os quais conseguiram aproximadamente 68 a 75% de eficiência de encapsulação utilizando surfactante HLB 4,3 de microcápsulas de diferentes óleos com gelatina e goma arábica.

Em estudos de Rabiskova *et al* (1994), com ácido oléico (HLB 1) e Squaleno (HLB =0) que são hidrofóbicos, obtiveram eficiência de encapsulação de 73 e 61%, respectivamente. A eficiência de encapsulação pode ser um resultado das afinidades de suas respectivas superfícies ou depender da estabilidade da emulsão. Gotas de óleo coalescidas e separação de fases prejudicam a encapsulação, pois diminuem a quantidade de gotas disponíveis comparadas a um sistema de emulsão ideal.

Tirkkonen, Turakka e Paronen (1994), conseguiram uma melhoria de eficiência de encapsulação com o uso de Tween 20 (HLB 16,7), porém as

concentrações utilizadas foram de 0,00075%, 0,0014% e 0,003%. O tamanho das partículas ficou maior que o padrão, indicando relação direta entre tamanho de partícula e concentração de surfactante.

A coacervação complexa de C₁₂OH (dodecanol) com gelatina (GE) e goma arábica (GA) foi otimizada por Kong *et al* (2009) através da mistura de GE e GA com pH pré-ajustado para 4,0 e razão entre os biopolímeros 1:1. A alta encapsulação de C₁₂OH passou de 80% com 1% (m/m) de Tween 20 e Span 80, dispersos com base nos materiais de parede.

Entre as amostras sem surfactantes (PCAD e PSAD), os valores de eficiência foram mais baixos, na faixa de 60%. Segundo Célis (2009), que utilizou goma arábica, gelatina e óleo de soja com oleoresina de páprica, obteve 87,90% de eficiência de encapsulação para condições de processo muito próximas às utilizadas neste trabalho, podendo ter havido alguma alteração nas microcápsulas no processo de liofilização. Para Prata (2006), as eficiências de encapsulação foram entre 75,6 e 95,4% para micropartículas de óleo de vetiver úmidas sem reticulação e reticuladas com glutaraldeído, respectivamente, sem utilização de surfactantes. A eficiência de encapsulação em sistemas coacervados está associada a condições de materiais e processo, que são muito variados, sendo necessária a avaliação caso a caso.

Analisando os tamanhos de partículas houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras em relação ao processo, mas não em relação ao uso de surfactante. As microcápsulas produzidas sem alteração de pH de reticulação, padrão e com surfactante HLB 4,3 ficaram menores que as que foram produzidas com ajuste de pH para 6,0 na reticulação.

Célis (2009) em processo semelhante e sem alteração de pH de reticulação obteve tamanhos de partículas de 60,92 a 87,90 μm , ainda inferiores ao obtido neste trabalho, porém as partículas produzidas por coacervação complexa podem variar de 1 a 500 μm (MUKAI-CORREA, 2003).

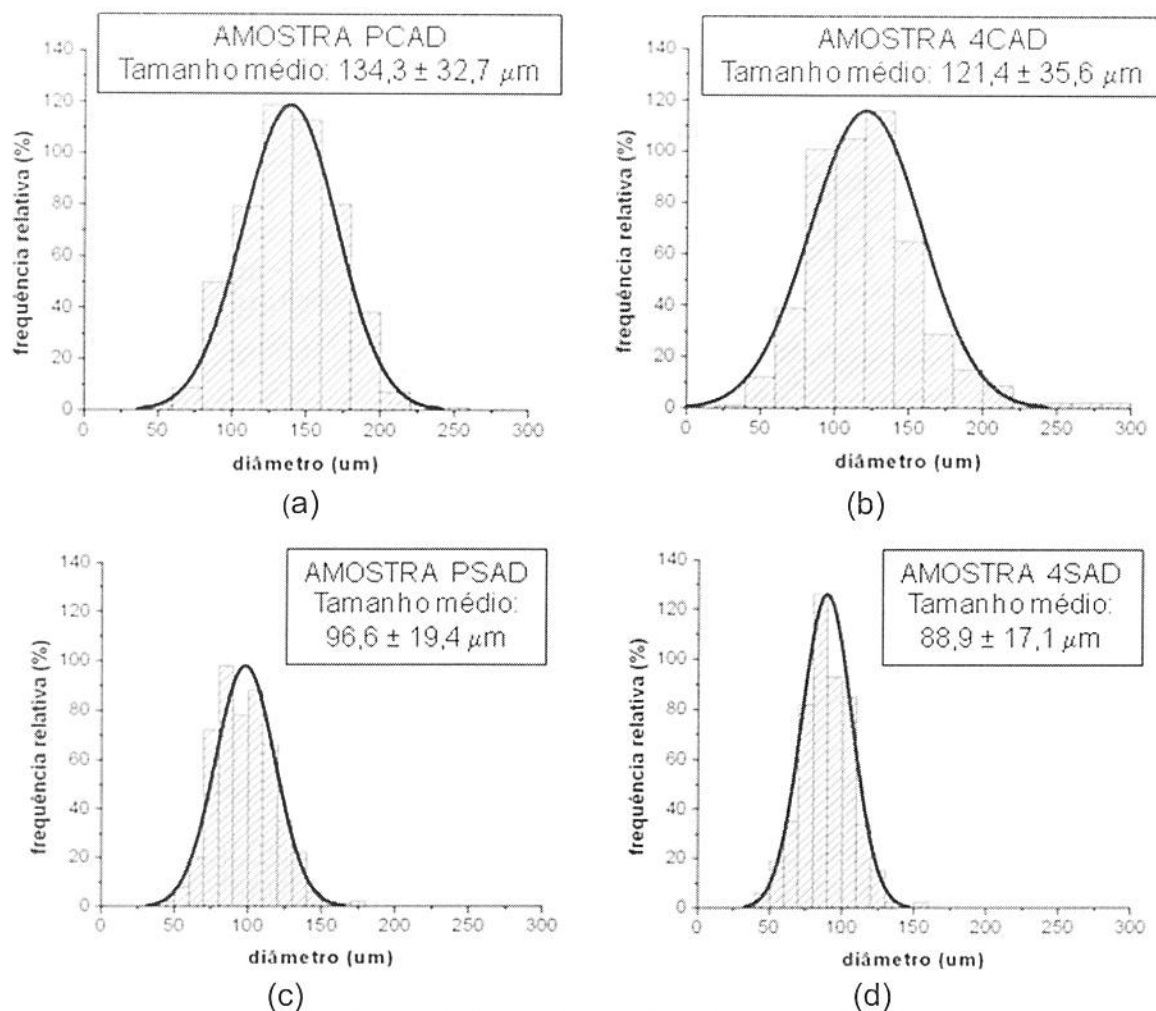


Figura 5: Histograma da distribuição do tamanho de partículas das microcápsulas. PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6; 4CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6; PSAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4; 4SAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 4

Os histogramas da Figura 5 mostram um perfil de distribuição unimodal em todos os casos, demonstrando comportamento menos polidesperso para amostra 4SAD, produzida com surfactante (HLB 4,3), pH de reticulação 4 e 14.000 rpm de agitação.

Em relação ao tamanho de partículas podemos analisar também os resultados da Tabela 7, referentes aos valores de tamanho de partículas dos processos com diferença apenas da velocidade de agitação da emulsão inicial de goma arábica com o recheio. Foram obtidos tamanhos de partículas menores para os testes com velocidade de agitação maiores, tanto para amostra padrão como para amostra com surfactante (HLB 4,3).

Jouzel *et al* (2003), avaliaram alterações na velocidade de agitação da emulsão e do processo. Avaliaram a velocidade, temperatura e tempo de emulsificação em função do tamanho das partículas. Para a faixa de temperatura estudada (40–60°C) o aumento da velocidade de agitação resultou em decréscimo do tamanho de partícula, sendo avaliadas velocidades mais próximas das utilizadas neste trabalho, faixa de 7.000 a 22.000 rpm. A velocidade indicada como ótima foi de 17.000 rpm. Tirkkonen, Turakka e Paronen (1994) e Dong *et al* (2007) também avaliaram a velocidade de agitação e tamanho de partícula e obtiveram resultados com a mesma correlação.

Tabela 7: Dados de tamanho de partículas das amostras com diferentes condições de processo – velocidade de agitação da emulsão

Amostra	Tamanho médio (µm)
PCAL	66,00
PCAD	134,37
4CAL	63,58
4CAD	121,43

PCAL: microcápsula sem surfactante; 20.000rpm; pH reticulação 6

PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6

4CAL: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 20.000rpm; pH reticulação 6

4CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6

Duquemin e Nixon (1986) testaram as velocidades de 180, 250 e 500 rpm para todo o processo e obtiveram microcápsulas com tamanho de partícula menor de acordo com o aumento da velocidade de agitação. Guo e Zhao (2008) testaram velocidades de 700 a 1200 rpm e obtiveram tamanhos de 60 a 31 µm,

comprovando a relação da velocidade de agitação e tamanho das partículas, além da melhora da distribuição do tamanho de partículas.

3.2.3.1 Microscopia ótica (MO) e eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia ótica foi utilizada durante todo o processo sendo registradas imagens de todas as fases de processo. Durante estas captações de imagens, um tipo de avaliação foi comparar imagens da etapa antes da reticulação, ou seja, antes do acerto de pH para 6,0 e adição da enzima e de imagens da mesma amostra após lavagem. As microcápsulas perderam muito óleo após este processo e muitas apareceram trincadas conforme verificado na Figura 6.

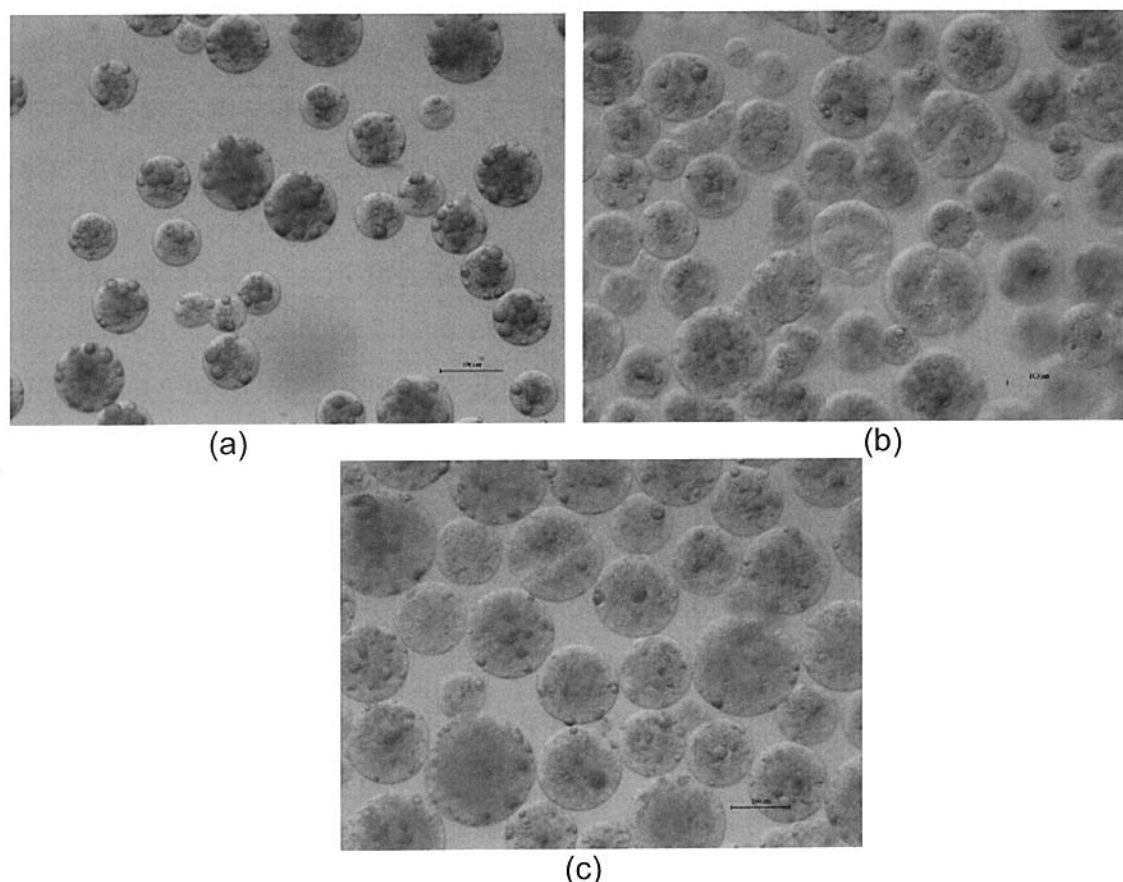


Figura 6: Imagens de microcápsulas rachadas. (a): 4CAD antes do acerto de pH e da adição enzima; (b): 4CAD após a lavagem; (c): PCAD após a lavagem. Barras Microscopia ótica = 100 μ m

PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6

4 CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6

Conforme Tolstoguzov (1996), os coacervados são insolúveis e são estes agregados insolúveis que irão se concentrar nas gotas coacervadas líquidas, conduzindo a uma separação de fases e este processo de associação é reversível, sendo que a titulação básica pode torná-los solúveis novamente. Verificando a Figura 6 talvez tenha ocorrido esta solubilização do coacervado com o acerto do pH para 6,0, tornando a cápsula mais instável permitindo seu rompimento durante as 15 horas de reticulação.

Mesmo com estas verificações visuais não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de eficiência de encapsulação das amostras sem e com acerto de pH de reticulação para 6 (Tabela 6). Porém, em relação ao diâmetro das partículas, verifica-se diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$) com acerto de pH 6 (PCAD e 4CAD) e as amostras sem acerto de pH (PSAD e 4SAD). Para as primeiras, o diâmetro foi maior, podendo se referir também ao processo de perda da insolubilidade do complexo. Ocorreu da mesma forma para amostras padrão e com HLB 4,3 (Tabela 6).

O processo de reticulação com transglutaminase deve ser estudado com mais detalhes, pois para manter a condição favorável à enzima ocorreu redução de eficiência na produção das microcápsulas. Em estudos de Soper e Thomas (2001) e Dong *et al* (2007) a alteração de pH para 7 e 6, respectivamente, foi feita em temperatura do sistema de 10°C e o tempo de reticulação foi de 16 h e 6 h, respectivamente, ambos obtendo bons resultados.

Na avaliação morfológica das microcápsulas, através da microscopia ótica todas as amostras úmidas mostraram morfologia de micropartículas esféricas com distribuição multinuclear do recheio características de microcápsulas coacervadas. Estas imagens podem ser vistas nas Figuras 7(a), 7(d), 8(g) e 8(j).

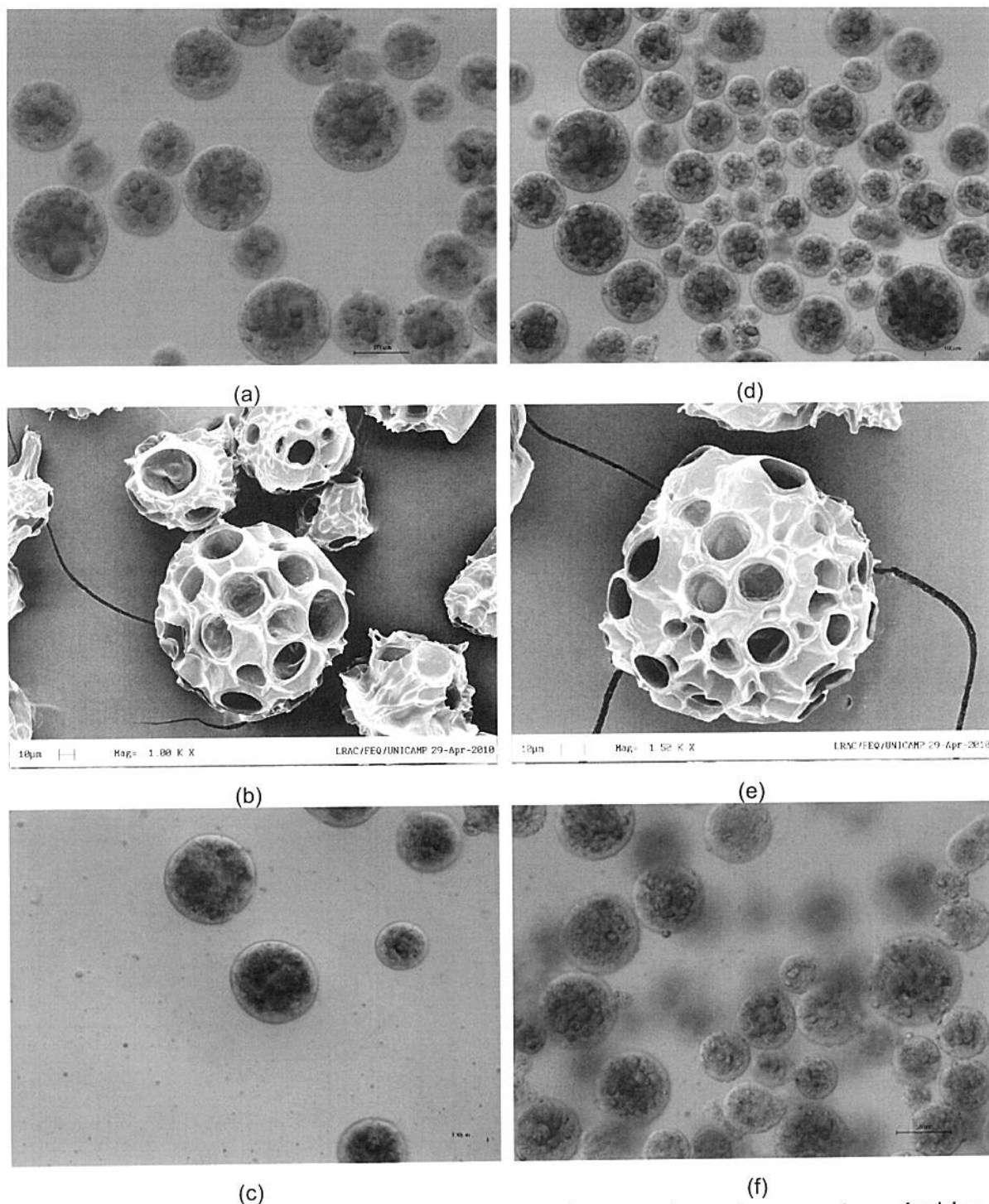


Figura 7: Imagens de microscopia ótica e de varredura de amostras úmidas, liofilizadas e reidratadas. Imagem ótica úmida: (a) PCAD e (d) 4CAD; Imagem MEV seca: (b) PCAD e (e) 4CAD; Imagem ótica reidratada: (c) PCAD e (f) 4CAD. Barras Microscopia ótica = 100 μ m e MEV=3 μ m

PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6
 4 CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6

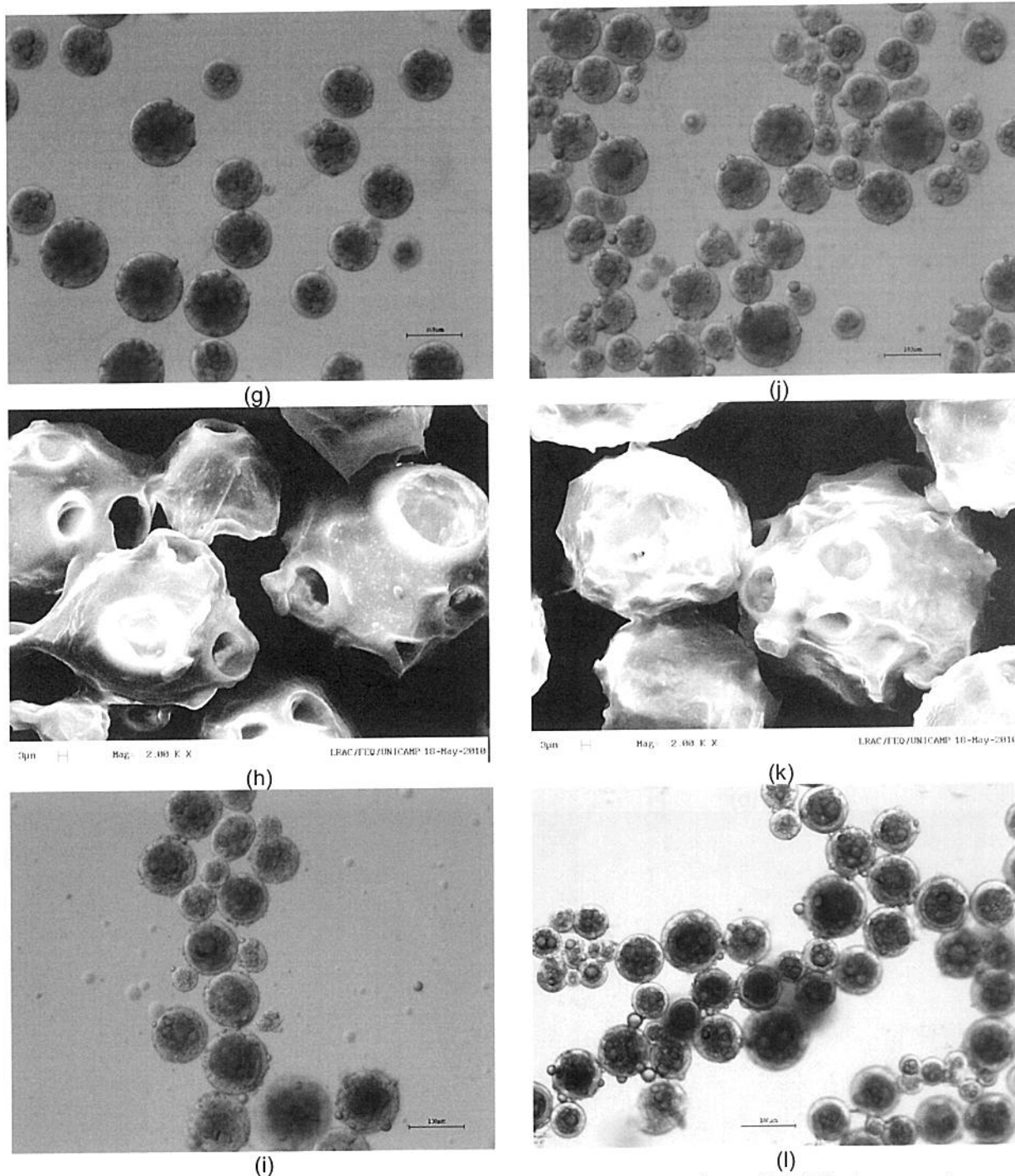


Figura 8: Imagens de microscopia ótica (MO) e de varredura (MEV) de amostras úmidas, liofilizadas e reidratadas. Úmidas - MO: (g) PSAD e (j) 4SAD; Liofilizadas – MEV: (h) PSAD e (k) 4SAD; Reidratadas – MO: (i) PSAD e (l) 4SAD. Barras Microscopia ótica = 100µm e MEV=3µm

PSAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4;
 4SAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível verificar a estrutura externa e característica da parede das microcápsulas. Em todas as amostras foi observada estrutura de parede rugosa com muitos poros, conforme Figuras 7(b), 7(e), 8(h) e 8(k). As estruturas das microcápsulas com acerto de pH para 6 (PCAD e 4CAD) aparentaram poros maiores que as amostras sem acerto de pH (PSAD e 4SAD).

De acordo com a química dos colóides, as micelas de coacervados possuem morfologia tipo esponja, que é formada em função da entropia do sistema na desestabilização da estrutura lamelar (organizada). As camadas lamelares se tornam multiconectadas no formato de cela com curvaturas Gaussianas negativas até a formação da estrutura esponja (STREY *et al*, 1990; MENDER *et al*, 2000; HOFFMANN, THUNIG, MUNKERT, 1992).

Esta morfologia esponja pode ser verificada na MEV das microcápsulas por coacervação complexa deste trabalho. Mesmo sendo uma característica dos coacervados, as microcápsulas produzidas formaram poros muito grandes tornando a estrutura frágil. O processo de liofilização foi muito drástico para esta estrutura formada e esta fragilidade pode ser oriunda de muitos fatores relativos às matérias primas e processo. Prata (2006) obteve microcápsulas com parede danificada e com poros em processo de secagem rápida com nitrogênio líquido.

Os poros formados foram muito grandes e não formaram uma estrutura rígida que suportasse um processo rigoroso de secagem. Muitas hipóteses podem ser feitas em relação às matérias primas e aos parâmetros de processo.

Provavelmente o processo de coacervação complexa não ocorreu no potencial zeta 0, ou seja, as cargas não ficaram neutras totalmente no pH 4. Uma hipótese é a não total dissolução dos materiais de parede ou matérias primas com composições diferentes. Em relação ao processo, como houve presença de furos em maior quantidade nas microcápsulas que sofreram alteração de pH de reticulação, a entropia do sistema pode ter sido alterada com adição da base para alteração de pH para 6 e modificado a estrutura do coacervado.

O processo de secagem deve ser avaliado em relação ao pré-tratamento, ou seja, o congelamento antes da liofilização também pode ser uma etapa que

fragilize a estrutura da parede pela formação de grandes cristais, sendo interessante a pré-secagem em temperatura ambiente para remoção da água em excesso. São muitos os fatores que podem ter afetado e somente comprova a complexidade de um processo de microencapsulação por coacervação complexa.

Mesmo com esta estrutura frágil, as microcápsulas secas foram reidratadas e retornaram à estrutura encontrada nas amostras úmidas iniciais, conforme imagens de microscopia ótica das Figuras 7(c), 7(f), 8(i), e 8(l). Estas imagens mostram que mesmo danificadas pelo processo de secagem, ao serem reidratadas retomam a estrutura de microcápsulas multinucleadas, porém pode ser explicado os valores mais baixos obtidos de eficiência de encapsulação em relação aos dados de literatura.

Após análise dos resultados de eficiência de encapsulação, distribuição de tamanhos de partículas e tamanho de partícula associados aos aspectos morfológicos observados por microscopia ótica e de varredura das microcápsulas podemos definir as amostras PSAD e 4SAD como as amostras padrão e com surfactante mais adequadas entre todas produzidas.

3.2.3.2 Análise da estabilidade oxidativa do material de recheio

Os resultados da avaliação da estabilidade oxidativa das amostras úmidas, secas e reidratadas estão mostrados nas Figuras 9, 10 e 11. As amostras úmidas após 15 dias ainda apresentaram coloração alaranjada forte. As amostras secas perderam a coloração rapidamente, em apenas 3 dias e as amostras secas reidratadas perderam a coloração após 8 dias.

As amostras já iniciaram os testes com uma parte oxidada, porém pode-se verificar que possivelmente a presença da água de reidratação tornou as microcápsulas secas mais estáveis à oxidação, porém é necessária uma análise quantitativa de coloração.

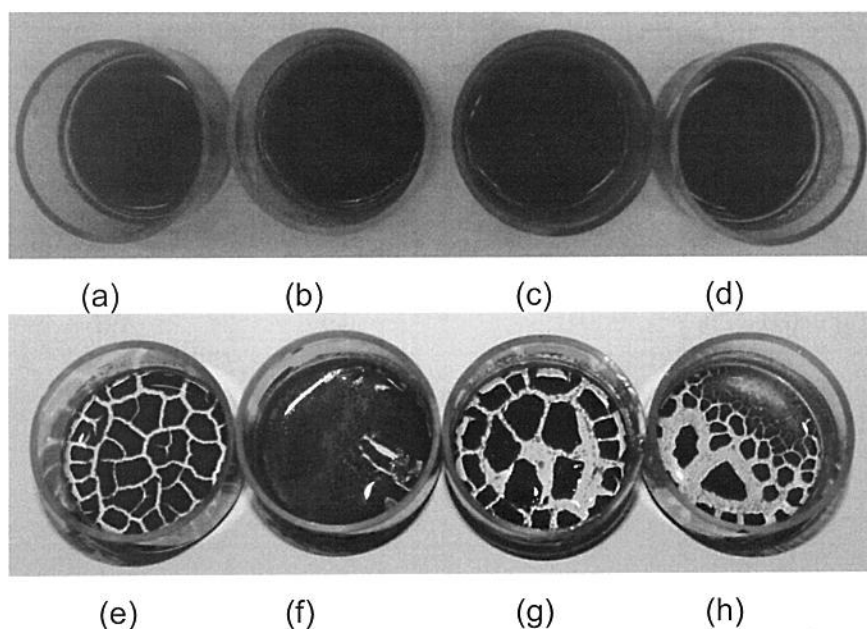


Figura 9: Imagens de microcápsulas úmidas para avaliação de oxidação do recheio expostas ao ar. Tempo 0: (a) PCAD; (b) 4CAD; (c) PSAD; (d) 4SAD. Tempo 15 dias: (e) PCAD; (f) 4CAD; (g) PSAD; (h) 4SAD.

PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6
 4 CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6
 PSAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4
 4 SAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 4

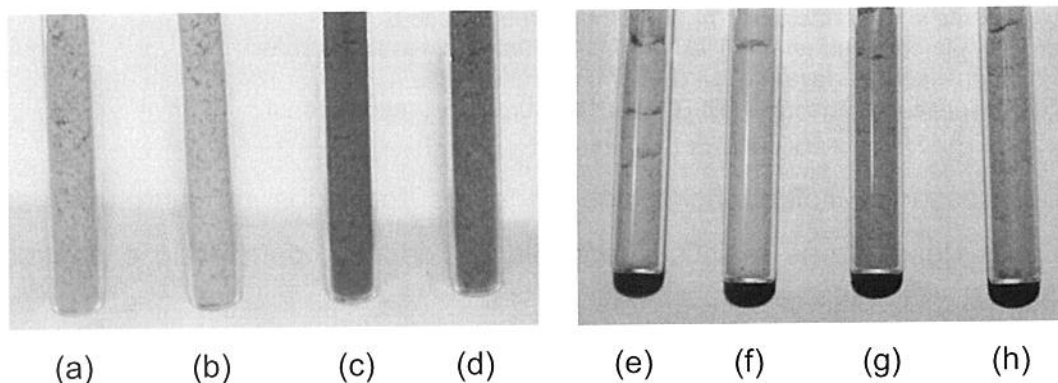


Figura 10: Imagens de microcápsulas secas para avaliação de oxidação do recheio expostas ao ar. Tempo 0: (a) PCAD; (b) 4CAD; (c) PSAD; (d) 4SAD. Tempo 3 dias: (e) PCAD; (f) 4CAD; (g) PSAD; (h) 4SAD.

PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6
 4 CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6
 PSAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4
 4 SAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 4

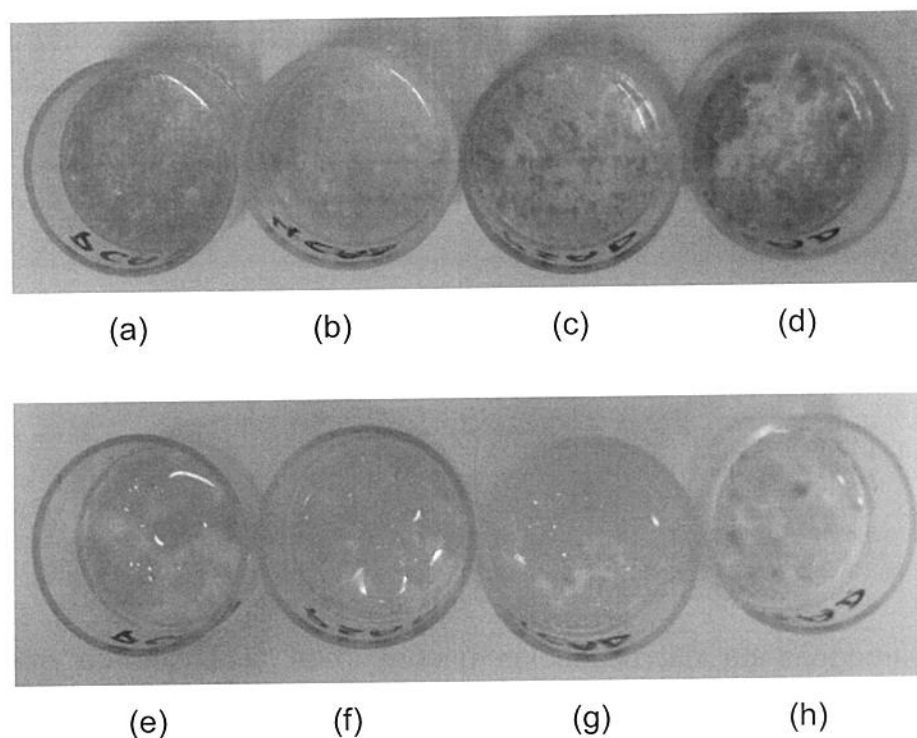


Figura 11: Imagens de microcápsulas secas reidratadas para avaliação de oxidação do recheio expostas ao ar. Tempo 0: (a) PCAD; (b) 4CAD; (c) PSAD; (d) 4SAD. Tempo 8 dias: (e) PCAD; (f) 4CAD; (g) PSAD; (h) 4SAD.

PCAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 6

4 CAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 6

PSAD: microcápsula sem surfactante; 14.000rpm; pH reticulação 4

4 SAD: microcápsula com surfactante HLB 4,30; 14.000rpm; pH reticulação 4

O processo de liofilização expõe os poros formados na estrutura das microcápsulas deixando-as mais susceptíveis à oxidação, permitindo o contato maior do óleo encapsulado com o ar.

4 CONCLUSÕES

Altos valores de HLB dificultam a encapsulação, em concentrações superiores a 0,0133 % (m/m) da emulsão inicial.

Na produção das microcápsulas é importante o controle da taxa de resfriamento que proporcione partículas com menor dispersão de tamanho.

Observou-se que na utilização de surfactante com HLB 6,45 houve interação negativa na formação das microcápsulas, produzindo microcápsulas vazias. Muito provavelmente este fenômeno se deu por alteração de hidrofobicidade do recheio, tornando-o mais hidrofílico.

Com o uso de surfactante de HLB 4,3 foi possível encapsular o recheio nas condições de pH de reticulação 6 e 4.

No pH de reticulação 6, as amostras com e sem surfactante resultaram em eficiência e morfologia inferiores aos obtidos com pH de reticulação 4. As amostras sem alteração de pH de reticulação (pH4) obtiveram tamanho de partículas menores, com possíveis vantagens nas aplicações em produtos alimentícios e na liberação do recheio.

A maior velocidade de agitação da emulsão resultou em menor tamanho de partículas.

As matérias primas e etapas de processo de coacervação complexa devem ser bastante avaliadas em relação à influência na entropia do sistema para evitar formação de microcápsulas muito frágeis.

Mesmo havendo conservação da estrutura das microcápsulas após a reidratação, o processo de liofilização mostrou-se drástico para a morfologia das microcápsulas, afetando sua estabilidade e favorecendo a oxidação do recheio.

Pode-se verificar melhor desempenho para o uso de surfactante com HLB 4,3 em relação à eficiência de encapsulação e distribuição mais uniforme do tamanho de partículas.

As amostras padrão (PSAD) e com surfactante de HLB 4,3 (4SAD) sem alteração de pH de reticulação obtiveram os melhores resultados gerais em relação a todas as microcápsulas produzidas, podendo ser indicadas para aplicação em sistema alimentício e possibilitando a avaliação da liberação do recheio neste sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes.** 2005. 243f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2005.

AACC. American Association of Cereal Chemists. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists.** v.1. 9th ed. St. Paul, 1995.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the AOAC.** 18th ed. Washington, 2005

AOCS. American Oil Chemists Society. **Official methods and recommended practices of the AOCS,** Illinois, Champaign, 2004.

AOCS. American Oil Chemists Society. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes,** 2 ed. , AOCS Press, 2006.

BUENO, C. M. M. **Extração e caracterização de gelatina de pele de tilápia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa.** 2008. 133f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

CÉLIS, F.T. **Efeito da reticulação induzida pela transglutaminase e o glutaraldeído sobre as propriedades das micropartículas obtidas por coacervação complexa.** 2009. 148f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

DONG, Z. J.; TOURE, A.; JIA, C. S.; ZHANG, X. M.; XU, S. Y. Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n.7, p.634–646, 2007.

DUQUEMIN, S-J.; NIXON, J. R. The effect of surfactants on the microencapsulation and release of phenobarbitone from gelatin-acacia complex coacervate microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, v.3, n.2, p. 89-93, 1986.

FAN, J.; SAITO, M.; TATSUMI, E. e LI, L. Preparation of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibiting Peptides from Soybean Protein by Enzymatic Hydrolysis. **Food Sci. Technol. Res.**, 9 (3),p.254–256, 2003.

GUO, H.; ZHAO, X. Preparation of microcapsules with narrow-size distribution by complex coacervation: Effect of sodium dodecyl sulphate concentration and agitation rate. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n.4, p.221-227, 2008.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Londres: Lab. Pract.,v.22, p. 475-476, 1973.

HOFFMANN,H.; THUNIG, C.; MUNKERT, U. From Vesicles to the L3 (Sponge) Phase in Alkyldimethylamine Oxide/Heptanol Systems. **Langmuir**, v.8, p. 2629-2638, 1992.

JEGAT, C.;TAVERDET, J. L. Stirring speed influence study on the microencapsulation process and on the drug release from microcapsules. **Polymer Bulletin**, v. 44, p. 345-351, 2000.

JOUZEL,B.; PENNARUN, A. L.; PROST, C.; RENARD, D.; PONCELET,D.; DEMAIMAY,M. Encapsulation of a lipid precursor, the eicosapentaenoic acid, to study the development of the *Crassostrea gigas* oyster flavours. **Journal of Microencapsulation**. v. 20, n. 1, p. 35-46, 2003.

KONG, X.Z. ; GU, X.; ZHU, X.; ZHANG, Z. Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component molecule. **Biomed Microdevices**, v. 11, p. 275-285, 2009.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 1-9, 2000.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for O - 3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 3, p. 347-357, 2001.

LIU., S; ELMER, C.; LOW, N.H.; NICKERSON, M.T. Effect of pH on the functional behavior of pea protein isolate-gum Arabic complexes. **Food Research International**, v. 43, p. 489-495, 2010a.

LIU., S; CAO, Y-L.; GHOSH, S.; ROUSSEAU, D.; LOW, N. H.; NICKERSON, M.T. Intermolecular interactions during Complex Coacervation of pea protein isolate and Gum Arabic. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 552-556, 2010b.

MEDANHA, D.V.; ORTIZ, S.E.M.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; MAURI, A. MONTERREY-QUINTERO, E.S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v.42, p. 1099-1104, 2009.

MENGER, F. M.; PERESYPKIN, A. V.; CARAN, K. L.; APKARIAN, R. P. A Sponge Morphology in an Elementary Coacervate. **Langmuir**, v. 16, p. 9113-9116, 2000.

MUKAI-CORRÊA, R. **Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe**. 2003. 173p. Dissertação (mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

NOVOZYMES, **Starch Application Sheet**, Denmark , 2003, p.1-9, catálogo do fornecedor.

OLIVEIRA, A.B. **Microencapsulamento de Estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae**. 2007. 132f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2007.

OOMAH, B.D.; MAZZA, G. Flaxseed Products for Disease Prevention. In. MAZZA, G. (Ed.). **Functional Foods**. Biochemical & Processing Aspects. CRC Press, 1998, p.91-127.

OZORIO, R.A. **Elaboração e Caracterização de micropartículas de astaxantina com quitosana**. 2007. 156p. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos). Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

PELSER, W. M. ; LINSSSEN, J. P. H.; LEGGER, A.; HOUBEN, J. H. Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. **Meat Science**. v. 75, p.1-11, 2007.

PÉREZ-GÁLVEZA, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZA, J.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; LOZANO-RUIZB, M. E MONTERO-DE-ESPINOSA, V. Fatty Acid Composition of Two New Pepper Varieties (*Capsicum annuum* L. cv. Jaranda and Jariza). Effect of Drying Process and Nutritional Aspects. **JAOCs**, v.76, n. 2, 1999.

PÉREZ-GÁLVEZA, A ; MINGUEZ-MOSQUERA, M.I. Degradation, under Non-Oxygen-Mediated Autooxidation, of Carotenoid Profile Present in Paprika Oleoresins with Lipid Substrates of Different Fatty Acid Composition, **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 632-637, 2004.

PRATA, A.S. **Estudos dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. 2006. 267f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

PRATA, A.S.; MENUT, C.; LEYDET, a.; TRIGO, J.R.; GROSSO, C.R.F. Encapsulation and release of a fluorescent probe, Khusimyl Dansylate, obtained from vetiver oil by complex coacervation. **Flavour and Fragrance Journal**, 2007.

RABIŠKOVÁ, M.; VALÁŠKOVÁ, J. The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation.. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 6, p. 747-751. 1998.

RABISKOVA, M., SONG, J.; OPAWALE, F.O.; BURGESS, D.J. The Influence of Surface Properties on Uptake of Oil into Complex Coacervate Microcapsules. **J.Pharm. Pharmacol**, v. 46, p. 631-635, 1994.

SANT'ANA, L.S. Mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão, absorção e metabolismo dos ácidos graxos ômega. **RBPS**. v. 17,n.4, p.211-216, 2004.

SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas: Uma alternativa viável - Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação: óleo-resina de páprica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 3, n. 16, p. 26-30. 2000.

SIMOPOULOS, A.P. The omega-6/omega-3 fatty acids ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.17, p. 131-134, 2008.

SOPER, J.C.; THOMAS, M.T.Enzymatically protein- encapsulating oil particles by complex coacervation. **U.S. Patent**. 6325951, 2001. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/6325951.html>>. Acesso em: maio 2010.

STATISTICA, 1995. Statistica v.5.0 for windows, Statsoft Inc., Tulsa-OK, USA (1995) (software)

STREY R.; JAHN, W.; PORTE, G.; BASSEREAU, P. Freeze Fracture Electron Microscopy of Dilute Lamellar and Anomalous Isotropic (L3) Phases. **Langmuir**, v. 6, p. 1635-1639, 1990.

TIRKKONEN, S., TURAKKA, L.; PARONEN, P. Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in the presence of surfactants. **Journal of Microencapsulation**, v.11, n.6, p. 615-626, 1994.

THIES, C. (Ed.). Complex Coacervation; Characterization. In. **How to make microcapsules: combined lecture and laboratory manual**, Thies Technology, St. Louis, Missouri, 1994.

TOLSTOGUZOV, V. Structure - Property Relationships in Foods. In. PARRIS, N.;KATO, A.; CREAMER, L.K.;PEARCE, J. (Ed.). **Macromolecular Interactions in Food Technology**. American Chemical Society: Washington, DC, 1996.

USDA. United States Department of Agriculture. **National Nutrient Database for Standard Reference**, Release 22. 2009. Disponível em:<<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acesso em: maio 2010.

VAN OSS, C.J.(Ed.).**Interfacial Forces in Aqueous Media**. Ed. CRC Press, 2006.

WEINBRECK, F.; MINOR, M.; DE KRUIF, C.G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation**, v.21, n.6, p. 667-679, 2004.

WIESENFELD, P.W.; BABU, U.S.; COLLINS, T.F.X.; SPRANDO, R.; O'DONNELL, M.W.; FLYNN, T.J.; BLACK, T.; OLEJNIK, N. Flaxseed increased α -linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. **Food Chem. Toxicol.** v.41, n.6, p.841-855, 2003

WU, J.; JOHNSON, L.A.; JUNG, S. Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme-assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes. **Bioresource Technology**, v.100, p. 527–533, 2009.

CAPÍTULO 4

**LIBERAÇÃO DE RECHEIO HIDROFÓBICO RICO EM ÔMEGA 3 DE
MICROCÁPSULAS PRODUZIDAS COM E SEM SURFACTANTE APLICADAS
EM EMULSÕES PADRÃO O/A E A/O**

1 INTRODUÇÃO

O processo de microencapsulação envolve a formação de uma cápsula ao redor do recheio, a manutenção deste recheio dentro da cápsula evitando sua saída e entrada de material indesejável e a liberação do recheio no tempo certo e com taxa controlada de liberação. O controle da liberação do recheio é uma das mais importantes características das microcápsulas. Existem muitos fatores que afetam a taxa de liberação do recheio, desde as características dos materiais de parede (densidade, cristalinidade, solubilidade), propriedades das microcápsulas (tamanho de partícula, espessura da parede, camadas de parede, morfologia, aspecto físico pó ou líquido), parâmetros experimentais e meios de aplicação (temperatura, pH, umidade, solventes, ação mecânica, pressão) (SHAHIDI; HAN, 1993).

Segundo Thies (1994), a liberação do recheio é determinada aplicando as microcápsulas em um ambiente bem definido e monitorando a quantidade de recheio liberado em função do tempo. As condições selecionadas para os estudos devem ser feitas tendo em vista a aplicação das microcápsulas. Uma microcápsula contendo recheio bastante solúvel em água tem sua liberação bastante influenciada pela força osmótica. Isto pode ser evitado alterando a composição do recheio com sais ou formação de complexos menos solúveis para ampliar a aplicação. Justamente por isto, em vários trabalhos de microencapsulação, a avaliação da liberação do recheio é uma das características estudadas, sendo que para fármacos a liberação é estudada simulando condições do trato digestivo humano.

A escolha de aplicação de microcápsulas em sistemas que possam ser extrapolados a uso industrial na área alimentícia, tendo em vista o estudo da liberação, não tem sido divulgado na literatura. Apenas metodologias com base em análise sensorial são disponíveis (PELSER *et al*, 2007; IAFELICE *et al*, 2008).

A grande maioria dos alimentos é formada por dois ou mais componentes imiscíveis que possuem uma camada limite entre as duas fases, a fase dispersa e a fase contínua, podendo formar soluções verdadeiras ou suspensões e dispersões coloidais. As emulsões são dispersões coloidais líquido/líquido

podendo ser tipo óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) e muito encontradas em produtos alimentícios de grande importância como leite, creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada, salsicha, bolos e sorvetes (BOBBIO; BOBBIO, 1992a; FELLOWS, 2006). Por serem sistemas encontrados em uma ampla variedade de produtos são interessantes para serem utilizados nos estudos de aplicação de microcápsulas. Uma emulsão óleo em água (O/A) pode simular a aplicação em molho de salada e uma emulsão água em óleo (A/O) simular a margarina.

Na definição de margarina, segundo DIPOA, Portaria nº 372, (BRASIL, 1997), a quantidade de lipídios totais deve ser no máximo de 95%, e para Creme Vegetal que é regulamentado pela ANVISA Portaria nº 193, (BRASIL, 1999), deve ser também no máximo 95% e no mínimo 10% de lipídios. Como não é muito específica a quantidade de lipídios na emulsão, existem muitas formulações de margarinas e creme vegetal no mercado, sendo que a categoria que contém altos teores de gordura é composta de 77 – 85% de lipídios e, por outro lado, para molhos de salada a quantidade de gordura é menor que 30 % nos produtos de mercado.

Para a produção de emulsão, dependendo do produto desejado, deve-se utilizar um dos processos de homogeneização ou uma combinação dos dois. Por exemplo, no preparo de molhos de salada usualmente utiliza-se a homogeneização primária para a mistura das fases oleosa e aquosa, enquanto que na produção de leite utiliza-se a homogeneização secundária para a redução dos glóbulos de gordura já existentes (MCCLEMENTS, 2005; PERRECHIL, 2008).

As emulsões são termodinamicamente instáveis e tendem a se romper com o tempo, resultando em duas fases líquidas separadas, fase oleosa e fase aquosa. Porém, com o uso de surfactantes para melhorar a estabilidade da emulsão, torna-se extremamente difícil a separação completa das duas fases. Os surfactantes, quando utilizados, são adsorvidos à interface das gotas de óleo e alteram a relação de hidrofiliicidade/hidrofobicidade na interface. Este processo de separação total denominado desmemulsificação é bastante complexo (PERRECHIL, 2008; SOUZA, 2003; MORAIS, 2008; RABISKOVA *et al*, 1994).

A desemulsificação normalmente é alcançada por métodos físicos como uso de calor, centrifugação e agitação que aumentam a frequência de contato das gotículas dispersas e método químico com adição de eletrólitos suprindo a dupla camada difusa e reduzindo o pontecial zeta, diminuindo drasticamente a repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas ocorrendo sua coalescência (SHAW, 1975; CHEN *et al*, 2000; SOUZA, 2003; MORAIS, 2008).

A desemulsificação da emulsão pelo aquecimento não provoca nenhuma alteração química, mas está relacionada a mudanças nas características da solubilidade dos compostos da emulsão ou na facilitação dos fenômenos de coalescência. A viscosidade diminui com o aquecimento, intensificando assim a probabilidade das partículas interagirem umas com as outras energeticamente, sob influência do movimento browniano. A diminuição da viscosidade da fase contínua ou dispersa, aumenta a probabilidade de coalescência no impacto.

A agitação (cisalhamento) somada ao aumento da temperatura, provoca alterações drásticas na aparência e na viscosidade das emulsões. Com a agitação e redução da viscosidade, as partículas ficam mais próximas, com energia cinética elevada, o suficiente para ocorrer a coalescência (SOUZA, 2003).

A desemulsificação é um processo indesejado para produção de produtos emulsionados, porém em alguns casos é de grande importância como na área de petróleo (ABDURAHMAN; YUNUS; JEMAAT, 2007). Para a análise de liberação de microcápsulas com recheio hidrofóbico aplicadas em emulsões, a desemulsificação é um processo necessário, pois a fase polar (oleosa) atrai o material hidrofóbico do recheio liberado e com a total separação das fases é possível caracterizar a fase polar e quantificar a quantidade de recheio liberado.

No caso de aplicação de microencapsulados de óleo de linhaça, fonte de ácidos graxos polinsaturados da família ômega 3, com aproximadamente 51% de ácido graxo α -linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA), é muito importante que a liberação ocorra o mínimo possível pois este composto deve ser liberado apenas no sistema digestivo, ou melhor, no trato intestinal, onde ocorre sua melhor absorção. Neste caso, portanto, a liberação gradual não é interessante e os mecanismos de liberação devem ser minimizados.

A caracterização da emulsão é importante para avaliar as condições do meio onde as microcápsulas serão aplicadas, principalmente para alimentos, onde os sistemas são bastante complexos. Como em qualquer processo de produção de alimentos existem fatores externos como pressão, temperatura, umidade, pH, concentração de sais, luz que irão afetar a liberação do recheio das microcápsulas e cada caso deverá ser analisado separadamente.

Como a hidrofiliicidade/hidrofobicidade é um dos pontos importantes de afinidade entre os compostos polares e apolares, neste trabalho foram utilizadas microcápsulas de óleo de linhaça e oleoresina de páprica produzidas por coacervação complexa, com e sem surfactante em seu recheio. O intuito do trabalho foi avaliar a liberação do recheio destas microcápsulas aplicadas em emulsões padrão do tipo O/A e A/O, verificando a interferência da presença do surfactante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Microcápsulas de óleo de linhaça e oleoresina de páprica produzidas conforme descrito no capítulo 3 (amostras PSAD e 4SAD), óleo de girassol alto oléico - PepsiCo; surfactantes - Croda do Brasil dos seguintes tipos: Monooleato de polioxietileno de sorbitana – polisorbato 80 ou Tween 80 (HLB 15) e monooleato de sorbitana - Span 80 (HLB 4,3); Cloreto de sódio PA - Ecibra, padrão interno ácido graxo nonadecanóico C19:0 – Fluka.

2.2 EQUIPAMENTOS

2.2.1 Equipamentos utilizados nos processo e determinações analíticas

Homogeneizador Ultraturrax TP 18, velocidade de rotação fixa 20.000 rpm - IKA-WERK; Balança Analítica Ohaus modelo Adventurer; pHmetro Schott Titroline; Banho Maria FANEM Modelo 100; Cromatógrafo Gasoso Capilar CGC Agilent 6850 Series GC System; Zeta Sizer Nano Series Nano ZS – Malvern Instruments, utilizado na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP; Microscópio ótico Jenaval - Carl Zeiss, Alemanha; Rotoevaporador Fisatom 802; Agitadores de tubos de ensaio AP56 - Phoenix.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Identificação dos óleos

A identificação dos óleos de girassol alto oléico (OGAO) e do recheio de oleoresina de páprica com óleo de linhaça (1:10) foram feitas através da composição em ácidos graxos (AOCS Ce 2-66, 2004), sendo o preparo dos ésteres metílicos realizado conforme Hartman e Lago (1973). As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Gasoso Capilar CGC Agilent 6850 Series GC System, dotado de coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropyl – methylpolysiloxane), dimensões 60m, Ø int: 0,25mm, 0,25µm filme; fluxo na coluna de 1,00mL/min; velocidade linear de 24cm/seg; temperatura do detector 280°C; temperatura do injetor 250°C. Temperatura do forno: 110°C – 5 minutos, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 34 minutos; gás de arraste: hélio; volume injetado 1,0µL, split 1:50.

O óleo de girassol alto oléico foi selecionado como o óleo das emulsões por ter em sua composição mínima quantidade de ácido graxo α -linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA), composto de interesse para as análises de liberação do recheio.

2.3.2 Elaboração das emulsões com microcápsulas

Os meios definidos como emulsões padrão seguiram processo determinado como emulsão primária, ou seja, apenas sofreram ação mecânica do tipo força de cisalhamento pelo uso de misturadores de alta velocidade, obtendo a redução do tamanho das gotículas apenas até um certo limite. A homogeneização secundária que consiste na redução dos tamanhos das partículas já existentes na emulsão e que resultaria em emulsão estável não foi feita para que pudesse ser avaliado somente um tipo de ação mecânica sobre as microcápsulas e analisar se elas suportam esta primeira pressão (MCCLEMENTS, 2005; PERRECHIL, 2008).

As emulsões padrão primárias estudadas foram definidas como emulsões EAO (80% de óleo de girassol alto oléico, 20% de água e 0,4% Span 80) e EOA (20% de óleo de girassol alto oléico, 80% de água e 0,4% Tween 80). Cada emulsão foi produzida com a mesma quantidade de cápsula definida, homogeneização de 20.000 rpm por 1 minuto, temperatura ambiente, água deionizada e em triplicata. A adição dos surfactantes seguiu a afinidade de cada um com o meio, ou seja, Tween 80 adicionado à água e Span 80 adicionado ao óleo.

Com a definição da eficiência de encapsulação e identificação dos óleos, buscando seguir uma relação de $n-6/ n-3$ nutricionalmente adequada, menor que 10, foi definida a quantidade de 6% de microcápsulas (PSAD e 4SAD) para a aplicação. Os valores teóricos de $n-6/ n-3$ para liberação total das microcápsulas estão descritos na Tabela 1 confirmando a redução da relação $n-6/ n-3$ das emulsões em comparação com a emulsão sem adição das microcápsulas, sendo este o objetivo nutricional da adição das microcápsulas em sistemas padrão de emulsões.

Tabela 1: Valores teóricos das quantidades de *n*-6 e *n*-3 e relação *n*-6/*n*-3 para emulsões óleo em água (EOA) e água em óleo (EAO) com microcápsulas

Emulsão	Valor <i>n</i> -6 (g)	Valor <i>n</i> -3 (g)	Relação <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 (*)
EOA	2,84	0,16	18,18
EAO	11,36	0,62	18,18
Microcápsula PSAD			
EOA	3,05	0,73	4,20
EAO	11,57	1,19	9,68
Microcápsula 4SAD			
EOA	3,11	0,88	3,53
EAO	11,63	1,35	8,62

EAO: 80% de óleo de girassol alto oléico e 20% de água – 0,4% Span 80

EOA: 20% de óleo de girassol alto oléico e 80% de água – 0,4% Tween 80

PSAD e 4SAD: microcápsulas produzidas por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina

PSAD: microcápsulas padrão com 60,03% de eficiência de encapsulação

4SAD : microcápsula com surfactante HLB 4,30 e com 76,31% de eficiência de encapsulação

(*): valores considerados para uma liberação de 100% do recheio

2.3.3 Caracterização das emulsões

A caracterização das emulsões foi realizada buscando conhecer os meios nos quais as microcápsulas seriam aplicadas. Foram produzidas emulsões sem microcápsulas segundo item 2.3.2 e no equipamento Zeta Sizer Nano Series Nano ZS foram medidos o potencial zeta, condutividade, viscosidade e tamanho de partículas. Outras características avaliadas foram as medidas de pH, temperatura e microscopia ótica utilizando-se um microscópio ótico Jenaval – Zeiss (Alemanha) com captação de imagens através de uma câmera digital H1 1606, usando lente auxiliar optovar de 1,25 x e objetiva 12,5x. O programa de aquisição de imagens foi EDN-2 Microscopy Image Processing System.

2.3.4 Processo de desemulsificação

Foi necessário um estudo de desemulsificação das emulsões padrão para que pudesse ser avaliada a liberação de recheio das microcápsulas. Por ser hidrofóbico, o recheio liberado migra para a fase oleosa da emulsão a qual deve ser totalmente separada para que se possa analisar em relação à sua composição em ácidos graxos e quantificar a quantidade de recheio liberado através do composto de interesse.

Testes preliminares foram realizados para separar as emulsões e assim avaliar somente a fase oleosa do sistema. Além da dificuldade de conseguir a total separação de fases, durante o processo deveriam ser minimizados os efeitos às microcápsulas, evitando induzir a liberação de recheio.

Algumas observações devem ser relatadas para se partir desta premissa, testando diferentes meios e condições. As microcápsulas adicionadas em água à temperatura ambiente e 100°C por 1 minuto, ficaram dispersas e íntegras por até 12 h. Adicionadas em óleo de soja à temperatura ambiente e 100°C por 1 minuto, ficaram íntegras, porém agrupadas. Adicionadas em emulsão A/O 1:1, 2:1 e 1:2 ficaram dispersas na fase aquosa após desestabilização das emulsões e separação das fases. Também foram testados alguns solventes como hexano, clorofórmio, éter de petróleo e solução salina NaCl. Em todos estes testes as microcápsulas migraram para a parte polar, ou seja, fase aquosa da emulsão.

Com estas informações do comportamento das microcápsulas e com base em estudos de Souza (2003), Abdurahman, Yunus e Jemaat (2007) e Chen *et al* (2000), dentre os vários métodos existentes foi possível definir o processo de desemulsificação. O uso de aditivo químico (cloreto de sódio), separação gravimétrica, aquecimento e agitação intensa foram utilizados para desestabilização das emulsões e separação da fase oleosa composta por óleo de girassol alto oléico e recheio liberado e da fase aquosa com microcápsulas inteiras.

As emulsões preparadas (10g) foram mantidas em banho maria a 50°C e após 1 hora foram transferidas para um funil de separação. Foram adicionados 5

mL de água deionizada e 5 mL de éter de petróleo e mantidas em repouso por 1 hora. A parte inferior, fase aquosa com microcápsulas inteiras e resíduos de material de parede, foi retirada. A adição de água foi repetida até total retirada de resíduos de microcápsulas inteiras na fase aquosa. A fase retida foi transferida para tubos de ensaio previamente tarados e pesados para obter a quantidade de emulsão restante. Adicionou-se 7,5% (m/m) de cloreto de sódio. Os tubos foram agitados em agitadores de tubos por 30 segundos e colocados em banho maria a 50°C por 1 hora ou até a emulsão separar totalmente. A cada 15 minutos foi feita agitação por 30 segundos. As fases separadas foram transferidas para funil de separação e adicionados 5 mL de água deionizada e 5 mL (ou mais) de éter de petróleo para lavagem dos tubos. A fase inferior aquosa foi retirada e a fase superior oleosa retida foi transferida para balões tarados para evaporação do éter de petróleo em rotoevaporador. A água residual na fase oleosa foi retirada com adição de acetona (5 mL) e evaporação em rotoevaporador. Os balões abertos foram colocados em estufa a 100°C, sem vácuo e mantidos por 30 minutos. Por diferença de peso se obteve a quantidade da fase oleosa (óleo da emulsão com recheio liberado). Este processo foi feito em triplicata.

As emulsões são bastante instáveis e após 24 horas ocorre separação quase total da emulsão, não sendo mais um sistema padrão de emulsão. Desta forma, o processo de desemulsificação e avaliação de liberação em função do tempo foram realizados somente nos tempos 0 e 24h.

2.3.5 Avaliação da liberação do recheio

2.3.5.1 Curva de calibração com padrão interno (P.I.)

Para a determinação da quantidade de recheio liberado foi elaborada uma curva de calibração com emulsões padrão conhecidas adicionadas de 20, 50 e 80% (m/m) de óleo de linhaça adicionado. Estas emulsões foram produzidas conforme item 2.3.2 e separadas conforme item 2.3.4.

A fase oleosa obtida do processo de desemulsificação de cada emulsão acima foi analisada através da composição em ácidos graxos (AOCS Ce 2-66,

2004), sendo o preparo dos ésteres metílicos realizado conforme Hartman e Lago (1973) com adição de quantidade conhecida (1 mL) de solução padrão de ácido graxo nonadecanóico - C 19:0 (1 mg / 1 mL hexano) como padrão interno (P.I.), em cada análise. Estas análises foram feitas em duplicata.

Conforme Lanças (1993), padrão interno (P.I.) é um composto que se adiciona à amostra de forma que nunca interfira com a análise, deve ser disponível em alto grau de pureza, ser adicionado em concentrações similares ao composto analisado e ter picos bem resolvidos.

As áreas obtidas para os ácidos graxos α - linolênico (C18:3) e nonadecanóico (C 19:0) nas análise das diferentes concentrações são utilizadas na construção da curva de calibração, segundo as Equações 1 e 2:

$$Y = \frac{\text{área (C 18:3)}}{\text{área (C 19:0)}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$X = \frac{\text{massa (C 18:3)}}{\text{massa (C 19:0)}} \quad (\text{Equação 2})$$

A normalização das áreas (LANÇAS, 1993) foi realizada e a regressão linear e a equação da reta foram calculadas.

2.3.5.2 Determinação da quantidade de recheio liberado

A composição em ácidos graxos da fase oleosa obtida do processo de desemulsificação das emulsões com aplicação de microcápsulas foi realizada conforme métodos de análises descritos em 2.3.5.1.

Utilizando a normatização das áreas, a equação da reta da curva de calibração descrita em 2.3.5.1 e a relação das áreas de C 18:3 e C 19:0 (Y) de cada análise, se determinou a relação das massas de C 18:3 e C 19:0 (X). Através da Equação 3 foi possível obter a quantidade em massa do ácido graxo C 18:3 na amostra analisada.

$$m \text{ (C 18:3)} = \frac{m \text{ (C 18:3)} \times m \text{ (C 19:0)}}{m \text{ (C 19:0)}} \quad (\text{Equação 3})$$

Com valores de massa de ácido graxo α - linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA) e composição em ácidos graxos do recheio foi determinada a quantidade de recheio liberado em massa. Utilizando os dados de eficiência de encapsulação das microcápsulas PSAD e 4SAD obtidos no Capítulo 3 foi calculada a % de recheio liberado.

2.3.6 Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios experimentais foram avaliados estatisticamente por meio do programa estatístico Statistica 5.0 - Statsoft, USA (STATISTICA,1995) com nível de significância de 5% para teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS

Através da normalização das áreas foi determinada a composição de ácidos graxos dos óleos de girassol alto oléico (OGAO), do recheio de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Composição de ácidos graxos (%) de Óleo de girassol alto oléico (OGAO) e recheio de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1)

Ácido Graxo (%)	OGAO	recheio
Ácido palmítico (C 16:0)	4,59	7,01
Ácido esteárico (C 18:0)	2,57	5,35
Ácido oléico (C 18:1)	76,16	21,03
Ácido linoléico (C 18:2)	14,22	17,91
Ácido linolênico (C 18:3)	0,78	48,00
Ácido araquídico (C 20:0)	0,31	0,22
Ácido gadoléico (C 20:1)	0,32	0,12
Ácido behênico (C 22:0)	0,71	0,21
Ácido lignocérico (C 24:0)	0,33	0,15

3.2. ELABORAÇÃO DAS EMULSÕES COM MICROCÁPSULAS

As emulsões foram preparadas conforme descrito em 2.3.2 e observou-se que as emulsões A/O com aplicação das microcápsulas ficaram estáveis, porém as microcápsulas não ficaram totalmente dispersas na emulsão, formando aglomerados. Nas emulsões O/A as microcápsulas ficaram bem dispersas e houve formação de espuma.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

As emulsões sem microcápsulas não foram preparadas no mesmo local da análise do potencial zeta, condutividade, tamanho de partícula e viscosidade, portanto por serem emulsões primárias a instabilidade já havia iniciado. Os valores destas análises estão na Tabela 3 e valores de potencial zeta comprovam a instabilidade das emulsões segundo classificação feita por Salopek, Krasic e Filipovic (1992), onde valores de potencial zeta entre +5 e -5 mV correspondem à sistemas de emulsões com aglomeração e precipitação, não sendo emulsões estáveis. Sendo assim, os valores de tamanho médio não devem ser considerados reais, pois os aglomerados também foram medidos.

Em relação à condutividade, os valores foram baixos devido ao sistema estar com partículas com reduzida eletronegatividade.

Tabela 3. Caracterização das emulsões sem microcápsulas

Emulsão	pH	Potencial zeta (mV)	Condutividade (μ S/cm)	Viscosidade (cP)	Tamanho médio (μ m)
EOA	5,75	- 0,375 $\pm$ 5,78	0,000365	0,8871	1910
EAO	5,62	0,906 $\pm$ 41,60	0,012700	0,8868	311

Temperatura 25°C

EAO: 80% de óleo de girassol alto oléico e 20% de água – 0,4% Span 80

EOA: 20% de óleo de girassol alto oléico e 80% de água – 0,4% Tween 80

Gráficos mostrados no Anexo B.

A microscopia ótica das duas emulsões está apresentada na Figura 1, possibilitando o entendimento da dispersão das partículas de óleo e água nas emulsões. É possível verificar a diferença do tamanho de partículas das emulsões e visualmente correspondem aos valores da Tabela 3 onde a emulsão EOA obteve valores de tamanho médio de partículas bem maiores que a emulsão EAO.

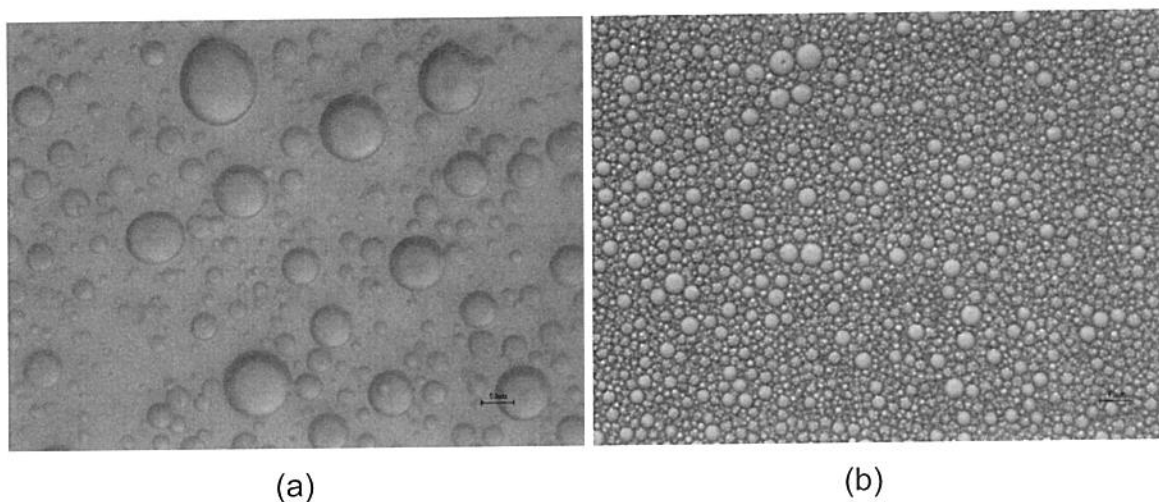


Figura 1: Microscopia ótica das emulsões sem microcápsulas: (a): O/A (EOA); (b): A/O (EAO). Barras Microscopia ótica = 50 μ m

3.4 DESEMULSIFICAÇÃO DAS EMULSÕES

Este método foi inicialmente testado em triplicata com as emulsões EAO e EOA sem microcápsulas e obtendo-se de 91 a 99% de rendimento, ou seja, % de óleo recuperado da emulsão inicial. A composição em ácidos graxos do óleo recuperado correspondeu à composição em ácidos graxos do OGAO, demonstrando que a análise não afetou a qualidade do óleo.

As emulsões com microcápsulas e com maior quantidade de óleo (EAO) separaram rapidamente e em alguns casos a quantidade de cloreto de sódio foi reduzida. As emulsões com maior quantidade de água (EOA) formaram além da espuma, uma fase intermediária branca de difícil separação e eliminação e a quantidade de cloreto de sódio foi mantida. O aumento da concentração de eletrólito (desemulsificador) em uma emulsão aumenta o efeito de afastamento

entre as partículas e faz com que a camada difusa se torne mais compacta, diminuindo rapidamente o potencial zeta e separando a emulsão (SOUZA, 2003).

Por ser um método de muitas etapas, nas emulsões A/O (EAO) foram recuperados 91% do óleo inicial e para emulsões O/A (EOA) 56%.

Foi feita captação de imagem por microscopia ótica das microcápsulas após desemulsificação, encontradas na fase aquosa recolhida e está apresentada na Figura 2.

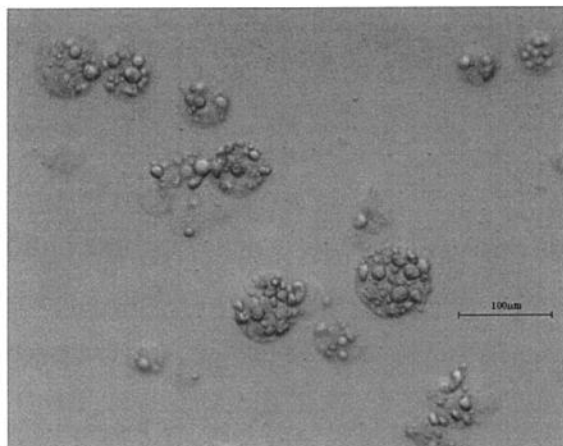


Figura 2: Microcápsulas inteiras após processo de desemulsificação da emulsão em que foi aplicada. Barra Microscopia ótica = 50µm

3.5 Curva de calibração com padrão interno (P.I.)

Através das análises cromatográficas foram obtidos os valores de área dos ácidos graxos α -linolênico (C18:3) e ácido graxo nonadecanóico (C 19:0) das emulsões padrão com 20%, 50% e 80% de óleo de linhaça. Determinando os valores de Y (relação de áreas de C 18:3 e C 19:0) e de X (relação de massas de C 18:3 e C 19:0) foi possível plotar em gráfico segundo Figura 3.

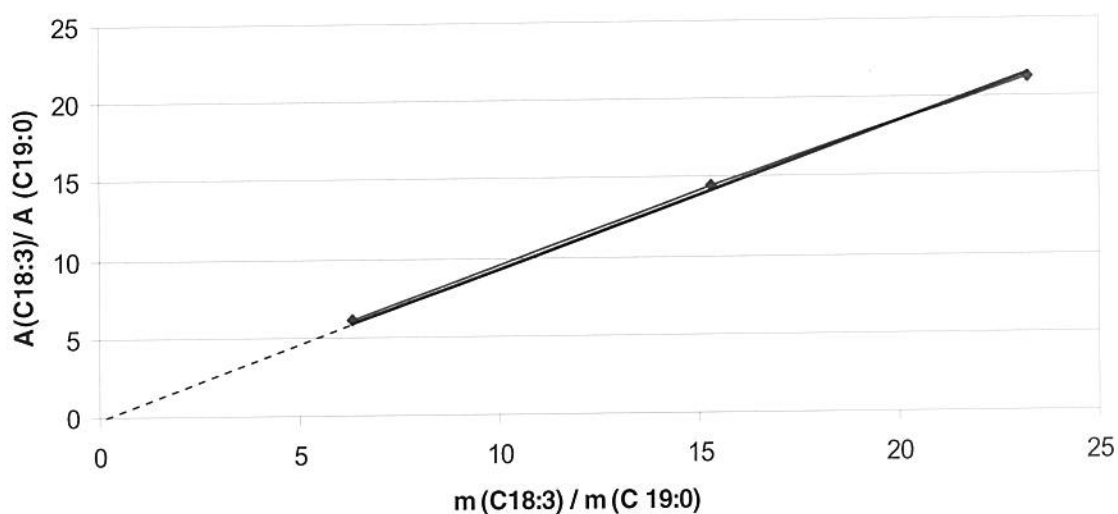


Figura 3. Curva de calibração para quantificação do ácido graxo α -linolênico (C 18:3). A: área obtida na análise de composição; m: massa adicionada C 19:0:ácido graxo nonadecanóico (P.I.); C 18:3:ácido graxo α -linolênico (composto de interesse)

O valor da regressão linear obtido pela curva foi alto, $R^2 = 0,9983$, portanto a equação da reta, Equação 4, foi utilizada para cálculo das quantidades de massa de ácido graxo α -linolênico (C18:3 *n*-3 - ALA) das emulsões testadas com as microcápsulas.

$$Y = 0,9274 X \quad (\text{Equação 4})$$

3.6 AVALIAÇÃO DAS LIBERAÇÕES DE RECHEIO

Através das análises cromatográficas (exemplos mostrados no Anexo C) e normalização das áreas foi determinada a composição em ácidos graxos das amostras da fase oleosa separada pela desemulsificação das emulsões (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Composição em ácidos graxos (%) da fase oleosa separada pela desmemulsificação das emulsões EAO com microcápsulas nos tempos 0 e 24 horas

Ácido Graxo	0h		24h	
	EAO		EAO	
	PSAD	4SAD	PSAD	4SAD
C16:0	4,56 ± 0,023	4,57± 0,021	4,55±0,014	4,55±0,015
C18:0	2,60 ±0,004	2,61±0,010	2,62±0,017	2,63±0,017
C18:1	75,89±0,049	75,81±0,043	75,88±0,114	75,87±0,122
C18:2	14,15±0,017	14,15±0,012	14,12±0,058	14,07±0,111
C18:3	1,11±0,004 ^(a)	1,19±0,005 ^(ab)	1,14±0,050 ^(ac)	1,17±0,022 ^(a)
C20:0	0,31±0,001	0,31±0,002	0,31±0,004	0,32±0,011
C20:1	0,33±0,020	0,32±0,002	0,32±0,002	0,33±0,023
C22:0	0,72±0,002	0,71±0,003	0,73±0,010	0,73±0,010
C24:0	0,33±0,001	0,33±0,003	0,34±0,006	0,34±0,005

Médias com as mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

EAO: 80% de óleo de girassol alto oléico e 20% de água – 0,4% Span 80

PSAD e 4SAD: microcápsula produzida por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina

PSAD: microcápsulas padrão com 60,03% de eficiência de encapsulação

4SAD : microcápsula com surfactante HLB 4,30 e com 76,31% de eficiência de encapsulação

A avaliação estatística foi realizada apenas para o ácido graxo α - linolênico (C18:3) que é o composto de interesse e nas emulsões EAO, entre os tempos de 0 e 24 horas não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras 4SAD e entre as amostras PSAD. O mesmo pode ser visto na Tabela 5 para emulsões EOA.

Tabela 5. Composição em ácidos graxos (%) da fase oleosa separada pela desemulsificação das emulsões EOA com microcápsulas nos tempos 0 e 24 horas

Ácido Graxo	0h		24h	
	EOA	4SAD	EOA	4SAD
	PSAD		PSAD	
C16:0	4,62±0,023	4,66±0,044	4,63±0,039	4,63±0,011
C18:0	2,67±0,013	2,78±0,166	2,71±0,043	2,71±0,020
C18:1	74,84±0,131	74,4±0,247	74,84±0,170	74,60±0,146
C18:2	14,15±0,118	14,15±0,014	14,12±0,164	14,13±0,152
C18:3	2,05±0,021^(a)	2,30±0,025^(a)	2,01±0,017^(a)	2,27±0,026^(a)
C20:0	0,31±0,002	0,34±0,056	0,31±0,003	0,31±0,004
C20:1	0,32±0,005	0,32±0,005	0,32±0,006	0,31±0,004
C22:0	0,71±0,005	0,71±0,008	0,72±0,010	0,72±0,011
C24:0	0,33±0,004	0,33±0,001	0,34±0,006	0,33±0,004

Médias com as mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

EOA: 20% de óleo de girassol alto oléico e 80% de água – 0,4% Tween 80

PSAD e 4SAD: microcápsula produzida por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina

PSAD: microcápsulas padrão com 60,03% de eficiência de encapsulação

4SAD : microcápsula com surfactante HLB 4,30 e com 76,31% de eficiência de encapsulação

Com os valores de composição em ácidos graxos da fase oleosa obtida da desemulsificação das emulsões, a curva de calibração e valores de eficiência de encapsulação de cada microcápsula calculou-se a % de recheio liberado conforme dados da Tabela 6 (Anexo D).

Avaliando os resultados da Tabela 6, houve diferença significativa ($p < 0,05$) de quantidade de recheio liberado entre as amostras das emulsões com mais água (EOA) e com mais óleo (EAO), para 0 e 24h. As microcápsulas aplicadas em emulsão com mais óleo (EAO) liberaram mais recheio que em emulsão com mais água (EOA). A afinidade do recheio com o meio pode ser o motivo da maior facilidade de liberação.

Tabela 6. Quantidade de recheio liberado na aplicação de microcápsulas em emulsões padrão EAO e EAO

Microcápsula PSAD	% de recheio liberado ⁽¹⁾ ⁽²⁾	
	0 h	24 h
EOA	29,68 ± 4,06 ^(bc) ^(bc)	25,30 ± 0,37 ^(b) ^(b)
EAO	42,85 ± 1,49 ^(a) ^(a)	42,90 ± 3,19 ^(a) ^(a)
Microcápsula 4SAD	% de recheio liberado ⁽¹⁾ ⁽²⁾	
	0 h	24 h
EOA	27,63 ± 2,68 ^(b) ^(bc)	24,85 ± 1,03 ^(b) ^(b)
EAO	41,00 ± 4,09 ^(a) ^(a)	33,61 ± 3,16 ^(c) ^(c)

(1): Médias com as mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

(2): Médias com as mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p < 0,10$)

EOA: 20% de óleo de girassol alto oléico e 80% de água – 0,4% Tween 80

EAO: 80% de óleo de girassol alto oléico e 20% de água – 0,4% Span 80

PSAD e 4SAD: microcápsula produzida por coacervação complexa de óleo de linhaça com oleoresina de páprica (10:1) e material de parede goma arábica e gelatina

PSAD: microcápsulas padrão com 60,03% de eficiência de encapsulação

4SAD : microcápsula com surfactante HLB 4,30 e com 76,31% de eficiência de encapsulação

No caso de liberação maior em emulsão EAO, avaliando a presença do surfactante, no tempo 0 não teve diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostra padrão (sem surfactante) e a amostra com surfactante (HLB 4,3) na liberação de recheio. Em 24 horas foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostra padrão e com surfactante, sendo este último um valor menor, podendo ser um indício que a presença do surfactante evita a liberação do recheio em meio oleoso.

Para emulsões com mais água, não houve diferença entre a liberação de recheio das microcápsulas padrão (sem surfactante) e das com surfactantes (HLB 4,3), para tempos 0 e 24h. Mesmo assim, os valores de liberação para amostra com surfactantes são menores que para amostra padrão sem surfactante.

Segundo trabalhos de Tirkkonen; Turakkas; Paronen (1994), a presença de qualquer dos surfactantes testados, catiônico, aniônico e não iônico (HLB 16,7) não afetou na liberação do material de recheio comparado à amostra preparada sem surfactante.

Para as emulsões com maior quantidade de água não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as microcápsulas e os tempos.

De acordo com McClements (2005) e Shahidi e Han (1993) os mecanismos de liberação podem ocorrer pelo processo de fratura, onde a cobertura pode ser quebrada por forças externas como pressão ou por cisalhamento; processo de difusão que ocorre por forças internas, um gradiente de concentração faz com que ocorra a transferência de massa de um meio mais concentrado para um menos concentrado; processo de dissolução que ocorre pela ação de um solvente ou por calor; ou processo de biodegradação que ocorre quando o material é susceptível a mecanismos degradativos, como por exemplo, a ação de enzimas.

Para os dois tipos de emulsões produzidas neste trabalho, pelo processo de preparo, a liberação do recheio pode ter ocorrido pelo mecanismo de fratura por cisalhamento, e no caso das emulsões com maior quantidade de óleo, um outro mecanismo de liberação adicional pode ter ocorrido, a difusão, explicando os valores mais altos de liberação do recheio nestas emulsões.

Considerando o fato de que o tratamento com pequeno cisalhamento pode destruir as microcápsulas, a indicação para aplicação em molhos de salada a temperatura ambiente podem ser recomendado.

4 CONCLUSÕES

O uso de surfactante de HLB 4,3 na produção de microcápsulas teve uma leve tendência de reduzir a liberação do recheio em emulsões padrão de água em óleo (EAO), principalmente, e de óleo em água (EOA).

Microcápsulas com recheio hidrofóbico tendem a liberar mais recheio em emulsões com maior quantidade de óleo.

A utilização dos surfactantes na produção das emulsões (Tween 80 na emulsão EOA e Span 80 na emulsão EAO) pode também ter interferido na liberação do recheio, porém não existem dados conclusivos.

O processo de desemulsificação pode ser melhorado mas foi eficiente para avaliação de recheio liberado na fase oleosa.

A técnica de quantificação de recheio liberado por cromatografia gasosa somente pode ser utilizada se o óleo utilizado nas emulsões não contiver o ácido graxo de interesse do recheio das microcápsulas.

Para uma avaliação de liberação em diferentes tempos é necessária a aplicação de microcápsulas em emulsões estáveis, porém com mais ações mecânicas que podem danificar as microcápsulas.

Como as microcápsulas testadas possuem uma estrutura fragilizada pelo processo de liofilização que foram submetidas, possivelmente microcápsulas com estruturas mais rígidas poderiam liberar menos recheio nas emulsões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDURAHMAN, H N.; YUNUS R. M.; JEMAAT Z. Chemical Demulsification of Water-in-Crude Oil Emulsions. **Journal of Applied Sciences**, v.7, n.2, p. 196-201, 2007.

AOCS. American Oil Chemists Society. **Official methods and recommended practices of the AOCS**, Illinois, Champaign, 2004.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO F. O. (Ed.). Dispersões e Reologia. In. **Química do Processamento de Alimentos**, 2 ed., Varela, São Paulo, 1992a, p.27-37.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **Portaria nº 193, de 9 de março de 1999** (DOU. DE 11/03/99). Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Creme Vegetal.

BRASIL. DIPOA - Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal: **Portaria nº372, de 04 de setembro de 1997**. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Margarina

CHEN, C., LU, C., CHANG, C., YANG, Y., MAA, J. Influence of on the pH on the stability of oil-in-water emulsions stabilized by a Splittable Surfactant. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 170, p.173–179, 2000.

FELLOWS, P.J. (Ed.). **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípio e Prática**, 2 ed., Artmed Ed.São Paulo, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Londres: Lab. Pract.*,v.22, p. 475-476, 1973.

IAFELICE, G.; CABONI, M.F.; CUBADDA, R.; CRISCIO, T. Development of Functional Spaghetti Enriched with Long Chain Omega-3 Fatty Acids. **Cereal Chemistry**; v.85, n.2, p.146-151, 2008.

LANÇAS, F.M. Análise Quantitativa. In.**Cromatografia em fase gasosa**, Suprema Ed. São Carlos, SP, 1993. p. 151-172.

MCCLEMENTS, D.J. (Ed.). **Food emulsions: principles, practice and techniques**. CRC Press, 2005.

MORAIS, J.M. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. 2008. 216f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, SP, 2008.

PELSE, W. M. ; LINSSEN, J. P. H.; LEGGER, A.; HOUBEN, J. H. Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. **Meat Science**. v. 75, p.1–11, 2007.

PERRECHIL, F.A. **Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí**. 2008. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2008.

RABISKOVA, M., SONG, J.; OPAWALE, F.O.; BURGESS, D.J. The Influence of Surface Properties on Uptake of Oil into Complex Coacervate Microcapsules. **J.Pharm. Pharmacol**, v. 46, p. 631-635, 1994.

SALOPEK, B.; KRASIC, D.; FILIPOVIC, S. Measurement and Application of Zeta-Potential. **Rudarsko-geoloiko-naftni zbornik**, v.4,p. 147-151,1992.

SHAHIDI, F; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHAW, D.J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. Ed.Edgard Blücher Ltda,São Paulo, SP, 1975.185p.

SOUZA, M.A. **Desemulsificação e purificação de resíduos gordurosos provenientes de esgotos domésticos**. 2003. 156p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, 2003.

STATISTICA, 1995. Statistica v.5.0 for windows, Statsoft Inc., Tulsa-OK, USA (1995) (software)

TIRKKONEN, S., TURAKKA, L.; PARONEN, P. Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in the presence of surfactants. **Journal of Microencapsulation**, v.11, n.6, p. 615-626, 1994.

THIES, C. (Ed.). Complex Coacervation; Characterization. In. **How to make microcapsules: combined lecture and laboratory manual**, Thies Technology, St. Louis, Missouri, 1994.

CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de surfactantes interfere na produção de microcápsulas de recheio hidrofóbico por coacervação complexa. O uso de surfactante com HLB 4,3 na dosagem de 0,013% (m/m) interferiu positivamente na eficiência de encapsulação e na liberação do recheio. Porém o uso de surfactantes com HLB maior que 6,45, na mesma dosagem, resultou em microcápsulas vazias ou mesmo na não formação do coacervado.

A dosagem de utilização do surfactante é um parâmetro que deve ser estudado para otimização da produção de microcápsulas por coacervação, porém as quantidades devem ser mínimas, o que dificulta a realização dos testes.

A utilização de cloreto de cálcio (0,05%, m/m) para minimizar a formação de espuma no processo de emulsão apresentou resultados favoráveis e pode ser uma opção interessante para as produções de microcápsulas coacervadas onde o sistema favorece a formação de espuma, ou pela presença de surfactantes ou pelas características do óleo encapsulado.

A produção de microcápsulas por coacervação complexa é bastante delicada e com muitos pontos críticos de processo. A estrutura de um coacervado é bastante complexa e muitos fatores afetam positiva e negativamente as características finais das microcápsulas. A partir dos resultados deste trabalho se torna de grande importância o acompanhamento do potencial zeta das emulsões de goma arábica, da gelatina, da primeira emulsão (goma arábica, óleo, surfactantes e outros) e do sistema coacervado para que possa garantir as estruturas rígidas da parede.

No processo de resfriamento, a taxa de resfriamento é de grande importância sendo a utilização de banhos controlados de temperatura muito favoráveis à formação de microcápsulas com menor dispersão de tamanho de partículas. Em relação ao tamanho de partículas, a velocidade de agitação influencia diretamente no tamanho de partículas, sendo que velocidades altas produzem tamanhos menores de partículas. As partículas com tamanhos menores

aumentam a área superficial total e necessitam maiores pressões para ruptura, sendo mais resistentes na liberação do recheio.

A reticulação com transglutaminase é uma etapa do processo que deve ser avaliada cuidadosamente pois com a alteração de pH para pH ótimo da enzima (pH 6) houve redução de performance das microcápsulas.

O processo de secagem das microcápsulas é uma etapa crítica, pois as microcápsulas após liofilização tiveram sua estrutura da parede danificada. O pré congelamento em freezer pode não ser adequado se a quantidade de água nas microcápsulas úmidas ainda for grande. Com a formação de cristais grandes desta água livre durante o congelamento lento, estes podem danificar a estrutura da parede mesmo antes da liofilização. Alguns trabalhos apresentam a secagem das microcápsulas em temperatura ambiente e isto pode ser uma etapa a ser adicionada antes da liofilização.

A microencapsulação de recheios de óleos insaturados é uma solução contra a oxidação destes, porém a avaliação da estabilidade das microcápsulas é de grande importância. Neste trabalho o uso da oleoresina de páprica foi bastante interessante, pois além de auxiliar na visualização da microscopia ótica, foi possível verificar visualmente a degradação dos carotenóides pela oxidação das microcápsulas, revelando a fragilidade da estrutura da parede. Pode-se pensar em utilizar análises de colorimetria para avaliação mais quantitativa das amostras em relação à estabilidade à oxidação, ou melhor, estrutura protetora da microcápsula.

As emulsões primárias foram importantes para estudos iniciais de comportamento das microcápsulas, porém dificultaram algumas análises por serem muito instáveis. As emulsões secundárias sofrem maior trabalho mecânico e o sistema recebe maior quantidade de energia favorecendo a ruptura das microcápsulas, porém é um sistema que deve ser estudado para maior esclarecimento em relação à liberação do recheio ao longo do tempo das microcápsulas aplicadas em emulsões padrão.

A avaliação da liberação de recheio em emulsões padrão foi adequada e possibilitou determinar uma metodologia de avaliação de liberação de recheios

hidrofóbicos, desde que haja uma boa seleção prévia da composição em ácidos graxos dos óleos utilizados.

Os resultados mostrados de liberação maior de recheio hidrofóbico em emulsões com maior quantidade de óleo indicam que a relação hidrofobicidade/hidrofilicidade entre o recheio e o meio aplicado influencia na liberação e portanto, deve-se projetar uma microcápsula para cada aplicação utilizando a alteração da hidrofobicidade do recheio.

As microcápsulas produzidas neste trabalho podem ser indicadas para aplicação em molhos de salada, a qual tem uma formulação com maior quantidade de água que de óleo e o processo implica trabalho mecânico mínimo, não afetando muito na liberação do recheio antes da ingestão pelo consumidor.

A aplicação de microcápsulas de óleo rico em ômega 3 em emulsões é uma interessante solução para se obter produtos variados da dieta diária humana com balanço $n-6/n-3$ adequado.

ANEXO

ANEXO A

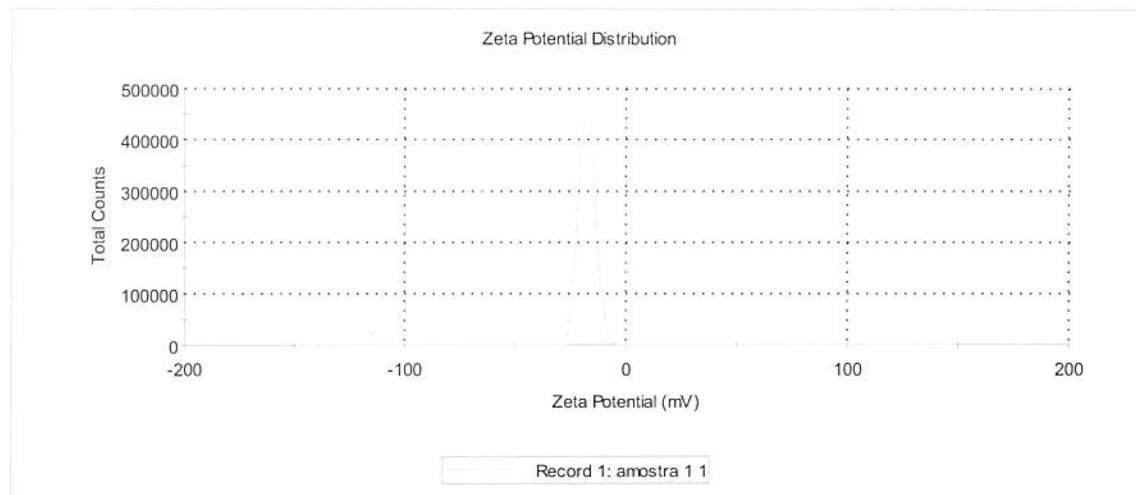


Gráfico de Potencial Zeta de solução de goma arábica

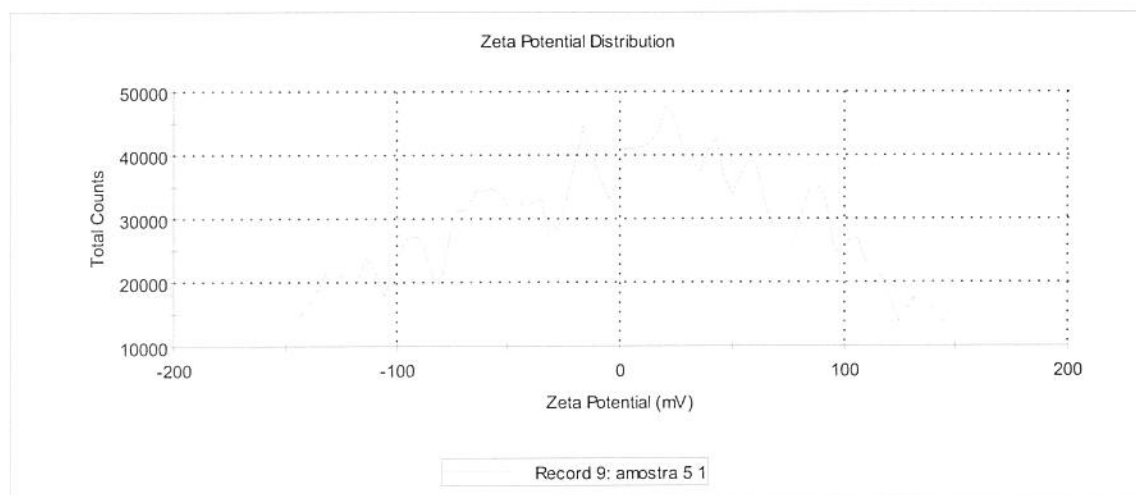


Gráfico de Potencial Zeta de solução de goma arábica e óleo de linhaça

ANEXO A

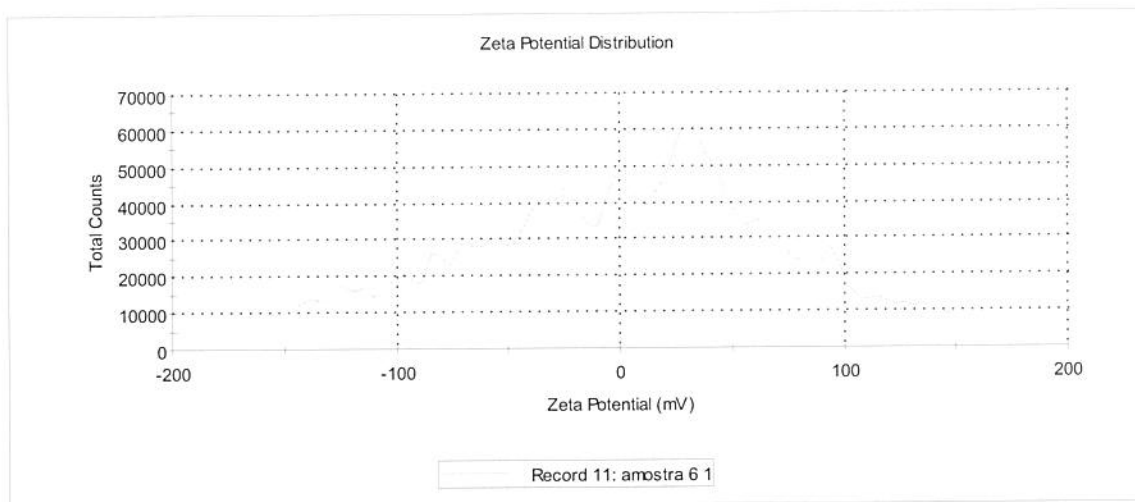


Gráfico de Potencial Zeta de solução de goma arábica, óleo de linhaça, Span 80 e cloreto de cálcio

ANEXO B

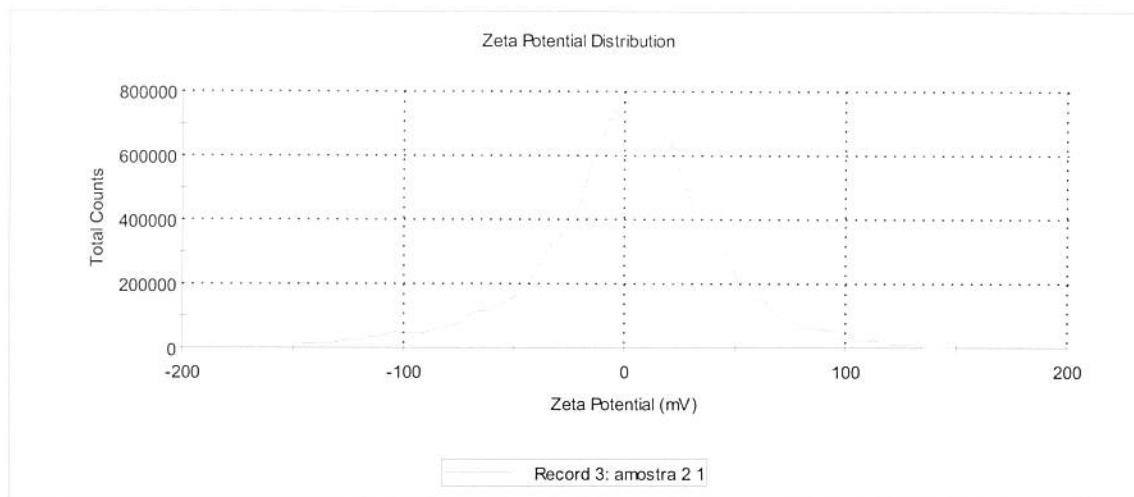


Gráfico de Potencial Zeta da emulsão EOA

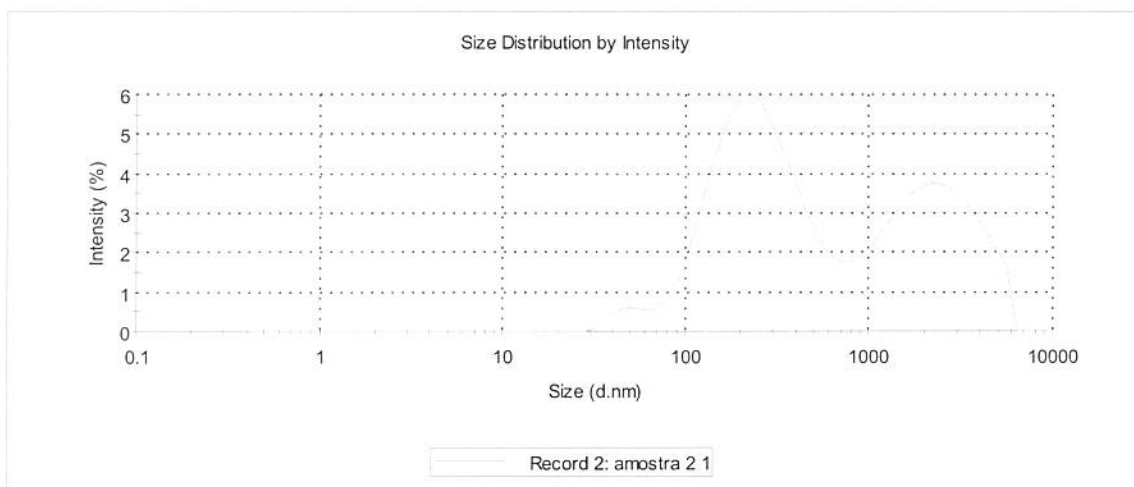


Gráfico de Distribuição de tamanho de partículas da emulsão EOA

ANEXO B

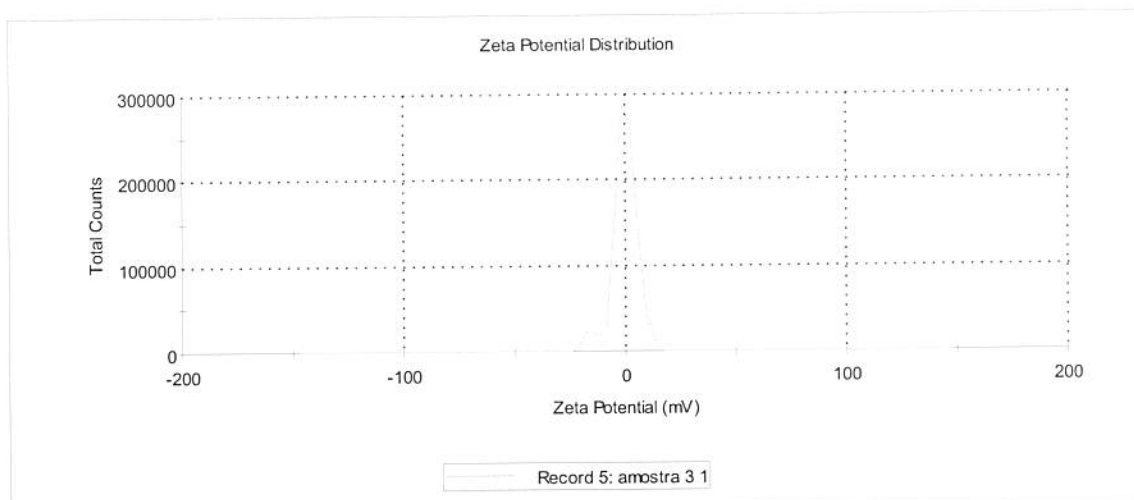


Gráfico de Potencial Zeta da emulsão EAO

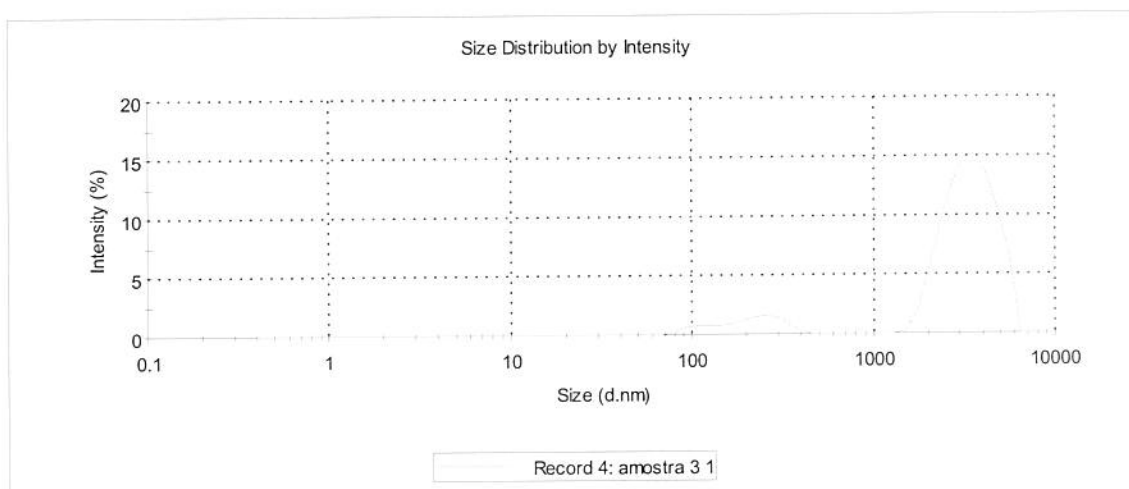
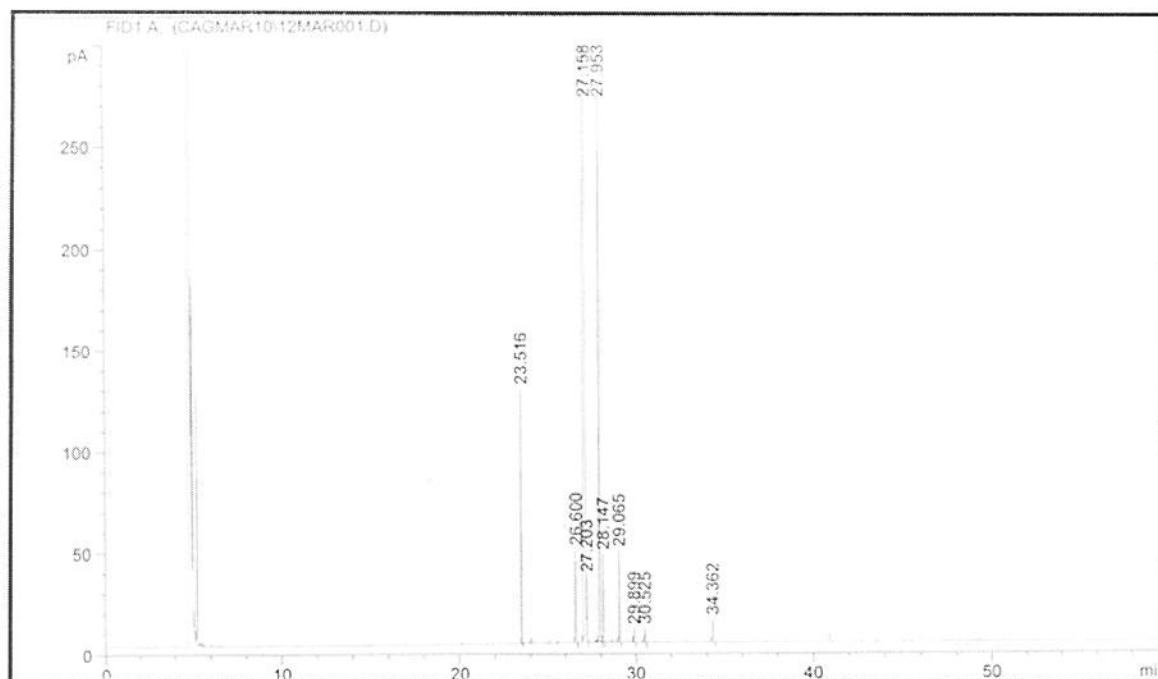


Gráfico de Distribuição de tamanho de partículas da emulsão EAO

ANEXO C

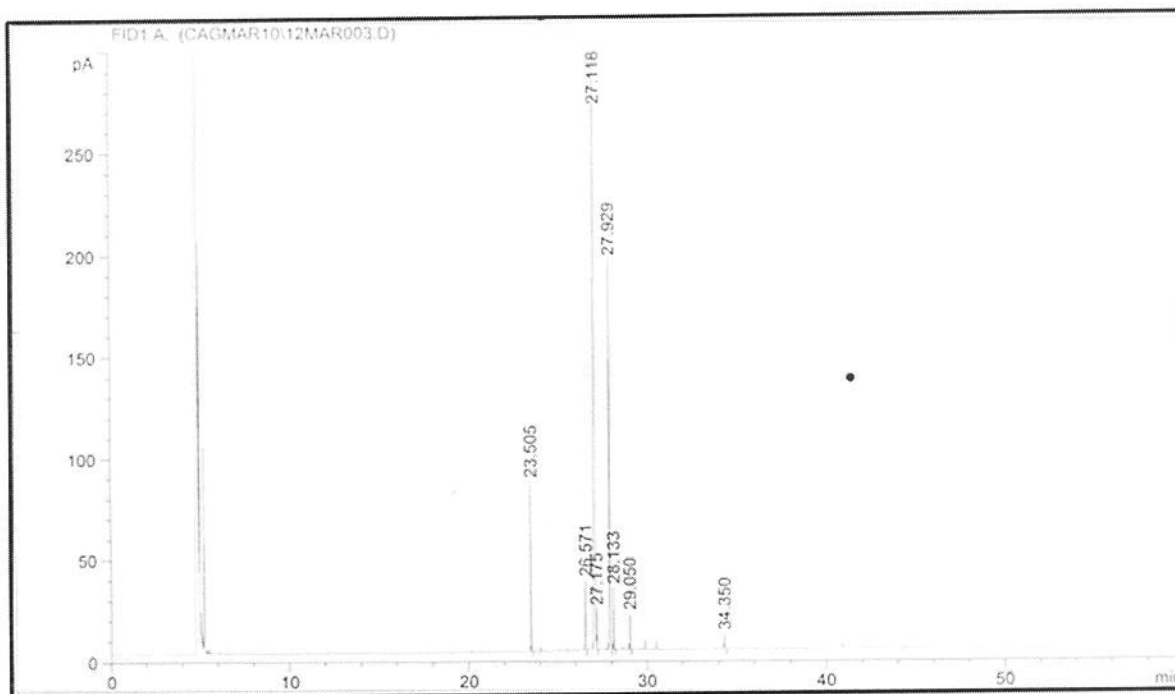


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	23.516	BB	0.0345	274.21964	125.39656	4.52843
2	26.600	BB	0.0483	158.48909	45.83650	2.61727
3	27.158	BV	0.0717	4417.97900	784.15857	72.95794
4	27.203	VB	0.0250	52.23859	32.14829	0.86266
5	27.953	BB	0.0464	846.57269	271.59082	13.98019
6	28.147	BB	0.0383	104.95375	43.28095	1.73319
7	29.065	VB	0.0426	121.63885	44.86919	2.00873
8	29.899	PP	0.0452	18.28524	6.61959	0.30196
9	30.525	VB	0.0459	19.28166	6.63834	0.31841
10	34.362	BP	0.0518	41.85630	10.89954	0.69121

Totals : 6055.51481 1371.43835

Resultados da composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa da amostra da fase oleosa obtida após desemulsificação da emulsão EOA com adição das micropartículas PSAD

ANEXO C



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	23.505	BB	0.0315	174.92476	83.39545	4.48955
2	26.571	BB	0.0455	100.22279	33.85626	2.57228
3	27.118	BV	0.0636	2894.66968	630.24615	74.29346
4	27.175	VB	0.0282	35.29168	19.39400	0.90578
5	27.929	BB	0.0422	545.98145	191.79369	14.01295
6	28.133	BB	0.0379	71.87415	30.10377	1.84469
7	29.050	VB	0.0435	45.90980	17.02276	1.17830
8	34.350	BP	0.0616	27.39002	7.00244	0.70298

Totals : 3896.26432 1012.81452

Resultados da composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa da amostra da fase oleosa obtida após desemulsificação da emulsão EAO com adição das micropartículas 4SAD

ANEXO D

Considerações: 48,00
 % C18:3 no recheio:
 equação da reta : $y = 0,9274 \times$
 massa C 19:0 : 1 mg
 % C18:3 no OGAO: 0,78

TEMPO 0

Valores de médias

Emulsão	MC	MC (g)	Eficiência encapsulação (%)	C18:3 recheio MC (g)	OGAO (g)	C 18:3 OGAO (g)	Area C 18:3	Area C 19:0	C 18:3 FOS total - x (g)	C18:3 no FOS origem recheio (g)	FOS (g)	C18:3 total (100%) (g)	OGAO + recheio total (g)	recheio liberado (%)
EAO	PSAD	0.602	60,00	0.17	8,0	0.062	43,61	74,95	0,63	0,62	51,72	0,24	8,36	42,85
EAO	4SAD	0.605	76,28	0.22	8,0	0.062	40,91	60,17	0,74	0,74	53,76	0,28	8,46	41,00
EOA	PSAD	0.605	60,00	0.17	2,0	0.016	81,86	66,51	1,35	1,34	56,38	0,19	2,36	29,68
EOA	4SAD	0.604	76,28	0.22	2,0	0.016	99,72	77,89	1,42	1,41	53,00	0,24	2,46	27,63

TEMPO 24h

Valores de médias

Emulsão	MC	MC (g)	Eficiência encapsulação (%)	C18:3 recheio MC (g)	OGAO (g)	C 18:3 OGAO (g)	Area C 18:3	Area C 19:0	C 18:3 FOS total - x (g)	C18:3 no FOS origem recheio (g)	FOS (g)	C18:3 total (100%) (g)	OGAO + recheio total (g)	recheio liberado (%)
EAO	PSAD	0.603	60,00	0.17	8,0	0.062	40,29	68,87	0,63	0,63	51,93	0,24	8,36	42,90
EAO	4SAD	0.606	76,28	0.22	8,0	0.062	35,97	65,33	0,60	0,60	53,08	0,28	8,46	33,61
EOA	PSAD	0.602	60,00	0.17	2,0	0.016	62,39	64,62	1,04	1,03	50,90	0,19	2,36	25,30
EOA	4SAD	0.602	76,28	0.22	2,0	0.016	69,81	60,12	1,26	1,25	52,26	0,24	2,46	24,85

OGAO: óleo de girassol alto oleico
 FOS: fase oleosa separada pela desmemulsificação
 MC: microcapsula

