

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Propriedades de microgéis de gelana-quitosana

obtidos a partir de extrusão

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP) para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Joice Aline Pires Vilela

Engenheira de Alimentos, 2009 (UNICAMP)

Prof^a Dra. Rosiane Lopes da Cunha

ORIENTADORA

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Joice Aline Pires Vilela, aprovada pela comissão julgadora em _/_/_ e orientada pela Prof^a. Dra. Rosiane Lopes da Cunha.

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Vilela, Joice Aline Pires

V711p Propriedades de microgéis de gelana-quitosana obtidos a partir a partir de extrusão / Joice Aline Pires Vilela. --Campinas, SP: [s.n], 2012.

> Orientador: Rosiane Lopes da Cunha. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

 Microgéis. 2. Gelana. 3. Quitosana. 4. Atomização.
Digestão in vitro. I. Cunha, Rosiane Lopes da. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Properties of gellan-chitosan microgels obtained from extrusion process Palavras-chave em inglês (Keywords): Microaels Gellan Chitosan Atomization In vitro digestion Área de concentração: Engenharia de Alimentos Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos Banca examinadora: Rosiane Lopes da Cunha [Orientador] Ana Silvia Prata Soares Lizielle Maria Ricardo Guerreiro Miriam Dupas Hubinger Ângelo Luiz Fazani Cavallieri Data da defesa: 09/03/2012 Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha TITULAR

Dra. Lizielle Maria Ricardo Guerreiro TITULAR

Profa. Dra. Ana Silvia Prata Soares TITULAR

Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger SUPLENTE

Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri SUPLENTE

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Geraldo e Solange.

E ao meu companheiro amado, Cléo.

Agradecimentos

À professora Rosiane por toda ajuda, orientação e apoio.

Ao Cléo pelo auxílio freqüente no meu trabalho através de discussões produtivas, sugestões de teorias e realização de análises (microscopias, infra-vermelho, outras). Além disso, pelo apoio em todos os momentos e por tudo de bom que temos vivido juntos.

Aos amigos do laboratório, Rapha, Carol, Faby, Kátia, Luiz, Rejane, Fezinha, Marisa, Aline, Lizi, Adriana, Francielle, Margarita, Gláucia, Marcela, Vanessas e Aninha pela companhia e por toda ajuda. À técnica do laboratório, minha xará, Joyce e a Dona Ana, que deixou saudades nesse último ano.

Aos meus amigos de estrada, Samu, Marília, Amanda, Mari, Robson, Edi, Ricardinho, Nilton, Wal, Henrique, Felipe e Paulinha.

A todos os meus familiares, todos os tios, primos, avós, e em especial aos meus pais, Geraldo e Solange, aos meus irmãos, Luana e Giovanni, aos meus tios, Iza, Nito, Betânia, Valter e Jijor, e aos familiares de coração, Cardoso, Geni, Josely e Ricardo.

A família do Cléo, especialmente à Tida, Lua e André Gil.

Ao Professor Eduardo e à Marina pelas análises de densidade. Ao professor Carlos Grosso e à técnica Yara pelas análises iniciais de tamanho de partícula. Ao professor Watson Loh e ao Márcio pelas análises de tensão superficial. À professora Maria Ângela, Rodrigo e Ari pelo ensaio de liofilização. Ao professor Marcelo Menossi pelos ensaios conduzidos em seu laboratório.

A todos os docentes e funcionários da FEA. E às agências de fomento, CNPq, Capes e Fapesp.

Enfim, a todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Microgéis	7
3.2 Processos utilizados na produção dos microgéis	9
3.2.1 Emulsão/gelificação	10
3.2.2 Extrusão/gelificação	10
3.3 Processo de atomização	11
3.3.1 Influência das propriedades do fluido na produção de microgéis por atomização/gelificação	15
3.3.2 Influência das variáveis de processo na produção de microgéis por atomização/gelificação	17
3.4 Biopolímeros utilizados na produção dos microgéis	21
3.4.1 Gelana	21
3.4.2 Quitosana	23
3.5 Recobrimento com quitosana	25
3.6 Digestão in vitro de partículas	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Materiais	31
4.2 Preparo das soluções	31

ÍNDICE

4.3 Definição das concentrações para formação de géis	31
4.4 Preparo dos microgéis	32
4.4.1 Equipamento	32
4.4.2 Processo de atomização para formação dos microgéis	33
4.4.3 Efeito da pressão de ar	36
4.4.4 Efeito da altura entre bico aspersor e banho de coleta (H)	36
4.4.5 Efeito do diâmetro do bico aspersor	36
4.4.6 Efeito da concentração de gelana nos microgéis	36
4.4.7 Microgéis formados através da atomização da solução de gelana (1% m/m) em quitosana	37
4.4.8 Números adimensionais do processo de atomização	37
4.5 Recobrimento dos microgéis de gelana/Ca e gelana/K com quitosana	40
4.6 Simulação in vitro das condições da digestão	41
4.7 Metodologias de análise	42
4.7.1 Densidade	42
4.7.2 Tensão superficial	42
4.7.3 Propriedades reológicas – curvas de escoamento e tensões normais	42
4.7.4 Compressão Uniaxial	43
4.7.5 Distribuição de tamanho de partículas – Difração à laser	44
4.7.6 Microscopia óptica e análise de morfologia dos microgéis	45
4.7.7 Potencial Zeta	46
4.8 Análise Estatística	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. Propriedades das soluções de gelana	47
5.1.1. Densidade	47

5.1.2 Tensão superficial	48
5.1.3. Viscosidade	49
5.1.4. Primeira Diferença de Tensões Normais (N1)	53
5.2. Definição das concentrações para formação de géis	55
5.2.1 Gelificação induzida por sais (CaCl ₂ e KCl)	55
5.2.2 Gelificação induzida por polieletrólito de carga positiva (quitosana)	59
5.3. Influência das condições de processo nas propriedades dos microgéis	61
5.4. Influência da composição nas propriedades dos microgéis de gelana	68
5.4.1 Microgéis com gelificação induzida por sais (CaCl ₂ e KCl)	68
5.4.2 Microgéis com gelificação induzida por polieletrólito de carga positiva (quitosana)	80
5.5 Recobrimento dos microgéis de gelana/Ca e gelana/K com quitosana	82
5.6. Simulação in vitro do processo de digestão	87
6. CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS	97

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetros e áreas de saída de líquido e gás dos bicos aspersores	34
Tabela 2. Parâmetros reológicos das soluções de gelana a 25°C.	51
Tabela 3. Números adimensionais calculados nas diferentes configurações de bico aspersor.	65
Tabela 4. Números adimensionais calculados nas diferentes pressões de ar utilizadas	66
Tabela 5. Parâmetros reológicos das suspensões de microgéis de gelana/Ca	78
Tabela 6. Potencial Zeta (mV) dos polissacarídeos puros.	83
Tabela 7. Potencial zeta das partículas de gelana/Ca e gelana/K em diferentes dispersante	es. 84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principais estruturas internas de partículas com um ou mais componentes (Adaptada de JONES & McCLEMENTS, 2010)
Figura 2. Atomizador pneumático com mistura interna (A) e com mistura externa (B) (FRITSCHING, 2006)12
Figura 3. Quebra do jato de líquido. (A) Crescimento das ondas instáveis, (B) formação dos ligamentos e (C) fragmentação dos ligamentos em gotas (DOMBROWSKI & JOHNS, 1963)
Figura 4. Líquidos newtonianos em ordem crescente de viscosidade até 50 Pa.s, atomizados com ar e utilizando vazão de líquido de 50 kg/h (FRITSCHING, 2006)17
Figura 5. Representação do comprimento de ruptura18
Figura 6. Unidade repetida do tetrassacarídeo que compõem a goma gelana (Tang et al., 1996)
Figura 7. Estrutura química da quitosana (Hamman, 2010)24
Figura 8. Configuração do bico aspersor e do processo de atomização. H: distância entre a saída do bico aspersor e a solução gelificante; d_g : diâmetro interno do orifício para passagem do ar; d_1 : diâmetro interno do orifício para passagem do líquido e $d_{1,0}$: diâmetro externo do orifício para passagem do líquido
Figura 9. Correlação entre pressão do ar e velocidade utilizando os diferentes bicos aspersores
Figura 10. Efeito da concentração de gelana na densidade
Figura 11. Tensão superficial das soluções diluídas de gelana

Figura 13. Efeito da concentração de gelana na viscosidade aparente (η) das soluções em taxa de deformação de 0,01 s⁻¹......**51**

Figura 23. Efeito da concentração de polissacarídeo e do sal utilizado na distribuição de tamanho das partículas contendo (A) 0,6, (B) 0,8, (C) 1 e (D) 1,2% (m/m) de gelana......71

Figura 24. Microscopia óptica (aumento de 10x) dos microgéis com gelificação induzida por CaCl₂ contendo (A) 0,4, (B) 0,6, (C) 0,8, (D) 1 e (E) 1,2% (m/m) de gelana.**72**

Figura 25. Microscopia óptica (aumento de 10x) dos microgéis de gelana com gelificação induzida por KCl. (A) 0,4%, (B) 0,6%, (C) 0,8%, (D) 1%, e (E) 1,2% m/m de gelana......75

Figura 28. Microscopias das estruturas formadas através da atomização de gelana (1% m/m) sobre soluções contendo 0,5% m/m de quitosana utilizando pressão de 1 (A) ou 1,5 bar (B) e sobre solução com 0,25% m/m de quitosana com 1,5 bar de pressão (C). Aumento de 10x. **81**

Figura 32. Efeito das etapas de digestão sobre o potencial zeta dos microgéis contendo 1% m/m de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ (gelana/Ca) ou KCl (gelana/K) sem ou com recobrimento com quitosana 0,25% m/m (gelana/Ca/quitosana e gelana/K/quitosana).

RESUMO

A encapsulação de muitos compostos bioativos, como vitaminas, bactérias probióticas e antioxidantes ajuda na incorporação, proteção, e entrega do bioativo em sítio específico, porém a eficiência da matriz carreadora depende da sua composição e processo de fabricação. Com este intuito, a viabilidade de produção e as características finais de microgéis de gelana formados por extrusão e posterior gelificação iônica foram estudadas. Micropartículas, com tamanho médio entre 70-120 µm, foram produzidas sob condições amenas de temperatura e concentração, utilizando um processo de atomização seguido de gelificação em soluções de cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de potássio (KCl) ou quitosana. O tamanho das partículas mostrou-se mais dependente das condições de processo (geometria do bico aspersor e velocidade de ar) que das propriedades da solução biopolimérica. No entanto, o aumento da concentração de gelana levou a maior esfericidade dos microgéis obtidos. Com relação aos agentes gelificantes, as micropartículas com gelificação induzida por CaCl₂ apresentaram formato mais esférico e maior estabilidade que as partículas formadas a partir de KCl. A obtenção de micropartículas de gelana recobertas com quitosana foi possível somente através de um processo em duas etapas. Na primeira etapa, a gelana foi gelificada através da difusão salina (CaCl₂ ou KCl) e posteriormente, as partículas formadas foram recobertas com quitosana. A presença da camada externa de quitosana teve influência na resistência das partículas às condições simuladas da digestão. As partículas estudadas, com ou sem recobrimento de quitosana, resistiram à digestão gástrica, mas na digestão entérica as partículas recobertas com quitosana apresentaram menor grau de fragmentação que as partículas contendo somente gelana. Assim, foi demonstrado que a produção de microgéis formados por interação entre dois biopolímeros de cargas opostas melhorou a eficiência das partículas como material de parede sendo este um potencial veículo de compostos bioativos.

ABSTRACT

The encapsulation of many bioactive compounds such as vitamins, antioxidants and probiotic bacteria allows the incorporation, protection, and delivery of bioactive on a specific site, but the efficiency of carrier matrix depends on its composition and manufacturing process. To this aim, the feasibility of production and the final characteristics of the gellan microgels obtained by extrusion process followed by ionic gelation were studied. Microparticles, with average size among 70-120 µm, were produced under mild conditions of temperature and concentration using an atomization process followed by gelation induced by calcium chloride (CaCl₂), potassium chloride (KCl) or chitosan solutions. The particle size was more dependent on process conditions (nozzle geometry and air velocity) than the properties of the biopolymeric solution. However, the increase in gellan concentration led to more spherical microgels. In relation to hardening agents, the microparticles with gelation induced by CaCl₂ showed more spherical shape and greater stability than the particles formed by KCl. Gellan microparticles coated with chitosan was possible to obtain only through a two-step process. In the first step, the gellan microgels were obtained through salt diffusion (KCl or CaCl₂) and the particles obtained were subsequently coated with chitosan. The presence of the outer layer of chitosan exerted effect on the resistance of the particles to the simulated digestion process. All particles studied, with or without a coating of chitosan, resisted to the gastric digestion, however the chitosan coated particles showed a lower degree of fragmentation than the particles containing only gelan when subjected to the enteric digestion step. Therefore the results obtained showed that the microgels formed by interaction between two oppositely charged polymers improved the efficiency of particles as wall material, showing a great potential as bioactive compounds carrier.

1. INTRODUÇÃO

Os microgéis têm sido extensivamente estudados devido ao seu potencial em aplicações como entrega, proteção e liberação controlada de fármacos e compostos bioativos, engenharia de tecidos, ou como agentes texturizantes em alimentos ou cosméticos. Essas partículas gelificadas associam as características dos hidrogéis convencionais (macrogéis), como boas propriedades mecânicas, alto teor de umidade, rede interna capaz de aprisionar compostos ativos, com outras características adicionais, como maior relação área superficial/volume e capacidade de escoamento (OH, 2010).

O sucesso nas mais diversas aplicações depende das características das partículas, como formato, tamanho médio, polidispersão, estabilidade, carga superficial e outras. Essas propriedades, por sua vez, estão relacionadas à composição do microgel, bem como ao processo de produção escolhido e condições utilizadas (CHAN et al., 2009; FREITAS et al., 2005; ZHANG et al., 2007; JONES & McCLEMENTS, 2010).

Várias técnicas podem ser utilizadas para a obtenção das micropartículas. A técnica mais simples envolve a extrusão de uma solução de polieletrólito, através de uma seringa, que goteja e cai em uma solução contendo agentes gelificantes (CHAN et al., 2009; ZHANG et al., 2007; FUNDUEANU et al., 1999). Apesar de sua simplicidade, esse método possui uma grande desvantagem em relação ao tamanho das partículas obtidas, sendo que tamanhos menores que 500 µm são dificilmente alcançados através dessa técnica. Outra técnica bastante empregada é a que utiliza emulsões água-óleo para formação das gotículas com posterior gelificação dessas gotas. Esse método permite obter

micropartículas de tamanho e polidispersão bastante reduzidas, porém para a separação das partículas da fase oleosa é necessário o uso de solventes orgânicos, que podem deixar resíduos tóxicos.

Assim, o processo de atomização/gelificação tem se mostrado como uma alternativa promissora, já que possibilita a obtenção de partículas menores que no gotejamento, e é uma tecnologia considerada limpa (REIS et al., 2006). Como a atomização é um processo de natureza complexa e aleatória, em que a geometria do atomizador, as variáveis de processo, e as propriedades físicas da solução biopolimérica têm grande influência nas características das gotas produzidas, o estudo do processo, bem como da etapa posterior de gelificação, é fundamental na obtenção de partículas com características desejáveis (FRITSCHING, 2006; CHAN et al., 2009).

Quanto à composição, os polissacarídeos são de particular interesse na produção de microgéis, já que são biodegradáveis, não tóxicos e possuem diversas propriedades funcionais (OH, 2010; OH et al., 2009; BUREY et al., 2008; REIS et al. 2006). A gelana é um polissacarídeo iônico que tem capacidade de formar géis a baixas concentrações na presença de ácidos, sais de cátions mono ou divalentes ou de polieletrólitos de carga oposta, como a quitosana. É um polissacarídeo de amplo uso na indústria de alimentos e em aplicações biotecnológicas por formar um gel transparente que é resistente ao aquecimento e à acidificação e têm demonstrado grande potencial em encapsulação (TANG et al., 1996; YAMAMOTO, 2006; KEDZIEREWICZ et al., 1999; FUJII et al., 2005; OHKAWA et al., 2004).

Já a quitosana é um dos compostos naturais mais estudados para aplicações envolvendo entrega controlada de fármacos. É um dos poucos polieletrólitos catiônicos

encontrados na natureza, e tem sido largamente utilizado no recobrimento de partículas, principalmente partículas de alginato (TAKAYANAGI & MOTOMIZU, 2006; KASAPIS et al., 2009). O recobrimento com quitosana pode reforçar a capacidade protetora e aumentar significativamente a bio-adesividade das partículas (GHERSD et al., 1998; COLINET, et al., 2010; COOK et al., 2011; MURATA, et al., 1993).

Assim, um estudo sobre a influência das condições de processo e das propriedades da solução biopolimérica nas propriedades das partículas formadas, como tamanho, carga elétrica superficial, estabilidade, comportamento frente às condições simuladas da digestão, se faz necessário para permitir que as características das partículas gelificadas sejam manipuladas e controladas de acordo com a aplicação final.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o efeito das variáveis de processo e da composição biopolimérica nas características dos microgéis de gelana produzidos através de atomização e posterior gelificação induzida por sais (CaCl₂ e KCl) ou através de complexação com quitosana.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar o efeito das propriedades da solução biopolimérica e das condições de processo no tamanho, distribuição de tamanho e morfologia dos microgéis produzidos.
- Realizar análise adimensional dos resultados obtidos e confrontar os valores de tamanho médio com valores preditos através de modelo proposto na literatura.
- Avaliar o efeito da composição (gelana/Ca, gelana/K e gelana/quitosana) na morfologia, tamanho e estabilidade dos microgéis.
- Avaliar as propriedades reológicas de suspensões das partículas obtidas.
- Avaliar a viabilidade do recobrimento com quitosana dos microgéis de gelana/Ca e gelana/K e compará-los frente às condições simuladas da digestão.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microgéis

Microgéis são partículas com tamanho na escala micrométrica, produzidos através da gelificação de biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos. Esses biopolímeros são biodegradáveis, abundantes na natureza, renováveis e não tóxicos. Assim a produção de microgéis é de particular interesse para aplicação em alimentos (OH, 2010; OH et al., 2009; BUREY et al., 2008; REIS et al., 2006).

Os microgéis podem ser utilizados para a encapsulação, proteção e entrega controlada de vários ingredientes alimentícios funcionais, como lipídeos bioativos, sais minerais, enzimas, peptídeos, antioxidantes e fibras dietéticas. Essas partículas também podem ser utilizadas na modulação das propriedades dos alimentos (aparência visual, textura, estabilidade ou sabor) ou para a substituição de ingredientes, como o uso de biopolímeros na substituição de gordura (JONES & McCLEMENTS, 2010; BUREY et al., 2008).

As micropartículas podem ser manufaturadas utilizando-se diferentes processos físico-químicos, como por exemplo, através de extrusão/gelificação, uso de emulsões, e/ou remoção de solvente. Para a utilização desses processos de forma adequada é necessário conhecer as propriedades dos biopolímeros e suas possíveis interações em solução (JONES & McCLEMENTS, 2010).

As partículas biopoliméricas podem ser obtidas em diferentes tamanhos, formatos e estruturas internas. O tamanho das partículas, que geralmente se encontra entre 0,01 e 1000 μ m, é um parâmetro importante que exerce influência nas propriedades físico-químicas e sensoriais dos alimentos em que são adicionadas (JONES & McCLEMENTS, 2010). Além

disso, em encapsulação, as partículas menores (maior relação área superficial/volume) permitem uma liberação do composto bioativo mais rápida que em partículas maiores (SUNDAR et al., 2010).

Quanto à morfologia, a maioria das partículas biopoliméricas possui formato esférico, embora outros formatos também sejam possíveis, como esferóides, fibras e "clusters". O formato tem influência na textura resultante das suspensões alimentícias (JONES & McCLEMENTS, 2010; McCLEMENTS, 2005).

A estrutura interna é também de grande importância, pois está diretamente relacionada a propriedades como eficiência da encapsulação, permeabilidade, porosidade, integridade e digestibilidade. Os três principais tipos de estruturas internas são apresentados na Figura 1. A estrutura homogênea é aquela cujo interior é composto por um ou mais biopolímeros completamente misturados de forma homogênea. Já as estruturas heterogêneas podem ser do tipo núcleo com camada externa de recobrimento, que pode variar quanto à sua composição, espessura e estrutura (por exemplo, ser constituída por múltiplas camadas). Já a estrutura heterogênea do tipo dispersão, é constituída por duas ou mais fases, com dispersão de uma ou mais fases sobre a outra contínua (JONES & McCLEMENTS, 2010).



Figura 1. Principais estruturas internas de partículas com um ou mais componentes (Adaptada de JONES & McCLEMENTS, 2010).

Outra característica importante das partículas é a carga elétrica superficial, que depende das propriedades dos componentes utilizados na sua produção, das interações entre eles, bem como do pH e força iônica do meio em que as partículas se encontram dispersas. A carga das partículas tem influência na estabilidade à agregação, nas interações das partículas com componentes presentes no meio dispersante e nas interações com superfícies biológicas, como as encontradas na boca, estômago e intestino (JONES & McCLEMENTS, 2010).

Outras propriedades físico-químicas das partículas, como densidade, índice de refração, propriedades reológicas, polaridade e porosidade também são de bastante interesse, pois terão efeito nas propriedades físico-químicas dos alimentos em que as partículas forem adicionadas. Em aplicações práticas é importante que as partículas causem melhoras ou, no mínimo, não afetem de forma adversa as propriedades físico-químicas e sensoriais do produto em que foram incorporadas (JONES & McCLEMENTS, 2010).

3.2 Processos utilizados na produção dos microgéis

A ampla gama de possíveis aplicações dos microgéis levou à necessidade de preparar essas partículas em escala industrial e de modo controlado, com qualidade, segurança e economia adequadas para seu uso e comercialização. Várias técnicas diferentes têm sido utilizadas para a formação de partículas gelificadas, e a maioria dos processos envolve a formação das gotas antes da gelificação. Os métodos mais comumente utilizados são os que envolvem preparação de emulsões com posterior gelificação das gotas ou processos de extrusão também seguidos de gelificação (BUREY et al., 2009).

9

3.2.1 Emulsão/gelificação

Partículas de tamanhos bem definidos podem ser obtidas através da técnica de emulsificação seguida de gelificação. Nesse método, uma solução aquosa contendo o biopolímero é homogeneizada com uma fase oleosa contendo emulsificante solúvel em óleo para formar uma emulsão água-óleo (A/O). O tamanho das gotas formadas pode ser controlado pelas condições de homogeneização (intensidade e tempo de homogeneização) ou através da composição do sistema. Os biopolímeros presentes nas gotas de água podem ser gelificados através de diferentes métodos, incluindo aquecimento, resfriamento, adição de sais, mudanças no pH ou adição de enzimas. Após a gelificação, as partículas são separadas da fase oleosa através de filtração ou centrifugação, e o excesso de óleo deve ser removido através de lavagens com solvente orgânico (OH et al., 2009; JONES & McCLEMENTS, 2010; SUNDAR et al., 2010).

A maior desvantagem desse método é a necessidade da utilização de solventes orgânicos e posterior remoção destes. Além disso, resíduos desses solventes podem causar problemas relativos à toxicidade (SUNDAR et al., 2010).

3.2.2 Extrusão/gelificação

Dentre os métodos de formação de gotas antes da gelificação, o gotejamento é a técnica mais simples, e envolve a extrusão de uma solução de polieletrólito através de uma pipeta ou seringa, que goteja e cai em uma solução contendo o agente gelificante, como ácidos ou sais de cátions mono ou divalentes. Os íons H⁺ ou cátions se difundem rapidamente na gota levando à sua gelificação (CHAN et al., 2009; ZHANG et al., 2007; FUNDUEANU et al., 1999). Apesar de sua simplicidade, esse método possui algumas

desvantagens como a limitação de tamanho das partículas produzidas, dado que o diâmetro das gotas depende do diâmetro do bocal e também da viscosidade da solução polimérica. Partículas menores que 500 µm são difíceis de se produzir com este método. Outra desvantagem é que este método não é adequado para escala industrial. Nesse sentido o processo de atomização em substituição ao gotejamento tem se mostrado como uma alternativa promissora, já que possibilita a obtenção de partículas menores e em taxas maiores. Porém, a atomização é um processo complexo e de difícil controle, com o qual produzir pequenas partículas em grandes quantidades continua sendo um desafio (REIS et al., 2006). O processo de atomização seguido de gelificação iônica será tratado com mais detalhes no tópico posterior.

3.3 Processo de atomização

A atomização de líquidos é um processo clássico das operações unitárias em engenharia, que tem aplicação em numerosos segmentos industriais, como na área química, mecânica, aeroespacial, engenharia civil, ciência e tecnologia dos materiais e metalurgia, processamento de alimentos, farmacêutica, agrícola, medicina e outras. O processo de atomização consiste em converter uma corrente de líquido em uma multitude de gotas individuais, o que pode ser causado por energia intrínseca (como a energia potencial) ou extrínseca (como a energia cinética) (FRITSCHING, 2006).

Os atomizadores são comumente classificados de acordo com a energia usada para a desintegração do líquido, como energia proveniente do próprio líquido pressurizado (atomizadores de pressão), energia fornecida por um meio externo, como um gás em alta

velocidade (atomizador pneumático), energia mecânica (atomizador rotacional), energia elétrica, acústica ou outras (FRITSCHING, 2006; LEFEBVRE, 1989).

Nos atomizadores pneumáticos a desintegração do líquido ocorre através da sua interação com um gás pressurizado a altas velocidades. Dois principais tipos de atomizadores pneumáticos podem ser distinguidos: com mistura interna ou externa de gás e líquido. Os dois princípios podem ser visualizados na Figura 2. Nos atomizadores de mistura interna, gás e líquido são misturados em uma câmara e a mistura é conduzida até o orifício de saída. Já nos atomizadores de mistura externa, o gás interage com o líquido fora do atomizador (FRITSCHING, 2006).



Figura 2. Atomizador pneumático com mistura interna (A) e com mistura externa (B) (FRITSCHING, 2006).

No atomizador pneumático de mistura externa, a desintegração pode ser explicada pelo mecanismo de ondas. Neste caso, o jato de líquido em baixa velocidade é acelerado pela corrente de gás em alta velocidade que o envolve, sendo a corrente de alimentação submetida à tração e tensões de cisalhamento. Essa ação fragmentadora das forças mecânicas aplicadas é oposta pela viscosidade e tensão superficial do líquido alimentado (MANSOUR & CHIGIER, 1995). Este processo envolve uma série de instabilidades. Inicialmente, a primeira instabilidade, denominada Kelvin–Helmhotz, se desenvolve na

camada anular presente na descarga do líquido pelo bico aspersor. Essa instabilidade se desenvolve na forma de ondas na interface gás-líquido (VARGA et al., 2003). Ocorre então um crescimento das ondas formadas até que estas começam a se separar na forma de ligamentos. Os ligamentos rapidamente se colapsam em gotas através da instabilidade secundária, chamada Rayleigh–Taylor (ALISEDA et al., 2008). Um esquema simplificado pode ser visualizado na Figura 3.



Figura 3. Quebra do jato de líquido. (A) Crescimento das ondas instáveis, (B) formação dos ligamentos e (C) fragmentação dos ligamentos em gotas (DOMBROWSKI & JOHNS, 1963).

Devido à natureza complexa e aleatória do processo de atomização, a maioria dos bicos aspersores não produzem jatos com tamanho de gota uniforme em quaisquer condições de operação. Ao contrário, o jato pode ser considerado como um espectro de distribuição de tamanho de gotas com um diâmetro médio definido. Quando todas as gotas possuem o mesmo tamanho trata-se de uma monodispersão, porém quando existe uma faixa com diferentes tamanhos, como no caso das gotas formadas por atomização, trata-se de uma polidispersão. Quanto menor a polidispersão mais estreita é a faixa de distribuição de tamanhos (LIU et al., 2006; FRITSCHING, 2006; McCLEMENTS, 2005).

O processo de atomização pode ser analisado por vias teóricas, numéricas e experimentais. No entanto, a caracterização do processo, principalmente quando envolve mudança de escala, é feita mais facilmente a partir de análise adimensional, sendo que, para a atomização, os número adimensionais mais importantes são:

$$M = \rho_g / \rho_l \qquad (Razão de densidades) \tag{1}$$

$$N = \eta_g / \eta_1$$
 (Razão de viscosidades) (2)

$$\operatorname{Re}_{g} = \rho_{g} u_{g} b_{g} / \eta_{g} \qquad (N \text{úmero de Reynolds do gás}) \qquad (3)$$

We =
$$\rho_g u_{rel}^2 d_l / \sigma$$
 (Número de Weber aerodinâmico (gás) (4)

Oh =
$$\eta_l / (\rho_l \sigma d_l)^{1/2}$$
 (Número de Ohnesorge) (5)

$$m_r = \frac{A_l \cdot \rho_l \cdot u_l}{A_g \cdot \rho_g \cdot u_g}$$
(Razão de vazões mássicas) (6)

$$I = \rho_g u_g^2 / \rho_l u_l^2$$
 (Razão de momento) (7)
Wi = N1/\tau_{12} (Número de Weissenberg) (8)

onde ρ , η , u, d, σ , A, N1 e τ_{12} representam, respectivamente, densidade (kg/m³), viscosidade (Pa.s), velocidade (m/s), diâmetro interno de saída (m), tensão superficial (N/m), área de saída (m²), primeira diferença de tensões normais ($\tau_{11} - \tau_{22}$) (Pa) e tensão de cisalhamento (Pa), sendo que o subscrito "g" indica uma propriedade do gás, "I" do líquido e u_{rel} indica velocidade relativa entre gás e líquido. A dimensão característica utilizada no número de Reynolds do gás é a espessura da camada de gás (b_g = d_g - d_{l,0}), em que d_{l,0} representa o diâmetro externo de saída de líquido (VARGAS et al., 2003; FRITSCHING, 2006).

O número de Ohnesorge (Oh) é um adimensional que relaciona as forças viscosas e a tensão superficial das gotas de líquido. Altos valores de Oh indicam grande influência da viscosidade. Esse adimensional tem mostrado ser um bom critério para prever o colapso de jatos de líquido em uma corrente de gás (XIONG & CHUNG, 2007).

O número de Weber pode ser considerado como o mais importante adimensional de processos envolvendo atomização de líquidos por meio de um gás em alta velocidade (DUMOUCHEL et al., 2005). O número de Weber é usado para prever o rompimento de uma interface sob a ação de fortes forças inerciais. Mais especificamente, este adimensional é a relação entre forças aerodinâmicas e tensões superficiais. Uma alta tensão superficial dificulta o rompimento da gota e a mantém com uma interface convexa. No entanto, com o aumento das forças inerciais a interface é deformada por ondas, torna-se localmente côncava e é, finalmente, rompida (PAN & SUGA, 2006).

Já o número de Weissenberg é um adimensional utilizado para quantificar a importância dos efeitos elásticos em escoamento (FAVERO, 2009).

3.3.1 Influência das propriedades do fluido na produção de microgéis por atomização/gelificação

As principais propriedades das soluções poliméricas que possuem efeito sobre as características das micropartículas formadas no processo de atomização são: densidade, tensão superficial, viscosidade e elasticidade (LEFEBVRE, 1989; CHAN et al., 2009).

A influência da densidade no tamanho das partículas produzidas através de atomização é reduzida devido ao fato de que a maioria dos líquidos exibe poucas diferenças em relação a essa propriedade. Além disso, a pequena quantidade de dados disponíveis sobre o efeito da densidade do líquido no diâmetro médio das gotas sugere que sua influência é realmente muito pequena (LEFEBVRE, 1989).

A tensão superficial é importante na atomização porque ela representa a força que resiste ao desenvolvimento de maior área superficial ou que se opõe às forças fragmentadoras. Antes da atomização, a área superficial é simplesmente a área do cilindro de líquido que sai do bico aspersor. Depois da atomização, a área é a soma das áreas superficiais de todas as gotas individualmente. Assim, a energia mínima necessária para a atomização é igual à tensão superficial multiplicada pelo aumento na área superficial do líquido. Para a maioria dos líquidos puros em contato com ar, a tensão superficial diminui com o aumento da temperatura (LEFEBVRE, 1989).

Com relação à viscosidade, em muitos casos essa propriedade do líquido pode ser considerada como a mais importante. Embora, em sentido absoluto sua influência não seja maior que a da tensão superficial, sua importância provém do fato de que essa propriedade afeta não só a distribuição de tamanho de gotas na atomização, mas também a vazão no bico aspersor e o tipo de jato (*spray*) formado. O aumento da viscosidade reduz o número de Reynolds e também dificulta o desenvolvimento de qualquer instabilidade natural no jato (LEFEBVRE, 1989). A atomização de líquidos altamente viscosos apresenta ainda maiores dificuldades, oferecendo resistência inclusive ao processo primário de fragmentação. Um exemplo da influência dessa propriedade na atomização pode ser vista na Figura 4, em que altas viscosidades acarretam grandes alterações no padrão de desintegração do líquido, com a formação de "fios" (e não gotas) durante a fragmentação primária.

16


Figura 4. Líquidos newtonianos em ordem crescente de viscosidade até 50 Pa.s, atomizados com ar e utilizando vazão de líquido de 50 kg/h (FRITSCHING, 2006).

A dificuldade encontrada na atomização de líquidos de alta viscosidade pode ser contornada através do aumento da área interfacial entre gás e líquido antes do processo de atomização, o que pode ser alcançado através de modificações na geometria do bico aspersor e/ou através do uso de atomizadores de mistura interna (FRITSCHING, 2006).

Já em relação às propriedades do gás, como densidade e viscosidade, foi observado que estas tem pouca importância frente à velocidade do ar, que é indubitavelmente a variável mais importante (LEFEBVRE, 1989).

Outros parâmetros de importância para o processo são as propriedades da solução gelificante em que serão coletadas as gotas. A composição e concentração da solução gelificante são determinantes na formação das partículas gelificadas e devem ser adequadas para induzir a gelificação da solução biopolimérica (PREGENT, 2009; CHAN et al., 2009).

3.3.2 Influência das variáveis de processo na produção de microgéis por atomização/gelificação

Em relação ao processo, este pode ser separado nas seguintes etapas: a atomização da mistura, a queda das gotas e seu impacto com a solução gelificante, passando pela interface ar/líquido e a gelificação. Assim, como variáveis mais relevantes nessas etapas que afetam as características das gotas obtidas pode-se citar a vazão de gás e de líquido na

atomização, os diâmetros de saída de ambos os fluidos no bico aspersor, e a altura da solução gelificante em relação à saída do atomizador.

3.3.2.1 Distância de coleta

A distância de coleta ou altura existente entre a saída do bico aspersor e superfície da solução gelificante, pode ter grande influência no formato e tamanho das partículas gelificadas. Na formação do *spray* existe um parâmetro denominado comprimento de ruptura, que especifica a altura do jato de líquido que continua como um meio contínuo antes da formação das gotas. Assim, o comprimento de ruptura é determinado como a distância entre a saída do bico aspersor e o ponto de ruptura (Figura 5). Muitas correlações empíricas para a determinação do comprimento de ruptura (L) já foram propostas, principalmente para fluidos newtonianos (LIN & REITZ, 1998). Também é interessante que a solução contendo o agente gelificante se encontre após esse comprimento de ruptura, dado que toda a região do *spray* já se encontraria constituída por gotas diminuindo, assim, o tamanho médio das partículas (FRITSCHING, 2006).



Figura 5. Representação do comprimento de ruptura.

Além disso, modificações podem ser observadas no formato das gotas dependendo da altura de queda, tanto permitindo que gotas deformadas na saída do bico aspersor se tornem esféricas, como gotas esféricas passem a ser deformadas. Outro fator dependente da altura de coleta é a velocidade de impacto das gotas com a solução gelificante, parâmetro que pode ter grande influência no formato da partícula formada. Em estudo realizado por CHAN et al. (2009) foi avaliado o efeito da distância entre o bico de saída das gotas e o banho de coleta no formato dos microgéis obtidos. Neste trabalho, a extrusão foi feita por gotejamento através de seringa. De forma geral, foi observado que as gotas apresentavam formato de lágrima na saída do bico da seringa, e conforme iam caindo seu formato ia mudando até chegar ao formato mais esférico. Porém, se a distância de queda era muito grande, as gotas se deformavam devido ao aumento das forças de arraste. Além disso, o impacto da gota com a solução gelificante pode deformar ou rearranjar a gota de forma a torná-la esférica, dependendo das propriedades físicas do líquido. Assim, um diagrama que correlacione a distância de coleta e as propriedades do líquido, de forma a se determinar as faixas em que é possível obter partículas esféricas seria essencial para o projeto do processo de extrusão (CHAN et al., 2009).

Ao entrar na solução gelificante, as alterações no formato da gota líquida vão depender também da competição que existe entre as tensões superficiais (ou interfaciais) e viscosas e as forças de impacto e de arraste. No estudo realizado por CHAN et al. (2009) foi observado que abaixo de um certo valor de Ohnesorge crítico, gotas esféricas não podem ser formadas pois as tensões superficiais e viscosas não conseguem superar o efeito do impacto e arraste na entrada da solução biopolimérica no meio gelificante.

3.3.2.2. Geometria do bico aspersor

As dimensões mais importantes de um atomizador pneumático, como o que foi utilizado neste trabalho, são os diâmetros de saída do líquido (diâmetro interno) e do gás (diâmetro externo). Esses diâmetros determinam as áreas da seção de saída do líquido e gás. De forma geral, o aumento do diâmetro externo ou redução do diâmetro interno resultam em aumento da área anular de ejeção de gás, que induz uma diminuição das forças cisalhantes do ar e de sua turbulência, levando ao aumento no tamanho das gotas (ZHANG et al., 2007).

3.3.2.3 Vazões mássicas (líquido/gás)

Em estudo realizado por ZHANG et al. (2007) sobre a influência das variáveis de processo de atomização sobre o tamanho das gotas de uma solução de alginato, foi verificado que, de forma geral, para vazão de líquido e diâmetro de bico constantes, o aumento da vazão de ar aumenta as forças cisalhantes e a turbulência, resultando em um decréscimo do tamanho das gotas. Já o aumento da vazão de líquido leva a um aumento no tamanho de gotas até um certo valor crítico e acima desse valor é possível observar um leve decréscimo no tamanho. Mas, em geral, usa-se uma vazão de líquido baixa e alta vazão de ar visando maximizar a velocidade relativa entre gás e líquido (MANSOUR & CHIGIER, 1995; FRITSCHING, 2006).

3.4 Biopolímeros utilizados na produção dos microgéis

Os principais componentes utilizados na preparação dos microgéis são os polissacarídeos, como quitosana, dextrana, celulose, alginato, gelana, carragenas, bem como proteínas, como as gelatinas, proteínas do soro do leite, colágeno e outras. O uso de proteínas e polissacarídeos para a produção dos microgéis permite sua incorporação nos alimentos sem riscos à saúde, já que estes são materiais provenientes de fontes naturais e seguros para uso em alimentos ("generally recognized as safe" - GRAS) (JONES & McCLEMENTS, 2010; BUREY et al., 2008).

Esses biopolímeros podem ser utilizados individualmente ou em conjunto na formação de partículas adequadas para encapsulação de compostos funcionais ou para modulação das propriedades dos alimentos. A eficiência obtida na aplicação final depende, em primeira instância, do conhecimento das propriedades funcionais e tecnológicas dos componentes (JONES & McCLEMENTS, 2010; KOSARAJU, 2005).

3.4.1 Gelana

A gelana é um polissacarídeo aniônico produzido pela bactéria *Sphingomonas elodea* que consiste de repetidas unidades de um tetrassacarídeo contendo um glicerato por unidade repetida e um acetato a cada duas unidades. Essa forma altamente acilada produz géis fracos devido à presença dos grupos glicerato que ficam localizados dentro das duplashélice, forçando uma rotação do grupo carboxílico e causando impedimento estérico no momento da agregação das hélices para formar a rede tridimensional. O tratamento com álcali resulta na gelana desacilada, que constitui sua forma comercial. A gelana em sua forma desacilada é composta por uma sequência complexa de unidades de tetrassacarídeos (Figura 6) que se repetem: β -D-glicose, β - D-ácido glicurônico, β -D-glicose e α -Lramnose. Cada unidade tetramérica repetida possui um grupo carboxílico lateral (SANDERSON, 1990).



Figura 6. Unidade repetida do tetrassacarídeo que compõem a goma gelana (Tang et al., 1996).

O mecanismo de gelificação da gelana é considerado como um processo em duas etapas, sendo a primeira a formação de duplas-hélices ordenadas (transição conformacional), seguida pela interação entre as hélices (transição sol – gel). A transição conformacional ocorre com o aumento da temperatura da solução, a qual pode variar de 30 a 50°C, dependendo da concentração de polímero e da composição da solução (RODRÍGUEZ- HERNÁNDEZ et al., 2003).

A interação entre as duplas-hélices depende da presença de cátions na solução que promovem a formação de zonas de junção, possibilitando a formação da rede. As propriedades mecânicas dos géis resultantes dependem da concentração da gelana, e dos cátions na solução. Na ausência de sais adicionados, a gelana não gelifica em concentração abaixo de 2,0%, pois o número de hélices agregadas não excede o número crítico necessário para que ocorra a transição sol – gel. Cátions divalentes são mais efetivos na formação de gel que os cátions monovalentes, sendo necessária maior concentração de

cátions monovalentes para formar géis com força semelhante aos géis com cátions divalentes (NICKERSON et al., 2003; TANG et al., 1996).

Atualmente, pode-se considerar que há poucos estudos sobre produção de microgéis por extrusão com soluções de gelana quando comparado aos trabalhos com microgéis de alginato. KEDZIEREWICZ et al. (1999) avaliaram a encapsulação de um fármaco em partículas de gelana produzidas por gotejamento em banho de CaCl₂ e verificaram que esse polissacarídeo pode oferecer grande eficiência de encapsulação. Foi verificado que as condições de armazenamento das partículas de gelana (úmidas ou desidratadas) e o tempo de estocagem não causaram alterações na liberação do composto ativo.

3.4.2 Quitosana

A quitosana é um aminopolissacarídeo semi-sintético, obtido através da desacetilação alcalina da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza que se encontra principalmente em exoesqueleto de insetos, crustáceos e fungos (DASH et al., 2011). Ambas quitina e quitosana são consideradas biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicas.

A quitosana é uma base fraca com valor de pKa entre 6,2-7, sendo portanto insolúvel em pH neutro ou alcalino. Em meio ácido, os grupos amina do polímero são protonados resultando em um polissacarídeo carregado positivamente e solúvel (DASH et al., 2011; HEJAZI & AMIJI, 2003). A quitosana é um dos poucos polieletrólitos catiônicos encontrados na natureza (TAKAYANAGI & MOTOMIZU, 2006; KASAPIS et al., 2009), e trata-se de um copolímero linear (Figura 7) com estrutura constituída por

unidades de 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glicose e 2-amino-2-deoxi- β -D-glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow 4)$ (AZEVEDO et al., 2007; DASH et al., 2011).



Figura 7. Estrutura química da quitosana (Hamman, 2010).

As propriedades da quitosana, como viscosidade, grau de desacetilação e massa molar dependem das fontes de matéria-prima e métodos de fabricação. O grau de desacetilação, principal diferencial entre quitina e quitosana, é uma das mais importantes propriedades químicas desse polímero, e está relacionado ao balanço entre as duas unidades que compõem a cadeia polimérica, sendo que, uma extensão acima de 60% de desacetilação, define a entidade química quitosana (DOMARD & DOMARD, 2002; DIAS et al., 2008).

A quitosana pode formar géis químicos ou físicos. Nos géis químicos uma rede de gel irreversível é formada através de ligações covalentes envolvendo os grupos funcionais, como –NH₂ ou –OH, presentes na cadeia do polissacarídeo. As ligações covalentes podem ser formadas através da utilização de agentes reticulantes, reações polímero-polímero envolvendo os grupos funcionais ativos, por agentes fotossintetizantes, ou por reações catalisadas enzimaticamente (DASH et al., 2011; JANES et al., 2001).

Já os géis físicos, de estrutura reversível, são formados por redes mantidas através de interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou por ligações de hidrogênio. O principal gel

físico é o promovido através de interações iônicas entre a quitosana carregada positivamente e pequenos compostos negativos, como os sulfatos, citratos, e íons fosfatos ou com metais aniônicos (DASH et al., 2011).

Outro tipo de gel físico é o formado através de interações eletrostáticas entre a quitosana e polieletrólitos de cadeia longa com carga oposta, os chamados complexos de polieletrólitos (PEC). A mistura dos polieletrólitos de carga oposta em solução resulta em espontânea associação entre os polímeros. O gel formado também é do tipo reversível e, em geral, é bastante sensível a mudanças nas condições do meio em que se encontra. A formação e estabilidade dos complexos dependem de vários fatores, como grau de ionização de cada polieletrólito, densidade de carga, distribuição de cargas na cadeia polimérica, concentração dos polieletrólitos, razão e ordem da mistura dos polímeros, natureza e posição dos grupos iônicos, massa molecular e flexibilidade das cadeias, bem como temperatura, força iônica e pH do meio de reação (HAMMAN, 2010; DASH et al., 2011).

3.5 Recobrimento com quitosana

O recobrimento de partículas formadas por polieletrólitos negativos utilizando quitosana tem sido largamente estudado, principalmente as partículas de alginato recobertas com quitosana (COLINET, et al., 2010; WITTAYA-AREEKUL et al., 2006; COOK et al., 2011; MURATA, et al., 1993).

Em muitos trabalhos encontrados na literatura foi demonstrado que o recobrimento com quitosana traz benefícios ao sistema utilizado na encapsulação (COOK et al., 2011; WITTAYA-AREEKUL et al., 2006; ANAL & STEVENS, 2005; COLINET, et al., 2010;

MURATA, et al., 1993). Em geral, a presença de uma camada externa adicional permite cobrir ou preencher as porosidades da matriz, resultando em aumento da proteção do composto bioativo (ZOU et al., 2011). O recobrimento de partículas de alginato com quitosana trouxe melhoras na estabilidade física das partículas quando em meios alcalinos, alterando a taxa de intumescimento e erosão das partículas, além de reduzir a velocidade de difusão das substâncias encapsuladas (COLINET, et al., 2010).

Outra vantagem do recobrimento que pode ser citada é o aumento da bioadesividade das partículas recobertas com quitosana. Com exceção do esôfago, todo o trato gastrointestinal, incluindo estômago, é recoberto por uma camada contínua de gel de muco insolúvel. O gel de muco é composto, principalmente, de glicoproteínas. Devido à presença de grupos estér sulfato e de grupos de ácidos siálicos na estrutura das glicoproteínas, a camada de muco como um todo é fortemente carregada negativamente, o que favorece as interações com partículas de carga positiva como as partículas recobertas com quitosana. A maior interação entre mucosas e partículas causa aumento no tempo de contato entre a cápsula e a mucosa, podendo prolongar o tempo de residência da cápsula no sítio de destino e permitir melhor controle da liberação dos compostos encapsulados (COLINET, et al., 2010; JONES & MCCLEMENTS, 2010; TAKEUCHI et al., 1996; GÅSEROD et al., 1998).

Estudos envolvendo o recobrimento com quitosana de partículas de gelana são menos freqüentes na literatura. FUJII et al. (2005) e OHKAWA et al. (2004) fizeram estudos sobre encapsulação de compostos bioativos, como enzimas, em cápsulas compostas por gelana e quitosana. As cápsulas formadas se mostraram mecânica e quimicamente estáveis em condições fisiológicas, podendo ser facilmente aplicadas na encapsulação de diversos compostos.

3.6 Digestão in vitro de partículas

Nos últimos anos tem sido notável o aumento do interesse em campos de estudo relacionados à encapsulação, proteção e entrega controlada de compostos bioativos com o objetivo de beneficiar a saúde humana. O método e material utilizados na encapsulação podem ser manipulados de forma a direcionar a entrega dos compostos de interesse em sítios específicos do trato gastrointestinal, e também de forma a controlar a velocidade de liberação do composto (HUR et al, 2011).

A verificação da eficácia das novas estruturas desenvolvidas para encapsulação de compostos bioativos depende da disponibilidade de modelos digestivos que simulem os eventos físico-químicos e fisiológicos complexos que ocorrem no trato gastrointestinal (HUR et al, 2011). Como os testes *in vivo*, tanto em humanos quanto em animais, são de alto custo e demandam longos períodos de tempo para serem realizados, os métodos de simulação gastrointestinal *in vitro* têm se mostrado como uma alternativa na obtenção de resultados rápidos e de maneira mais simplificada (HUR et al, 2011).

De fato, simular completamente as condições da digestão não é uma tarefa simples, e muito esforço tem sido feito nos últimos anos de forma a se obter condições *in vitro*, como atividade enzimática, composição iônica, pH, forças mecânicas e tempos de digestão, semelhantes às condições encontradas *in vivo* (HUR et al, 2011). No entanto, atualmente, ainda não existe um método universalmente aceito. O processo de digestão é constituído por uma série de etapas. Todas as etapas ocorrem na temperatura normal do corpo humano, 37°C, ideal em relação à atividade das enzimas e sua solubilidade (OOMEN et al., 2003). Inicialmente, na boca, o alimento é misturado com saliva, o que pode resultar em modificações no pH, força iônica e temperatura do meio. Além disso, o alimento pode ser modificado pelas enzimas, como lipases, amilases e proteases, interagir com os biopolímeros presentes na saliva e ser fisicamente quebrado através da mastigação. A saliva humana tem pH entre 7 e 8 logo após a ingestão de alimentos. Os alimentos, geralmente, permanecem curtos períodos de tempo na boca antes de serem deglutidos, e os efeitos da digestão ocorrida na boca dependem do alimento, duração e intensidade da mastigação e das condições fisiológicas do indivíduo (HUR et al, 2011; OOMEN et al., 2003).

Após a deglutição, o alimento passa pelo esôfago e chega ao estômago, em que é misturado com sucos gástricos ácidos, com pH entre 1 e 3. Além disso, é exposto à ação de enzimas gástricas (pepsina, lipase), minerais, componentes com atividade de superfície, outros componentes biológicos e agitação mecânica devido à mobilidade estomacal. Os alimentos podem permanecer no estômago por poucos minutos ou até algumas horas, dependendo da sua quantidade, estado físico, dimensões e estrutura (HUR et al, 2011; OOMEN et al., 2003).

A próxima etapa da digestão é realizada no intestino delgado, um tubo com cerca de 5m de comprimento e de área superficial muito grande devido a sua topologia complexa. Ao entrar na primeira porção do intestino, o "quimo" é misturado com bicarbonato de sódio, sais de bile, fosfolipídios e enzimas secretadas pelo pâncreas, fígado e vesícula biliar. Nessa etapa o pH da mistura passa de ácido para neutro (pH entre 5,8-6,5). A maioria dos nutrientes é absorvida no intestino delgado (HUR et al, 2011; OOMEN et al., 2003). Os componentes que não são absorvidos chegam ao intestino grosso, cuja principal função é absorver água e eletrólitos, dar lugar à fermentação de polissacarídeos e proteínas, reabsorver os sais de bile, e formar, armazenar e eliminar a matéria fecal (HUR et al, 2011; MCCLEMENTS & LI, 2010).

No caso de géis de polissacarídeos como a gelana e quitosana, compostos resistentes à maioria das enzimas presentes no trato gastrointestinal humano, os fatores mais importantes durante as etapas da digestão, são aqueles que podem causar quebra da matriz gelificada, e assim, liberar o componente encapsulado. Dentre estes fatores é possível citar o pH, presença de componentes com atividade de superfície, força iônica do meio, e forças mecânicas envolvidas na digestão. A matriz gelificada pode responder às mudanças nas condições do meio ao qual foi exposta de várias formas, como: permanecer intacta, intumescer ou diminuir, ser física, química ou enzimaticamente degradada ou sofrer fragmentação física. O comportamento da matriz é determinado pelo tipo de material e pelas interações que formam a rede de gel. Um exemplo que pode ser dado são os complexos eletrostáticos formados entre polissacarídeos aniônicos e proteínas em baixos valores de pH, que podem se dissociar em meios com pH acima do ponto isoelétrico da proteína, devido ao enfraquecimento das interações eletrostáticas que une os biopolímeros (MCCLEMENTS & LI, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os materiais utilizados foram a goma gelana desacilada (Kelcogel®), gentilmente cedida pela Kelco (San Diego, EUA), a quitosana (Primex Ingredients S.A., Islândia) proveniente de carapaça de caranguejo com grau de desacetilação de 86,7% e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Preparo das soluções

As soluções de gelana (0,4, 0,6, 0,8, 1 e 1,2% m/m) foram preparadas pela dissolução do pó em água deionizada sob agitação magnética à temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, foi aplicado um tratamento térmico a 70°C por 30 minutos e depois um resfriamento até 25°C utilizando um banho de água. As soluções de gelana foram caracterizadas quanto à sua densidade, tensão superficial e propriedades reológicas (metodologias descritas nas seções 4.7.1, 4.7.2 e 4.7.3, respectivamente).

Já as soluções salinas foram obtidas através da pesagem dos sais (CaCl₂ ou KCl) e transferência para balão volumétrico, com volume completado com água deionizada, de modo a obter as concentrações desejadas. As soluções contendo quitosana (0,25 e 0,5% m/m) foram obtidas através da dissolução do polissacarídeo em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH = $3,0 \pm 0,1$), sob agitação magnética à temperatura ambiente por 12 horas.

4.3 Definição das concentrações para formação de géis

Um ensaio preliminar foi realizado com o objetivo de determinar as concentrações adequadas do agente gelificante (CaCl₂, KCl ou quitosana) para a formação de gel das

soluções de gelana (0,4, 0,6, 0,8, 1,0 e 1,2% m/m). O processo de gotejamento foi utilizado, pois permitia a produção de macroesferas (diâmetro de aproximadamente 3 mm), em que as características do gel foram mais facilmente avaliadas.

As soluções de gelana a temperatura ambiente (25°C) foram gotejadas nas soluções contendo o agente gelificante através da extrusão em seringa de 5 ml acoplada a agulha hipodérmica com diâmetro de 0,8 mm. A altura entre a saída da agulha e a solução gelificante foi fixada em 10 cm (CHAN et al., 2009). As partículas foram mantidas por 30 minutos no banho gelificante sob agitação orbital de 100 oscilações por minuto (OPM) em Shaker modelo TE-420 (Tecnal, Brasil). Logo depois foram filtradas em peneira, lavadas com água destilada e armazenadas em recipientes fechados a 10°C. Após 24 horas foi realizada a análise de compressão uniaxial para determinar a força máxima das macroesferas (seção 4.7.4) e a sua morfologia foi registrada por uma câmera digital.

4.4 Preparo dos microgéis

4.4.1 Equipamento

O aparato para a produção dos microgéis era composto por uma bomba peristáltica (com intervalo de vazão de 0,18 a 22,8 L/h) Masterflex modelo 7518-00 (Cole-Parmer Instrument Company, EUA), um compressor (pressão máxima de 8,3 bar) com 2 pistões, simples estágio e isento de óleo, modelo CSA-6,5 Silent (Schulz, Brasil) e um suporte onde foi fixado o aspersor de fluxo coaxial, com mistura externa gás/líquido. A representação da geometria do bico aspersor e do processo encontram-se na Figura 8.



Figura 8. Configuração do bico aspersor e do processo de atomização. H: distância entre a saída do bico aspersor e a solução gelificante; d_g : diâmetro interno do orifício para passagem do ar; d_l : diâmetro interno do orifício para passagem do líquido e $d_{1,0}$: diâmetro externo do orifício para passagem do líquido.

4.4.2 Processo de atomização para formação dos microgéis

As soluções de gelana a 25°C foram bombeadas com vazão constante de aproximadamente 0,18 L/h, através do diâmetro interno do bico aspersor (d₁). Foi utilizada a vazão mínima da bomba pois, em geral, menores tamanhos de gotas são obtidos usandose vazões de líquido e ar baixa e alta, respectivamente, de modo a maximizar a velocidade relativa entre gás e líquido (MANSOUR & CHIGIER, 1995; FRITSCHING, 2006). A pressão relativa (manométrica) de ar para a atomização variou entre 1 e 1,5 bar, pois acima de 1,5 bar a solução salina acabava sendo lançada fora do recipiente de coleta. Três diferentes bicos aspersores foram utilizados. A Tabela 1 mostra o diâmetro interno de saída de líquido (d_1) e diâmetro interno de saída de ar (d_2) das 3 configurações utilizadas.

	d _l (mm)	Área (líquido) (mm ²)	d _g (mm)	Área (gás) (mm ²)
Bico 1	0,7	0,38	2,5	3,02
Bico 2	1	0,79	3,0	3,77
Bico 3	1,2	1,13	3,35	5,01

Tabela 1. Diâmetros e áreas de saída de líquido e gás dos bicos aspersores.

Na Figura 9 é possível observar a correlação entre a pressão do ar e a velocidade correspondente utilizando os diferentes bicos aspersores. As vazões volumétricas na saída de cada bico aspersor, nas diferentes pressões utilizadas, foram obtidas através de medidas feitas com um rotâmetro (Gilmont Instruments, INC., USA). A velocidade do gás (v_g) foi calculada através da relação entre as vazões volumétricas e as áreas de saída de gás dos bicos aspersores. É possível observar que as maiores velocidades foram alcançadas com o "Bico 1", pois este possui a menor área de saída do ar.



Figura 9. Correlação entre pressão do ar e velocidade utilizando os diferentes bicos aspersores.

As gotas produzidas foram coletadas em 800 ml de solução gelificante $(1,1\% \text{ m/v} \text{ de } \text{CaCl}_2, \text{ ou } 2,28\% \text{ m/v} \text{ de KCl ou } 0,25\% \text{ e } 0,5\% \text{ m/m} \text{ de quitosana})$ sob agitação magnética. As concentrações das soluções gelificantes foram determinadas através do ensaio preliminar descrito na seção 4.3. A distância entre o bico aspersor e a superfície da solução de coleta (H) variou entre 20 e 35 cm.

As partículas foram mantidas por 30 minutos no banho de coleta e analisadas imediatamente quanto a sua distribuição de tamanho (seção 4.7.5). O restante da solução contendo os microgéis foi filtrado em peneira com abertura de 0,037 mm, lavadas com água destilada e analisadas quanto a sua morfologia e potencial Zeta (seções 4.7.6 e 4.7.7, respectivamente). Em alguns casos também foi determinada a distribuição de tamanho das partículas após a etapa de filtração.

A estabilidade dos microgéis foi avaliada através do armazenamento de suspensões aquosas contendo 10% m/m de microgéis à temperatura de 10°C. Alíquotas das suspensões foram analisadas periodicamente quanto ao tamanho e morfologia (seções 4.7.5 e 4.7.6, respectivamente). Foi avaliada a estabilidade em água destilada e em tampão acetato 0,1 M (pH 3,2).

Suspensões de microgéis contendo 30, 50 ou 70% de partículas (m/m) dispersas em água destilada tiveram suas propriedades reológicas determinadas (seção 4.7.3). A análise foi realizada imediatamente após a suspensão das partículas. Como os microgéis de gelana gelificados com cloreto de potássio foram menos estáveis em água destilada, somente foram analisadas as suspensões contendo microgéis de gelana com gelificação induzida por cloreto de cálcio.

4.4.3 Efeito da pressão de ar

A pressão de ar foi de 1, 1,25 e 1,5 bar durante a atomização da solução contendo gelana (1% m/m) em solução de cloreto de cálcio ou cloreto de potássio, enquanto que todas as demais condições de processo como configuração do bico aspersor, altura de coleta e vazão de líquido foram mantidas constantes ($d_1 = 0,7$ mm, H = 20 cm, vazão de alimentação = 0,18 L/h).

4.4.4 Efeito da altura entre bico aspersor e banho de coleta (H)

As alturas entre bico aspersor e o banho gelificante foram de 20, 25, 30 e 35 cm durante a atomização da solução contendo gelana (1% m/m) em solução de cloreto de cálcio ou cloreto de potássio, enquanto que todas as demais condições de processo foram mantidas constantes ($d_1 = 0.7$ mm, vazão de alimentação = 0,18 L/h, pressão = 1 bar).

4.4.5 Efeito do diâmetro do bico aspersor

Foram avaliados três diferentes bicos aspersores com diâmetros internos de passagem de líquido de 0,7, 1 e 1,2 mm durante a atomização da solução contendo gelana (1% m/m) em solução de cloreto de cálcio ou cloreto de potássio. As demais condições de processo foram mantidas constantes (H = 20 cm, vazão de alimentação = 0,18 L/h, pressão = 1 bar).

4.4.6 Efeito da concentração de gelana nos microgéis

Foi determinado o efeito da concentração de gelana (0,4, 0,6, 0,8, 1 ou 1,2% m/m) na morfologia e tamanho das partículas formadas através de gelificação induzida por CaCl₂ ou KCl. Para tal as seguintes condições de processo foram fixadas: altura de coleta = 20 cm, pressão do ar = 1 bar, uso do bico aspersor 1 ($d_1 = 0,7$ mm) e vazão de líquido = 0,18 L/h.

4.4.7 Microgéis formados através da atomização da solução de gelana (1% m/m) em quitosana

Ensaios envolvendo a atomização de solução de gelana (1% m/m) com coleta das gotas em solução de quitosana 0,25 e 0,5% m/m em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH = 3) foram feitos visando à produção de microgéis formados por complexação eletrostática de gelana/quitosana. Também foi feito um ensaio controle em que as gotas de gelana foram coletadas em tampão acetato de sódio 0,2 M sem a presença de quitosana, para assim determinar a contribuição deste na formação das partículas. Para a atomização foram utilizadas duas condições de pressão (1 ou 1,5 bar) enquanto outras condições de processo foram fixadas (H = 20cm, bico aspersor 1, vazão de líquido = 0,18L/h). As partículas formadas foram analisadas quanto a sua morfologia (seção 4.7.6) e distribuição de tamanho de partículas (seção 4.7.5).

4.4.8 Números adimensionais do processo de atomização

Os principais números adimensionais que caracterizam o processo de atomização foram calculados para as diferentes condições de processo utilizadas. Os números de Reynolds do gás (Re_g) e da camada de líquido ($Re_{\lambda l}$) foram calculados de acordo com as Equações 3 e 9, respectivamente.

$$\operatorname{Re}_{\lambda l} = \frac{(u_c - u_l)\lambda_l}{v_l} \tag{9}$$

em que u₁ representa a velocidade do líquido, e v₁ é sua viscosidade cinemática (m²/s). A dimensão característica utilizada foi o comprimento das ondas formadas na interface gáslíquido na saída do aspersor (λ_1) e não o diâmetro do líquido (d₁), dado que o λ_1 é a dimensão crítica para o processo (VARGA et al., 2003). O comprimento de onda (λ_1) e a velocidade dessas ondas (u_c) foram calculados de acordo com as equações 10 e 11, respectivamente.

$$\lambda_l \approx \frac{2Cb_g}{\sqrt{\mathrm{Re}_g}} \frac{\sqrt{\rho_l}}{\sqrt{\rho_g}} \tag{10}$$

$$u_c = \frac{\sqrt{\rho_l} u_l + \sqrt{\rho_g} u_g}{\sqrt{\rho_l} + \sqrt{\rho_g}}$$
(11)

em que C é um coeficiente de proporcionalidade que depende da configuração do bico aspersor e foi considerado como 1,2 (VARGA et al., 2003). Os parâmetros relacionados às ondas geradas pela primeira instabilidade na interface gás-líquido foram utilizados no cálculo da taxa de deformação aplicada no líquido durante o processo de atomização, assim como apresentado na Equação 12 (ALISEDA et al., 2008).

$$\dot{\gamma} = \frac{u_c}{\lambda_l} \tag{12}$$

Soluções contendo polissacarídeos podem apresentar comportamento nãonewtoniano dependendo da sua concentração, o que significa que os valores de viscosidade diminuem com a taxa de deformação aplicada segundo a Lei da Potência. Assim, nos cálculos realizados foram utilizados os valores estimados de viscosidade, utilizando-se os parâmetros dos modelos reológicos ajustados para cada solução de gelana, na taxa de deformação calculada para o processo (Equação 12).

O número de Ohnesorge (Oh), que relaciona a viscosidade do líquido com a tensão superficial, foi calculado de acordo com a Equação 5. Já o número de Weber (We) que relaciona as forças fragmentadoras exercidas pelo gás e as forças mantenedoras associadas com a tensão superficial foi determinado de acordo com a Equação 4, em que a velocidade relativa (u_{rel}) foi considerada como a diferença entre a velocidade do gás (u_g) e a velocidade das ondas formadas na interface gás-líquido (u_c). Outro número adimensional importante é a relação entre as vazões mássicas de líquido e gás (m_r), calculada de acordo com a Equação 6.

Estes adimensionais foram utilizados em um modelo para predição do valor de diâmetro de partícula (D_{32}) feito por ALISEDA et al. (2008). O modelo sugerido leva em consideração os efeitos gerados por fluidos de alta viscosidade e por fluidos nãonewtonianos, como é o caso das soluções de gelana. Além disso, o modelo foi desenvolvido sem a utilização de correlações empíricas, partindo de princípios relacionados às instabilidades envolvidas no processo de atomização (instabilidade de Kelvin–Helmhotz e de Rayleigh–Taylor) para obter a dependência do D_{32} com relação aos números adimensionais mais relevantes para o processo (Reynolds, Weber e Ohnesorge). A Equação 13 apresenta o modelo desenvolvido por ALISEDA et al. (2008).

$$\frac{D_{32}}{d_l} = C_1 (1 + m_r) \left(\frac{b_g}{d_l}\right)^{1/2} \left(\frac{\rho_l / \rho_g}{\text{Re}_g}\right)^{1/4} \frac{1}{\sqrt{We}} \left\{1 + C_2 \left(\frac{d_l}{b_g}\right)^{1/6} \left(\frac{\text{Re}_g}{\rho_l / \rho_g}\right)^{1/12} We^{1/6} Oh^{2/3}\right\} (13)$$

em que os coeficientes C_1 e C_2 são da ordem de 1 e ambos são determinados experimentalmente. O valor de C_1 depende da configuração do bico aspersor e C_2 está relacionado à dependência da viscosidade em comparação à tensão superficial do comprimento de onda crítico na instabilidade de Rayleigh–Taylor. Os valores de C_1 e C_2 foram obtidos por ajuste de forma a minimizar o erro entre os valores experimentais obtidos para o D_{32} das partículas com gelana/Ca e gelana/K e os valores preditos pelo modelo.

4.5 Recobrimento dos microgéis de gelana/Ca e gelana/K com quitosana

Microgéis de gelana (0,6, 0,8, 1 e 1,2 % m/m) formados através de gelificação iônica com CaCl₂ ou KCl foram recobertos com solução de quitosana. Para tal, os microgéis de gelana/Ca e gelana/K foram dispersos em solução de quitosana (0,25% m/m) e foram mantidos sob agitação magnética durante 30 minutos. A adição dos microgéis na solução de quitosana foi feita em duas etapas para evitar a formação de aglomerados. Na primeira etapa os microgéis foram dispersos em uma alíquota de tampão acetato de sódio 0,2 M. Em seguida, uma alíquota igual de solução de quitosana (0,5 % m/m) foi adicionada gradativamente, resultando em uma dispersão contendo 20% m/m de microgéis em solução de quitosana 0,25% (m/m). Ao final, as dispersões foram filtradas em peneira de abertura de 38 μ m, e os microgéis resultantes foram analisados quanto a sua morfologia (seção 4.7.6), distribuição de tamanho de partículas (seção 4.7.5) e potencial zeta (seção 4.7.7).

4.6 Simulação in vitro das condições da digestão

Os microgéis contendo 1% (m/m) de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ ou KCl, com ou sem recobrimento de quitosana (0,25% m/m) foram submetidos a ensaios de simulação de digestão in vitro. Os microgéis foram incubados em diferentes meios de modo a simular a digestão bucal (saliva), gástrica e entérica. Na etapa de simulação da digestão bucal, os microgéis foram adicionados ao tampão fosfato (0,005M, pH 6,9; NaCl 1M + CaCl₂ 0,004M) na proporção de 1g de amostra para cada 4 ml de tampão (HOEBLER et al., 2002). As etapas de digestão gástrica e entérica foram simuladas seguindo a metodologia de GARRETT et al. (1999). O suco gástrico foi composto por pepsina porcina (40mg/ml em 0,1 M HCl) que foi adicionada em uma proporção de 0,5g de pepsina por 100g de amostra (MILLER et al., 1981). Após a adição do suco gástrico, o pH da mistura foi ajustado para um valor igual a 2 através da adição de HCl, e a mistura foi incubada por 1 hora. Na etapa de digestão entérica, a mistura resultante da digestão gástrica foi neutralizada e levada a pH 5,3 com o auxílio de solução de bicarbonato de sódio 0,9 M antes da adição de 9ml de uma mistura de extrato de bile e pancreatina (2 mg/ml pancreatina + 12 mg/ml extrato de bile porcina). O pH da mistura foi ajustado a 7 antes da incubação das amostras por mais 2 horas. Todas as incubações foram realizadas em uma incubadora com agitação orbital (Shaker), modelo TE-420 (Tecnal, Brasil), com temperatura controlada, de modo que os sistemas permanecessem com 37°C e agitação constante de 100 oscilações por minuto (OPM). Ao final das etapas de digestão gástrica e entérica, as partículas presentes na mistura foram analisadas quanto a sua distribuição de tamanho (seção 4.7.5), morfologia (seção 4.7.6) e potencial zeta (seção 4.7.7).

4.7 Metodologias de análise

4.7.1 Densidade

A densidade das soluções de gelana na temperatura de 25°C foi determinada através de densímetro digital Digital Density Meter (Antoon Paar, Áustria). As medidas foram realizadas em triplicata.

4.7.2 Tensão superficial

A tensão superficial (interface gás-fluido) das soluções de gelana nas diversas concentrações foi feita em um tensiômetro de anel Sigma 701 (KSV Instruments, Finland) na temperatura de 25°C. As análises foram feitas em triplicata.

4.7.3 Propriedades reológicas – curvas de escoamento e tensões normais

As propriedades reológicas foram determinadas a 25°C em um reômetro modular compacto Physica MCR301 (Anton Paar, Áustria). Para determinar o comportamento reológico do fluido foram realizados ensaios para a determinação da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação aplicada no sistema (curvas de escoamento). Para a avaliação das soluções de gelana foi utilizada uma geometria tipo cone-placa com 50 mm de diâmetro, e a taxa de deformação aplicada variou entre 0 e 4000 s⁻¹. Já as curvas de escoamento das suspensões de microgéis foram determinadas com geometria rugosa de placas paralelas com 50 mm de diâmetro e "gap" de 0,8 ou 1 mm, dependendo do comportamento da amostra. A taxa de deformação aplicada variou entre 0 e 300 s⁻¹. Os modelos para fluidos Newtoniano (14), pseudoplástico (15) e de Herschel-Bulkley (16) foram utilizados para ajustar as curvas de escoamento:

$$\sigma = \eta . \dot{\gamma} \tag{14}$$

$$\sigma = k.(\dot{\gamma})^n \tag{15}$$

$$\sigma = \sigma_0 + k.(\dot{\gamma})^n \tag{16}$$

onde $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s⁻¹), η é a viscosidade (Pa.s), n é o índice de comportamento, σ_0 é a tensão residual (Pa), e k é o índice de consistência (Pa.sⁿ).

A primeira diferença de tensões normais (N1) também foi obtida em função da taxa de deformação (Pa).

4.7.4 Compressão Uniaxial

A força máxima das macroesferas foi determinada através de ensaios de compressão uniaxial realizados em um texturômetro TA-XT Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK) utilizando a geometria do tipo placa cilíndrica de acrílico com 35 mm de diâmetro, lubrificada com óleo de silicone de baixa viscosidade de forma a evitar o atrito com a amostra. As macroesferas foram comprimidas até 80% da sua altura inicial sob velocidade de 0,5mm/s. A força máxima obtida foi utilizada para determinar as concentrações adequadas de sal e de polissacarídeo para a produção de microgéis mais resistentes. Durante a análise de força máxima, 5 macroesferas foram comprimidas em cada ensaio, tomando-se o cuidado de manter sempre a mesma disposição. Para obtenção do resultado final, o valor obtido em cada ensaio foi dividido por 5. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7.5 Distribuição de tamanho de partículas – Difração à laser

A distribuição de tamanho de partículas foi determinada através da técnica de difração à laser utilizando-se um equipamento Laser Scattering Spectrometer Mastersizer 2000 (Malvern Instruments LTD., U.K). As propriedades ópticas das partículas utilizadas foram 1,33 para o índice de refração e 0,1 para o índice de absorção. A análise foi realizada imediatamente após o tempo de cura, em que uma alíquota da solução salina contendo os microgéis foi inserida no equipamento, utilizando água destilada como meio dispersante. Foi utilizada agitação de 1750 rpm e os dados obtidos foram convertidos em tamanho de partículas utilizando-se a Teoria de Mie, adequada para partículas transparentes como os microgéis de gelana. O tamanho médio das partículas foi determinado utilizando o *Sauter Mean Diameter* (D₃₂), que é definido como o diâmetro da esfera que possui a mesma relação volume/área superficial que a partícula de interesse (Equação 17) (CHAN et al., 2012).

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$$
(17)

onde n_i é o número de partículas com diâmetro d_i. Também foi determinado através da curva de distribuição de tamanhos o "span", parâmetro associado à polidispersão das partículas, calculado de acordo com a Equação 18.

$$Span = \frac{d_{(0,9)} - d_{(0,1)}}{d_{(0,5)}}$$
(18)

em que d(0,1), d(0,5) e d(0,9) representam os valores de diâmetro em que 10, 50 e 90% das partículas da distribuição encontram-se abaixo, respectivamente.

4.7.6 Microscopia óptica e análise de morfologia dos microgéis

A morfologia dos microgéis foi analisada através de microscopia óptica utilizando um microscópio Scope A1 (Carl Zeiss, Germany) com lentes objetivas de 10x. Os microgéis de gelana foram corados com azul de metileno, colocados em lâminas e, cuidadosamente, cobertos com lamínulas. No mínimo 20 imagens foram obtidas para cada amostra. Para corar os microgéis com camada de recobrimento de quitosana foi utilizado o corante Vermelho do Congo.

O D₃₂ e o formato dos microgéis foram determinados por análise de imagens utilizando-se o software Image J 1.36b (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Medidas dos diâmetros de Feret mínimo ($F_{mín}$) e máximo ($F_{máx}$) foram feitas para cada partícula, em um total mínimo de 400 partículas para cada amostra. O *aspect ratio* (AR), que indica quão irregular é a partícula, foi obtido a partir da relação entre $F_{máx}$ e $F_{mín}$ (Equação 19). Quanto mais próximo da unidade estiver o valor do AR, mais esférica é a partícula, sendo que o valor de 1 indica uma esfera perfeita. O diâmetro médio das partículas (d_i) foi determinado pela área da esfera equivalente (Equação 20), considerando que as partículas apresentam um formato elipsoidal, e este foi utilizado no cálculo do *Sauter mean diameter* (D_{32}) (Equação 17) com o intuito de comparar o tamanho dos diferentes microgéis produzidos (PERRECHIL, 2010).

$$AR = \frac{F_{\text{max}}}{F_{\text{min}}} \tag{19}$$

$$d_i = \sqrt{F \max \cdot F \min} \tag{20}$$

4.7.7 Potencial Zeta

O potencial zeta dos microgéis foi determinado através de análise em NanoZetaS (Malvern Instruments LTD., U.K). Para tal foi feita uma suspensão em água destilada contendo 1,5% m/m de microgéis. Essa concentração foi determinada através de ensaios preliminares. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.8 Análise Estatística

A comparação entre as amostras em relação às diferentes propriedades determinadas foi feita através de análise de variância-ANOVA em que diferenças estatísticas (p < 0,05) foram determinadas pelo teste de Tukey utilizando o software STATISTICA 5.5 (Statisoft Inc., Tulsa USA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Propriedades das soluções de gelana

5.1.1. Densidade

A Figura 10 apresenta o efeito da concentração de gelana na densidade da solução a 25°C. É possível observar que a densidade aumenta com o aumento da concentração de polissacarídeo, porém esse aumento é bastante reduzido, com valores muito próximos à densidade da água. Foi obtido um bom ajuste linear, portanto a densidade para outras concentrações dentro da faixa estudada pode ser estimada a partir da equação obtida. Apesar da influência da densidade ser reconhecida como pequena no tamanho das partículas produzidas durante o processo de atomização (LEFEBVRE, 1989), a determinação dessa propriedade se faz necessária para o cálculo dos números adimensionais, importantes para a caracterização e aumento de escala do processo.



Figura 10. Efeito da concentração de gelana na densidade.

5.1.2 Tensão superficial

A tensão superficial das soluções de gelana nas concentrações de 0,4, 0,6, 0,8, 1 e 1,2% m/m não pode ser determinada devido aos altos valores de viscosidade dessas soluções. Na Figura 11 são apresentados os dados de tensão superficial de soluções com até 0,3% m/m de gelana. É possível observar para estes dados, que a tensão superficial não variou com a concentração de gelana. A adição desse polissacarídeo, independente da concentração, causou uma redução na tensão superficial da água que é de 71,9 mN/m a 25°C (VARGAFTIK et al., 1983).



Figura 11. Tensão superficial das soluções diluídas de gelana.

PAUNOV (2003) mediu a tensão superficial de soluções com diferentes concentrações de gelana (0,2, 0,5, 1 e 2% m/m) com um tensiômetro de gota pendente. No estudo de PAUNOV (2003) a adição de gelana não alterou o valor de tensão superficial observado para a água pura, o que foi atribuído à purificação do polissacarídeo realizada antes do ensaio. No entanto, a tendência foi similar aos nossos resultados, ou seja, os valores de tensão superficial não mostraram dependência da concentração de polissacarídeo. Os resultados obtidos no estudo de PAUNOV também mostraram que a

gelana tem atividade de superfície muito reduzida tanto na interface ar-água quanto em interfaces hidrofóbicas como decano-água.

A tensão superficial que foi utilizada nos cálculos dos números adimensionais relacionados ao processo de atomização, foi um valor médio dos valores apresentados na Figura 11. O mesmo valor foi utilizado para as diferentes concentrações de gelana estudadas.

5.1.3. Viscosidade

A Figura 12 apresenta as curvas de escoamento para as soluções de gelana obtidas em um amplo intervalo de taxas de deformação, uma vez que em processos de atomização o fluido é exposto a taxas de deformação da ordem de 10^4 s⁻¹. Em função de limitações experimentais, a solução com 0,4% m/m de gelana foi avaliada até 1.000 s⁻¹ (acima dessa taxa de deformação o fluido era expulso da geometria) e as demais concentrações até 4.000 s⁻¹.



Figura 12. Curvas de escoamento das soluções de gelana a 25°C.

A partir das curvas obtidas, foi possível ajustar o modelo Lei da Potência (pseudoplástico) para as soluções com 0,6, 0,8 e 1% (m/m) de gelana e o modelo de Herschel-Bulkley para a solução mais concentrada de gelana (1,2% m/m). Já a solução contendo 0,4% m/m de gelana apresentou comportamento de fluido Newtoniano, com viscosidade constante frente ao cisalhamento. O modelo Newtoniano foi adequado nesse caso, já que se tratava de uma solução bastante diluída, em que o comportamento do solvente (água) prevaleceu.

O comportamento de fluido pseudoplástico para as outras concentrações de gelana está associado ao alinhamento das cadeias e a quebra de aglomerados durante o cisalhamento de compostos de cadeias longas, como é o caso da gelana, resultando na redução da viscosidade da solução e favorecimento do escoamento. O comportamento pseudoplástico é característico de polímeros lineares como a gelana (BEMILLER, 2007) em concentrações acima do regime diluído.

Já a solução com maior concentração de gelana apresentou comportamento muito semelhante ao da solução com 1% m/m de polissacarídeo, porém foi observada uma pequena tensão residual. Isso pode ser atribuído ao início de formação de gel.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros reológicos obtidos através dos modelos ajustados. É possível observar um aumento no índice de consistência com o aumento da concentração de gelana até 1% m/m. Já o índice de comportamento apresentou tendência inversamente proporcional em relação à concentração de polissacarídeo, mostrando que o comportamento pseudoplástico se intensificou com a concentração até 1% m/m. Não houve

diferença estatística entre as soluções contendo 1 e 1,2% (m/m) de gelana quanto aos valores de índice de consistência e índice de comportamento.

Gelana (% m/m)	Comportamento	σ _ο (Pa)	k (Pa.s ⁿ) ou μ (Pa.s)	n	R ²		
0,4	Newtoniano		0,009± 0,0002 ^A		0,9999		
0,6	Pseudoplástico		1,28± 0,025 ^B	$0,464\pm0,002$ ^A	0,9966		
0,8	Pseudoplástico		4,85± 0,164 ^C	$0,331\pm0,003$ ^B	0,9958		
1	Pseudoplástico		10,95± 0,665 ^D	0,268± 0,014 ^C	0,9963		
1,2	Herschel-Bulkley	$4{,}09\pm1{,}2$	9,5± 0,984 ^D	0,278± 0,018 ^C	0,9982		

Tabela 2. Parâmetros reológicos das soluções de gelana a 25°C.

Letras diferentes indicam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (p < 0,05).

Na Figura 13 é apresentada a relação entre a viscosidade aparente das soluções na menor taxa de cisalhamento $(0,01 \text{ s}^{-1})$ em que foi possível realizar a medida e a concentração de gelana. É possível observar que a viscosidade aumentou exponencialmente com a concentração de polissacarídeo.



Figura 13. Efeito da concentração de gelana na viscosidade aparente (η) das soluções em taxa de deformação de 0,01 s⁻¹.

Essa alta dependência da concentração apresentada pela viscosidade, em que pequenos incrementos na concentração resultam em grandes aumentos nos valores de viscosidade, é típica de polissacarídeos (BEMILLER, 2007). Em concentrações acima de 0,064% m/v, que é o valor crítico que define o limite entre regime diluído e concentrado (JAMPEN et al., 2000), aumenta-se a probabilidade de colisão e sobreposiçao das moléculas do biopolímero. Como resultado ocorre o emaranhamento das cadeias e o aumento do volume ocupado por elas, com conseqüente aumento do valor da viscosidade (BEMILLER, 2007; YAMAMOTO, 2006).

Na Figura 14 pode-se observar a influência da taxa de deformação na viscosidade aparente das soluções de gelana. Durante a preparação dos microgéis estas soluções são expostas a diversas condições de taxas de deformação. No processo de formação das gotas, as soluções são lançadas em correntes de ar em alta velocidade, que expõem o líquido a taxas de deformação da ordem de 10^3 - 10^4 s⁻¹. Depois disso, as gotas formadas vão de encontro ao banho gelificante, em que taxas de deformação bem menores podem ser observadas. Assim, é importante avaliar a viscosidade das soluções em diversas taxas de deformação. É possível observar que conforme a taxa aumenta, mais próximos são os valores de viscosidade observados para as soluções com diferentes concentrações de gelana.


Figura 14. Influência da taxa de deformação na viscosidade aparente das soluções de gelana a 25°C.

No cálculo dos números adimensionais do processo, os valores de viscosidade em taxas de deformação acima das aplicadas durante os ensaios foram obtidas através dos modelos ajustados para cada solução de gelana.

5.1.4. Primeira Diferença de Tensões Normais (N1)

A tensão normal é um parâmetro associado à elasticidade não linear dos fluidos. Essa elasticidade pode ter influência durante o processo de atomização, podendo afetar o formato das gotas formadas após a saída do bico atomizador. Assim, algumas tentativas para determinar essa propriedade foram feitas, mas nenhum resultado confiável foi obtido. A Figura 15 mostra um exemplo, em que são apresentadas as replicatas obtidas para uma solução de gelana (1% m/m) que teve seu N1 analisado em taxa de deformação constante de 11000 s⁻¹, utilizando um "gap" de 50 μm.



Figura 15. Replicatas obtidas na determinação de N1 em taxa de deformação constante (11.000 s⁻¹) para solução de gelana (1% m/m).

Recentemente foi publicado um estudo feito por STOKES et al. (2011) em que a primeira diferença de tensões normais foi determinada para soluções aquosas de polissacarídeos (xantana, gelana, pectina, goma locusta e carragena). Os resultados desse estudo mostraram que as soluções de polissacarídeos apresentaram componentes de tensões normais, mas estas só apareceram em taxas de cisalhamento muito altas, em geral acima de 1.000 s⁻¹ e no caso da gelana em taxas de cisalhamento acima de 11.000 s⁻¹, ou seja, as soluções de gelana mostraram pouca elasticidade, quando comparadas com os outros polissacarídeos.

A determinação de N1 em reômetros rotacionais pode ser feita facilmente, porém não é simples atingir taxas de deformação acima de 10^4 s⁻¹. Um método utilizado para atingir valores extremos de taxa de deformação seria através da redução da dimensão característica (h) ("gap") entre as placas paralelas (DAVIES & STOKES, 2005; DAVIES

& STOKES, 2008). A taxa de deformação é uma relação entre velocidade e o "gap", assim a redução do "gap" levaria a um aumento da taxa de deformação aplicada. Porém, essa redução no "gap" (entre 5 e 50 μm) leva à aparição de inúmeros artefatos nas medidas, que não podem ser facilmente corrigidos, como aquecimento viscoso, fratura de borda, escoamento secundário e migração radial do fluido. Além disso, também apresenta alguns erros que podem ser corrigidos através da determinação de fatores de correção para o equipamento que está sendo utilizado, como os decorrentes de efeitos inerciais e erros na medida do "gap" realizada pelo reômetro. Esse último pode ser gerado devido a vários fatores como não paralelismo das placas, não concentricidade, efeito de borda, deslizamento do fluido e do procedimento utilizado para zerar o "gap" (DAVIES & STOKES, 2005; DAVIES & STOKES, 2008). No entanto, a principal dificuldade para avaliar o N1 da solução de gelana pode ser atribuída à sua baixa elasticidade em condições de viscoelasticidade não linear (STOKES et al., 2011).

5.2. Definição das concentrações para formação de géis

5.2.1 Gelificação induzida por sais (CaCl₂ e KCl)

Ensaios de gotejamento foram realizados com o objetivo de determinar as concentrações adequadas de polissacarídeo e dos sais (CaCl₂ e KCl) para a formação de gel e assim, usá-las durante a produção dos microgéis no processo de atomização. Este processo foi utilizado devido à semelhança quanto à difusão do agente gelificante através das gotas de polissacarídeo do processo de produção de microgéis, e, pelo fato de serem produzidas partículas macroscópicas, o que permite a visualização de gelificação dos sistemas mais facilmente que nos microgéis.

Na Figura 16 é possível observar que, independentemente do sal utilizado, a força máxima aumentou com o incremento da concentração de polissacarídeo até 1% m/m de gelana. Acima dessa concentração foi observada uma redução na força, pois o excesso de polissacarídeo passou a deixar o sistema mais frágil e quebradiço.



Figura 16. Força máxima das macroesferas de gelana formadas com A) $CaCl_2$ ou B) KCl. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de gelana para uma concentraçõe fixa de sal. Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de sais para uma concentraçõe fixa de gelana.

Com relação à concentração de sal, em geral, foi observado que a força máxima também aumentou com maiores concentrações de sal para uma concentração fixa de polissacarídeo. As macroesferas formadas na menor concentração de KCl (1% m/v) mostraram pequeno valor de força máxima, sendo que na concentração de 0,4% de gelana a partícula obtida não pôde ser analisada devido à sua fragilidade.

Na Figura 17 são apresentadas as imagens das macroesferas obtidas nas concentrações intermediárias de sal $(1,1\% \text{ m/v} \text{ de CaCl}_2 \text{ e } 3\% \text{ m/v} \text{ de KCl})$. Em geral, foi

possível observar que o formato das partículas tornou-se mais regular e esférico com o aumento da concentração de gelana, independente do sal utilizado. O aumento da concentração de sal para uma concentração fixa de gelana também resultou em partículas de formato mais regular e esférico (imagens não apresentadas), sendo que esse efeito foi mais pronunciado nas menores concentrações de gelana. Quanto maior a concentração salina do meio, mais rápida é a difusão do sal para dentro das gotas. Um processo de gelificação mais rápido (que pode ser causado tanto pela maior concentração de sal quanto pela maior concentração de polissacarídeo) impede a deformação das gotas, o que explicaria os resultados obtidos.



Figura 17. Imagem das macroesferas de gelana com gelificação induzida por $CaCl_2$ (1,1 % m/v) ou KCl (3% m/v). A) 0,4, B) 0,6, C) 0,8, D) 1 e E) 1,2 % m/m de gelana. As barras representam 1 cm.

A partir dos resultados apresentados anteriormente foram escolhidas as concentrações de sal a serem utilizadas para a produção dos microgéis no processo de atomização. No caso das partículas formadas com CaCl₂, embora a maior concentração de sal (3% m/v) tenha resultado nas partículas mais firmes, foi possível observar que houve uma diferença pequena nos valores de força máxima das partículas gotejadas na concentração de 1,1% m/v comparadas às gotejadas em 3% m/v de CaCl₂. Assim, para a

produção dos microgéis foi escolhida a concentração intermediária de CaCl₂ (1,1% m/v), pois a maior concentração avaliada (3% m/v) resultou em aumento da força máxima que não justificaria a utilização de uma concentração de sal cerca de três vezes maior. Para a escolha da concentração do KCl para produção dos microgéis foi levada em consideração a força iônica (FI) da solução, que foi calculada de acordo com a Equação 21:

$$FI = \sum c_i z_i^2$$
(21)

em que c_i representa a concentração molar, e z_i a carga do íon. A equivalência de força iônica facilita a comparação dos sistemas com diferentes tipos de sais. Deste modo, para a produção dos microgéis de gelana/K foi fixada a concentração de 2,28% m/v, que resulta em mesma força iônica (FI = 0,3M) que a solução de cloreto de cálcio 1,1% m/v.

A Figura 18 mostra a força máxima das macroesferas gelificadas à mesma força iônica (0,3 M). É possível observar que as macroesferas gelificadas por CaCl₂ possuem maior força máxima em todas as concentrações de gelana estudadas. Esse resultado está de acordo com o obtido em macrogéis (TANG et al., 1996; VILELA et al., 2011), e pode ser explicado pelo tipo de interação que ocorre entre os cátions e as cadeias de gelana. Os cátions monovalentes permitem a formação de gel através de neutralização de cargas das cadeias de gelana. Já os cátions divalentes formam pontes salinas entre as cadeias de gelana, resultando em uma interação mais forte que a observada no caso do KCl e, por isto, um gel mais forte é obtido.



Figura 18. Força máxima das gotas gelificadas por soluções de $CaCl_2$ ou KCl na mesma força iônica (FI = 0,3M). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de gelana para o mesmo tipo de sal. Letras minúsculas: diferenças entre os diferentes tipos de sais para uma concentração fixa de gelana.

5.2.2 Gelificação induzida por polieletrólito de carga positiva (quitosana)

Na Figura 19 são apresentadas as macroesferas formadas pela complexação entre gelana e quitosana. Como as soluções de quitosana foram preparadas em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH = 3), também foi feito um ensaio controle (branco) com gotejamento da gelana em tampão acetato de sódio sem presença de quitosana, pois os íons H⁺ também podem induzir gelificação do polissacarídeo. O efeito do abaixamento do pH é análogo ao provocado pela adição de sais, dado que os íons hidrogênio permitem a formação do gel através da redução da repulsão eletrostática existente entre as cadeias de gelana (MORITAKA, 1995; YAMAMOTO, 2006). Além disso, o sódio, cátion monovalente presente no tampão, também pode levar à gelificação da gelana. A força iônica do tampão acetato de sódio 0,2 M (pH = 3) também foi calculada e apresentou um valor 10x menor (FI

= 0,03 M) que o das soluções salinas nas concentrações escolhidas para o processo de atomização (1,1% m/v de CaCl₂ e 2,28% m/v de KCl).

Os resultados obtidos com relação à força máxima (Fig. 19) mostram que não houve diferença significativa entre as macroesferas. No entanto, através de uma análise qualitativa das imagens foi possível observar que o gotejamento sobre quitosana (0,25 ou 0,5% m/m) resultou em partículas mais esféricas do que as formadas no ensaio controle (somente tampão acetato como agente gelificante). Assim, a quantidade de íons carregados positivamente presentes no tampão é suficiente para induzir a gelificação das gotas de gelana, apesar de formar partículas com formato bastante irregular. Essa diferença observada na morfologia das macroesferas pode ser um indício de que está havendo complexação entre a gelana e quitosana. Mas, como não foi possível observar diferenças nas propriedades mecânicas das amostras, as 3 diferentes condições foram testadas durante o processo de atomização para a formação de microgéis.



Figura 19. Força máxima e imagens das macroesferas formadas através de gotejamento de gelana (1% m/m) sobre soluções de quitosana 0,5% m/m (A) e 0,25% m/m (B), e em tampão acetato de sódio 0,2 M (C). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).

Comparando a força máxima obtida para as macroesferas de gelana com os diferentes agentes gelificantes foi possível observar que as macroesferas com gelificação induzida por quitosana foram mais frágeis que as obtidas com os sais. Como a quitosana é um biopolímero de alta massa molecular, esta não pode difundir para o interior das gotas de gelana, provocando uma gelificação somente na camada mais externa (formação de cápsulas), diferente das partículas formadas com CaCl₂, KCl ou tampão acetato de sódio, em que o gel se forma em toda a extensão da partícula. Isso explica a maior fragilidade das macroesferas formadas através de complexação entre gelana e quitosana. Já as partículas formadas somente com o tampão acetato de sódio apresentaram menor força que as partículas com gelificação induzida por CaCl₂ ou KCl, devido à menor força iônica apresentada pelo tampão.

5.3. Influência das condições de processo nas propriedades dos microgéis

Foi determinado o efeito do diâmetro do bico atomizador, da pressão do ar e da distância de coleta (distância entre a saída do bico atomizador e entrada da solução salina) no tamanho dos microgéis contendo 1% m/m de gelana atomizados sobre 1,1% m/v de CaCl₂ ou 2,28% m/v de KCl. As Figuras 20 e 21 mostram os resultados obtidos.

De modo geral, a mesma tendência foi observada para as partículas com CaCl₂ ou KCl. Foi possível verificar um aumento no tamanho das partículas com o aumento do diâmetro do bico aspersor. Os principais fatores que contribuíram para este resultado foi o aumento da área de saída do gás, que tornou a velocidade do ar menor e o aumento da área de saída do líquido, que levou a maior espessura do jato de líquido (Tabela 1 e Figura 9). O processo de formação de gotas através da atomização envolve uma série de instabilidades

na interface anular líquido/gás. Inicialmente, as forças exercidas pelo ar geram a primeira instabilidade, denominada Kelvin–Helmhotz, em que ondas são formadas na superfície anular do líquido. Essas ondas aumentam e começam a se separar na forma de ligamentos, que rapidamente se colapsam em gotas através da instabilidade secundária, chamada Rayleigh–Taylor (MANSOUR & CHIGIER, 1995; VARGA et al., 2003; ALISEDA et al., 2008). Assim, o aumento da espessura do jato e a redução da velocidade de saída do ar fizeram com que este processo de desintegração fosse menos efetivo. Já o *span*, parâmetro associado à polidispersão da distribuição de tamanho das partículas, diminuiu com o aumento do diâmetro do bico aspersor. Com o aumento do diâmetro do bico aspersor, partículas com tamanhos menores (entre 10 e 30 µm) não foram formadas devido à redução da turbulência, causando um estreitamento da distribuição de tamanhos.



Figura 20. Efeito da distância de coleta, diâmetro do bico e pressão do ar no D_{32} , no *Span* e na curva de distribuição de tamanho do microgel de 1% gelana/Ca. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).



Figura 21. Efeito da distância de coleta, diâmetro do bico e pressão do ar no D_{32} , no *Span* e na curva de distribuição de tamanho do microgel de 1% gelana/K. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).

A Tabela 3 apresenta os números adimensionais calculados para os diferentes bicos aspersores utilizados, em que pode ser observada a redução na taxa de deformação do processo e no número de Re do gás com aumento dos diâmetros de saída dos bicos aspersores. A redução observada no número de We está relacionada diretamente à diminuição das velocidades de ambos os fluidos. Foi possível observar um aumento no número de Ohnesorge, mostrando que o incremento da viscosidade (redução da taxa de deformação) prevaleceu sobre o aumento do diâmetro de saída do líquido.

Tabela 3. Números adimensionais calculados nas diferentes configurações de bico aspersor.

								D ₃₂ (μm)	
d _ı (mm)	γ̀ (s⁻¹)	Re _λ ι	ղ _၊ (Pa.s)	Reg	Oh	We	gelana/Ca	gelana/K	Modelo
0,7	6974	213	0,0169	8460	0,0813	279	68,48	93,56	75,54
1	4336	126	0,0239	5934	0,0963	209	95,38	100,95	113,06
1,2	2362	77	0,0373	5331	0,1372	130	142,62	182,04	181,37

A Tabela 3 também apresenta os valores obtidos através do modelo de predição proposto por ALISEDA et al. (2008), sendo possível observar que valores da mesma ordem de grandeza que os experimentais foram obtidos. Os coeficientes ajustados foram: $C_1 =$ 2,12 e $C_2 = 0$ (média dos coeficientes ajustados em relação às partículas com CaCl₂ e KCl). Como C_2 apresentou valor nulo, é possível concluir que os efeitos viscosos tiveram pouca influência no tamanho obtido através do modelo. Isso pode ter ocorrido devido aos baixos valores de viscosidade obtidos em taxas de deformação altas, como as observadas durante o processo de atomização. É importante ressaltar que o modelo utilizado faz a predição do tamanho das gotículas formadas através do processo de atomização, mas não considera o processo de gelificação e o encontro das gotas com o banho salino, fatores que têm influência no tamanho final das partículas obtidas. Já o aumento da pressão de ar levou a um aumento da força cisalhante do gás e de sua turbulência (ZHANG et al., 2007), ou seja, sua capacidade de desintegrar o jato de líquido em gotas aumentou, levando a menores tamanhos de partículas. Um resultado similar foi descrito por PERRECHIL et al. (2011) para microgéis de κ-carragena. O *span* também foi reduzido com o aumento da pressão do ar. A Tabela 4 apresenta os números adimensionais calculados nas diferentes pressões utilizadas, em que é possível observar o aumento da pressão. O número de We também aumentou consideravelmente, indicando um crescimento mais rápido das ondas formadas na instabilidade primária (ALISEDA et al., 2008), favorecendo a obtenção de gotas menores com o aumento da pressão. O aumento da taxa de deformação do processo levou a uma redução dos valores de viscosidade e, consequentemente, dos valores de número de Oh observados. Os resultados de D₃₂ obtidos através do modelo foram relativamente próximos aos valores experimentais, principalmente no caso das partículas de gelana/Ca.

					D ₃₂ (μm)				
P (bar)	γ̀ (s⁻¹)	Re _λ ι	η _ι (Pa.s)	Reg	Oh	We	gelana/Ca	gelana/K	Modelo
1	6974	213	0,0169	8460	0,0813	279	68,48	93,56	75,54
1,25	9167	285	0,0138	10177	0,0666	404	54,44	83,13	59,15
1,5	11840	375	0.0115	12095	0.0552	570	43,25	62,64	47,16

Tabela 4. Números adimensionais calculados nas diferentes pressões de ar utilizadas.

Em todas as condições de processo estudadas (Tabelas 3 e 4) foi possível observar que os valores para o número de Re da camada líquida ($Re_{\lambda l}$) foram todos acima de 10, condição necessária para o desenvolvimento da instabilidade primária e, consequentemente, para a quebra do líquido em gotas (ALISEDA et al., 2008). No caso da distância de coleta foi observado que dependendo do sal utilizado, o efeito no tamanho das partículas é diferente. Mas a tendência geral observada é a mesma, ocorrendo aumento das partículas com o aumento da distância de coleta. Isso pode ter ocorrido porque uma maior distância entre bico aspersor e solução de coleta pode permitir que processos de aglomeração ou até mesmo coalescência das gotas ocorram mais facilmente. Esse aumento também poderia ser relacionado à velocidade com que as partículas alcançam o banho. Com relação à influência do tipo de sal utilizado, a velocidade de gelificação deve ser diferente dependendo se a interação está sendo feita por sal de cátion divalente ou monovalente (VILELA et al., 2011), e essa velocidade pode estar associada ao tamanho das partículas geradas.

De fato, as partículas formadas com o cátion monovalente foram maiores que as do cátion divalente em cada condição de processo, mostrando a influência do processo de gelificação. Esse resultado pode explicar a maior proximidade do resultado obtido pelo modelo e o experimental usando CaCl₂, em que o R² calculado foi de 0,9407 e 0,9973 para as partículas de gelana/K e gelana/Ca, respectivamente.

De forma geral, foi observado que o diâmetro do bico aspersor e a pressão do ar foram os parâmetros com efeito mais acentuado sobre a distribuição de tamanho das partículas obtidas utilizando tanto CaCl₂ como KCl como agentes gelificantes. Os números adimensionais calculados são importantes no direcionamento do aumento de escala do processo e permitiram comparar os dados obtidos experimentalmente com valores preditos por um modelo da literatura. O modelo testado permitiu que a tendência e grandeza dos valores de tamanho médio fossem preditas de forma razoável. Em alguns casos, valores preditos e experimentais foram bastante similares.

5.4. Influência da composição nas propriedades dos microgéis de gelana

5.4.1 Microgéis com gelificação induzida por sais (CaCl₂ e KCl)

5.4.1.1 Tamanho e formato

Foi avaliado o efeito da concentração de gelana no tamanho e formato dos microgéis obtidos a partir da atomização sob mesmas condições de processo (H = 20 cm, pressão = 1 bar e d₁ = 0,7 mm), porém com gelificação induzida pelos dois diferentes sais. As gotículas produzidas na atomização foram coletadas em banho salino de CaCl₂ ou KCl nas concentrações determinadas através dos ensaios preliminares (FI = 0,3 M). A Figura 22 apresenta a influência da composição nos parâmetros D_{32} e *span*, ambos obtidos a partir da curva de distribuição de tamanho de partículas.

Os microgéis induzidos por CaCl₂, mostraram aumento de tamanho com o aumento da concentração de gelana até 1% m/m. Acima dessa concentração foi observada uma queda no tamanho das partículas. Já nas partículas formadas com KCl foi observado um aumento no seu tamanho com o incremento da concentração de gelana em todo o intervalo estudado. Em relação ao tipo de sal utilizado foi observado que as partículas de gelana/Ca apresentaram tamanho um pouco maior que as partículas de gelana/K à mesma concentração de gelana (1,2% m/m), em que o tamanho dos microgéis formados com os diferentes sais foi semelhante.



Figura 22. Efeito da composição no D_{32} (A) e *span* (B) dos microgéis formados sob condições idênticas de processo. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de gelana para um mesmo tipo de sal. Letras minúsculas: diferenças entre os diferentes sais utilizados para uma concentração fixa de gelana.

O *span* (polidispersão) foi similar para todas as amostras exceto para as partículas produzidas com solução de gelana na menor concentração (0,6% m/m). Nesta condição, a polidispersão foi maior, praticamente o dobro, da obtida para as outras concentrações de polissacarídeo, independente do sal utilizado. Para as maiores concentrações de gelana (0,8, 1 e 1,2% m/m) a polidispersão das partículas de gelana/Ca foram levemente maiores que a obtida para as partículas de gelana/K.

A Figura 23 apresenta as curvas de distribuição de tamanho dos microgéis de gelana. É possível observar que na menor concentração de gelana (0,6% m/m), independente do sal utilizado, as curvas apresentam comportamento bimodal bem acentuado, o que está de acordo com a maior polidispersão encontrada nessas condições. Essa curva apresentou um pico de menor área na mesma região do pico de maior área obtido para as partículas com maior concentração de gelana, e o pico maior referia-se às partículas de tamanhos menores. É possível concluir que a menor viscosidade dessa solução permitiu a obtenção de partículas com tamanho variando dentro de uma faixa mais ampla, mostrando que os efeitos viscosos influenciaram no perfil de desintegração ocorrido durante o processo de atomização. Uma viscosidade menor representa uma menor resistência frente ao cisalhamento durante o processo de atomização.

Já as partículas com maior concentração de polissacarídeo apresentaram distribuições de tamanho bem semelhantes para os dois sais utilizados. Porém, para os microgéis com gelificação induzida por CaCl₂ foi possível observar um comportamento bimodal com convolução dos picos em tamanhos próximos.



Figura 23. Efeito da concentração de polissacarídeo e do sal utilizado na distribuição de tamanho das partículas contendo (A) 0,6, (B) 0,8, (C) 1 e (D) 1,2% (m/m) de gelana.

Na Figura 24 é possível observar a morfologia dos microgéis gelana/Ca. As partículas com menor concentração de gelana (0,4% m/m) apresentaram uma estrutura composta de filamentos e com formato irregular, pois as partículas se desintegram em poucos minutos devido à baixa concentração de polissacarídeo. Isso ocorreu, provavelmente, devido à baixa densidade polimérica presente nessa concentração e alta afinidade das cadeias de gelana com a água.



Figura 24. Microscopia óptica (aumento de 10x) dos microgéis com gelificação induzida por $CaCl_2$ contendo (A) 0,4, (B) 0,6, (C) 0,8, (D) 1 e (E) 1,2% (m/m) de gelana.

Assim, considerou-se que houve formação de partículas somente a partir de 0,6% m/m de gelana. A análise de imagem mostrou que não houve diferenças significativas

(p<0,05) entre os valores de *aspect ratio* (AR) para as amostras estudadas, mas houve uma tendência de decrescimento com o aumento da concentração de gelana com 80% de confiança. O tamanho das partículas (D₃₂) obtido através da análise de imagem apresentou tendência crescente frente ao aumento da concentração de polissacarídeo. Os valores apresentaram certa discrepância em relação aos obtidos através da técnica de difração à laser.

Nas partículas formadas através de gelificação induzida por KCl (Figura 25) também houve formação de filamentos na menor concentração de gelana e aumento da esfericidade a maiores concentrações de polissacarídeo (a partir de 0,6% m/m). Os valores de AR mostraram que o aumento da esfericidade das partículas com o aumento da concentração de polissacarídeo foi mais acentuado para as partículas formadas com KCl. O tamanho (D₃₂) das partículas de gelana/K obtido através de análise de imagem foi ligeiramente maior que os obtidos com a técnica de difração a laser em todas as concentrações estudadas, mas a tendência apresentada foi a mesma.

Comparando a formação de microgéis com os diferentes sais, em geral, é possível observar que a gelificação com CaCl₂ levou a partículas mais esféricas. Com relação ao tamanho médio, os valores obtidos com a técnica de difração à laser mostraram que as partículas de gelana/Ca são maiores que as partículas de gelana/K. No entanto, através de análise de imagem o oposto foi observado, concordando com o resultado obtido em relação às condições de processo (seção 5.3), em que as partículas com gelificação induzida por KCl foram maiores que as formadas através de gelicação com CaCl₂ em todas as condições estudadas. Ambas as técnicas utilizadas na determinação de tamanho das partículas possuem seus erros inerentes. Na análise de imagem, por exemplo, partículas de tamanho muito reduzido podem não ser identificadas pelo software, e aglomerados podem ser

identificados como uma partícula única. Na determinação de tamanho através de difração à laser, problemas como presença de bolhas, sedimentação, quebra de partículas e outros também podem ocorrer, levando à discrepância nos resultados.

Portanto, de modo geral, foi possível observar que a tendência de tamanho e morfologia foi bastante similar para os diferentes sais utilizados. Houve uma tendência de aumento de tamanho das partículas e redução do AR (partículas ficaram mais esféricas) com o aumento da concentração de gelana. Esse resultado está de acordo com o encontrado por PERRECHIL et al. (2011) para microgéis de κ-carragena, o qual foi atribuído à maior densidade biopolimérica e, consequentemente, maior viscosidade das soluções com maior concentração de polissacarídeo. Devido à discrepância dos resultados obtidos pelas duas diferentes técnicas de medição de tamanho e também devido à natureza complexa e aleatória do processo de atomização, não foi possível concluir qual sal resulta em menores tamanhos de partículas. Quanto à concentração de gelana, verificou-se que partículas foram formadas somente acima de 0,4% (m/m) de polissacarídeo na estrutura do microgel. Além disso, foi possível concluir que as concentrações de 0,8, 1 e 1,2% (m/m) de gelana resultaram em microgéis com distribuição de tamanho e formato (AR) bastante similares.



Figura 25. Microscopia óptica (aumento de 10x) dos microgéis de gelana com gelificação induzida por KCl. (A) 0,4%, (B) 0,6%, (C) 0,8%, (D) 1%, e (E) 1,2% m/m de gelana.

5.4.1.2 Estabilidade

A estabilidade das partículas quando armazenadas em diferentes solventes foi determinada. A Figura 26A apresenta os valores de D_{32} ao longo do tempo de armazenamento da suspensão dos microgéis 1% m/m gelana/Ca em água destilada. Pode ser observado que entre o tempo zero e 6 dias de armazenamento houve um aumento do valor de D_{32} , possivelmente devido a um inchaço das partículas causado por absorção de água. Depois dessa fase inicial, o tamanho permaneceu constante ou estável até 60 dias de armazenamento.



Figura 26. Estabilidade em água destilada do microgel contendo 1% m/m de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ (A) e estabilidade em tampão acetato de sódio (pH = 3,2) dos microgéis contendo 1% m/m de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ (B) ou KCl (C).

Já o microgel 1% m/m gelana/K não apresentou estabilidade em água destilada, sendo que as partículas foram rapidamente dissolvidas quando adicionadas nesse dispersante. Esse resultado mostra como as pontes salinas feitas pelo cátion divalente (cálcio) foram mais eficientes que o mecanismo de gelificação através de neutralização das cargas efetuado pelo cátion monovalente (potássio). Nas partículas com gelificação induzida por KCl a interação entre as cadeias de gelana e os cátions K⁺ não foram suficientemente fortes para impedir a hidratação da gelana e solvatação do KCl, possibilitando a dissolução das partículas. Um resultado semelhante foi encontrado por PERRECHIL et al. (2011), em que microgéis compostos por κ-carragena com gelificação induzida por KCl não foram estáveis quando adicionados em água deionizada.

Já as Figuras 26B e 26C apresentam a estabilidade em tampão acetato (pH =3,2) dos microgéis de 1% m/m gelana/Ca e de 1% m/m gelana/K, respectivamente. Os resultados mostram que as duas partículas permaneceram praticamente inalteradas quanto ao seu tamanho durante os 60 dias de armazenamento, podendo ser consideradas estáveis nessa condição de pH. Provavelmente os íons H^+ presentes no tampão reforçaram a rede de gel, contribuindo à estabilidade das partículas.

A determinação da estabilidade em tampão com pH ácido é importante em termos de aplicações tecnológicas, pois trata-se de um meio encontrado em grande parte dos alimentos. Assim, os microgéis de gelana, principalmente os formados através de gelificação com CaCl₂, podem ser adicionados em soluções ácidas, sem que ocorra a desintegração das partículas.

5.4.1.3 Reologia das suspensões

Curvas de escoamento foram obtidas para as suspensões contendo 30, 50 ou 70% (m/m) de microgéis de gelana/Ca. Os microgéis de gelana/K não foram avaliados devido a sua baixa estabilidade no dispersante utilizado, a água destilada. As curvas foram ajustadas pelo modelo mais adequado em cada caso e os parâmetros reológicos obtidos podem ser observados na Tabela 5.

Fração mássica = 30%						
Gelana (% m/m)	Comportamento	η (Pa.s)	n	R ²		
0,6	Newtoniano	0,0024		0,994		
0,8	Newtoniano	0,0022		0,962		
1	Newtoniano	0,0027		0,996		
1,2	1,2 Newtoniano			0,996		
Fração mássica = 50%						
Gelana (% m/m)	Comportamento	k (Pa.s ⁿ)	n	R ²		
0,6	Pseudoplástico	0,0265	0,6736	0,995		
0,8	Pseudoplástico	0,0177	0,7243	0,994		
1	Pseudoplástico	0,0075	0,8825	0,997		
1,2	Pseudoplástico	0,0091	0,8642	0,999		
Fração mássica = 70%						
Gelana (% m/m)	Comportamento	k (Pa.s ⁿ)	n	R ²		
0,6	Pseudoplástico	0,2785	0,3939	0,971		
0,8	Pseudoplástico	0,0934	0,5986	0,999		
1	Pseudoplástico	0,0259	0,7813	0,999		
1,2	Pseudoplástico	0,0199	0,8124	0,999		

Tabela 5. Parâmetros reológicos das suspensões de microgéis de gelana/Ca.

Na menor fração mássica as suspensões apresentaram comportamento Newtoniano, enquanto que nas demais frações o comportamento de fluido pseudoplástico foi o que melhor se ajustou aos dados obtidos. Essa mudança no comportamento é comum em suspensões. Frações mássicas mais baixas significam menor quantidade de partículas em suspensão, portanto há pouca interação entre elas. O aumento da fração mássica faz com que as interações partícula-partícula ocorram em maior grau, porém são interações fracas, que são quebradas com o aumento da taxa de deformação aplicada, por isso o comportamento pseudoplástico (SATO & CUNHA, 2011; SATO, 2009).

Os valores de viscosidade das suspensões contendo 30% (m/m) de microgel foram muito semelhantes. Já nas frações mássicas maiores foi possível verificar que, em geral, a diminuição da concentração de gelana no microgel resultou em aumento nos valores do índice de consistência e redução nos valores do índice de comportamento. Menores concentrações de gelana formaram rede de gel com menor firmeza (seção 5.2.1), e assim, partículas mais susceptíveis ao alinhamento e elongações decorrentes da aplicação de taxa de deformação foram formadas. Isso explica, portanto, a intensificação do comportamento pseudoplástico (redução nos valores de n) com a redução da concentração de polissacarídeo nos microgéis.

De modo geral, as propriedades reológicas das suspensões foram modificadas em maior grau através da adição das partículas contendo menor concentração de goma gelana. Esse comportamento também pode ser relacionado ao formato dessas partículas, que foi mais polidisperso e menos esférico que o obtido para as partículas com maior concentração de polissacarídeo (seção 5.4.1.1).

A viscosidade aparente em 50 s⁻¹ foi avaliada com o objetivo de comparar as suspensões em uma taxa de deformação típica de mastigação (Figura 27). A viscosidade aparente aumentou com o aumento da fração mássica, para uma concentração fixa de gelana, em todas as condições estudadas.

79



Figura 27. Viscosidade aparente das suspensões contendo microgéis de gelana/Ca em diferentes frações mássicas.

Para uma mesma fração mássica, foi observado que os microgéis com menores concentrações de gelana possuem maior viscosidade aparente, confirmando o observado para o índice de consistência. Esse comportamento ficou mais pronunciado à medida que a fração mássica aumentou e pode ser explicado pelo menor tamanho das partículas com menor concentração de gelana (seção 5.4.1.1). Para uma mesma fração mássica, quanto menor o tamanho das partículas maior o número de partículas na suspensão. Assim, ocorrem mais interações partícula-partícula, o que acaba por resultar em maiores valores de viscosidade da suspensão (SATO & CUNHA, 2011; SATO, 2009).

5.4.2 Microgéis com gelificação induzida por polieletrólito de carga positiva (quitosana)

Os ensaios envolvendo a atomização de gelana (1% m/m) sobre soluções de quitosana (0,5 e 0,25% m/m) foram realizados sob as mesmas condições de processo dos géis induzidos por sais, com exceção da pressão do ar, que variou entre 1 e 1,5 bar. Também foi realizado um teste controle, em que as gotículas de gelana foram coletadas em

tampão acetato de sódio sem a presença de quitosana, em que foi observada somente a formação de filamentos que rapidamente se dissolviam e não puderam ser visualizados.

Em todas as condições estudadas foi observada a formação de estruturas filamentosas visíveis macroscopicamente. Assim, a determinação de tamanho de partícula não pode ser realizada, devido à presença de estruturas com tamanho maior que o máximo permitido pelo equipamento de difração à laser.

A Figura 28 apresenta as microscopias das estruturas formadas. No primeiro ensaio (Fig. 28A) foi possível visualizar somente grande aglomerados, e o corante utilizado corou preferencialmente a gelana. Já na Figura 28B foi possível verificar que, além dos grandes aglomerados visíveis macroscopicamente, também foi possível a formação de micropartículas, devido ao aumento da pressão de ar (de 1 para 1,5 bar) utilizada no processo de atomização. A utilização de menor concentração de quitosana (Fig. 28C) também resultou na formação de grandes aglomerados, mas também de micropartículas, as quais se encontraram nas extremidades de filamentos da quitosana.



Figura 28. Microscopias das estruturas formadas através da atomização de gelana (1% m/m) sobre soluções contendo 0,5% m/m de quitosana utilizando pressão de 1 (A) ou 1,5 bar (B) e sobre solução com 0,25% m/m de quitosana com 1,5 bar de pressão (C). Aumento de 10x.

A formação de grandes aglomerados provavelmente se deve à dificuldade encontrada pelas gotículas de gelana em penetrar na solução contendo quitosana. Como a quitosana é uma macromolécula, mesmo sob agitação, as gotículas de gelana permaneceram na superfície da solução, formando, inicialmente, filmes, que depois de certo tamanho e tempo acabaram sendo rompidos pela agitação, formando os aglomerados.

Assim, o processo de atomização aliado à gelificação não foi adequado para a formação de partículas de gelana/quitosana através de complexação poli-iônica. Já o processo de gotejamento foi aplicado com sucesso para a formação de cápsulas de gelana/quitosana no presente trabalho e em outros estudos, como os conduzidos por OHKAWA et al. (2004) e FUJII et al. (2005). Assim, foi possível concluir que a entrada das gotas de gelana no banho de coleta contendo quitosana foi um problema apenas quando essas gotas apresentaram tamanho micrométrico.

5.5 Recobrimento dos microgéis de gelana/Ca e gelana/K com quitosana

A Figura 29 apresenta os resultados de potencial zeta antes e após o recobrimento com quitosana dos microgéis de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ ou KCl. É possível observar que antes do recobrimento, todas as partículas apresentaram valores de potencial zeta negativos, ou seja, a superfície das partículas possuía carga negativa, provavelmente devido aos grupos carboxílicos presentes na cadeia do polissacarídeo que ficaram expostos e não foram neutralizados pelos sais de cálcio e de potássio. Em geral as partículas de gelana/K apresentaram maior potencial zeta, em valor absoluto, que as partículas de gelana/Ca. Já com relação à concentração de gelana nas partículas, foi possível concluir que praticamente não há diferença estatística entre as amostras formadas com o mesmo tipo de sal e diferentes concentrações de polissacarídeo. Também foi determinado o potencial zeta da gelana pura dispersa em água (Tabela 6), que apresentou um potencial zeta de -44,27 \pm 3,71 mV. Após a formação do microgel, as partículas formadas com $CaCl_2$ apresentaram valores de potencial em torno de -12 mV, enquanto que as partículas com KCl tiveram potencial em torno de -17 mV. Esse resultado sugere que a neutralização das cadeias efetuada pelo cálcio foi maior, pois cátions divalentes são mais efetivos na formação de gel de gelana (TANG et al., 1996).



Figura 29. Potencial zeta dos microgéis de gelana (0,6, 0,8, 1, e 1,2% m/m) com gelificação induzida por CaCl₂ ou KCl antes (gelana/Ca e gelana/K) e após o recobrimento com quitosana (gelana/Ca/quitosana e gelana/K/quitosana). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de gelana para uma composição fixa (tipo de sal e presença ou não de quitosana). Letras minúsculas: diferenças entre composição para uma concentração fixa de gelana.

Tabela 6. Potencial Zeta (mV) dos polissacarídeos puros.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
Quitosana dispersa em água	$36,57 \pm 3,79$
Quitosana dispersa em tampão acetato	$69,07 \pm 2,13$
Gelana dispersa em água	-44,27 ± 3,71

Como as partículas de gelana/K foram pouco estáveis em água destilada (seção 5.4.1.2), a medida de potencial zeta para estas partículas também foi feita usando tampão acetato como meio dispersante. Na Tabela 7 pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre as medidas feitas em diferentes meios dispersantes da mesma amostra, assim os resultados medidos em água destilada foram considerados confiáveis.

Tabela 7. Potencial zeta das partículas de gelana/Ca e gelana/K em diferentes dispersantes.

	Potencial Zeta (mV)			
Amostra	Em água	Em tampão acetato		
1%gelana/Ca	-11,38±1,50 ^A	-10,31±2,46 ^A		
1%gelana/K	-18,55±1,21 ^в	-20,05±2,15 ^B		

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) para a mesma amostra analisada em diferentes meios dispersantes.

Após o recobrimento com quitosana, um polissacarídeo catiônico, todas as amostras apresentaram valores de potencial zeta positivos, permitindo concluir que o recobrimento foi efetivo. Em geral, também não houve diferença entre os valores de potencial das amostras com mesmo tipo de sal e diferentes concentrações de gelana. Com relação ao sal utilizado na formação inicial da partícula foi possível observar que as partículas com CaCl₂ apresentaram maiores valores de potencial zeta em todas as concentrações de gelana estudadas. Comparando o potencial das partículas recobertas com o potencial da quitosana pura dispersa em tampão acetato, meio em que esta se encontra solubilizada (Tabela 6), foi possível observar que os valores foram relativamente próximos. O potencial zeta da quitosana pura também foi medido em água, e um valor de potencial mais baixo foi encontrado. Esse resultado está relacionado ao pH da água, que é mais próximo ao pKa da

quitosana (6,2-7), nessas condições este biopolímero apresenta carga mais próxima do neutro (DASH et al., 2011).

A Figura 30 mostra os resultados referentes à influência do recobrimento no tamanho das partículas. Foi possível observar pouca diferença entre os valores de D_{32} das amostras antes e após o recobrimento com quitosana. Após o recobrimento com quitosana praticamente não houve modificação do tamanho das partículas com menores concentrações de gelana (0,6 e 0,8% m/m) tanto para as partículas com CaCl₂ como para as partículas com KCl. Porém, nas partículas com maior concentração de gelana (1 e 1,2% m/m) foi observada uma redução de tamanho.



Figura 30. Efeito do recobrimento com quitosana no D_{32} dos microgéis de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ (A) ou KCl (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre as amostras para uma concentração fixa de gelana.

Observando-se a distribuição de tamanho para os casos em que houve redução do D_{32} é possível notar que as curvas possuem perfil similar, porém com um deslocamento para menores valores das partículas com recobrimento de quitosana (Figura 31). Esta diminuição pode estar associada às interações eletrostáticas atrativas entre quitosana e

gelana, alterando a sua estrutura, e promovendo a sua compactação. Por outro lado, esse resultado também pode ter sido causado pela presença de estruturas filamentosas de quitosana que não se ligaram às partículas, e foram responsáveis pela redução de tamanho observada.



Figura 31. Distribuição de tamanho da partícula de 1%gelana/Ca antes e após o recobrimento com quitosana.

Um resultado semelhante foi obtido no estudo feito por WANG et al. (2011), em que micropartículas de alginato com gelificação induzida por carbonato de cálcio foram recobertas com quitosana. Nesse estudo a interação entre os polissacarídeos (alginato/quitosana) foi confirmada através de Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho e após a determinação da distribuição de tamanho das partículas também foi observada uma redução no tamanho das partículas com recobrimento, em relação às partículas sem a camada de recobrimento.

5.6. Simulação in vitro do processo de digestão

Os microgéis contendo 1% (m/m) de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ ou KCl, sem ou com recobrimento de quitosana (0,25% m/m) foram submetidos a ensaios de simulação de digestão *in vitro*. A Figura 32 apresenta a variação do potencial Zeta ao longo das diferentes etapas do processo: início, após as digestões gástrica e entérica.



Figura 32. Efeito das etapas de digestão sobre o potencial zeta dos microgéis contendo 1% m/m de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ (gelana/Ca) ou KCl (gelana/K) sem ou com recobrimento com quitosana 0,25% m/m (gelana/Ca/quitosana e gelana/K/quitosana).

A partir dos resultados apresentados na Figura 32 foi possível observar que o recobrimento teve influência na carga superficial das partículas. No caso das partículas recobertas com quitosana, os valores obtidos nas 3 etapas distintas não apresentaram diferenças significativas (p < 0,05) entre os dois sais utilizados. Já os microgéis sem recobrimento foram estatisticamente diferentes, porém apresentaram tendência similar em

cada etapa da digestão. A etapa de digestão gástrica praticamente não alterou o balanco de cargas superficial dos microgéis sem a presença do recobrimento, porém as partículas com quitosana tiveram seu potencial zeta reduzido, mas continuaram apresentando valores positivos. Já a etapa de digestão entérica teve um efeito mais pronunciado na carga superficial das partículas. Os microgéis sem a camada de quitosana mostraram uma elevação do valor absoluto do potencial zeta, ou seja, ficaram com carga superficial mais negativa. Já o potencial zeta dos microgéis com recobrimento de quitosana passou de positivo para negativo. Essa alteração pode ter sido causada pela perda da camada de quitosana, que se encontrava ligada à gelana através de interações eletrostáticas, que foram rompidas pelas condições de pH e força iônica do meio. Outra explicação seria somente uma alteração de carga da quitosana, já que esta possui pKa de aproximadamente 6,5, portanto apresenta-se carregada positivamente em pH ácido, mas em pH neutro (como na digestão entérica) pode ter carga levemente positiva ou negativa (McCLEMENTS & LI, 2010). A quitosana apresenta grupos amina em sua estrutura, indicando que, assim como ocorre com proteínas, o pH do meio pode alterar substancialmente sua carga superficial (DASH, 2011).

As Figuras 33, 34 e 35 apresentam as curvas de distribuição de tamanho das partículas e sua morfologia ao longo das etapas de digestão *in vitro*. Nestas figuras são apresentadas as distribuições de tamanho em função da fração numérica e volumétrica das partículas de forma a contribuir com a interpretação dos resultados obtidos.

É possível observar que a etapa de digestão gástrica dos microgéis sem recobrimento de quitosana (Figuras 33 e 34) não alterou as curvas de distribuição de tamanho (numérica e volumétrica) e a morfologia das partículas. Esse resultado está de acordo com o obtido para o potencial zeta, e confirma a resistência dessas partículas frente
às condições de digestão encontradas no estômago. Estes microgéis são estáveis quando adicionados em soluções ácidas (seção 5.4.1.2), o que explicaria a estabilidade frente às condições do estômago (pH = 2).



Figura 33. Efeito das etapas da digestão na distribuição de tamanho e na morfologia dos microgéis com 1% m/m de gelana com gelificação induzida por CaCl₂ (I) e ampliação de escala das distribuições obtidas após a digestão entérica (II). As microscopias foram feitas com aumento de 10x, sendo A) Início do processo, B) Pós digestão gástrica e C) Pós digestão entérica. As barras têm 200 μm.

Já na etapa de digestão entérica, foi observado que os microgéis sem a camada de quitosana foram quebrados em partículas menores, com tamanhos entre 6 e 10 µm no caso dos microgéis de gelana/Ca, e entre 0,3 e 1 µm para os microgéis de gelana/K. Através da curva de distribuição numérica de tamanho é possível observar, à primeira vista, somente o pico referente às partículas menores formadas após a digestão entérica. Porém, a microscopia destas amostras mostra que ainda havia partículas que não foram quebradas durante o tempo de incubação, cujo tamanho manteve-se inalterado. Esse resultado pode ser visto mais facilmente através da curva de distribuição volumétrica, que apresenta dois picos, um pequeno referente às partículas menores e outro que coincide com o pico encontrado no início do processo. De fato, essa distribuição bimodal também pode ser vista na curva numérica, mas somente através de uma ampliação na escala no gráfico (Figura 33-II), em que um pico em torno de 50 µm se torna aparente. Isso ocorreu porque o número de partículas menores é maior, porém, o volume ocupado por elas é muito reduzido frente às partículas maiores. Assim, na curva de distribuição volumétrica o pico que prevalece é o referente às partículas maiores, ou seja, às que não quebraram durante a digestão entérica, já que uma partícula com tamanho 10x maior ocupa um volume 1000x maior (Volume = 4/3. π . R³).



Figura 34. Efeito das etapas da digestão na distribuição de tamanho e na morfologia dos microgéis com 1% m/m de gelana com gelificação induzida por KCl. As microscopias foram feitas com aumento de 10x, sendo A) Início do processo, B) Pós digestão gástrica e C) Pós digestão entérica. As barras têm 200 μm.

Na Figura 35 são apresentados os resultados para as partículas de gelana recobertas com quitosana. Nesse caso, os resultados obtidos para os microgéis contendo diferentes tipos de sais em sua composição foram muito semelhantes entre si.



Figura 35. Efeito das etapas da digestão na distribuição de tamanho e na morfologia do microgel com 1% m/m de gelana com gelificação induzida por $CaCl_2$ (I) ou KCl (II) com recobrimento de quitosana. As microscopias foram feitas com aumento de 10x, sendo A) Início do processo, B) Pós digestão gástrica e C) Pós digestão entérica. As barras tem 200 µm.

Após a digestão gástrica ambas as partículas se mantiveram estáveis, sem diferenças na distribuição de tamanho e morfologia. Porém, após a digestão entérica as partículas foram desintegradas em menores tamanhos. A diferença em relação às partículas sem recobrimento é que, nesse caso, o comportamento bimodal da distribuição de tamanhos é evidente, com o segundo pico, referente às partículas que não quebraram, maior que no caso das partículas contendo somente gelana. Portanto, pode-se concluir que um menor número de partículas foi desintegrado. Assim, acredita-se que a presença dessa camada dificultou a desintegração das partículas.

De modo geral, é possível concluir que as partículas de gelana com ou sem recobrimento de quitosana resistiram à digestão gástrica, mas desintegraram parcialmente durante a digestão entérica. No entanto, a presença da camada de quitosana resultou em desintegração de um menor número de partículas em condições da digestão entérica. Acredita-se que se o tempo de incubação da etapa de digestão entérica fosse maior, todas as partículas seriam completamente quebradas. No entanto as partículas com a camada de quitosana, quando aplicadas como material de parede, poderiam resultar em uma liberação mais lenta do composto bioativo ao longo do intestino. Esse resultado é um indício de que estas partículas poderiam ser aplicadas para veiculação de compostos bioativos a serem liberados somente no intestino. No estudo realizado por COOK et al. (2011), foi observado um resultado semelhante, em que macroesferas de alginato recobertas com quitosana apresentaram dissolução mais lenta que as macroesferas contendo somente alginato quando submetidas às condições simuladas do intestino. Além disso, nesse estudo as macroesferas foram aplicadas na encapsulação de uma bactéria probiótica, e os resultados mostraram que o recobrimento com quitosana aumentou significativamente o número de células viáveis após a etapa simulada de digestão gástrica.

Durante a digestão, o material de parede utilizado na encapsulação pode responder às alterações no meio de diversas formas: continuar intacto, intumescer ou encolher, sofrer degradação física, química ou enzimática, ou ser fragmentado fisicamente (McCLEMENTS & LI, 2010). No caso de polissacarídeos não digeridos pelas enzimas do trato gastrointestinal humano, como a gelana e quitosana, o que se observou foi somente uma fragmentação física. Assim, as condições do meio simulado como pH, força iônica, e presença de componentes com atividade de superfície (como os sais de bile) foram os responsáveis pela fragmentação ocorrida. As condições do meio causaram um enfraquecimento das interações eletrostáticas que mantinham o microgel, permitindo sua desintegração em partículas menores.

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que partículas biopoliméricas de tamanho micrométrico puderam ser produzidas sem o uso de condições severas e a partir de componentes biocompatíveis. Os microgéis de gelana foram feitos utilizando baixas concentrações de polissacarídeo, em temperatura ambiente, através de um aparato simples para formação das gotículas por atomização com posterior gelificação.

Em geral, as partículas obtidas apresentaram formato mais esférico e menor polidispersão com o aumento da concentração de polissacarídeo. Além disso, o tamanho médio obtido mostrou-se menos dependente das propriedades do fluido em relação às condições de processo utilizadas. Maior velocidade do ar na atomização e menor diâmetro do bico aspersor levaram à diminuição do tamanho das partículas obtidas. Já o aumento na distância de coleta levou à formação de partículas maiores.

Ambas as partículas de gelana/Ca e gelana/K permaneceram estáveis por até 60 dias de armazenamento em soluções ácidas. Os microgéis de gelana/Ca também se mantiveram estáveis quando adicionados em água destilada. A capacidade das micropartículas de manter sua estrutura em meio aquoso permite concluir que estas são adequadas em aplicações envolvendo a incorporação de compostos bioativos em alimentos líquidos. As propriedades reológicas das suspensões de microgéis de gelana/Ca foram mais fortemente influenciadas por partículas contendo a menor concentração de gelana, provavelmente devido à menor firmeza, maior polidispersão e maior irregularidade no formato desses microgéis em relação aos que possuíam maior concentração de polissacarídeo em sua estrutura.

95

A obtenção de micropartículas de gelana com quitosana através de uma única etapa, ou seja, atomização da gelana diretamente sobre soluções de quitosana, não foi possível. Entretanto, o processo utilizando duas etapas, com atomização da gelana sobre soluções salinas e posterior etapa de recobrimento das partículas gelificadas com quitosana, mostrouse viável para a obtenção de micropartículas compostas pelos dois polissacarídeos. A complexação eletrostática entre as macromoléculas foi confirmada através da mudança de carga elétrica superficial das partículas. As interações eletrostáticas atrativas entre os polieletrólitos de carga oposta, causou compactação da estrutura, e uma redução no tamanho médio dos microgéis.

A presença da camada externa de quitosana teve influência na resistência das partículas às condições simuladas da digestão. Os resultados obtidos permitem concluir que as partículas estudadas, com ou sem o recobrimento, foram estáveis quando expostas às condições simuladas do estômago. Já na etapa da digestão entérica, as partículas foram fragmentadas fisicamente. No entanto, as partículas recobertas com quitosana se romperam menos, mostrando que o recobrimento pode melhorar a eficiência das partículas como material de parede na encapsulação de compostos bioativos.

7. REFERÊNCIAS

ALISEDA, A.; HOPFINGER, E. J.; LASHERAS, J. C. Atomization of viscous and nonnewtonian liquids by a coaxial, high-speed gas jet. Experiments and droplet size modeling. **International Journal of Multiphase Flow**, v. 34, p. 161-175, 2008.

ALLEN, A.; FLENSTROM, G.; GARNER, A.; KIVILAAKSO, E. Gastroduodenal mucosal protection. **Physical Review**, v. 73, p. 823-857, 1993.

ANAL, A. K., STEVENS, W. F. Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 45–54, 2005.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L. M.; COSTA, A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 23, p. 27-34, 2007.

BEMILLER, J. N. Carbohydrate chemistry for food scientists. Second Edition. St. Paul, Minnesota, AACC International, Inc., 2007, 389 p.

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.

BUREY P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Gel particles from spraydried disordered polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.76, n. 2, p. 206-213, 2009.

CHAN, E.; LEE, B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. **Journal of colloid and interface science**, v. 338, n. 1, p, 63-72, 2009.

CHAN, E.; LIM, T.; RAVINDRA, P.; MANSA, R. F.; ISLAM, A. The effect of low air-toliquid mass flow rate ratios on the size, size distribution and shape of calcium alginate particles produced using the atomization method. **Journal of Food Engineering**, v.108, p. 297-303, 2012.

COLINET, I., DULONG, V., MOCANU, G., PICTON, L., CERF, D. L. Effect of chitosan coating on the swelling and controlled release of a poorly water-soluble drug from an amphiphilic and pH-sensitive hydrogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 120–125, 2010.

COOK, M. T.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Production and evaluation of alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic

bacteria. **International Congress of Engineering and Food**, Caderno de Resumos, v. 1, p. 679-680, 2001.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DAVIES, G A.; STOKES, J. R. On the gap error in parallel plate rheometry that arises from the presence of air when zeroing the gap. **Journal of. Rheology**, v. 49, n. 4, p. 919-922, 2005.

DAVIES, G A.; STOKES, J. R. Thin film and high shear rheology of multiphase complex fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 148, p. 73–87, 2008.

DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; NASCIMENTO, R. F.; LIMA, M. B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 160-163, 2008.

DOMARD, A.; DOMARD, M. Chitosan: Structure–Properties Relationship and Biomedical Applications. In: DUMITRIU, S. **Polymeric Biomaterials**. Second edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.

DOMBROWSKI, N.; JOHNS, W. R. The aerodynamic instability and disintegration of viscous liquid sheets. **Chemical Engineering Science**, v. 18, p. 203–214, 1963.

DUMOUCHEL, C.; COUSIN, J.; TRIBALLIER, K. On the role of the liquid flow characteristics on low-Weber-number atomization processes. **Experiments in Fluids**, v. 38, p. 637–647, 2005.

FAVERO, J. L. Simulação de escoamentos viscoelásticos: desenvolvimento de uma metodologia de análise utilizando o software OpenfOAM e equações constitutivas diferenciais. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313–332, 2005.

FRITSCHING, U.: "Spray Systems" in: **Multiphase Flow Handbook**, Ed.: C.T. Crowe, CRC-Press, Boca Raton, Fl, USA, 2006, Chapter 8, pp. 8.1 – 8.100.

FUJII, T.; OGIWARA, D.; OHKAWA, K.; YAMAMOTO, H. Alkaline phosphatase encapsulated in gellan-chitosan hybrid capsules. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 5, p. 394-400, 2005.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, p. 1427-1435, 1999.

GARRETT, D. A.; FAILLA, M. L.; SARAMA, R. J. Development of an in Vitro Digestion Method Io Assess Carotenoid Bioavailability from Meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 47, n. 10, p. 4301-4309, 1999.

GÅSEROD, O., JOLLIFFE, I. G., HAMPSON, F. C., DETTMAR, P. W., SKJÅK-BRÆK, G. The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 237-246, 1998.

HAMMAN, J. H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. Journal of Controlled Release, v. 89, p. 151–165, 2003.

HOEBLER, C.; LECANNU, G.; BELLEVILLE, C.; DEVAUX, M.F.; POPINEAU, Y.; BARRY, J.L. (2002) Development of an in vitro system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 53, p. 389-402.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1–12, 2011.

JAMPEN, S.; BRITT, I. J.; TUNG, M. A. Gellan polymer solution properties: dilute and concentrated regimes. **Food Research International**, v. 33, p. 579-586, 2000.

JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 83–97, 2001.

JONES, O. G.; McCLEMENTS, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 9, n. 4, p. 374-397, 2010.

KASAPIS, S.; NORTON, I. T.; UBBINK, J. B. Modern biopolymer science. Editora Elsevier, primeira edição, capítulo 16 Biopolymers in controlled-release delivery systems, p. 519-558, 2009.

KEDZIEREWICZ, F.; LOMBRY, C.; RIOS, R.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Effect of the formulation on the in-vitro release of propranolol from gellan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 178, n. 1, p. 129-136, 1999.

KOSARAJU, S. L. Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 251–258, 2005.

LEFEBVRE, A. H. Atomization and sprays. New York: Hemisphere Publishing Corporation; 1989. p. 27–260.

LIN, S. P.; REITZ, R. D. Drop and Spray Formation From a Liquid Jet. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 30, n. 1, p. 85-105, 1998.

LIU H.; LI, W.; GONG, X.; CAO, X.; XU, J.; CHEN, X.; WANG, Y.; YU, G.; WANG, F.; YU, Z. Effect of liquid jet diameter on performance of coaxial two-fluid airblast atomizers. **Chemical Engineering and Processing**, v. 45, n. 4, p. 240-245, 2006.

MANSOUR, A.; CHIGIER, N. Air-blast atomization of non-Newtonian liquids. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, v. 58, p. 161-194, 1995.

MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions: principles, practice and techniques, CRC Press, New York, 2005.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. **Food Functions**, v. 1, p. 32-39, 2010.

MILLER, D.D.; SCHRICKER, B.R.; RASMUSSEN, R.R.; van CAMPEN, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34 (10), p. 2248-2256, 1981.

MORITAKA, H.; NISHINARI, K.; TAKI, M.; FUKUBA, H. Effects of pH, potassium chloride, and sodium chloride on the thermal and rheological properties of gellan gum gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1685 - 1689, 1995.

MURATA, Y., MAEDA, T., MIYAMOTO, E., KAWASHIMA, S. Preparation of chitosanreinforced alginate gel beads - effect of chitosan on gel matrix erosion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 96, p. 139-45, 1993.

NICKERSON, M. T.; PAULSON, A. T.; SPEERS, R. A. Rheological properties of gellan solutions: effect of calcium ions and temperature on pre – gel formation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 577 – 583, 2003.

OH, J. K.; LEE, D. I.; PARK, J. M. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 12, p. 1261-1282, 2009.

OH, J. K. Engineering of nanometer-sized cross-linked hydrogels for biomedical applications. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 173-184, 2010.

OHKAWA, K.; KITAGAWA, T.; YAMAMOTO, H. Preparation and Characterization of Chitosan-Gellan Hybrid Capsules Formed by Self-Assembly at an Aqueous Solution Interface. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 289, n. 1, p. 33-40, 2004.

OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; BRUIL, M. A.; DOBBE, C. J. G.; PEREBOOM, D. P. K. H.; SIPS, A. J. A. M. Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 44, p. 281–287, 2003.

PAN, Y.; SUGA, K. A Numerical Study on the Breakup Process of Laminar Jets into a Gas. **Physics of Fluids**, v. 18, p. 052101, 2006.

PAUNOV, V. N. Novel method for determining the three-phase contact angle od colloid particles adsorbed at air-water and oil-water interfaces. **Langmuir**, v. 19, p. 7970-79-76, 2003.

PERRECHIL, F. A.; SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L. Microgels of k-carrageenan and sodium caseinate: effect of composition on morphology and rheology. In: **Thirteenth Food Colloids 2010**, Granada. Thirteenth Food Colloids 2010. Granada : Universidade de Granada, 2010. v. 1. p. 136-137.

PERRECHIL, F.A.; SATO, A.C.K.; CUNHA, R.L. κ-Carrageenan–sodium caseinate microgel production by atomization: Critical analysis of the experimental procedure. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 123–133, 2011.

PREGENT, S.; ADAMS, S.; BUTLER, M.; WAIGH, T. A. The impact and deformation of a viscoelastic drop at the air – liquid interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 331, p. 163-173, 2009.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; VILELA, S.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 3, p. 245-257, 2006.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I.; DURAND, S.; GARNIER, C.; TECANTE, A.; DOUBLIER, J. L. Rheology-structure properties of gellan systems: Evidence of network formation at low gellan concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 5, p. 621–628, 2003.

SANDERSON, G. R. Gellan Gum. In: Harris, P (Ed.). Food Gels. Elsevier Applied Science, 1990. p. 201 – 231.

SATO, A. C. K. Reologia de suspensões-modelo: efeito da concentração de sólidos e da matriz dispersante. Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L. Influence of dispersing media and particle characteristic on rheological behavior of non-colloidal suspensions. Journal of Dispersion Science and Technology, DOI:10.1080/01932691.2011.562445.

STOKES, J. R.; MACAKOVA, L.; CHOJNICKA-PASZUN, A.; KRUIF, C. G.; JONGH, H. H. J. Lubrication, Adsorption, and Rheology of Aqueous Polysaccharide Solutions. **Langmuir**, v. 27, p. 3474–3484, 2011.

SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. Science and. Technology of Advanced Materials, v. 11, 014104 (13pp), 2010.

TAKAYANAGI, T.; MOTOMIZU, S. Chitosan as cationic polyeletrolyte for the modification of electroosmotic flow and its utilization for the separation of inorganic anions by capillary zone electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 22, (9), p. 1241-1244, 2006.

TAKEUCHI, H., YAMAMOTO, H., NUWA, T., HINO, T., KAWASHIMA, Y., Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. **Pharmaceutical Research.**, v. 13, p. 896–900, 1996.

TANG, J.; TUNG, M. A.; ZENG, Y. Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono- and divalent cations. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 11-16, 1996.

VARGA, C. M.; LASHERAS, J. C.; HOPFINGER, E. J. Initial breakup of a small-diameter liquid jet by a high-speed gas stream. **Journal of Fluid Mechanics**, v. 497, p. 405-434, 2003.

VARGAFTIK, N. B.; VOLKOV, B. N.; VOLJAK, L. D. International tables of the surface tension of water. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 12 (3), p. 817-820, 1983.

VILELA, J. A. P.; CAVALLIERI, A. L. F.; CUNHA, R L. The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate-gellan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 7, p. 1710-1718, 2011.

XIONG, R.; CHUNG, J. N. An Experimental Study of the Size Effect on Adiabatic Gas-Liquid Two-Phase Flow Patterns and Void Fraction in Microchannels. **Physics of Fluids**, v. 19, p. 033301, 2007.

WANG, X.; ZHU, K.; ZHOU, H. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3042-3054, 2011.

WITTAYA-AREEKUL, S., KRUENATE, J., PRAHSARN, C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 113–118, 2006.

YAMOMOTO, F. Reologia e microestrutura de géis ácidos de gelana. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

ZHANG, J.; LI, X.; ZHANG, D.; XIU, Z. Theoretical and experimental investigations on the size of alginate microspheres prepared by dropping and spraying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 4, p. 303-322, 2007.

ZOU, Q., ZHAO, J., LIU, X., TIAN, F., ZHANG, H., ZHANG H., CHEN, W. Microencapsulation of Bifidobacterium bifidum F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1672–1678, 2011.