



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



ESTUDO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE MICROCÁPSULAS PRODUZIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos para
obtenção do título de Doutor em
Alimentos e Nutrição.

ANA SILVIA PRATA

Doutoranda

CARLOS R. F. GROSSO

Orientador

MARIA INÊS RÉ

Co-Orientadora

-Abril/2006-

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

Prata, Ana Silvia
P887e Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na
formação de microcápsulas produzidas por coacervação
complexa / Ana Silvia Prata. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Microencapsulação. 2. Surfatantes. 3. Coacervação complexa. 4. Óleo essencial. 5.
Liberação controlada. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Ré, Maria Inês. III. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Study of the physical-chemical parameters in the microcapsules formation
produced for complex coacervation.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Microencapsulation, Surfactants, Complex coacervation,
Essential oil, Controlled release

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Theo Guenter Kieckbusch

Watson Loh

Oswaldo Novais de Oliveira Júnior

Rosiane Lopes da Cunha

Maria Helena Andrade Santana

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Orientador

Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP
Membro

Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior
Instituto de Física – USP
Membro

Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP
Membro

Prof^a Dr^a Rosiane Lopes da Cunha
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro

Que idéia tenho eu das cousas?
Que opinião tenho sobre as causas e os efeitos?
Que tenho eu meditado sobre Deus e a alma
E sobre a criação do Mundo?
Não sei. Para mim pensar nisso é fechar os olhos
E não pensar. (...)

(Que mais sei eu de Deus que Deus de si próprio?).
Obedeço-lhe a viver, espontaneamente,
Como quem abre os olhos e vê,
E chamo-lhe luar e sol e flores e árvores e montes,
E amo-o sem pensar nele,
E penso-o vendo e ouvindo,
E ando com ele a toda a hora.

Alberto Caeiro

AGRADECIMENTOS

Esta tese é fruto do trabalho e apoio de inúmeras pessoas, espero conseguir lembrar e agradecer a todas.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Carlos Grosso, pelo constante empenho pessoal. Esses anos de contato me ensinaram a admirá-lo. Obrigada por sua disponibilidade incondicional, pela disciplina e respeito ao nosso trabalho. A você, meus irrestritos agradecimentos por contribuir de forma intensa na minha formação.

Aos professores Dr. Alain Leydet e Dra Chantal Menut, que acompanharam de perto a realização deste trabalho. A eles devo quase tudo o que sei sobre química orgânica e cromatografia. Agradeço especialmente a Chantal, que se tornou uma grande amiga e que se ocupou de minha tese com muito interesse e vontade.

À Professora Dr^a Maria Inês Ré pelas estimulantes discussões que contribuíram largamente para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores presentes na banca: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch, Prof. Dr. Watson Loh, Profa Dra Rosiane Cunha, Prof. Dr. Osvaldo Novais Junior, Profa Dra Maria Helena Santana. Vossas numerosas sugestões melhoraram, não só o trabalho em si, mas também a escrita desta tese. Agradeço às discussões informais que muito me auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Jean Louis Monteiro, por disponibilizar a infra-estrutura de seu laboratório para que o composto fluorescente pudesse ser desenvolvido.

À Dra Karine Molvinger pelo comprometimento no desenvolvimento das partículas por secagem supercrítica.

Agradeço à Profa Dra Maria Helena Zanin por seu incentivo e disponibilidade em trocar informações e particularmente pelas noites

dispensadas à modelagem das curvas de liberação. Minha sincera admiração por seu maravilhoso trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo que muito colaborou para que o experimento de liberação de compostos voláteis se realizasse. Obrigada pela paciência e dedicação.

Aos maravilhosos momentos creditados a meus colegas de trabalho em Montpellier, em especial aos meus companheiros de laboratório que sempre discutiram e me ajudaram muito: Huguette, Marie Rose, David, Guy e Maximilienne. Agradeço a uma pessoa muito especial, Huguette Agnanié por sua amizade, alegria e irmandade que partilhamos desde nosso primeiro encontro. Meus sinceros agradecimentos.

A Raquel Zago e Nara, minhas gentis e competentes estagiárias. Espero ter contribuído para a vida de vocês como vocês o fizeram para a minha.

Ao Prof Dr Watson Loh pelas valiosas sugestões e por disponibilizar seu laboratório para as determinações de tensão superficial. Agradeço também a Priscila, que pacientemente me auxiliou nas medidas.

Ao Professor Theo, por partilhar comigo suas geniais idéias e opiniões.

Ao Siani, pelas tardes dispensadas ao esclarecimento de muitas dúvidas. Obrigada pela força.

À grande companheira Mônica Freiman, por seu permanente interesse. Sua força me estimulou todo o tempo. Agradeço às excelentes sugestões e por inúmeras trocas de revisões bibliográficas.

À Renata (Ingrata), pela sinceridade de nossa amizade acima de qualquer outra coisa.

A todas as meninas do laboratório: Izabela, Karina, Noemi, Taciane pelas maravilhosas trocas e momentos. Agradeço às amigas Andréa e Renata

que foram tão importantes durante os anos de dedicação à tese. Não poderia deixar de agradecer à Heleninha, que durante 6 meses conviveu intensamente com a gente.

Ao Cosme. Sem você, não sei o que seria de nós. Obrigada pela competência e responsabilidade com a individualidade de todos os alunos da FEA. Agradeço a todos os gentis e prestativos funcionários da pós-graduação e do microcentro da FEA.

Agradeço ao Prof. Dr. Alfredo Vitali. Sua generosidade em passar toda sua ampla experiência no domínio da engenharia, acompanhada de estimulantes discussões, sempre contribuiu com nosso trabalho.

Ao Prof Dr César Santana pela gentileza em ceder o fluorímetro para que pudéssemos fazer todas as análises e pelas facilidades postas à minha disposição. Obrigada pela confiança.

Quero expressar a minha gratidão ao amigo Ivanildo por sua ajuda irrestrita e constante disponibilidade.

Ao Prof. Sgarbieri. Mesmo após alguns anos continuo sendo sua aluna e precisando muito de seus ensinamentos.

Agradeço a todos os amigos e colegas do Departamento de Nutrição e Alimentos: Yara, Chico, Suzana, Fátima, Cidinha, Beth, o Pioio, Soeli, Sônia e Adriana. Agradeço imensamente ao Éder pelas inúmeras discussões e ajudas.

A CAPES pelo financiamento da bolsa e ao doutorado sanduíche CAPES-COFECUB.

A Colloids Naturels pela goma arábica cedida. A Aji-no-moto pela transglutaminase.

Às pessoas que contribuíram para que as microscopias pudessem ser realizadas: Adriane e Antônia, Prof. Áureo Yamada e sua equipe, Prof Débora e Yara e Carlos (Fiocruz).

Agradeço a Clau. Minha amiga do coração, obrigada por existir.

À minha família (todos os Braguini, os Prata, os Borsoi Soares, os Borsoi Ribeiro) por todo apoio, carinho e amor, especialmente à minha mãe, por suportar pacientemente uma filha distante da vida familiar durante tantos anos. Mãe, é a você que ofereço o resultado deste trabalho.

Finalmente quero agradecer ao João pelo paciente e constante apoio; por tolerar minhas ausências dedicadas à realização desta tese.

A todos agradeço, profundamente.

Índice

Índice	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas	xv
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivos específicos.....	3
3. Revisão bibliográfica	5
3.1 Embasamento Teórico	5
3.1.1 Teoria termodinâmica	7
3.1.1.1 Teoria de Flory –Huggins	10
3.1.2 Representação física da separação de fases.....	12
3.1.3 Separação de fases associativa.....	16
3.1.3.1 Descrição teórica da coacervação complexa.....	17
Teoria de Voorn e Overbeek [1957]	18
Teoria de Veis e Aranyi [1960]	19
Teoria de Nakajima e Sato [1972]	20
Teoria de Tainaka [1979, 1980]	21
Teoria de Biesheuvel & Stuart [2004].....	22
3.2 A Microencapsulação	23
3.2.1 Áreas de Aplicação.....	26
3.2.1.1 Indústria de alimentos	26
3.2.1.2 Indústria Agropecuária	27
3.2.1.3 Indústria Farmacêutica.....	28
3.3 Coacervação complexa aplicada à microencapsulação	29
3.3.1 Parâmetros físico-químicos	33
3.3.1.1 Tipos de forças químicas.....	34
Densidade de cargas	35
pH	36
Natureza do polissacarídeo	36
Massa molecular	37
Razão proteína:polissacarídeo	37

3.3.2 Parâmetros físicos do processo	39
3.3.2.1 Temperatura.....	39
3.3.2.2 Agitação e Pressão.....	39
3.4 Polímeros de parede para coacervação complexa	40
3.4.1 Goma Arábica	41
3.4.2 Pectina.....	43
3.4.3 Gelatina	46
3.4.4 Propriedades da parede - Reticulação	47
3.5 Liberação modificada.....	54
3.5.1 Projeto de uma partícula.....	56
3.5.2 Modelos matemáticos para o sistema difusivo: Ativo solubilizado e sistema matricial monolítico.....	61
3.5.2.1 Fundamentos da difusão.....	63
3.6 Utilização de tensoativos para alteração de solubilidade no acompanhamento da liberação.....	65
3.6.1 Fenômenos superficiais	66
3.6.2 Balanço Hidrofílico-Hidrofóbico	68
3.6.3 Toxicidade.....	70
3.7 Óleos essenciais	71
3.7.1 Óleo essencial de vetiver	72
4. Materiais e métodos	74
4.1 Materiais	74
4.2 Outros reagentes.....	74
4.3 Caracterização dos materiais.....	74
4.3.1 Análise do óleo de vetiver.....	75
4.3.2 Obtenção do Composto Fluorescente – Dansilato de Khusimila	76
4.3.2.1 Extração do ácido zizanóico.....	76
4.3.2.2 Purificação do ácido zizanóico.....	76
4.3.2.3 Síntese do composto fluorescente	77
Espectroscopia de Ressonância Magnética de Prótons ¹ H-RMN.....	78
4.3.2.4 Preparação do óleo fluorescente	78
4.4 Estudo do processo de formação.....	79
4.4.1 Influência da estequiometria entre os polímeros.....	79
4.4.1.1 Potencial zeta	79
4.4.2 Influência do tipo de óleo.....	80

4.4.2.1 Caracterização do tamanho da emulsão	80
4.4.3 Influência da formação dos complexos na microencapsulação	80
4.5 Microencapsulação	81
4.5.1 Caracterização do processo	81
4.5.2 Eficiência da Encapsulação	82
4.5.2.1 Eficiência de encapsulação do óleo fluorescente	82
4.5.2.2 Eficiência de encapsulação dos óleos	82
4.5.3 Influência das variáveis de processo	83
4.5.3.1 Planejamento experimental: Varredura dos fatores do processo GA:GE .	83
4.5.3.2 Otimização da Eficiência de Encapsulação e do Rendimento	84
4.5.3.3 Planejamento Experimental- varredura dos fatores do processo PE:GE..	84
4.5.3.4 Otimização do Rendimento	85
4.5.4 Tratamento das partículas.....	86
4.5.4.1 Reticulação.....	86
Química	86
Enzimática	86
4.5.4.2 Secagem das partículas	86
4.5.5 Caracterização das partículas formadas	87
4.5.5.1 Microscopia ótica e eletrônica de varredura	87
4.5.5.2 Microscopia de Varredura Laser Confocal (CLSM).....	87
4.5.5.3 Tamanho médio e distribuição do tamanho de partículas	87
4.5.5.4 Densidade dos pós.....	88
4.5.5.5 Capacidade de entumescimento.....	88
4.6 Estudo da liberação.....	89
4.6.1 Modificação do meio.....	89
4.6.2 Estudo da solubilidade do óleo e do composto fluorescente no meio de liberação	89
4.6.3 Curva analítica	90
4.6.3.1 Componentes do óleo de vetiver	90
4.6.3.2 Composto fluorescente	90
4.6.4 Liberação "in vitro"	91
4.6.4.1 Liberação a partir de micropartículas com óleo fluorescente	91
4.6.4.2 Liberação a partir de micropartículas com óleo de vetiver	93
4.7 Análise estatística	93
5. Resultados e Discussão.....	94

5.1	Influência da estequiometria entre os polímeros.....	94
5.2	Influência do tipo de óleo.....	103
5.3	Discussão sobre a Teoria da Coacervação.....	116
5.4	Testes de eficiência de encapsulação	118
5.5	Análise das variáveis do processo	120
5.5.1	Planejamento Experimental.....	121
5.5.2	Sistema goma-arábica-gelatina	121
5.5.2.1	Otimização da eficiência de encapsulação do óleo de vetiver	127
5.5.3	Sistema Gelatina- Pectina	134
5.6	Ensaio de secagem, reticulação e reidratação	138
5.6.1	Caracterização das matrizes reticuladas.....	144
5.6.1.1	Efeito do tensoativo na estabilidade da partícula	152
5.7	Estudo de Liberação.....	156
5.7.1	Caracterização das partículas produzidas com o óleo fluorescente.....	160
5.7.1.1	Produção do composto fluorescente	160
5.7.1.2	Produção das partículas com óleo fluorescente.....	162
5.7.1.3	Fluorimetria	164
5.7.2	Liberação em etanol anidro	164
5.7.2.1	Análise cromatográfica	169
5.7.3	Liberação com tensoativos	177
6.	Conclusões	187
7.	Avaliação crítica dos resultados e sugestões de continuidade	189
8.	Referências bibliográficas.....	196
A.	Resultados Preliminares.....	229
A.1	Diagrama de fases.....	229
A.1.1	Determinação do teor de polissacarídeo.....	230
A.1.2	Escolha do método de análise de proteína.....	230
A.2	Teste de eficiência de encapsulação	238
A.3	Liberação em solução etanólica	241

Índice de Figuras

Figura 1. Mistura de biopolímeros e vias de interação. Adaptada de DE KRUIF&TUINIER, 2001.	6
Figura 2. Modelos mecânicos para uma redução nos efeitos do volume excluído. (a), (b) e (c) são modelos descritos no texto.	9
Figura 3. Ilustração visual e a nível molecular da coacervação complexa de um par polimérico. Adaptação de DE KRUIF, WEINBRECK & DE VRIES [2004].	14
Figura 4. Representação triangular (diagrama de fases) das separações entre biopolímeros. a. separação associativa (coacervação complexa), b. separação segregativa (incompatibilidade) e c. distribuição uniforme de um dos polímeros nas duas fases.	15
Figura 5. Formação de coacervados (esquerdo) ou agregados (direita) em função de variáveis físico-químicas. Adaptada de TURGEON et al. [2003].	30
Figura 6. Distribuição de cargas dos biopolímeros e região de cargas opostas-indica região de coacervação.	38
Figura 7. Goma acácia: <i>Acacia tortilis</i> , In natura e processada (<i>spray dryer</i>).	41
Figura 8. Estrutura molecular da goma arábica. A = arabinosil; Radicais baseados em R1= ramnose, R2=ácido gulucurônico, R3= arabinose. Adaptado de ISLAM et al. [1997].	43
Figura 9. Dois tipos de estruturas que formam as pectinas. (a) Cadeia polissacarídica poligalacturano, (b) ramnogalacturano I.	44
Figura 10. Estrutura química da gelatina [POPPE, 1997].	47
Figura 11. Possibilidades de reticulações entre diferentes grupos da proteína. Os quadros contêm as duas possibilidades de se ligar aminas residuais [Adaptado de GERRARD, 2002].	49
Figura 12. Reação de reticulação sobre a ação do glutaraldeído.	50
Figura 13. Reação de reticulação da proteína sob ação da enzima transglutaminase. .	53
Figura 14. Definição do sistema pela distribuição do ativo. A. sistema matricial, B. sistema reservatório.	57
Figura 15. Etapas de produção do KD (dansilato de kusimila) a partir do ácido zizanóico.	78
Figura 16. Fluxograma de ensaio da ordem de inserção do óleo sem prévia emulsificação (BP=biopolímero).	81
Figura 17. Sistema de liberação elaborado para o estudo com microcápsulas contendo OF.	92

- Figura 18. Comportamento do par polimérico Goma arábica (GA): Gelatina (GE) em diversas proporções, com 2,5% (p/v) de polímero total, como função do pH..... 98
- Figura 19. Potencial zeta para misturas de gelatina:goma arábica em diferentes proporções. 100
- Figura 20. Efeito do pH na mudança de absorbância a 590 nm dos pares poliméricos Goma arábica (GA) : Gelatina (GE) em diversas proporções, com 2,5% (p/v) de polímero total, como função do pH. A. Proporção fixa de gelatina, B. Proporção fixa de goma arábica..... 101
- Figura 21. Efeito do pH na mudança de absorção a 590 nm dos pares poliméricos Gelatina (GE): Pectina (PE) em diversas proporções, com 2,0%(p/v) de polímero total, como função do pH..... 103
- Figura 22. Micropartículas produzidas por coacervação complexa de GE:GA com 50% de recheio. A. Óleo de amêndoas, B. Óleo mineral, C. Óleo de vetiver..... 105
- Figura 23. Microcápsulas coacervadas com óleo mineral em três concentrações: A. 25%, B. 50%, C. 75%. e D. 50% de uma composição (1:1 óleo mineral: óleo vetiver). 107
- Figura 24. Microcápsulas coacervadas com óleo essencial de vetiver com três concentrações: A. 25%, B. 50%, C. 75%, D. 75%. 109
- Figura 25. Emulsão de amêndoas (A)-9,20 μm , mineral (B)-33,94 μm (12,5x) e vetiver (C)-5,87 μm (25x), em solução de gelatina (2,5% p/v)..... 112
- Figura 26. Microscopia óptica das partículas produzidas com óleo de amêndoas (A,B), óleo mineral (C,D) e óleo de vetiver (E,F). As barras representam 40 μm 113
- Figura 27. Distribuição de tamanho das partículas com tamanho médio de Amêndoas (19,23 μm), Mineral (34,99 μm), Vetiver (43,49 μm). 115
- Figura 28. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das partículas liofilizadas. A e B partículas com óleo de amêndoas, C e D partículas com óleo mineral, E e F partículas com óleo de vetiver. 116
- Figura 29. Microcápsulas coacervadas sem emulsificação, pH 4,0, 50°C. A ordem de acerto de pH foi alterada A. Após a adição do óleo, B. Antes da adição do óleo..... 118
- Figura 30. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias do planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} para partículas produzidas com GE:GA e óleo de amêndoas. $R^2= 0,92$ 124
- Figura 31. Partículas produzidas com óleo de amêndoas e goma arábica-gelatina a partir do planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} . Os números representam os ensaios. 125
- Figura 32. Gráfico de Pareto de rendimento do processo do óleo de vetiver (Y1), no sistema GE:GA. $R^2= 0,84$ 129

Figura 33. Micropartículas formadas a partir de um planejamento completo 2^3 para partículas produzidas com GE:GA e óleo de vetiver. Os números correspondem aos ensaios.	130
Figura 34. Gráfico de Pareto para Eficiência de Encapsulação das partículas produzidas com GE:GA e óleo de vetiver. $R^2= 0,58$	131
Figura 35. Superfícies de contorno obtidas a partir do planejamento experimental completo de partículas produzidas com GE:GA e óleo essencial de vetiver.	133
Figura 36. Gráfico de Pareto para rendimento em coacervados, do planejamento de partículas produzidas com GE:PE e óleo de amêndoas. $R^2=0,93$. Média de rendimento em coacervados 32,4%.	135
Figura 37. Gráfico de Pareto para o rendimento em coacervados, do planejamento de partículas produzidas com GE:PE e o óleo de vetiver. $R^2 = 0,79$	136
Figura 38. Micropartículas formadas a partir de um planejamento completo 2^3 para o óleo de amêndoas com pectina-gelatina. Os números correspondem aos ensaios realizados	137
Figura 39. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microcápsulas de óleo de vetiver (2,5%p/v, 1:1 GA:GE, pH4,0) liofilizadas a partir de um congelamento com nitrogênio líquido. Aumentos de 100x (A), 500x (B), 1000x (C, D).	139
Figura 40. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microcápsulas de óleo de vetiver (2,5%p/v, 1:1 GA:GE, pH4,0) liofilizadas a partir de um congelamento gradual. Aumentos de 1000x (A), 500x (B, C), 100x (D).	140
Figura 41. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microcápsulas de óleo de vetiver após a secagem por CO_2 supercrítico, em diferentes campos do stab. Aumentos de 100x (C), 250x (E), 500x (D,F), 850x (A) e 3000x (B).	143
Figura 42. Distribuição de tamanho e diâmetro médio: D0- inicial e D5- após 5 minutos. (A) transglutaminase D0=81,07 μ m e D5=86,87 μ m. (B) glutaraldeído D0=220,7 μ m e D5=223 μ m.....	146
Figura 43. Microcápsulas de vetiver sem reticulação (A), com glutaraldeído (B), com transglutaminase (C). Os meios da esquerda pra direita são água (coluna 1), em SDS 5% após 10s (coluna 2) e em SDS 5% após 24h (coluna3).	154
Figura 44. Microcápsulas de vetiver sem reticulação (A), com glutaraldeído (B), com transglutaminase (C). Os meios da esquerda pra direita são água (coluna 1), em Tween 2% após 10s (coluna 2) e em Tween 2% após 24h (coluna 3).	155
Figura 45. Diagrama de fase parcial do vetiver nos solventes água e etanol. I. Região onde a mistura dos três componentes se encontra solubilizada. Linhas pontilhadas indicam também situação de solubilidade.	157
Figura 46. Diagrama de fase parcial do vetiver em água e Tween 80. A região hachureada representa situação onde a mistura dos três componentes se encontra solubilizada em uma fase.	158

Figura 47. Diagrama de fase parcial do vetiver nos solventes água e SDS. A região hachureada representa situação onde a mistura dos três componentes se encontra solubilizada em uma fase.	159
Figura 48. Espectro de RMN do composto fluorescente formulado através da ligação de khusimol (1-15) com cloreto de dansila (16-25).....	161
Figura 49. (A) Microscopia óptica de micropartículas de óleo essencial de vetiver. A barra de medida corresponde a 40µm. (B) Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microcápsulas de óleo de vetiver liofilizadas. A barra de medida corresponde a 10µm.	163
Figura 50. Curva de liberação kusimol-dansila em álcool (333/517nm).....	165
Figura 51. Micropartícula produzida com OF observada por microscopia confocal. ...	166
Figura 52. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas úmidas (A) e secas (B). SR- sem reticulação, Glu- reticuladas com glutaraldeído, Tgase- com transglutaminase, em álcool.	169
Figura 53. Cromatograma do óleo essencial de vetiver.....	170
Figura 54. Porcentagem de liberação de compostos presentes no óleo essencial de vetiver após 15 e 300 minutos de ensaio em etanol anidro.....	176
Figura 55. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas úmidas (A) e secas (B) em SDS 5%p/v reticuladas com glutaraldeído (Glu), e com transglutaminase (Tgase).	180
Figura 56. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas úmidas (A) e secas (B) em Tween 80 (2%p/v). SR- sem reticulação, Glu- reticuladas com glutaraldeído, Tgase- com transglutaminase.....	183
Figura 57. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas sem reticulação úmidas e secas em Tween 80 (2%p/v) e álcool anidro.	184
Figura 58. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas reticuladas com glutaraldeído (A) e transglutaminase (B) úmidas e secas em Tween 80 (2%p/v), SDS e em álcool anidro.....	185
Figura 59. Curvas de calibração para determinação da goma arábica (GA) e pectina (PE).	230
Figura 60. Curva de absorção a 280nm de (♦) gelatina, (■) goma arábica e (△) pectina	231
Figura 61. Resposta da gelatina à complexação com o corante de Bradford (corante:proteína).....	233
Figura 62. Varredura da absorção dos compostos em comprimentos de onda no espectro visível.	234
Figura 63. Curva analítica de gelatina com Bradford pH 0,6.	236

- Figura 64. Comparação do óleo comercial livre (A) e encapsulado extraído com éter(B)
..... 239
- Figura 65. A.pH 1, B. pH 10, C. T=60°C por quinze minutos. A barra representa
100µm..... 239
- Figura 66. Microcápsulas coacervadas contendo 50% de óleo de vetiver e inserida em
diferentes meios na proporção 0,8 g de microcápsulas em 6 mL de solução. a. água, b.
álcool, c. álcool : água (1:1) , d. álcool: água (1:2), e. óleo mineral, f. óleo mineral.
Optovar 0,8, aumento 12,5, filtro verde..... 242

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação visual das transições de fases de uma mistura de biopolímeros.	13
Tabela 2. <i>Vários ingredientes alimentícios que são encapsulados</i>	27
Tabela 3. Utilização da coacervação complexa como técnica de microencapsulação. ..	31
Tabela 4. Possíveis mecanismos de liberação controlada a partir de micropartículas com distribuição matricial ou monolítica do ativo.....	59
Tabela 5. Faixas de aplicação de tensoativos de acordo com o HLB.	69
Tabela 6. Parâmetros estudados na etapa de <i>screening</i> do sistema GE:GA para o óleo de amêndoas (Planejamento Fatorial Fracionário)	83
Tabela 7. Variáveis e níveis no planejamento completo para o óleo de vetiver.	84
Tabela 8. Parâmetros estudados na etapa de <i>screening</i> do sistema GE:PE para o óleo de amêndoas (Planejamento Fatorial Fracionário)	85
Tabela 9. Variáveis e níveis no planejamento fatorial do sistema GE:PE para o óleo de vetiver.	85
Tabela 10. Composição dos biopolímeros.	94
Tabela 11. Composição em minerais dos biopolímeros.	96
Tabela 12. Características do processo de formação de partícula.	104
Tabela 13. Potencial zeta nos passos formadores da micropartícula com diferentes óleos.	110
Tabela 14. Propriedades físicas dos óleos estudados.	111
Tabela 15. Planejamento fatorial fracionado para o óleo de amêndoas avaliando o rendimento em coacervados (Y1).	122
Tabela 16. Planejamento fatorial completo para o óleo de vetiver, sistema GE:GA, sobre o rendimento em coacervados (Y1) e a eficiência de encapsulação (Y2).	128
Tabela 17. Planejamento fatorial fracionado GE:PE para o óleo de amêndoas.	134
Tabela 18. Planejamento fatorial completo para o óleo de vetiver com o par pectina-gelatina.	136
Tabela 19. Propriedades de densidade e compressibilidade das partículas reticuladas.	145
Tabela 20. Média do diâmetro (μm) das partículas úmidas e liofilizadas após 1h de suspensão em diferentes meios.	147

Tabela 21. Inchamento das micropartículas secas observado pela variação de peso nos meios de liberação estudados* 151

Tabela 22. Nomenclatura dos compostos analisados no óleo comercial de vetiver ... 171

Tabela 23. Caracterização cromatográfica dos compostos liberados. CG-MS e CG (% de área, tempo e índice de retenção), fatores de resposta das curvas de calibração e conteúdo médio percentual. 174

Tabela 24. Estrutura química e log P de alguns compostos do óleo de vetiver..... 175

Tabela 25. Coeficientes de difusão (D)*10⁻¹⁰ cm²/s (média±SD) 179

Tabela 26. Varredura dos comprimentos de onda dos polissacarídeos e da proteína. 231

Tabela 27. Variação da concentração com o espectro de absorção. 235

Tabela 28. Resposta do complexo formado e do corante não complexado às variações de proporções entre reagente:proteína e concentração de proteína..... 236

Tabela 29. Comparação dos métodos de eficiência de encapsulação para o óleo de vetiver. 238

Tabela 30. Eficiência de encapsulação pelo método fluorimétrico das partículas reticuladas. 240

RESUMO

Microencapsulação é uma tecnologia usada como ferramenta potencial para proteção de um composto e modulação de sua liberação. Atualmente, estudos na área de micropartículas e liberação controlada estão bastante avançados e uma variedade de técnicas estão disponíveis entre as quais destacam-se processos por atomização (*spray drying*, *spray cooling* e *spray chilling*), coacervação e recobrimento por leite fluidizado e por complexação. A coacervação complexa envolve a associação reversível de dois polímeros e apresenta algumas vantagens frente a outras técnicas como a possibilidade de se trabalhar com biopolímeros, a ausência de solvente orgânico e condições brandas de temperatura no processamento. Porém a complexidade do processo dificulta a aplicação da técnica a biopolímeros com diferentes características físico-químicas. Assim, neste trabalho foram estudadas as principais condições que podem interferir na formação das partículas por coacervação complexa do sistema clássico goma-arábica:gelatina e pectina:gelatina, na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos. Além disso, as propriedades de barreira das partículas encapsuladas com óleo essencial de vetiver foram alteradas sob duas condições de reticulação (glutaraldeído e transglutaminase) como forma de prever o comportamento da membrana polimérica em diferentes meios. O ensaio de liberação foi mensurado a partir de um composto apolar fluorescente (dansilato de kusimila - KD) em meios aquosos com polaridade modificada pela adição de tensoativos de natureza iônica (dodecilsulfato de sódio) e não-iônica (Tween 80). Os resultados obtidos confirmaram que existe uma faixa ótima de formação de partículas dependente do pH. Acredita-se que as partículas são formadas pela coacervação dos polímeros no sistema líquido-líquido sobre a superfície hidrofóbica do agente de núcleo. O planejamento experimental possibilitou a otimização do processo clássico de formação de partículas gelatina-goma arábica resultando em uma proporção ótima de 2:1. As condições estudadas para a pectina não possibilitaram otimizar o processo nem produzir cápsulas esféricas, sendo que uma massa coacervada foi formada arrastando a porção hidrofóbica e conseqüentemente encapsulando-a. Nas melhores condições

experimentais encontradas foram testados agentes reticulantes (glutaraldeído e transglutaminase) que apresentaram diferenças quanto à retenção do composto fluorescente encapsulado e diferenças morfológicas nos meios estudados. Para as partículas não reticuladas úmidas, KD foi completamente liberado após 5 horas enquanto para partículas secas esta quantidade foi de 80%. Nestes sistemas liberação do óleo de vetiver foi avaliada por quantificação cromatográfica através da medida de liberação de alguns compostos presentes no óleo. Em geral, maior porcentagem de liberação foi observada para álcoois e cetonas e menor porcentagem de liberação observada para os hidrocarbonetos. Partículas reticuladas com glutaraldeído apresentaram menor liberação de KD em relação às reticuladas com transglutaminase, que por sua vez apresentaram liberação ligeiramente inferior às partículas não-reticuladas, independentemente dos meios de liberação estudados. Considerando os meios, a ordem de liberação de KD observada foi : etanol anidro>SDS>tween80.

Palavras-chave: microencapsulação; tensoativo; coacervação complexa; óleo essencial; liberação controlada.

ABSTRACT

Microencapsulation is a technology used as a potential tool in the protection of a product and the modulation of its core release. Currently, studies in the area of microparticles and controlled release are considerably advanced and a variety of techniques and products are available, among them different processes for atomization (spray drying, spray cooling and spray chilling), coacervation and fluidized bed and complexation. The complex coacervation involves the reversible association (ionic) of two polymers and presents some advantages in comparison to other techniques such as the possibility to work with biopolymers, the absence of organic solvent and mild temperatures. However the complexity of the process turns the application of the technique difficult to biopolymers due to different physical and chemical characteristics. Thus, this work considered a study of the main conditions that can influence the formation of particles by complex coacervation in an attempt to elucidate the mechanisms involved. Moreover, the barrier properties of these particles were modified under two conditions of crosslinking. The release assay was measured with a hydrophobic fluorescent (khusimyl dansylate - KD), substance in solvents with their polarity modified by the addition of ionic and non-ionic surfactants (SDS and Tween 80). The results confirmed that an optimum band of particle formation exists and depends on the pH. The particles are formed by the coacervation of polymers in the liquid-liquid system over the hydrophobic surface of the core agent. The experimental design made possible the optimization of the classic process of particle formation when the arabic gum-gelatin ratio was 1:2. For the pectin, the range of conditions studied did not allow to optimize the process or to produce spherical capsules, but a coacervated mass was formed dragging the hydrophobic portion and consequently encapsulating it. In the best conditions found, the crosslinking agents (glutaraldehyde and transglutaminase) presented different retention capacities for the encapsulated fluorescent probe and morphological differences in the solvents studied.

The KD in the moist capsules without reticulation was completely released after 5 hours, whilst for the freeze-dried particles, this amount was 80%. Release of vetiver oil was evaluated indirectly by chromatographic quantification following the release of some of the compounds present in the oil. In general, a greater percent of release occurred for the alcohols and ketones and smaller percent release was observed for the hydrocarbon compounds. Crosslinking using glutaraldehyde showed smaller release of the KD than particles crosslinked with transglutaminase. The release KD profile of the particles crosslinked with transglutaminase was almost the same compared with particles without crosslinking, in all release medium used. The release order observed for KD was: anhydrous ethanol>SDS>tween80.

Keywords: microencapsulation; surfactant; complex coacervation; essential oil; controlled release.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o estudo de biopolímeros como alternativa ao uso de polímeros sintéticos apresentou um grande avanço na indústria de materiais, pois apesar da menor resistência mecânica e térmica, eles são provenientes de recursos renováveis além de serem biodegradáveis. Muitas vezes, blendas poliméricas são obtidas para permitir uma combinação favorável das propriedades dos diferentes polímeros, que podem ser melhores quando utilizados conjuntamente [ROGOVINA, 1998]. Há, porém, grande dificuldade de se prever o comportamento das macromoléculas num sistema principalmente pela interação entre os componentes [TOLSTOGUZOV, 2002]. O estudo de sistemas multicomponentes envolve as propriedades dos polieletrólitos como densidade de carga, conformação da cadeia, além da resposta destes à variação de temperatura, pH e força iônica [HUGERTH, CARAM-LELHAM & SUNDELOF, 1997]. Portanto, a análise do comportamento dos polímeros isolados não é suficiente, já que quando complexados agem como um novo polímero.

Os complexos de polieletrólitos, conhecidos como coacervados, têm recebido bastante atenção por seu uso em sistemas de liberação de fármacos e em aplicações biotecnológicas [YOSHIOKA, STERNBER & FLORENCE, 1994; IKEDA et al., 1995, DE KRUIF, WEINBRECK & DE VRIES, 2004]. A microencapsulação é eficiente para adicionar compostos sensíveis ou reativos a um produto, pois a parede da partícula funciona como barreira, serve como estabilizante do material de recheio e aumenta a resistência de materiais frágeis a condições de armazenamento, processo e manuseio. A coacervação complexa especificamente é vantajosa por não utilizar solvente orgânico nem condições drásticas de temperatura.

Partículas produzidas por coacervação complexa são funcionalmente adequadas a encapsulação de compostos hidrofóbicos. A grande maioria das informações disponíveis sobre propriedades de barreira e medidas de liberação para micropartículas está concentrada em recheios contendo compostos

hidrofílicos. Nas diferentes áreas de aplicação, o desenvolvimento de compostos hidrofóbicos vem se acentuando, porém a avaliação da liberação ainda é bastante restrita devido à baixa solubilidade aquosa de compostos hidrofóbicos. Meios hidroalcoólicos, bastante utilizados na área cosmética e de perfumes, apresentam pouca significância em sistemas biológicos e portanto, estudos de meios alternativos que permitam aumentar a solubilidade deste tipo de recheio são necessários e relevantes, como a utilização de surfactantes proposta neste trabalho. Alternativas que melhorem a sensibilidade de medida da liberação dos compostos hidrofóbicos também são desejáveis. Neste sentido, a utilização de compostos fluorescentes contribui para aumentar fortemente a sensibilidade da quantificação.

Partículas coacervadas apresentam características de porosidade e resistência mecânica, nem sempre adequadas, requerendo algum tipo de modificação para melhorar tais propriedades. Tradicionalmente, patentes e aplicações industriais utilizam-se da reticulação com aldeídos, especialmente glutaraldeído. Infelizmente, para aplicações alimentícias, existem fortes evidências da toxicidade deste tipo de agente. A utilização de alternativas mais apropriadas é bastante desejável. Neste sentido, a utilização de um agente enzimático poderia contornar os aspectos de toxicidade. Transglutaminase vem sendo utilizada com o propósito de aumentar o intercruzamento de proteínas na área de alimentos, melhorando sua funcionalidade e pode se constituir numa alternativa à melhora das propriedades de barreira das partículas.

Neste projeto propomos um estudo para otimizar os mecanismos envolvidos na microencapsulação por coacervação complexa envolvendo parâmetros físico-químicos associados ao processo de obtenção das partículas, a reticulação das mesmas, química e enzimaticamente, a produção de um composto fluorescente para aumentar a sensibilidade nos estudos de liberação e considerando a hidrofobicidade do composto de recheio, a alteração da polaridade dos meios de liberação utilizando dois tensoativos, SDS e tween80.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o de estudar os mecanismos envolvidos na formação de micropartículas por coacervação complexa, que envolve a interação de dois biopolímeros com cargas opostas na encapsulação de um composto hidrofóbico. Dentro desse quadro, a primeira parte do estudo envolveu a análise dos pares poliméricos individualmente: o clássico gelatina-goma arábica e gelatina-pectina, e a avaliação das variáveis envolvidas no processo de encapsulação de óleos de diferentes fontes: Mineral, vegetal (amêndoas) e óleo essencial. A segunda parte do trabalho envolveu o estudo das variáveis envolvidas no controle da liberação. Para isso, reticulação química com glutaraldeído ou enzimática, com transglutaminase, foram utilizadas para alterar a porosidade das partículas e assim tentativamente modular a liberação do recheio. Ácido zizanóico, a partir do óleo essencial de vetiver, foi extraído, purificado e derivatizado para produzir um composto fluorescente (dansilato de kusimila) através do qual as liberações foram acompanhadas. Devido ao caráter fortemente hidrofóbico do composto fluorescente, meios de diferentes polaridades (alcoólico e aquoso, com adição de tensoativos) foram estudados. Partículas úmidas e secas por diferentes métodos de secagem (liofilização e secagem por CO₂ supercrítico) foram avaliadas.

2.1 Objetivos específicos

Estudar a influência dos diferentes polímeros (gelatina-goma arábica, pectina-gelatina) na formação das partículas utilizando a medida de turbidez e de potencial zeta dos sistemas.

Otimizar a produção da coacervação complexa através do estudo das variáveis do processo (estequiometria de polímeros, pH, temperatura, condições de agitação, concentração de recheio) através de planejamentos fatoriais sequenciais com avaliação do rendimento em coacervados, eficiência de encapsulação e morfologia das partículas formadas.

Estudar o efeito do óleo essencial de vetiver, óleo de amêndoas e mineral, a partir do sistema clássico goma arábica-gelatina, na formação das partículas avaliando características físicas dos óleos (tensão superficial e interfacial, densidade) e morfologia das partículas formadas.

Extrair, purificar e derivatizar o ácido zizanóico presente no óleo essencial de vetiver para obtenção de um composto fluorescente, dansilato de kusimila, a ser utilizado para avaliar as propriedades de barreira das partículas obtidas. O composto fluorescente foi caracterizado por RMN.

Reticular as partículas utilizando glutaraldeído e transglutaminase para alterar características de porosidade.

Avaliar dois métodos de secagem (liofilização e secagem por CO₂ supercrítico) para obtenção de partículas secas. Esta avaliação foi fundamentada pelas características morfológicas das partículas.

Estimar a liberação do composto fluorescente e de alguns constituintes do óleo essencial de vetiver nas partículas úmidas e secas, reticuladas ou sem reticulação, em três diferentes meios de liberação (etanol anidro, solução aquosa contendo sódio dodecilsulfato ou tween80), através de técnicas fluorimétrica e cromatográfica. Para avaliar a liberação foi necessário caracterizar as partículas quanto ao tamanho, distribuição de tamanho e entumescimento e morfologia. O coeficiente de difusão em todos os meios de liberação e partículas foi estimado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Embasamento Teórico

A maior parte dos sistemas alimentares reais são misturas multicomponentes de água, biopolímeros (proteínas e polissacarídeos), ingredientes de baixa massa molecular (tensoativos, sais minerais, açúcares, aromatizantes e lipídios) e partículas coloidais (gotas de óleo e bolhas de ar) [DICKINSON, 1998; POLYAKOV, GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997]. Em processos que fazem uso de polímeros, sejam eles sintéticos ou não, inevitavelmente haverá mistura e conseqüentemente, pode ocorrer interação entre eles. Por isso, muitos estudos [ANTONOV *et al.*, 1996; ANTONOV & GONÇALVES, 1999; BOURRIOT, GARNIER & DOUBLIER, 1999; POLYAKOV, GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; POLYAKOV *et al.*, 1985, 1986 a, b; GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997] são dedicados à análise do comportamento de fases das misturas e ao desenvolvimento de explicações teóricas de sistemas não usuais.

O estudo do comportamento de fases pode oferecer uma idéia clara de mecanismos moleculares específicos envolvidos na formação de macroestruturas de colóides em produtos alimentícios. A garantia do controle na manipulação da textura do produto e um desenvolvimento de novas maneiras para criá-lo implicam no entendimento dos elementos estruturais que formam a rede contínua do gel, dentro e nas interfaces do sistema coloidal, bem como a natureza das interações entre os biopolímeros e as partículas coloidais cobertas pelos biopolímeros [SEMENOVA, 2005].

O comportamento de fases da mistura de dois biopolímeros dependerá de parâmetros físico-químicos que determinarão a estrutura e as propriedades de blendas poliméricas. Quando em uma solução coexistem diferentes biopolímeros, esta apresenta a tendência de separar fases [TOLSTOGUZOV, 2003]. A separação de fases depende principalmente da estrutura dos polímeros em solução, podendo ocorrer pela segregação de cada macromolécula em fases separadas, conhecida por incompatibilidade

termodinâmica ou pela concentração de ambas as macromoléculas complexadas em uma só fase (separação associativa) [ALBERTSSON, 1995, in SCHMITT et al., 1998]. A Figura 1 ilustra as possibilidades de interação entre proteínas e polissacarídeos.

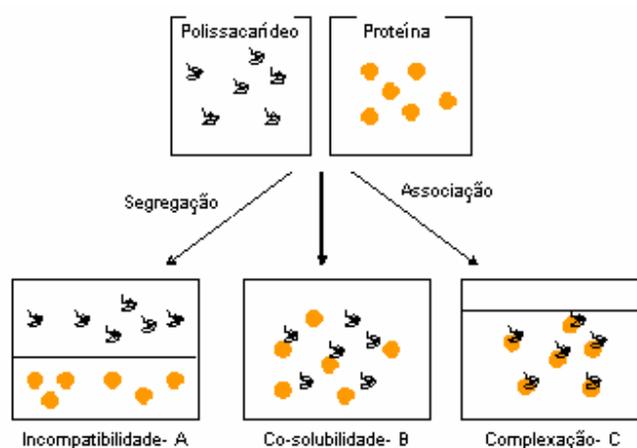


Figura 1. Mistura de biopolímeros e vias de interação. Adaptada de DE KRUIF&TUINIER, 2001.

Normalmente, a separação causada pela incompatibilidade termodinâmica ocorre entre polímeros de forma e estruturas diferentes cujas interações são entalpicamente desfavoráveis [GILSENAN, RICHARDSON & MORRIS, 2003]. Tais biopolímeros em solução mostram uma preferência a serem cercados pelo seu próprio tipo, o que provoca uma redução da concentração do polímero perto da outra partícula [DE KRUIF & TUINIER, 2001] e um conseqüente aumento dos biopolímeros nas diferentes fases [TOLSTOGUZOV, 2003] (Figura 1A). Porém, quando as interações heterotípicas são favorecidas, a separação de fases ocorre pela associação dos polímeros e as fases formadas consistem de uma, apenas com o solvente e a outra, com os polímeros complexados (Figura 1C). Essa separação das fases é atribuída à diferença na energia da interação entre segmentos do polímero e é a síntese da teoria de Flory-Huggins onde a compatibilidade entre diferentes polímeros manifesta-se quando a possibilidade de formar complexo entre eles exclui intensivas associações entre macromoléculas similares [ANTONOV & GONÇALVES, 1999].

A compatibilidade de polímeros ou a afinidade entre eles usualmente é avaliada por dois caminhos: (1) o estudo do equilíbrio de fases como função da temperatura e composição e (2) medidas de parâmetros de afinidade termodinâmica [ROGOVINA, 1998], que incluem a explicação em termos de entropia de mistura de contra-íons e a influência de interações eletrostáticas na probabilidade dos segmentos se encontrarem nas soluções poliméricas [ALVES, ANTONOV & GONÇALVES, 1999].

3.1.1 Teoria termodinâmica

A análise termodinâmica de sistemas contendo proteína e polissacarídeo visa principalmente encontrar uma estimativa para a energia livre de Gibbs (ΔG) que poderá prever se o sistema permanecerá em uma só fase. Esta análise torna-se mais importante na medida em que muitos fatores estão envolvidos na mistura, pois ela consegue prever a influência de cada parâmetro na interação entre os componentes. Há diversos critérios de estabilidade termodinâmica, mas a completa miscibilidade na mistura de dois polímeros requer que haja uma diminuição na energia livre da mistura durante a formação do sistema e pode ser representada de acordo com a equação (1):

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M < 0 \quad (\text{Equação 1})$$

Os dois principais constituintes de ΔG_M são a variação de entalpia ΔH_M da mistura e o produto entre a variação da entropia da mistura (ΔS_M) e a temperatura absoluta (T). Os pares poliméricos mistos formam uma única fase somente se a contribuição entrópica para energia livre excede a contribuição entálpica.

$$\Delta H_M < T\Delta S_M \quad (\text{Equação 2})$$

A variação de entalpia está diretamente relacionada à interação polímero-polímero e, para garantir o critério de estabilidade, deve ser negativa. Ela explica as interações energéticas, porém a entropia também apresenta um papel importante na estabilidade termodinâmica dos sistemas poliméricos [ROGOVINA, 1998]. Assim, a estabilidade da mistura de duas

macromoléculas em água é governada por três efeitos termodinâmicos: entropia combinatorial da mistura, interações intermoleculares de diferentes forças em torno da molécula e o efeito do volume excluído [TOLSTOGUZOV, 2000]. Quando um deles se altera, conseqüentemente todo o equilíbrio pode ser afetado. A separação de fases, do ponto de vista termodinâmico, é um rearranjo dos componentes a fim de que satisfaçam os critérios de estabilidade. Portanto, estabilidade não necessariamente significa que não haja separação de fases.

Alguns autores afirmam que a complexação entre proteínas e polissacarídeos é principalmente dirigida pela entalpia [DE KRUIF & TUINIER, 2001; GIRARD, TURGEON & GAUTHIER, 2003] devido à diminuição da energia eletrostática livre do sistema. Entretanto, outros indicam que a complexação é principalmente entropicamente dirigida, devido à liberação de contra-íons e moléculas de água [DAUTZENBERG, 2001; BALL et al., 2002] que contribuem para o ganho entrópico no sistema. Porém existe ainda um fenômeno derivado da forma e do comprimento das cadeias de macromoléculas em solução, nomeado como efeito do volume excluído, que reflete a competição mútua entre as macromoléculas pelo espaço da solução. Em nível molecular, geralmente o volume excluído das macromoléculas determina suas condições de separação de fase [TOLSTOGUZOV, 2003] e geralmente, polímeros de grande área e cadeia rígida, possuem baixa co-solubilidade. Por isso, quando excedem uma concentração crítica, tornam-se limitadamente miscíveis [POLYAKOV, GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997].

Duas moléculas esféricas adjacentes de mesmo raio R , que não estão interpostas, possuem uma distância mínima entre elas. Esta distância é a soma dos diâmetros das partículas e o volume excluído em torno de cada molécula é oito vezes maior que a própria partícula e significativamente maior para moléculas não esféricas, como é o caso de polissacarídeos lineares rígidos [TOLSOTOGUZOV, 2003]. No entanto, em solução diluída, as macromoléculas que se apresentam como fitas são relativamente independentes quando a distância entre elas iguala ou é maior que seu comprimento. Por isso,

umentar a concentração das macromoléculas provoca uma redução no volume excluído o que acarreta o surgimento de interações repulsivas entre elas.

TOLSTOGUZOV [1991] explica o efeito da competição pelo espaço da solução entre macromoléculas de diferentes tamanhos em movimento térmico a partir de modelos mecânicos para o trânsito de veículos (Figura 2). Ele associa moléculas grandes a caminhões e moléculas globulares a motos e as medidas que podem ser tomadas para que o tráfego flua, ou seja, para reduzir este efeito. Uma delas é o movimento coletivo de veículos por transportadores de carros (a), sendo que este modelo corresponde a biopolímeros associados (co-solubilidade). Os modelos (b) e (c) são "separações de fases", onde numa faixa trafegam apenas motos e em outra, os caminhões. Estas duas representações mostram características importantes de sistemas com fases separadas. É a presença de filmes interfaciais (ou depleção) de baixa densidade entre as fases de biopolímeros. O modelo (c) corresponde à separação de fases em misturas proteína-proteína e proteína-polissacarídeo, enquanto que (b) corresponde à incompatibilidade nas misturas de polissacarídeo-polissacarídeo e na mistura de complexos entre biopolímeros [TOLSTOGUZOV, 1991].

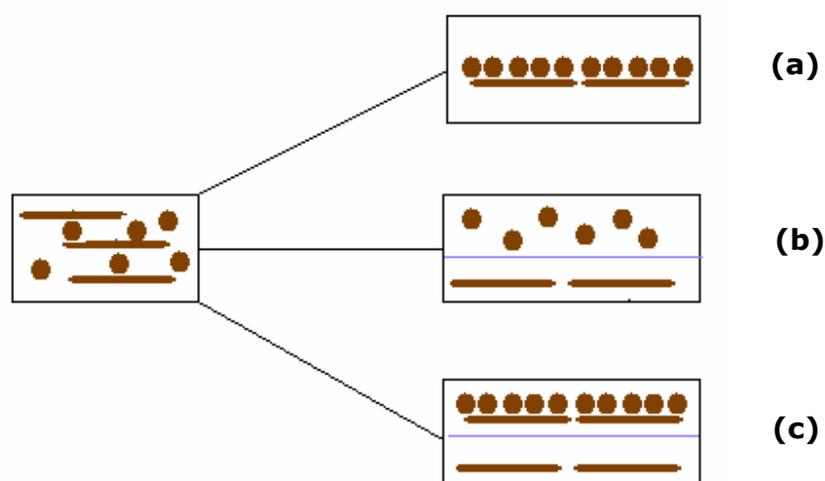


Figura 2. Modelos mecânicos para uma redução nos efeitos do volume excluído. (a), (b) e (c) são modelos descritos no texto.

3.1.1.1 Teoria de Flory -Huggins

A maioria das interpretações teóricas de soluções e de misturas de polímeros é baseada na teoria de Flory-Huggins. Ela faz algumas simplificações da teoria termodinâmica para casos gerais de misturas poliméricas com moléculas de cadeia flexível e diferentes tamanhos. Apesar de não descrever precisamente as propriedades termodinâmicas das soluções, ela prediz a estabilidade de uma solução de macromoléculas em relação à observada numa solução de moléculas simples. O modelo admite que não há mudança de volume durante a mistura (modelo incompressível), que a entropia de mistura é dada inteiramente pelo número dos rearranjos durante a mistura (entropia combinatorial) e que a entalpia de mistura é causada por interações de segmentos diferentes após a dissolução das interações do mesmo tipo de segmentos. É um modelo em que somente as interações médias são levadas em consideração e é conhecido por teoria de rede por utilizar um modelo cúbico rígido na determinação da expressão de entropia de mistura. Esse artifício reduz os desvios significativos encontrados experimentalmente entre os valores esperados e os ideais e, para sistemas binários de soluções poliméricas, a equação pode ser expressa como:

$$\Delta G_M = RT \left[\frac{\varphi_1}{r_1} \ln \varphi_1 + \frac{\varphi_2}{r_2} \ln \varphi_2 + \chi \varphi_1 \varphi_2 \right] \quad \text{(Equação 3)}$$

onde φ_i é a fração volumétrica dos componentes i , r_i é o número de segmentos poliméricos, χ é o parâmetro de interação binária de Flory-Huggins, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta. Os dois primeiros termos da equação são relacionados à entropia combinatorial de mistura e o terceiro termo é originalmente desenvolvido para a entalpia de mistura.

Esta abordagem teórica é baseada em uma aproximação para os sistemas ternários que consistem em dois polímeros em um único solvente. Os sistemas podem ser considerados como soluções moderadamente

concentradas (regime semi-diluído) onde as diferentes cadeias dos polímeros se sobrepõem enquanto que o solvente constitui ainda uma grande fração do volume da solução. Pode-se ver que a entropia de mistura (Equação 3) diminui com o aumento da massa molar (r_i é proporcional ao grau de polimerização) e desaparece para massas molares infinitas. Portanto, exceder a concentração crítica de um dos polímeros ou ocasionar a associação dos biopolímeros em solução torna o sistema instável pela influência negativa na entropia de mistura, o que provoca um aumento da energia livre do sistema. Para os polímeros que têm a massa molar muito grande, como sistemas usuais polímero-polímero e polímero-solvente, a contribuição entrópica é muito pequena e a miscibilidade ou imiscibilidade do sistema depende praticamente do valor da entalpia de mistura.

A entalpia está relacionada com a interação entre as espécies e esta teoria considera o parâmetro da interação do polímero-polímero como uma constante, independente da composição do polímero, do solvente ou da temperatura [SCHMITT et al., 1998; CARLSSON, LINSE & MALMSTEN, 2001], o que não é verdadeiro para muitos casos. De acordo com a teoria, essa condição pode ser admitida quando o solvente for completamente miscível com cada polímero individual, o que torna a interação do solvente-polímero de importância secundária. Neste caso, a compatibilidade dos dois polímeros é governada unicamente pelo parâmetro de interação entre os polímeros (χ), que está relacionado com a energia de contato entre as partículas e o número de contato entre elas, com o volume molar dos polímeros e suas solubilidades.

De acordo com o critério de solubilidade, a miscibilidade, neste caso, pode acontecer somente quando χ é negativo, ou seja misturas endotérmicas. Geralmente, as interações entálpicas entre cadeias diferentes poderão ser mais ou menos favoráveis que interações entre cadeias do mesmo tipo. Quando as interações heterotípicas são entalpicamente desfavoráveis, haverá a tendência do sistema em segregar em regiões onde as cadeias individuais são rodeadas por outras do mesmo tipo e ao contrário, as entalpicamente favoráveis

promoverão associação entre os polímeros [GILSENAN, RICHARDSON & MORRIS , 2003].

Alternativamente, a teoria de Flory-Huggins utiliza parâmetros moleculares que são representativos da auto-associação de um biopolímero. Todos esses parâmetros moleculares podem ser medidos em soluções diluídas diretamente por uma combinação de espalhamento de luz estático e dinâmico [SEMENOVA, 2005]. São eles, a massa molecular média, o raio de giro ou o raio hidrodinâmico e o segundo coeficiente virial (A_2). O raio hidrodinâmico fornece a noção do volume ocupado pela molécula e A_2 é o segundo coeficiente na expansão dos potenciais químicos do solvente e do biopolímero em uma dada concentração de biopolímero. O sinal e a magnitude de A_2 remetem ao desvio do estado ideal da solução macromolecular e refletem a natureza e a intensidade das interações dos pares intermoleculares (biopolímero-biopolímero e biopolímero-solvente) em solução [EDMOND & OGSTON, 1968]. Desta forma, um $A_2 < 0$ indica interações termodinamicamente favoráveis entre macromoléculas em solução (atração mútua). Tais interações provocam uma redução no potencial químico do biopolímero, e conseqüentemente diminuem a energia livre do sistema como um todo [SEMENOVA, 2005].

3.1.2 Representação física da separação de fases

Os diagramas de fases ternários são modelos triangulares esquemáticos que ilustram graficamente as interações intermoleculares entre os componentes de uma mistura ternária, descrevendo as condições de fronteira da separação de fases e de partição dos componentes. Também são usados para apresentar os efeitos de temperatura, pH, concentração de sais e outras variáveis no comportamento de fases da mistura de biopolímeros [TOLSTOGUZOV, 2000]. É uma outra maneira de se avaliar o comportamento de fases de uma mistura polimérica, sem entrar em detalhes de parâmetros termodinâmicos. Os vértices do triângulo correspondem à totalidade dos componentes individuais e afastando-se dele, em linhas paralelas, a composição do componente em questão é reduzida, aumentando-se portanto,

a fração relativa dos demais componentes. A linha binodal ou curva de equilíbrio delimita a região de separação de fases, e pelo seu posicionamento no diagrama, consegue-se visualizar o tipo de separação de fases [PICULELL, BERGFELDT & NILSSON, 1995].

Os diagramas de fases, em geral, podem ser construídos por uma variedade de técnicas: cromatografia gasosa, dispersão de luz, calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectrofotometria, etc. [ROGOVINA, 1998]. A medida da turbidez, também conhecida como método *cloud point*, baseia-se num fenômeno que tem sido reconhecido como propriedade característica de macromoléculas, e deve-se ao fato de a incompatibilidade entre os polímeros poder ser visualizada através da turbidez e opacidade da mistura resultante [ZASLAVSKY, 1994].

THIES [1995] representa o comportamento das macromoléculas em solução conforme pode ser observado na Tabela 1 e ilustrado por TURGEON et al. (2003) na Figura 3.

Tabela 1. Classificação visual das transições de fases de uma mistura de biopolímeros.

CLARA	TURVA	DUAS FASES	PRECIPITADO
Interações fracas. Os polieletrólitos possuem baixa densidade de carga iônica efetiva	Maior densidade de cargas. A interação entre os polieletrólitos é mais forte, mas não ocorre separação macroscópica de fases.	Um ligeiro aumento na densidade de cargas é capaz de promover a separação associativa das macromoléculas	O precipitado se forma devido ao grande número de formas iônicas ligadas.

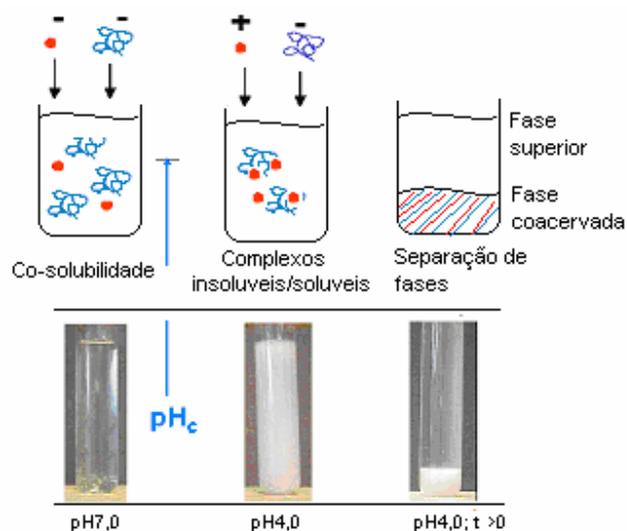


Figura 3. Ilustração visual e a nível molecular da coacervação complexa de um par polimérico. Adaptação de DE KRUIF, WEINBRECK & DE VRIES [2004].

Estudos prévios sobre interação entre carboximetilcelulose (CMC) e proteínas (proteínas do soro, gelatina, etc) mostraram que a formação do complexo poderia ser monitorada pela medida de viscosidade, turbidez ou volume de coacervado [KOH & TUCKER, 1988 a, b]. THIMMA & TAMMISHETTI [2003] encontraram consistência entre os resultados obtidos com gelatina e com a CMC-goma guar, com pH variando de 2,5-4,5, utilizando o método que mede o volume de coacervados e o método de turbidez. Os autores observaram a mesma faixa de pH de coacervação ótimo e uma relação entre a intensidade de absorvância com o rendimento em coacervados.

A identificação da região de separação de fases de uma mistura [SCHMITT et al., 1999, 2000] pode ser útil quando se espera estabilidade da mistura, por exemplo, na formulação de um produto alimentício, ou o contrário, quando se deseja exatamente a faixa onde ocorre a separação, que é o caso da microencapsulação por coacervação.

Os diagramas a e b da Figura 4 ilustram os dois tipos de separação de fases mais comuns em mistura de dois biopolímeros (P2 e P3) em um solvente (S1). A Figura 4a mostra a separação onde uma das duas fases é enriquecida

com os dois componentes poliméricos. A Figura 4b mostra o caso onde o equilíbrio de fases tem concentração global similar dos polímeros, mas onde cada fase é enriquecida com apenas um dos polímeros. A Figura 4c representa um caso muito especial onde a separação não é nem associativa e nem segregativa, onde um dos polímeros é distribuído exatamente igual nas duas fases [PICULLEL, BERGFELDT & NILSSON, 1995]

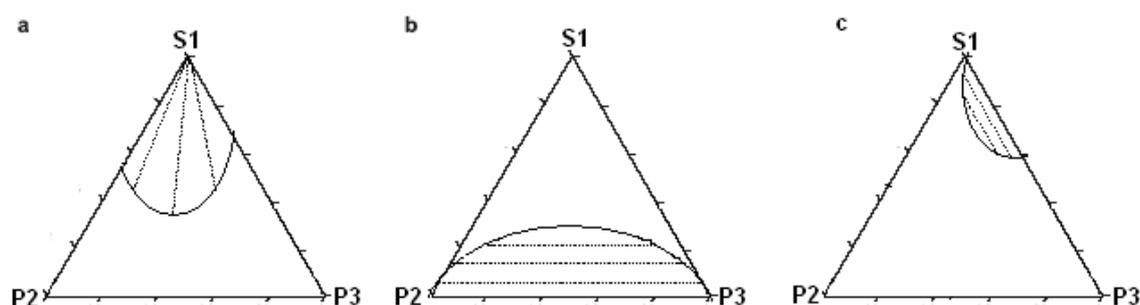


Figura 4. Representação triangular (diagrama de fases) das separações entre biopolímeros. a. separação associativa (coacervação complexa), b. separação segregativa (incompatibilidade) e c. distribuição uniforme de um dos polímeros nas duas fases.

Os complexos ligados (Figura 4a e b) podem ser solúveis ou não. Normalmente, complexos solúveis são formados como um excesso de um dos biopolímeros e sua concentração relativamente baixa no meio [TOLSTOGUZOV, 2003].

A estabilidade das zonas de junção depende principalmente da natureza das interações interbiopolímeros (eletrostáticas, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio). A hidrofobicidade dessas zonas é reduzida a partir da neutralização mútua das cadeias com cargas opostas [TOLSTOGUZOV, 2003], pois se reduz a densidade de cargas. Além disso, a conformação compacta do complexo formado esconde as zonas de junção em seu interior hidrofóbico. A insolubilidade dos complexos é uma das características dos coacervados (Figura 4a). São estes agregados insolúveis que irão se concentrar nas gotas coacervadas líquidas conduzindo a uma separação de fases em dois filmes líquidos. Outro fator que determina a solubilidade do complexo é a velocidade

de formação. Os complexos formados pela mistura de soluções proteína e polissacarídeo com cargas opostas são menos solúveis pois se formam mais rapidamente, limitando a estruturação da solução. Porém como é um processo de associação reversível, a titulação básica pode torná-los solúveis [TOLSTOGUZOV et al., 1985].

3.1.3 Separação de fases associativa

A separação de fases que ocorre na mistura de dois polieletrólitos de cargas opostas é também conhecida por coacervação complexa. A separação de fases na coacervação simples não envolve o mesmo conceito de interação que a complexa e é obtida através da adição de um agente extremamente hidrofílico à solução coloidal ou pela diminuição da temperatura. A adição de um não solvente, alteração no pH ou na força iônica, também podem ser considerados fatores indutores [MAGDASSI & VINETSKY, 1997].

A coacervação complexa envolve mais que um polímero num meio aquoso que se interagem por atração e os complexos insolúveis formados entre os polímeros se concentram nas gotas líquidas que sedimentam e se fundem para formar uma fase coacervada [WEINBRECK et al., 2004a]. Então, a separação, devido a esta mistura, ocorre em duas fases líquidas nos sistemas coloidais [IUPAC, 1997]. A fase mais concentrada no componente colóide é o coacervado, e a outra fase é a solução de equilíbrio.

A palavra coacervação deriva do latim *co-* juntos e *acerv-* massa amorfa para indicar a agregação das partículas coloidais e o termo coacervação complexa foi introduzido por Bungenberg de Jong, um químico alemão. Ele pode ser considerado o pai da química de coacervados pela contribuição pioneira de uma série de trabalhos completos e sistemáticos sobre a coacervação complexa entre goma arábica e a gelatina. Também reconheceu a importância dos coacervados em sistemas biológicos, escrevendo em 1936 a monografia intitulada "Os coacervados e sua importância em Biologia" [MENGER & SYKES, 1998].

DE JONG [1949] verificou a dependência da separação de fases agregativa com a concentração, a massa molecular, a proporção entre os polieletrólitos, a força iônica, o pH e a temperatura. Seus estudos serviram de base para a maior parte das pesquisas sobre o fenômeno de coacervação, inclusive os tratamentos teóricos desenvolvidos. As propostas feitas por VOORN [1956] e OVERBEEK & VOORN [1957] e depois por VEIS, BODOR & MUSSELL [1967], NAKAJIMA E SATO [1972], TAINAKA [1979, 1980] recorrem a diferentes mecanismos na tentativa de explicar a razão pela qual ocorre a coacervação. A pesquisa em coacervados no século vinte, inclui décadas de inatividade relativa sendo que a maioria dos trabalhos que investigam a coacervação data de, no mínimo, 20 anos atrás. É notável que os estudos sobre coacervados complexos sejam tão escassos tendo em vista sua relevância biológica e prática [MENGER & SYKES, 1998].

A separação de fases associativa entre proteínas e polissacarídeos tem importância em sistemas biológicos, como na organização de células vivas, interação de DNA com proteínas de transcrição, ligação da heparina, ácido hialurônico e sulfato de condroitina com proteínas [DE KRUIF, WEINBRECK & DE VRIES, 2004] e afeta as propriedades de produtos alimentícios como no caso de leites acidificados quando ocorre a formação de complexos entre a pectina e a caseína [WEINBRECK et al., 2003]. Como método, se aplica a produtos farmacêuticos e processamento de alimentos, purificação de macromoléculas [WANG, GAO & DUBIN, 1996], microencapsulação de ingredientes ativos ou cosméticos, e produção de substitutos de gordura [BAKKER, KONING & VISSER, 1994], análogos cárnicos [TOLSTOGUZOV et al., 1974] e filmes [SHIH & CARUSO, 2001].

3.1.3.1 Descrição teórica da coacervação complexa

A modelagem teórica da coacervação complexa foi proposta através de quatro principais teorias. No entanto nenhuma fornece visão geral de todas as separações de fases associativas. Além disso, elas são contraditórias em muitos pontos incluindo interações eletrostáticas e forças de entropia, a

importância das interações de Huggins e o tipo de interação de carga [BURGESS, 1990].

Teoria de Voorn e Overbeek [1957]

Esta teoria tenta explicar termodinamicamente a coacervação complexa. Ela se baseia na análise dos resultados do sistema clássico de gelatina-goma acácia obtidos por Bungenberg de Jong (1949). Algumas premissas que foram assumidas para formulá-la:

a) os poliíons devem apresentar uma configuração estrutural aleatória (*random coil*) em ambas as fases, o que aumenta a probabilidade de os dois polímeros interagirem.

b) as interações solvente/soluto são muito pequenas a ponto de serem desprezíveis. Esta condição favorece as interações soluto - soluto.

c) as forças interativas eletrostáticas são de natureza distributiva (cargas distribuídas através da solução de maneira homogênea), ou seja, elas permitem que na eletroneutralidade global, as moléculas sejam livres para mover-se no estado líquido. Se as interações fossem específicas elas tenderiam a formar precipitados ou agregados.

De acordo com os autores, a coacervação complexa deve ser considerada como um fenômeno espontâneo que se estabelece entre dois biopolímeros de carga oposta. Ela resulta da competição entre as forças eletrostáticas atrativas (efeitos entálpicos) que tendem a aproximá-los e os efeitos entrópicos que tendem a afastá-los. As contribuições entálpicas e entrópicos provocam uma redução na energia eletrostática livre [DE KRUIF, WEINBRECK & DE VRIES, 2004]. Neste modelo, as cadeias que compõem a estrutura das biomoléculas se associam eletrostaticamente para formar o coacervado e encapsulam solvente neste processo. O solvente presente na fase coacervada contribui para o aumento da entropia do sistema, permitindo diversos arranjos das macromoléculas. É por isso que o coacervado é líquido por natureza e prontamente reversível.

No tratamento teórico efetuado, Voorn e Overbeek [1957] utilizam as equações de Debye e Hückel (1923, 1924) para as interações eletrostáticas da mistura considerada como um sal simples e não como um políon/sal, e a teoria de Flory-Huggins para o termo de entropia, a fim de estimar a energia livre para uma carga simples. O ponto crítico da compatibilidade ocorre quando a densidade de carga σ e/ou a massa molecular, r , do biopolímero são suficientemente altas. Esse parâmetro ($\sigma^3 r \geq 0,53$) tende a aumentar com a adição de mais componentes ou com o aumento da força iônica. Ou seja, a teoria correlaciona bem interações entre dois eletrólitos fracos mas não explica condições espaciais muito mais fortes em sistemas contendo macroíons [DE KRUIF, WEINBRECK & DE VRIES, 2004].

Teoria de Veis e Aranyi [1960]

A teoria é conhecida como Modelo de Agregação da Fase Diluída. Esta teoria baseia-se na exceção da condição crítica postulada por Voorn e de Overbeek e considera a coacervação complexa como um processo em dois passos e não como um processo espontâneo como assumido anteriormente. Antes da coacervação, os polímeros complexam-se de maneira solúvel [WEINBRECK et al., 2003].

Eles formaram coacervados entre gelatinas em condições de fraca densidade de carga, ou seja, $\sigma^3 r < 0,53$. Inicialmente, as moléculas de gelatina carregadas opostamente agregam-se espontaneamente por interações eletrostáticas, com baixa entropia configuracional. Estes agregados rearranjam-se lentamente para formar a fase coacervada e sua formação é dirigida pelo ganho na entropia configuracional que ocorre com sistemas aleatoriamente misturados, na diluição da fase agregada e na concentração da fase coacervada. Os autores incluíram o efeito de interações não-eletrostáticas à teoria de Voorn & Overbeek para melhorar o ajuste do modelo em sistemas mistos de gelatina (sem sal) [DE KRUIF, WEINBRECK & DE VRIES, 2004].

O modelo introduz o parâmetro de interação (χ) de Huggins e substitui o termo entálpico por um termo que é função da concentração e da densidade de

carga dos biopolímeros e que representa a variação de energia eletrostática livre do sistema quando há a transferência de um segmento de biopolímero da fase diluída à fase concentrada.

Experimentalmente, Veis verificou uma linearidade entre o termo eletrostático e a concentração de polímero total, com uma faixa de descontinuidade coincidente com a supressão da coacervação. O modelo prediz supressão com excesso de cargas de sais que podem competir com os biopolímeros obstruindo a primeira fase de formação dos complexos [WEINBRECK et al., 2003].

A validade da teoria de Veis e Aranyi foi verificada por BURGESS & CARLESS [1984, 1985]. Eles detectaram por espalhamento de luz, a formação de pequenos agregados nas primeiras fases da reação de coacervação complexa gelatina/gelatina. Em outro estudo, com base na massa molecular e na densidade de cargas, a coacervação complexa entre a albumina e o alginato seguiu o padrão da gelatina/goma arábica. As proteínas e os polissacarídeos apresentam massas moleculares de mesma ordem e mesma densidade de cargas nos pHs estudados [SINGH & BURGESS, 1989]. No entanto, as condições críticas do modelo Voorn não explicam o sistema albumina/alginato. Os desvios são atribuídos às considerações da configuração *random coil*, interações de carga distributiva e interações de Huggins desprezadas [BURGESS & CARLESS, 1984], já que assumem que a separação de fases não é eletrostaticamente dirigida mas consequência do aumento da entropia configuracional ou da contribuição entálpica (polímero-solvente) para a energia livre do sistema.

Teoria de Nakajima e Sato [1972]

Esta teoria considera uniforme a distribuição de cargas entre as fases diluída e concentrada e por isso, aplicam a equação de variação de energia livre (obtida por Veis para a fase concentrada) a ambas as fases. A condição para a separação de fases é obtida aplicando-se a teoria de Veis em concentração suficientemente alta de polímeros e, no caso de soluções

diluídas, supõe-se pequeno, o segundo coeficiente virial das soluções. A teoria introduz o parâmetro de interação de Flory-Huggins, χ_{ij} , à teoria de Voorn e de Overbeek a fim de aumentar o termo eletrostático e é baseada na coacervação complexa entre polímeros de álcool polivinílico (PVA) carregados de maneira oposta e com densidades de cargas muito elevadas.

Teoria de Tainaka [1979, 1980]

Trata-se de uma teoria desenvolvida especificamente para coacervação complexa. Baseia-se no modelo de Veis e Aranyi e considera a coacervação como sendo originada por uma gota coacervada. A fim de simplificar o sistema para a análise teórica e para o entendimento da separação de fases, trabalha com um sistema de polímeros simétricos (polication e poliânion com densidade de cargas e comprimento de cadeias idênticas). Como no modelo de Veis e Aranyi, os agregados formados por interação eletrostática entre as macromoléculas interagem para formar o coacervado. Neste modelo, os agregados estão presentes ao mesmo tempo na fase diluída e na fase concentrada. O modelo considera as duas fases como a fase diluída do modelo de Veis e aplica o método de expansão do coeficiente virial a ambas as fases.

A teoria assume que o segundo coeficiente virial é diretamente influenciado por mudanças nos agregados poliméricos simétricos (APS) e que o ganho de energia eletrostática é produzido como resultado do aumento da densidade de íons no domínio sobreposto do APS. Isto se traduz por um ganho de energia eletrostática provocado pelo aumento da densidade de biopolímeros na zona de interação. Conseqüentemente, o motor da separação de fases reside nas interações eletrostáticas atrativas que são favorecidas pelo aumento da massa molecular das macromoléculas e o aumento da sua densidade de carga [LI et al., 1995]. Esta teoria permite igualmente explicar o fenômeno da supressão da coacervação complexa à forte concentração total de biopolímeros. Neste caso, o ganho de energia potencial devido a uma concentração local das macromoléculas induzida pelo efeito de sua interação eletrostática é muito limitado. Este modelo descreve com sucesso a

coacervação complexa entre a gelatina e a goma acácia [BURGESS, 1990], assim como entre a albumina e a goma acácia em $\text{pH} < \text{pI}$ e fraca força iônica [BURGESS, KWOK & MEGREMIS, 1991].

Teoria de Biesheuvel & Stuart [2004]

Eles estenderam a teoria de Voorn com o desenvolvimento em maiores detalhes do termo de energia eletrostática livre. Os autores descrevem a mudança na energia eletrostática livre quando macromoléculas ionizáveis formam complexos macroscópicos. A energia eletrostática livre inclui um termo elétrico e um químico que está relacionado à associação de grupos iônicos no polímero.

Na complexação entre um poliácido e uma polibase, a teoria usa diferentes modelos eletrostáticos para o polímero em solução e no complexo. O uso de parâmetros como as diferenças entre pK_a e pK_b (para "ácido" e "base") e a distância entre os grupos ionizáveis ao longo do polímero gera diagramas de estabilidade teórica qualitativa e comparáveis a um diagrama experimental baseado na turbidez das misturas de gelatina-goma arábica como obtido por DE JONG [1949]. O mecanismo proposto sugere que a coacervação complexa acontece quando a diminuição da energia eletrostática livre na complexação é maior que o aumento da energia livre relacionada aos termos de mistura e conformacionais. A energia eletrostática livre na coacervação diminui devido ao desaparecimento (parcial) da carga difusa em torno do polímero e pelo aumento da ionização de ambos polieletrólitos.

O interessante desta teoria são as previsões da tendência à separação de fases quando um dos polímeros é mais fortemente carregado, o que foi anteriormente sugerido por DE KRUIF, WEINBRECK & DE VRIES [2004], e de que a complexação de poliácidos ou polibase com um polímero anfotérico (proteína), de mesmo sinal, acima do ponto isoelétrico pode ser devido a uma carga reversa induzida da proteína.

3.2 A Microencapsulação

A idealização do modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que o protege do meio externo e ao mesmo tempo controla a entrada e saída de substâncias na célula, deu origem ao conceito da microencapsulação, que, de maneira similar, tem uma parede que isola o material ativo e controla a liberação sob estímulo específico. Portanto, o propósito da microencapsulação é proteger seu conteúdo do ambiente que pode ser destrutivo, permitindo trocas pela membrana [JIZOMOTO et al., 1993].

Os primeiros registros de tentativa de aplicação dessa idéia datam dos anos 30. O primeiro produto com material microencapsulado surgiu em 1954, com a patente do papel de cópia sem carbono comercializado pela empresa norte-americana National Cash Register, que consistia no recobrimento de papel comum por uma fina camada de microcápsulas contendo tinta incolor. As microcápsulas quando rompidas (por pressão) liberavam a tinta que, ao entrar em contato com uma segunda folha previamente banhada num revelador, produzia a cópia nos pontos pressionados. As primeiras pesquisas na área farmacêutica, realizadas pela Universidade de Wisconsin (Estados Unidos), também datam dos anos 50 [RÉ, 2003].

Define-se microencapsulação como uma tecnologia de empacotamento de sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso em finas camadas poliméricas que podem liberar seu conteúdo a taxas controladas e condições específicas [SPARKS, 1981]. O material coberto ou encapsulado é conhecido como ativo, material de recheio, fase interna, *fill* ou *payload* e o material de cobertura pode ser chamado de cápsula, material de parede, membrana, carregador ou casca [GIBBS et al., 1999].

A classificação das partículas é feita de acordo com parâmetros morfológicos de tamanho e distribuição do ativo. As partículas podem assumir diferentes formas como uma simples membrana de cobertura, uma membrana esférica ou de forma irregular, estrutura de multiparedes de mesma ou várias

composições ou numerosos núcleos em uma mesma estrutura [GIBBS et al., 1999]. Também, de acordo com a estrutura interna, podem ser classificadas em esferas, quando não se pode diferenciar o núcleo (sistema monolítico) e cápsulas, quando o sistema é do tipo reservatório em que o(s) núcleo(s) é bem definido e envolto por um filme polimérico. São denominadas micro, as partículas com tamanho entre 1 a 100 μm [THIES, 1995].

Todos esses parâmetros são variados em função das propriedades de liberação do produto encapsulado. Adicionalmente, a porosidade da partícula pode ser controlada em uma ampla faixa para reter moléculas como a glicose (180Da) ou permitir o fluxo controlado de moléculas tão grandes quanto as imunoglobulinas (155000Da) [TANAKA et al., 1984].

A formação de partículas constitui a etapa fundamental na produção de sólidos particulados, bem como na determinação de características e propriedades específicas dos produtos. A necessidade de produzir sólidos com propriedades controladas, como pureza, distribuição de tamanho, forma cristalina, morfologia, área específica, porosidade, fluidez e compressibilidade, tem incentivado o desenvolvimento de novos métodos e processos na preparação de partículas sólidas e na inovação de processos clássicos [RÉ, 2003].

A composição dos encapsulantes depende do tipo de aplicação a que se destinam e podem variar de comestíveis (carboidratos, proteínas) a polímeros biodegradáveis ou sintéticos. Existe uma variedade de materiais de paredes a serem utilizados para a formação de microcápsulas com particular eficiência e propriedades de liberação no método de formação escolhido. A estabilidade dos compostos contra a oxidação é também influenciada pela natureza química dos polímeros formadores de parede [ARSHADY, 1993, SINKO & KHON, 1993].

Os materiais mais utilizados como encapsulantes incluem [SHAHIDI & HAN, 1993]:

- **gomas:** goma arábica, agar, alginato de sódio, carragena;

- **carboidratos:** amidos, dextrinas, xarope de milho, sacarose;
- **celuloses:** carboximetilcelulose, etil, metil, acetil e nitro-celulose;
- **lipídeos:** cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e di glicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas;
- **proteínas:** glúten, caseína, isolado protéico de soro de leite (WPI), gelatina e albumina e algumas fontes alternativas como a quitosana.

Polímeros são especialmente adequados como material formador de parede de sistemas de liberação controlada porque sua mobilidade pode ser modificada. Ingredientes ativos e modificadores adequados podem ser incorporados física ou quimicamente. Em geral, polímeros naturais têm pouca ou nenhuma toxicidade. Apresentam diversidade de aplicações que incluem atuar como membranas ou envelopes, como matrizes nas quais o ingrediente ativo é disperso ou dissolvido [JACOBS & MASON, 1993].

As técnicas utilizadas para microencapsulação de ingredientes/princípios ativos podem ser divididas em **métodos físico-químicos:** Coacervação simples ou complexa, separação por fase orgânica, envolvimento lipossômico, pulverização em agente formador de reticulação; **métodos físicos:** *Spray drying, spray coating, spray chilling, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização; **métodos químicos** polimerização interfacial, inclusão molecular [JACKSON & LEE, 1991].*

A escolha do método depende primeiramente das propriedades do ativo (especialmente a solubilidade) e do tipo de partícula procurada (proteção e liberação) [DHOOT, 2003], além da finalidade (morfologia, estabilidade, mecanismo de liberação) e das circunstâncias envolvidas na manufatura do produto.

3.2.1 Áreas de Aplicação

Em geral, a microencapsulação é usada quando o ativo requer proteção, para isolá-lo de componentes incompatíveis, aumentar a estabilidade do produto, converter líquidos em sólidos, mascarar odores ou a liberação do componente ativo em taxas diferentes do que se administrado livremente. Em função da variedade de propósitos, as microcápsulas vêm sendo adaptadas a importantes ramos tecnológicos [RENARD et al., 2002; SHAHIDI & HAN, 1993].

3.2.1.1 Indústria de alimentos

É usual a incorporação de ingredientes (corantes, temperos, acidulantes, vitaminas e minerais) e aditivos naturais em produtos alimentícios. Eles têm função de alterar a textura, melhorar a qualidade nutricional, aumentar a vida de prateleira ou controlar as propriedades dos alimentos processados. A técnica da microencapsulação aplica-se como forma de reter compostos voláteis, proteger esses ingredientes contra perdas nutricionais (efeitos de evaporação e umidade, oxigênio e luz ultravioleta), auxiliar na mistura e preservar ou mascarar cor e sabores (inibindo a reação com outros materiais), além de incorporar aos alimentos, mecanismos de controle da liberação de certos componentes [RÉ, 2003].

A Tabela 2 lista os principais agentes encapsulados na indústria de alimentos. Como exemplo, acidulantes são adicionados ao processamento por atuarem como preservantes e agentes modificadores de sabor, porém a interação com gomas, amidos, proteínas e pectinas pode desenvolver uma grande faixa de texturas. A encapsulação desses agentes aumenta a vida útil de compostos de aromas cítricos e alimentos contendo amido e previne perda de voláteis e cor por serem liberados controladamente [DZIEZAK, 1988].

Enzimas são proteínas termolábeis e sua atividade é extremamente dependente das condições do meio. Membranas de nylon vêm sendo empregadas para encapsular enzimas como a pepsina, a *pectina esterase* para

clarificação de sucos, a *invertase* para a inversão de sacarose e a *renina* para a coagulação do leite, como uma maneira de melhorar a estabilidade e atividade deste tipo de proteína [POPPELWELL et al., 1995]. No caso de enzimas de maturação, a liberação gradual catalisa reações de degradação e modificação na matriz do queijo durante o período de maturação e controla o desenvolvimento de compostos de aroma [SCHROOYEN et al., 2001].

Uma bactéria ácido láctica, *Lactobacillus lactis*, foi encapsulada em alginato para que as bactérias imobilizadas pudessem ser usadas na produção contínua de iogurte [HERNANDEZ & GUZMAN, 2003; LISERRE, 2005].

Tabela 2. Vários ingredientes alimentícios que são encapsulados

Tipos de ingrediente
Agentes aromatizantes como óleos, pimentas, adoçantes e especiarias
Ácidos, bases e tampões
Lipídeos
Agentes redutores (branqueadores, maturantes)
Enzimas e microorganismos
Antioxidantes
Preservantes
Corantes
Agentes de <i>crosslinking</i> e <i>setting</i>
Agentes com sabores e odores indesejáveis
Óleos essenciais, aminoácidos, vitaminas e minerais

Fonte: Adaptada de KIRBY et al. [1991].

3.2.1.2 Indústria Agropecuária

Neste setor, a microencapsulação pode ser usada no envolvimento de pesticidas químicos (herbicidas, inseticidas e parasiticidas), o que significa reduzir a contaminação ambiental e sua toxicidade por contato, ou biopesticidas, prolongando sua atividade biológica até ser ingerido pela praga-destino (lagartas, insetos adultos, etc.) [MARSHALL et al., 1999]. Na agricultura, insumos são encapsulados para serem liberados controladamente, como no caso de fertilizante balanceado em nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), que numa alta concentração no solo, provoca efeitos danosos sobre o vegetal. A microencapsulação de micronutrientes também é feita como forma de protegê-los da degradação durante a produção, manuseio e reação com

outros componentes da formulação. Além disto são usados com sucesso na encapsulação de alimentos para peixes [PEDROZA-ISLAS, 2002].

Na área de inseminação artificial, a microencapsulação é usada como ferramenta para proteger o sêmen dos animais e liberá-los aos poucos [NEBEL & SAACKE, 1994; TORRE et al., 2002; WATSON, 1993].

3.2.1.3 Indústria Farmacêutica

Na área farmacêutica, fórmulas de liberação gradual e direcionada a órgãos alvos tornou-se corriqueira. O transporte seletivo de um agente terapêutico no local de ação pode otimizar a resposta biológica [BRAZEL, 1999]. Além disso, com a microencapsulação consegue-se melhorar a performance do produto por mascarar odor e sabor de medicamentos. As microcápsulas também aumentam a resistência de materiais frágeis às condições de processamento e empacotamento e previne reações indesejáveis com outros componentes do medicamento quando este é armazenado por um período prolongado. Exemplo clássico de liberação controlada é o caso do anticoncepcional de dose única, que mantém o nível de hormônio no corpo da mulher sem a necessidade de fornecer de uma só vez uma carga muito grande de hormônios [POPPLEWELL et al., 1995].

Uma aplicação farmacêutica conhecida é a redução da irritação gastrointestinal conseguida pela microencapsulação de ativos, como o ácido acetilsalicílico (aspirina). Nesse caso, uma liberação constante é conseguida por um revestimento do pó preparado com etilcelulose. Para atenuar os efeitos nocivos de medicamentos que contenham componente agressivo à mucosa estomacal, costuma-se encapsulá-lo, usando como membrana um material resistente ao meio ácido e que somente se decompõe em pH alcalino. Dessa forma, a cápsula passa pelo estômago sem se romper, permitindo a absorção do ativo apenas no intestino, onde o meio alcalino existente propiciará sua liberação, graças à degradação da membrana. Assim, a absorção dos compostos ocorre com um mínimo de reações adversas [HAPPI, 2005; SOUZA, 2003].

3.3 Coacervação complexa aplicada à microencapsulação

Nem toda a mistura de polieletrólitos opostos forma coacervados e nem todo coacervado é microcápsula. Para ocorrer a microencapsulação por coacervação complexa, deve-se garantir que os complexos sejam formados ao redor do ativo que se deseja encapsular. SINGH & BURGESS [1989] verificaram que a albumina e o ácido algínico formam tanto precipitados complexos quanto coacervados, o que limita o uso deste sistema para a microencapsulação.

A Figura 5 representa a separação de fases que pode ocorrer a partir de uma mistura ao se variar características do polímero e da mistura. Dependendo das propriedades dos polímeros usados com as condições do meio, a separação de fases pode ocorrer pela formação de precipitados caracterizados por uma rede bifásica interconectada (lado direito) ou de complexos mais organizados (lado esquerdo) [TURGEON et al., 2003].

As variações locais de concentração do biopolímero dentro do volume da mistura podem resultar de uma mistura ineficiente dos componentes, flutuações de temperatura ou interações específicas-não específicas. Por isso, a separação de fases é um processo cinético que pode não ocorrer imediatamente dependendo da conformação dos polímeros em solução [TOLSTOGUZOV, 2002].

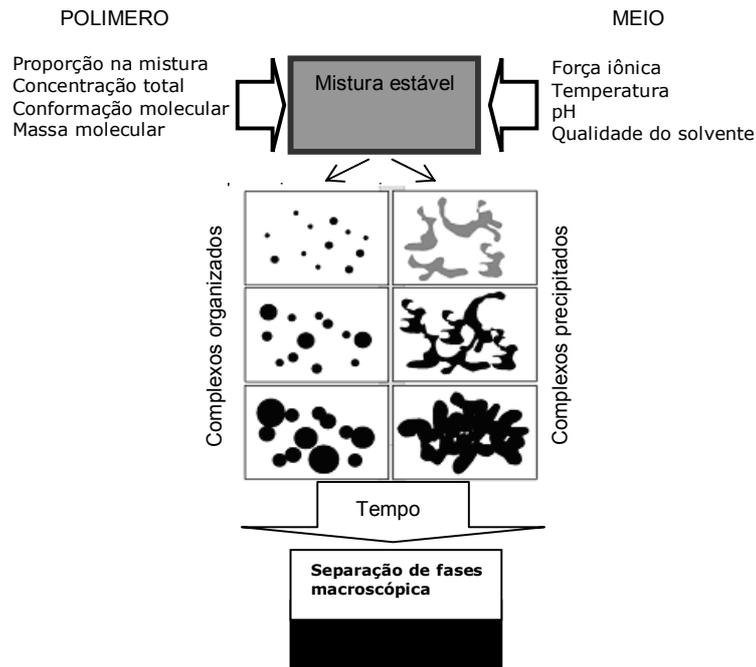


Figura 5. Formação de coacervados (esquerdo) ou agregados (direita) em função de variáveis físico-químicas. Adaptada de TURGEON et al. [2003].

A Tabela 3 resume alguns estudos da literatura utilizando coacervação complexa aplicada à microencapsulação. Alguns deles são estudos preliminares do processo de coacervação complexa.

Tabela 3. Utilização da coacervação complexa como técnica de microencapsulação.

Polímero 1	Polímero 2	pH	P ₁ :P ₂	[total]	Ativo	Referência
PROTEÍNA	POLISSACARÍDEO					
GELATINA	GOMA ARÁBICA	4	1:2	2%	Óleo de soja	NAKAGAWA et al., 2004
		3,9	1:1	2%	Esqualeno Lipossoma	RABISKOVA et al., 1994 DONG;ROGERS, 1993. PETERS et al., 1992 SUZUKI & KONDO, 1982
		4	1:1	3%	Óleo com drogas lipofílicas	JIZOMOTO et al., 1993
		4	1:1	3%	Sulfametoxazol Indometacina	TAKENAKA et al., 1980 TIRKONNEN et al., 1994
		4,2 3,9	1:1 1:1	0,2% 2%	Capsaicina Óleo fígado de bacalhau	XING et al., 2004 JOUZEL et al., 2003
	Pectina				Sulfamerazina	GILSENAN et al., 2003; BECHARD;MCMULLEN,19 86 MCMULLEN et al., 1984
	Goma xantana	2,3	1:1	0,1%		LII et al., 2002
	n-carragena					ANTONOV;GONCALVES,1 999; HAUG et al., 2003
	ι-carrageenan	5,0	~3:1	2%		MICHON et al. 1995
	Goma Gelana	3,5- 5,0		baixa	partículas sólidas e óleo	CHILVERS;MORRIS, 1987
Goma guar +CMC	4,5	3:1	2%		THIMMA;TAMMISHETTI, 2003	
Quitosana	5,5	20:1	3%		REMUNAN-LOPEZ et al.,1996	
Albumina	Goma arábica ι ou λ carragena	3,9	1:1	2%		BURGESS;PONSART, 1998 GALAZKA et al. 1999
B-lactoglobulina	Goma arábica	4.2	2:1	0.1- 5 %		SCHMITT et al., 1999; 2000; 2001
		4.2	2:1	1 %		SANCHEZ et al., 2001; 2002 a, b
	Pectina					KAZMIERSI et al., 2003, GIRARD et al., 2003
	Goma arábica	4	2:1	1%		WEINBRECK et al. 2003, 2004 a,b,c, 2005
Proteínas do soro de leite	Carragena					WEINBRECK et al., 2004
	Goma xantana	4.2	4:1	3 %		LANEUVILLE et al. 2000
	Exopolissacarídeo					WEINBRECK et al. 2003a
Caseína	Carragena					BUROVA et al., 2004
Poli-lisina	ι-carragena					GIROD et al. 2004
Proteínas da batata	CMC					VIKELOUDA;KIOSSEOGL U 2004
Proteínas de plantas	Goma arábica	3,5	1:1	15	migliol	DUCEL et al., 2004

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

POLISSACARÍDEO	POLISSACARÍDEO					
quitosana	hialurano Leguminosa de fava	3,5	1:1	1 %	dextrana	VASILIU et al., 2005 PLASHCHINA et al. 2001
	alginato					YAN et al. 2001; LI et al., 2005
	carragena					SHUMILINA;SHCHIPUNOV , 2002
PROTEÍNA	PROTEÍNA					
lizozima	heparina	7,0	1:3	0,24%		Van der WEERT et al., 2004
Gelatina		2,7	2:1	0,02%		TSUNG;BURGESS, 1997
PROTEÍNA	POLICATION					
DNA	Gelatina e quitosana					LEONG et al., 1998
	Quitosana	5,5	1:1	0,01%		MAO et al., 2001, BOSKIR;SAKA, 2004
	Quitosana galactosilada	7,0	1:1	0,02%	hepatócito	GAO et al., 2005
	Copolímeros hidrolizados	4,3	1:1	3%	Tetracloroetileno	RONG et al., 2005
	Carbopol					ELGINDY;ELEGAKEY, 1981
Gelatina	Polifosfato					AMIET-CHARPENTIER et al., 1998
BSA	Ácido hialurônico				gentamicina	LIM et al., 2000
	Sulfato de dextrana					GUROV et al. 1988
POLICATION	POLIANION					
Colágeno metilado	HEMA-MMA-MAA	-	1:20	3%	hepatócito	NG et al., 2005, ZHOU et al., 2005
protamina	Sulfato de condroitina					KIRPOTIN et al., 1993
Acido metacrílico (MAA)	metacrilato dimetilaminoetil					WEN et al., 1991

A coacervação é baseada em mecanismos físico-químicos complexos por envolver muitas variáveis como: taxas de agitação, relação núcleo/parede, características do polímero e do núcleo, taxas de adição e resfriamento. Existem poucas informações sobre o mecanismo de formação ou sobre a estrutura dos coacervados, o que restringe a predição das propriedades tecnofuncionais dos encapsulados e de seu processamento [SCHMITT et al., 2000].

A formação dos complexos de biopolímeros deve-se principalmente às interações eletrostáticas que dependem do grau de ionização dos polímeros e, portanto, do pH. [WEINBRECK et al., 2004]. Coacervar depende sobretudo, da

carga líquida do sistema, sendo conseqüentemente influenciada pela estequiometria, por parâmetros estruturais (conformação e comprimento de cadeia apropriados) dos polímeros, e pelas condições do meio como pH, força iônica, temperatura e natureza dos reagentes. E a microencapsulação, por sua vez, só acontece na presença de um recheio imiscível, na proporção adequada.

Em geral o processo de coacervação complexa consiste em três estágios: A) Formação de um sistema em três fases quimicamente imiscíveis (um solvente, um material de cobertura e um material de recheio) B) Deposição do material polimérico líquido, carregado com carga oposta ao da espécie coloidal, que formará a cobertura. C) Solidificação da cobertura [PEDROZA-ISLAS, 2002].

As microcápsulas produzidas por coacervação podem ter pequenos diâmetros (4 μ m) e alta eficiência de encapsulação [PEDROZA-ISLAS, 2002]. A principal desvantagem é a necessidade de se manter um controle crítico das concentrações do material coloidal e do iniciador da coacervação, pois a coacervação ocorrerá somente dentro de uma limitada faixa de pH, concentração de colóide e/ou de eletrólito [RÉ, 2003].

3.3.1 Parâmetros físico-químicos

As propriedades físico-químicas envolvidas no processo de coacervação complexa influenciam a formação ou supressão do mesmo. A situação otimizada ocorre quando existe um equilíbrio entre cargas positivas e negativas de modo que a maior parte dos sítios ativos estejam ligados. A influência do sal, ou seja, a força iônica do sistema de coacervação, não foi inserida na revisão por não se adotar condições de adição salina neste trabalho, porém, sabe-se que a presença do sal pode suprimir a coacervação em vários graus dependendo da natureza e concentração do mesmo [SCHMITT et al., 1998; BURGESS & CARLESS, 1985].

3.3.1.1 Tipos de forças químicas

As interações envolvidas entre a proteína e o polissacarídeo modificam seu comportamento em solução [STAINSBY, 1980] e todas as associações que ocorrerem em função da alteração das cargas estarão relacionadas a este item de alguma maneira.

A formação de complexos macromoleculares pode ocorrer por interações entre as macromoléculas carregadas, entre os resíduos de suas cadeias laterais ou pelas interações entre outro grupamento presente na macromolécula. As interações envolvem ligações específicas ou interações não-específicas. Os dois tipos de interações não-específicas entre os biopolímeros, as forças atrativas e repulsivas se aplicam a dois fenômenos opostos de separação de fases: a incompatibilidade entre os biopolímeros e sua complexação [BUROVA et al., 1992, TOLSTOGUZOV, 2003].

A força, a especificidade e a natureza atrativa ou repulsiva destas interações são variáveis. As interações moleculares repulsivas são não-específicas e geralmente são de natureza eletrostática devido às forças de van der Waals ou às repulsões estéricas [HIEMENZ & RAJAGOPALAN, 1997]. São encontradas entre misturas de proteína/polissacarídeo não-iônico ou com polissacarídeos aniônicos abaixo do ponto isoelétrico da proteína [IMESON, LEDWARD & MITCHELL, 1997]. As interações atrativas não específicas resultam de muitas interações fracas como ligações iônicas, de hidrogênio ou hidrofóbicas mas também podem ser específicas, de intensidade elevada e permanentes (ligações covalentes), no entanto, são poucas moléculas envolvidas numa ligação específica [ZUCKERKANDL, 1975].

Embora haja evidência para indicar que as principais forças responsáveis para estas interações são de natureza eletrostática (íon-íon) [IMESON, LEDWARD & MITCHELL, 1997], existem outras interações, tais como ligações de hidrogênio, covalentes ou hidrofóbicas, também significativas na estabilização da interação e podem envolver moléculas de solvente e cadeias de hidrocarbonetos dos polieletrólitos [PICULELL et al., 1995].

As interações íon-íon são envolvidas entre duas moléculas que possuem uma carga elétrica permanente, alcance variando entre 0,2 e 0,3 nm e uma energia potencial entre 25 e 50 kJ·mol⁻¹ [ISRAELACHVILI, 1991]. A força de interação depende das cargas das moléculas, da distância entre elas e da constante dielétrica do meio [PRAUSNITZ et al., 1999], de acordo com a fórmula:

$$F = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r^2} \quad \text{Equação 4}$$

q: carga das moléculas [C]; ϵ_0 : permissividade do vácuo [$8,85419 \times 10^{-12}$ C²·J⁻¹·m⁻¹); ϵ_r : constante dielétrica do meio [adimensional].

Densidade de cargas

A distribuição das cargas na superfície das partículas tem importância decisiva na estabilidade dos sistemas dispersos. As cargas superficiais produzem forças de repulsão eletrostática entre partículas com cargas de mesmo sinal, opondo-se conseqüentemente às forças de atração de Van der Waals. Se as cargas iguais são suficientemente elevadas, os colóides permanecem dispersos e em suspensão. Porém, uma forte densidade de cargas opostas induz a precipitação ou a gelificação dos colóides. Estas cargas podem ser produzidas em conseqüência de: ionização das moléculas dispersas, adsorção de íons presentes no solvente e/ou atrito [MATTISON, BRITAIN & DUBIN, 1998]. Além disso, a carga residual influencia a solubilidade dos complexos obtidos. Eles serão solúveis, se a carga de uma das macromoléculas em excesso permitir a interação com o solvente [XIA & DUBIN, 1994; MATTISON, BRITAIN & DUBIN, 1995; TOLSTOGUZOV, 1997]. A densidade de carga superficial depende da intensidade do potencial produzido pelo íon no solvente iônico que tem uma afinidade particular pela superfície. Em muitos sistemas, o íon H⁺ determina o potencial e por isso, são diretamente dependentes do pH.

pH

O pH influencia o grau de ionização dos grupos residuais das proteínas, os grupos aminas e os carboxílicos [SINGH & BURGESS, 1989; BURGESS, 1990], e como a formação de complexos entre os biopolímeros geralmente resulta de interações eletrostáticas entre macromoléculas carregadas com cargas opostas, trabalha-se com esta variável para adequar-se à situação de máxima concentração de cargas opostas. Em pHs abaixo do ponto isoelétrico (PI), as moléculas de proteínas possuem carga total positiva, ou seja, comportam-se como polications. Os polissacarídeos contendo carboxilas aniônicas, por sua vez, atuam como poliânions e em contato com as proteínas formam complexos eletrostáticos em pHs variando, geralmente, de 2 a 5. Os complexos interbiopolímeros são desfeitos geralmente quando a força iônica excede 0,2 a 0,5 e quando o pH está acima do ponto isoelétrico da proteína. Proteínas oligoméricas podem ainda formar complexos a pHs acima do PI da proteína em função das diferentes cargas de suas subunidades [GALAZKA et al., 1999].

Natureza do polissacarídeo

Existem muitos mecanismos de interação envolvendo polissacarídeos e proteínas que se tornam mais difíceis de serem compreendidos conforme aumenta a diversidade estrutural e as propriedades dinâmicas complexas dos polissacarídeos [IMBERLY & PEREZ, 2000].

Os polissacarídeos aniônicos não possuem o mesmo grau de compatibilidade com as proteínas. Os sulfatados se ligam mais fortemente a uma proteína abaixo do seu ponto isoelétrico que os carboxilados. Mesmo que a proteína e o polissacarídeo estejam numa situação de pH onde as cargas líquidas sejam negativas, ainda assim existe a possibilidade de associação iônica entre os grupos OSO^{3-} e NH^{3+} , neste caso específico. Os polissacarídeos que possuem grupos carboxilados não se complexam com as proteínas globulares com uma força iônica inferior a 0,2, ou a valores de pHs muito

superiores ao ponto isoelétrico das proteínas. A ação dos polissacarídeos se caracteriza principalmente pela diminuição das interações proteína/proteína.

Massa molecular

Como as interações eletrostáticas entre proteína e polissacarídeo são muito fortes, o efeito da massa molecular dos polissacarídeos sobre a quantidade das proteínas complexadas é desprezível [MORR & HA, 1993]. Quando as interações são fracas, um polissacarídeo de alto peso molecular complexa uma quantidade maior de proteína e o maior espaço ocupado na solução favorece o contato com a proteína [SEMENOVA, 1996]. Porém, as proteínas de alta massa molecular tendem a formar géis ou precipitados preferivelmente a complexos. As moléculas com baixa massa molecular interagem por associação iônica, no lugar da complexação, conduzindo à formação de agregados moleculares.

Razão proteína:polissacarídeo

A estequiometria de um complexo eletrostático depende da conformação e da carga global dos reagentes. Devido a limitações topológicas, proteínas globulares e cadeias de polissacarídeos aniônicos rígidos não conseguem contato entre todos seus grupos carregados. Ao contrário, estruturas de proteínas desdobradas (caseína, gelatina e algumas globulinas desnaturadas em meio ácido) tendem a formar o máximo contato com um polissacarídeo com carga oposta. No entanto, proteínas com uma estrutura desdobrada usualmente formam complexos insolúveis eletricamente neutros, onde as cargas dos componentes são mutuamente neutralizadas [TOLSTOGUZOV, 2003]. Em outras palavras, a quantidade de complexos neutros formados (N) por uma proteína desdobrada e um polissacarídeo aniônico em complexos insolúveis é igual à fração de suas cargas (Z). Isto significa que a estequiometria dos complexos depende do valor do pH do sistema e da proporção entre os reagentes macromoleculares, porém independe da quantidade inicial de reagentes macromoleculares. Assim, quando o pH diminui, os complexos insolúveis são enriquecidos com polissacarídeos

aniônicos. Depois da precipitação de complexos insolúveis de uma composição constante correspondente a certo pH, o excesso de um biopolímero permanece em solução [TOLSTOGUZOV, 2003].

A Figura 6 mostra que um complexo insolúvel é enriquecido em polissacarídeo quando o pH é reduzido abaixo do PI da proteína. Isto é devido a um aumento na carga total da proteína e uma diminuição na do polissacarídeo. Uma proporção equivalente entre os reagentes macromoleculares corresponde ao máximo rendimento de complexos eletricamente neutros e os complexos insolúveis são formados em soluções diluídas (menor que 0,01%) de reagentes macromoleculares.

A proporção entre os biopolímeros influencia a carga e as propriedades dos complexos obtidos, mas ela tem mais influência sobre a solubilidade dos complexos. A estequiometria de um complexo eletrostático de biopolímeros insolúvel tende a satisfazer as condições de sua eletroneutralidade, e a neutralização das cargas pode reduzir a rigidez das cadeias pela diminuição nas interações repulsivas de grupos de mesma carga, o que diminui, conseqüentemente a solubilidade.

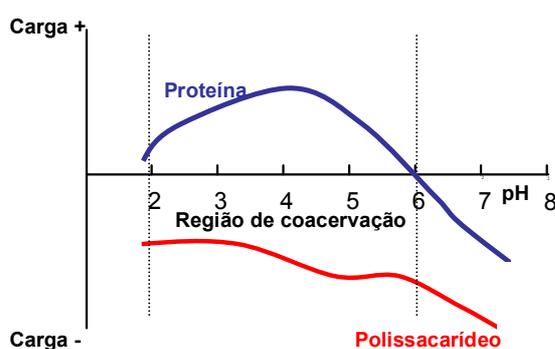


Figura 6. Distribuição de cargas dos biopolímeros e região de cargas opostas-indica região de coacervação.

3.3.2 Parâmetros físicos do processo

Vários estudos têm reportado [LAMPRECHT, SCHÄFER & LEHR, 2001] o efeito de fatores físicos como velocidade de agitação, pressão e temperatura no comportamento da coacervação.

3.3.2.1 Temperatura

KELLY et al. [1994] verificaram que o aumento temperatura juntamente com o conteúdo total de polímeros possuía um efeito sinérgico na separação de fases. Ela favorece as interações hidrofóbicas e covalentes e sua redução (baixas temperaturas) favorece as pontes de hidrogênio [STAINSBY, 1980]. As interações hidrofóbicas são aumentadas pela exposição dos grupos reativos pela desnaturação térmica das proteínas globulares e as mudanças na conformação da estrutura do polissacarídeo. A redução da temperatura também exerce influência sobre a interação dos biopolímeros, pois diminui a agitação térmica e as moléculas mais próximas aumentam a intensidade dos parâmetros interacionais de Flory-Huggins [SCHMITT et al., 1998].

3.3.2.2 Agitação e Pressão

A aplicação de uma pressão hidrostática facilita a formação dos complexos. De fato, o tratamento conduz à desnaturação parcial das proteínas e permite a exposição de grupos reativos, inicialmente escondidos na molécula [DICKINSON & PAWLOWSKI, 1997]. No caso de altas pressões dinâmicas, elas reduzem o tamanho dos complexos por ação das forças de turbulência, cavitação e cisalhamento [LE HÉNAFF, 1996]. A duração do cisalhamento influencia também o tamanho dos complexos. Quanto maior, mais possibilidades de colisões e maior quantidade de complexos terá grandes tamanhos [SCHMITT et al., 1998]. Estes conceitos são diretamente aplicados à agitação. A maior velocidade de cisalhamento gera gotas coacervadas menores.

3.4 Polímeros de parede para coacervação complexa

Características físico-químicas do polímero de parede, como a solubilidade, peso molecular, transição vítrea, cristalinidade, formação de filme e difusividade, são parâmetros importantes na escolha de um polímero de parede desejado. Os biopolímeros mais utilizados para produzir microcápsulas e hidrogéis são apresentados na Tabela 3 e os polissacarídeos comumente usados são caracterizados como gomas.

A definição de goma é baseada em características físicas e na origem dos materiais em questão. Em termos práticos podem ser definidas como moléculas de alta massa molecular com características hidrofílicas ou hidrofóbicas que, usualmente, possuem propriedades coloidais [PASQUEL, 2001], capacidade de produzir géis ou soluções viscosas e portanto o nome "goma". É mais comum a utilização do termo para referir-se a polissacarídeos ou seus derivados, obtidos a partir de plantas (exsudados, sementes, algas) ou por processamento microbiológico [WHISTLER & DANIEL, 1985]. As gomas são inertes em termos nutricionais e usadas na indústria de alimentos como espessantes, estabilizantes, para suspender partículas e impedir a formação de cristais de gelo. São empregadas também na medicina, na produção de papel, perfurações de petróleo (na lubrificação da broca e para emulsionar a água usada na recuperação secundária).

3.4.1 Goma Arábica



Figura 7. Goma acácia: *Acacia tortilis*, In natura e processada (*spray dryer*).

Também conhecida por goma acácia ou goma indiana, a goma arábica é exsudada de árvores e obtida como resposta à ferida da planta. Aproximadamente $\frac{3}{4}$ da produção de goma vem da espécie *Acacia senegal*, seguida pela *Acacia seyal*, produzida principalmente no Sudão [THEVENET, 1988]. É o hidrocolóide emulsificante mais comumente conhecido e amplamente usado na indústria de bebidas para emulsificar óleos aromatizantes, como o óleo de laranja, sob condições ácidas. É um ingrediente razoavelmente caro comparado aos amidos modificados e maltodextrina, e em decorrência existem muitas sugestões na literatura para sua substituição por outros emulsificantes poliméricos [TRUBIANO & LACOURSE, 1989] ou outras gomas como a goma mesquita [VERNON-CARTER, 1998].

Quimicamente, a goma arábica é um sal neutro ou levemente ácido de um polissacarídeo complexo que contém íons cálcio, magnésio e potássio em sua molécula [PRAKASH & MANGINO, 1990]. Segundo BEMILLER & WHISTLER [1996] é uma mistura complexa de duas frações distintas, com estruturas químicas diferentes. A primeira fração, a componente principal, representa 70% da goma e é composta por cadeias de polissacarídeos com pouco ou nenhum material nitrogenado. A segunda fração é formada por

aproximadamente 2% de proteína ligada covalentemente ao carboidrato através dos resíduos de serina e de hidroxiprolina [OSMAN et al., 1993; RANDALL, PHILLIPS & WILLIAMS, 1989]. A proteína em geral se apresenta com uma fração de elevada massa molecular que representa menos de 30% da goma total [VANDEVELDE & FENYO, 1985]. É esta fração que parece ser predominantemente responsável pelas propriedades emulsificantes e estabilizantes especiais do hidrocolóide [RANDALL, PHILLIPS & WILLIAMS, 1989].

A estrutura em que a goma arábica é formada é conhecida por *wattle blossom* e consiste, de uma cadeia principal de galactana ligando lateralmente cadeias de galactose/arabinose fortemente ligadas. A metade do carboidrato é composto de D-galactose (40% dos resíduos), L-arabinose (24%), L-ramnose (13%), e 2 ácidos urônicos, responsáveis pelo caráter polianiónico da goma, o ácido D-glucurônico (21%) e o ácido 4-O-metil-D-glucurônico (2%). Estes últimos são ânions solúveis em água na proporção 1:2 (influenciado pelo pH porque ao se acidificar diminui-se a dissociação da carboxila e também a solubilidade) [DICKINSON, 2003].

Sabe-se que a goma é negativamente carregada acima de pH 2,2, e a baixos pHs (<2,2) a dissociação dos grupos carboxilas é suprimida. Ela apresenta boa capacidade emulsificante e sua viscosidade (1,8 mPa.s solução a 1%) é baixa comparada a outros polissacarídeos de massa molar similar (400KDa) [SANCHEZ et al., 2002]. De sua estrutura molecular (Figura 8), pode-se estimar sua densidade de carga como um grupo carboxílico a cada 5nm [ISLAM et al., 1997]. A habilidade formadora de filmes da goma arábica há muito tempo foi estabelecida por ela ser um emulsificante natural que confere funcionalidade, não pela modificação da reologia da fase aquosa mas por conduzir à formação de uma camada macromolecular estabilizadora em torno das gotas do óleo. Além disso, a goma pode estabilizar a emulsão do óleo aromatizante na bebida [TAN, 1990] e protegê-lo contra oxidação de voláteis durante processamento e estocagem de microcápsulas [BUFFO, REINECCIUS & OEHLERT, 2001].

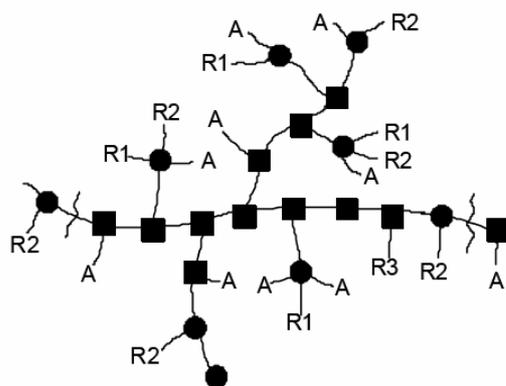


Figura 8. Estrutura molecular da goma arábica. A = arabinosil; Radicais baseados em R1= ramnose, R2=ácido gulucurônico, R3= arabinose. Adaptado de ISLAM et al. [1997].

3.4.2 Pectina

É um polissacarídeo derivado de paredes celulares de plantas, sementes de girassol e polpa da beterraba [THAKUR, SINGH & HANDA, 1997], mas é principalmente preparada a partir da extração ácida do albedo de cítricos (*Rutaceae*) e da casca e polpa da maçã (*Rosaceae*). [BEMILLER & WHISTLER, 1996]. Nas plantas, elas contribuem para a firmeza e estrutura dos tecidos atuando na parede celular de forma semelhante ao colágeno, em tecidos de origem animal [ASPINALL et al., 1970]. Geralmente são associadas ao cálcio e possuem alta massa molecular. Não são digeríveis por seres humanos, por isso muito usadas como fibras dietéticas para eliminação de gorduras, e como tendem a formar géis são empregadas na manufatura de geléias.

As pectinas possuem estrutura complexa com comprimentos de cadeia variados e ordem particular de cada unidade de monossacarídeo e, portanto dependem da fonte e da metodologia de extração [LSBU, 2005]. Quimicamente, a maioria é composta por uma cadeia linear de ácido galacturônico ligado por associação α -(1→4) a uma cadeia polissacarídica [LOOTENS et al., 2003]. Esta cadeia de polissacarídeo pode ser de três tipos [PÉREZ, RODRÍGUEZ-CARVAJAL, DOCO, 2003].

- poligalacturonano, composto por subunidades repetidas de ácido galacturônico. São homopolímeros parcialmente metilados (Figura 9 a).

- ramnogalacturonano I, composto por subunidades de ácido galacturônico, α -(1 \rightarrow 4)-D-galacturonosila, e ramnose, α -(1 \rightarrow 2)-L-ramnosil, alternados. Os pontos de ligação ocorrem no lado neutro da cadeia (1 - 20 resíduos) de principalmente L-arabinose e D-galactose (Figura 9b).

- ramnogalacturonano II, polissacarídeo complexo altamente ligado. Pode conter resíduos como D-xilose, L-fucose, ácido D-glucurônico, D-apiose, ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico e ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosônico ligados às regiões do ácido poli- α -(1 \rightarrow 4)-D-galacturônico.

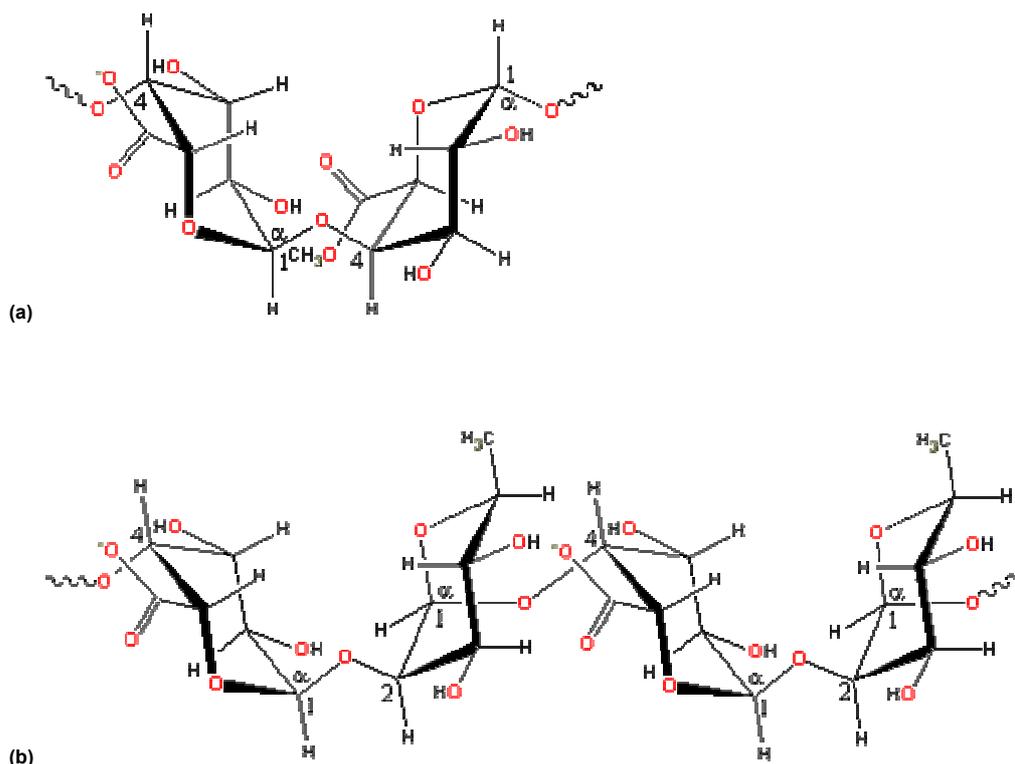


Figura 9. Dois tipos de estruturas que formam as pectinas. (a) Cadeia polissacarídica poligalacturano, (b) ramnogalacturano I.

Geralmente pectinas não possuem estruturas exatas [PEREZ et al., 2000]. A molécula não adota uma conformação reta em solução, mas ocorre

de forma estendida e flexível. Os grupos carboxilados tendem a expandir a estrutura das pectinas como resultados de sua carga, a menos que eles interajam através de ligações catiônicas divalentes, e seu pKa é de aproximadamente 2,9 [RALET et al., 2001], possuindo carga consideravelmente negativa na maioria das circunstâncias.

Comercialmente existem dois tipos de pectinas que dependem de seu grau de metilação: pectinas de alto (>50%) e baixo teor de esterificação (inferior a 50% dos grupos carboxílicos esterificados). O grau de esterificação é a porcentagem de unidades de ácidos galacturônicos que são metil esterificados [DZIEZAK, 1991]. Os metil ésteres formados ocupam um espaço similar, mas são mais hidrofóbicos e conseqüentemente têm um efeito diferente na estruturação da água vizinha. Por isso, as propriedades das pectinas dependem do grau de esterificação [ROLIN & DE VRIES, 1990].

Pectinas pouco metiladas (LM) formam gel por pontes com cátions divalentes (cálcio) entre as cadeias de dupla hélice adjacentes formando as estruturas conhecidas como *egg-box* [RALET et al., 2001]. A força do gel aumenta com o aumento da concentração de Ca^{2+} mas é reduzida com a temperatura e o aumento da acidez ($\text{pH} < 3$), portanto são termoreversíveis em pHs entre 3,0-4,0 [LOOTENS et al., 2003]. Esta redução pode ocorrer porque dois grupos carboxilados são associados à água antes dos íons cálcio formarem as ligações salinas que fazem essas zonas de junção. A habilidade geleificante de di-cátions é similar à encontrada para alginatos ($\text{Mg}^{2+} \ll \text{Ca}^{2+}$, $\text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$) sendo que com Na^+ e K^+ , ela não geleifica. Quando a quantidade de metoxila esterificada é maior que 50%, íons cálcio mostram alguma interação, mas não formam gel. A similaridade de comportamento com alginatos é que o ácido poli- α -(1→4)-D-galacturônico é quase imagem espelho do ácido poli- α -(1→4)-L-gulurônico, sendo que o grupo 3-hidroxila é axial neste último [LSBU, 2005].

A desesterificação controlada para conversão de pectinas altamente metoxiladas (HM) a pectinas com baixo teor em metoxilas (LM) é feita em

meio alcoólico, ácido ou amônia [AXELOS & THIBAUT, 1991]. Quando amônia é usada para a desesterificação, alguns dos grupos metil éster são substituídos pelos grupos amidas, o que resulta em pectinas com vários graus de amidação [ROLIN & DE VRIES, 1990].

Pectinas HM (usualmente ~67%) geleificam pela formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas na presença de ácidos (pH ~3.0, para reduzir repulsões eletrostáticas) e açúcares (geralmente em torno de 62% de açúcar por peso, para reduzir as interações água-polímero) [TSOGA et al., 2004]. São géis termo-irreversíveis. Pectinas LM (~35% esterificadas) , na ausência de cátions adicionados geleificam pela formação de associações entre cadeias a baixas temperaturas (~10°C) para formar géis transparentes [KJØNIKSEN, HIORTH & NYSTRÖM, 2004].

Pectinas são principalmente usadas como agentes geleificantes mas também podem agir como ligantes de água, estabilizantes e espessantes por promover o aumento da viscosidade quando submetidas à hidratação [THAKUR, SINGH & HANDA, 1997]. As composições e propriedades das pectinas variam com a matéria-prima, os processos usados durante a extração e os subsequentes tratamentos realizados [DZIEZAK, 1991; BEMILLER & WHISTLER, 1996].

3.4.3 Gelatina

Gelatina é uma proteína de origem animal, solúvel em água (em temperaturas entre 38-40°C) resultante da hidrólise do colágeno proveniente de osso, peles e tecidos conectivos de suínos e bovinos. O colágeno é caracterizado por apresentar alto teor em glicina (33%), prolina e hidroxiprolina (22%) [JOHNSTON-BANKS, 1990]. A Figura 10 apresenta a estrutura química da gelatina de pele bovina.

A extração da gelatina a partir de colágeno é realizada em etapas com diferentes temperaturas (de 60 a 90°C) e é pH-dependente. A seleção do pH é

feita visando maximizar a taxa de extração e a manutenção de suas propriedades físicas [CARVALHO, 2002].

Gelatinas, como outras proteínas, podem agir como ácido ou base, dependendo do pH do meio. Em soluções ácidas, apresentam-se positivamente carregadas e, o contrário ocorre em soluções alcalinas. Porém, variações na proporção de grupos amídicos e carboxílicos são responsáveis por diferenças nos pontos isoelétricos da gelatina. No colágeno, 35% dos grupos ácidos estão sob a forma de amidas, o que o caracteriza como uma proteína básica ($pI \sim 9,4$). De acordo com o pré-tratamento de hidrólise utilizado, o ponto isoelétrico da gelatina extraída é alterado ficando em torno de 4,5 a 5,3 para gelatinas tipo B (pré-tratamento com pH alcalino) e permanecendo entre 7,0 a 9,4 na gelatina tipo A (pré tratamento ácido) [POPPE, 1997].

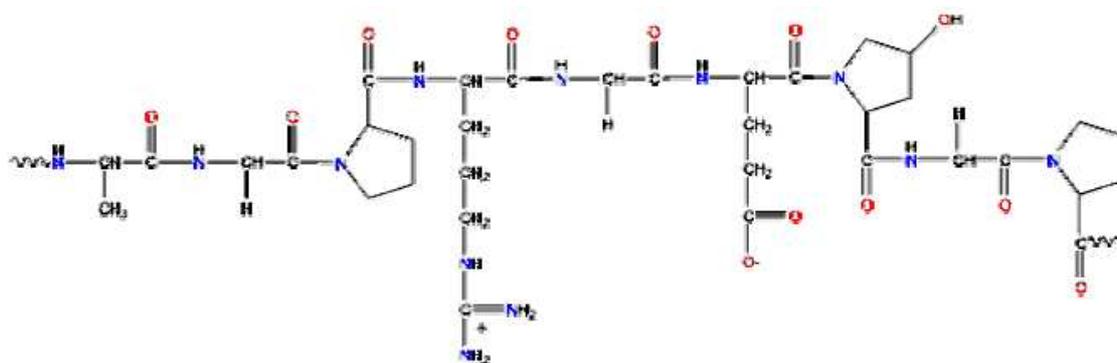


Figura 10. Estrutura química da gelatina [POPPE, 1997].

3.4.4 Propriedades da parede - Reticulação

Uma diversidade de materiais de parede é utilizada na produção de microcápsulas e microesferas para a liberação controlada. Desses, para a coacervação complexa, aproximadamente 90% dos pares fazem uso de uma proteína na constituição do par polimérico. Observando-se a formação estrutural do colágeno, percebeu-se que a ligação covalente entre as moléculas era essencial para a função dos tecidos conectivos como tendões, ossos e pele, por possuírem características de maior resistência mecânica e controlarem o grau de flexibilidade das cadeias polipeptídicas. Na ausência

desses *crosslinkings* intermoleculares, as moléculas na fibra são capazes de movimentar-se relativamente às outras; conseqüentemente, a fibra é fraca e extensível [MILES et al., 2005].

Consegue-se um aumento da estabilidade destas fibras através da reticulação, e dois fatores são identificados como principais responsáveis por isso. O primeiro mecanismo é uma perda de entropia pelo número reduzido de configurações moleculares disponíveis devido às moléculas serem covalentemente ligadas. O segundo é a hidratação. *Crosslinkings* podem desidratar a fibra pela ligação mais próxima das moléculas e expulsar água e esta desidratação melhora a estabilidade das fibras de colágeno [MILES et al., 2005].

O conceito de reticulação foi aplicado para alterar as propriedades de barreira das paredes das cápsulas auxiliando no controle da liberação do ativo encapsulado. Geralmente são reticulações protéicas e referem-se à formação de ligações covalentes entre cadeias polipeptídicas (intramoleculares) ou entre proteínas (intermoleculares) [FEENEY & WHITAKER, 1984]. Um resumo de *crosslinks* protéicos em alimentos é apresentado na Figura 11. Nem todos os aminoácidos são passíveis de participação na reticulação e os que reagem diferem em grau de reatividade sob várias condições [GERRARD, 2002].

Os tipos de forças químicas envolvidas na formação das redes protéicas estruturadas são as mesmas da organização de moléculas de proteínas individuais. No sentido crescente de intensidade energética da interação, as principais são: hidrofóbicas (5-10 KJ/mol), pontes de hidrogênio (10-40 KJ/mol), interações eletrostáticas (25-80 KJ/mol) e interações covalentes (200-400 KJ/mol). Cada uma das interações tem uma função específica e são as interações covalentes intermoleculares que permitem a reticulação permanente na rede [GERRARD, 2002].

Entre os grupos presentes nas proteínas, os resíduos das aminas usualmente estão expostos e são muito reativos sem qualquer tipo de prévia ativação [MATEO et al., 2005]. Por isso muitos agentes reticulantes são

formulados para atacar especificamente estes grupos. A gelatina, por exemplo, contém aproximadamente 33 grupos ϵ -amino e 120 grupos de ácidos carboxílicos em uma molécula ideal de 100 KDa composta de 1000 resíduos de aminoácidos [VEIS, 1960].

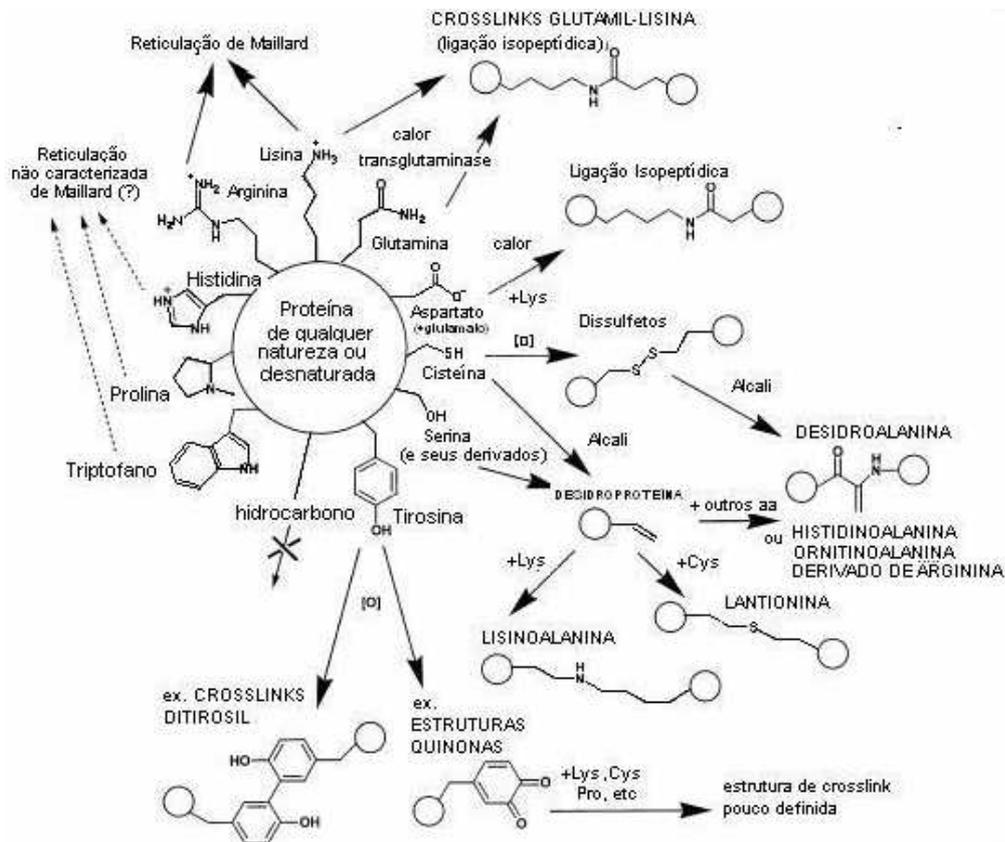


Figura 11. Possibilidades de reticulações entre diferentes grupos da proteína. Os quadros contêm as duas possibilidades de se ligar aminas residuais [Adaptado de GERRARD, 2002].

A reticulação pode ser química ou via enzimática, uma alternativa mais adequada para utilização em alimentos [DICKINSON, 1997]. No entanto, o grau e o tipo de reticulação podem diferir de acordo com o agente reticulante. Métodos físicos como o tratamento dehidrotérmico (DHT), fotooxidação, microondas e irradiação ultravioleta [RAY-NENG et al., 2005] também podem ser empregados, em alguns casos.

Muitos agentes químicos de reticulação são disponíveis comercialmente, e a maioria dos grupos reativos usados para imobilizar proteínas (glutaraldeído, brometo de cianogênio, etc) é capaz de produzir ligações estáveis com resíduos específicos sob condições brandas (por exemplo, pH neutro) [MATEO et al., 2005]. Usualmente, eles são reagentes com dois lados reativos derivados de moléculas desenvolvidas para reagir com as cadeias laterais das proteínas [FEENEY & WHITAKER, 1984] e geralmente ligam-se a resíduos de lisina ou cisteína (Figura 12).

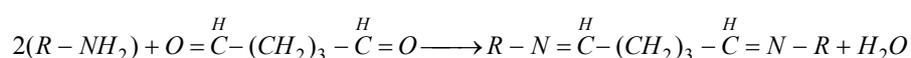


Figura 12. Reação de reticulação sobre a ação do glutaraldeído.

Muitos estudos indicaram que microcápsulas reticuladas com glutaraldeído, estrutura com dois aldeídos terminais, apresentaram propriedades desejadas de liberação controlada [LEE & ROSENBERG, 1999]. A reticulação com aldeídos é a principal utilizada na estruturação de paredes de micropartículas por ser mais rápida e potente.

O grau de reticulação está diretamente associado à concentração. Com baixas concentrações, o *crosslinking* intramolecular é predominante. À medida que se aumenta a concentração do glutaraldeído ocorre a formação de ligações transversais intermoleculares e conseqüente maior insolubilidade da proteína. No entanto, o glutaraldeído é conhecido por provocar calcificação e citotoxicidade [RAY-NENG et al., 2005] e por isso, esse reagente não é aprovado para uso em alimentos [SINGH et al., 1991]. Além disso, dúvidas têm surgido sobre a precisão com que a reatividade destes reagentes pode ser prevista [GREEN, REISLER & HOUK, 2001], mas eles permanecem amplamente usados para aplicações biotecnológicas e bioquímicas.

Existe um método para determinar a quantidade de *crosslinks* em matrizes protéicas [GILBERT & KIM, 1990; BUBNIS & OFNER, 1992], empregando TNBS (2,4,6-ácido trinitrobenzenosulfônico), um cromóforo UV

que reage especificamente com grupos amino primários [MWANGI & OFNER, 2004].

Como dito anteriormente, a reticulação química apresenta desvantagens de citotoxicidade e alta reatividade. Uma alternativa que vem sendo estudada em nosso grupo de pesquisa é a reticulação de matrizes protéicas com agentes menos tóxicos. Assim, métodos enzimáticos podem ser promissora-mente usados, pois por atuarem como catalisadores, não participam dos produtos finais (Figura 11).

A maioria das enzimas de interesse para modificações de proteínas são enzimas de *crosslinking* covalente e somente a transglutaminase (TG) está comumente disponível para catalisar formação de ligações covalentes entre moléculas de proteína em uma escala comercial [DICKINSON, 1997]. No entanto, seu uso é ainda pouco explorado e não existem na literatura trabalhos que utilizem esta enzima para alterar propriedades de barreira de micropartículas para liberação controlada.

Transglutaminases (TGases; γ -glutamilttransferase proteína-glutamine, EC 2.3.2.13) são distribuídas extensamente em vários organismos, incluindo vertebrados, invertebrados, plantas e microorganismos, e são responsáveis por certos eventos biológicos tais como o queratinização epidermal, coagulação do sangue e regulação das membranas do eritrócito. [RAY-NENG et al., 2005]. Os estudos na produção da TG por microorganismos começaram recentemente, sendo a enzima obtida a partir de fermentação microbiana. Produtos alimentícios tratados com a TG microbiana apresentaram sabor, aparência e textura melhorados. Além disso, esta enzima pode aumentar a vida de prateleira e reduzir a alergenicidade de determinados alimentos [ZHU et al., 1995].

A enzima TG catalisa a reação de transferência de acil entre o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina ($R'-NH_2$, doador) e um grupo γ -carboxiamida de um resíduo glutaminil ($R-CONH_2$,ceptor) [FOLK & CHUNG, 1985] (Figura 13). A modificação de proteínas alimentares pela TG pode conduzir a produtos

texturizados, ajudar a proteger a lisina das várias reações químicas, encapsular lipídios e/ou materiais solúveis em lipídios, melhorar a elasticidade e a capacidade de ligação de água, modificar a solubilidade e as propriedades funcionais, e produzir proteínas com valor nutritivo mais elevado através do *crosslinking* de diferentes proteínas [MATHEIS & WHITAKER, 1987]. A taxa de *crosslinking* pela TG é dependente da estrutura macromolecular de cada substrato de proteína uma vez que os resíduos reativos estão inseridos em regiões flexíveis da cadeia polipeptídica. Outros fatores que afetam a taxa de reação são a temperatura, pH e conteúdo de cálcio [DICKINSON, 1997]. A transglutaminase opera efetivamente na faixa de pH de 4-9 e de 0-50°C [MOTOKI & SEGURO, 1998].

A polimerização das proteínas pode ser conseguida em conseqüência da formação das ligações intermoleculares ou intramoleculares do grupo ϵ -(γ - glutamil) lisina [FOLK & CHUNG, 1985]. Recentemente, uma transglutaminase microbiana (MTGase) isolada do meio de cultura do *Streptoverticillium mobaraense* tornou-se comercialmente disponível. Ao contrário de TGases de muitas outras fontes, as MTGases possuem muitas características, incluindo a independência de Ca^{2+} , maior especificidade para doadores de acil, menor tamanho da molécula e taxa de reação mais elevada, as quais as tornam apropriadas para as aplicações industriais [RADEK et al., 1993; ANDO et al., 1989].

Vários produtos comerciais fazem uso da transglutaminase e em todos os casos é observado que ela melhora a estabilidade térmica, firmeza e elasticidade [KURASHI, YAMAZAKI & SUSU, 2001]. Ela também apresenta capacidade de reduzir a alergenicidade de algumas proteínas [WATANABE et al., 1994] e não apresentou citotoxicidade [CHEN, HO & SHEU, 2005].

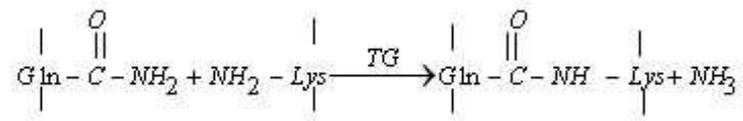


Figura 13. Reação de reticulação da proteína sob ação da enzima transglutaminase.

3.5 Liberação modificada

A liberação do ativo microencapsulado em quantidade e velocidade controladas é um dos principais objetivos da microencapsulação. Existem muitos produtos formulados para atrasar a liberação ou programar a velocidade e a duração de liberação do princípio ativo. Os sistemas *drug delivery* são projetados para fornecer uma quantidade mais eficaz de ativos num período de tempo otimizado, a fim de evitar fenômenos de sub ou superdosagem, além de diminuir os efeitos indesejados. Estes sistemas apresentam como principal vantagem a manutenção do nível de ativo no meio, em concentrações dentro da zona da eficácia com uma única administração. No setor farmacêutico, isto garante o sucesso da terapia por parte do paciente que, por diminuir o número de dosagens, reduz o risco de esquecimento ou auto ajuste na ingestão da droga [STWEARD, 2003].

As previsões são de que o mercado para tecnologias de *drug delivery* nos ESTADOS UNIDOS tenha um aumento de \$19 bilhões em 2000 para mais de \$41 bilhões em 2007 [KANGA, 2005]. Avanços tecnológicos são perceptíveis especialmente na área de cosméticos onde além da eficácia do princípio ativo, são desenvolvidas tecnologias para prolongar a entrega dos ingredientes incluindo a possibilidade de utilizar diferentes rotas de fornecimento. Isto inclui um grande segmento que é a nanotecnologia [RODRIGUEZ, 2005].

É importante obter uma melhor compreensão da influência do ambiente biológico no desempenho da liberação de vários sistemas da entrega. Mais de 90% das drogas aprovadas desde 1995 têm baixa solubilidade, baixa permeabilidade, ou ambos. Mais de 40% das drogas recentemente descobertas apresentam muito baixa solubilidade em água [KANGA, 2005]. No caso da via transdérmica, muitos dos agentes ativos são peptídeos ou proteínas, contudo a pele é uma barreira extremamente eficaz e altamente impermeável aos peptídeos e às proteínas de alto peso molecular. Drogas com alta solubilidade em lipídeos são mais facilmente transportadas através da membrana celular e as com baixa solubilidade, devido à ionização, necessitam de um sistema de

transporte ativo, porque as moléculas ionizadas não penetram as membranas [NYSTROM & WESTERBERG, 1986].

O coeficiente de partição de uma droga depende, sobretudo, da polaridade e de seu tamanho. As drogas com momento de dipolo elevado, mesmo que não-ionizadas, têm baixa solubilidade em lípides e, portanto baixa permeabilidade. A ionização reduz não somente a solubilidade em lípides, mas retarda também o movimento através das membranas carregadas. Conseqüentemente, as moléculas ionizadas não penetram as membranas. Nesses casos, a membrana requer a presença de agentes que neutralizem a carga ou protejam a molécula para que ocorra a absorção [LARSEN et al., 2002].

Muitas empresas estão desenvolvendo tecnologias avançadas de liberação modificada para fármacos com baixa solubilidade em água. Estas aproximações incluem dispersões contínuas, microemulsões, sistemas auto-emulsificantes, complexação, lipossomas e a criação de partículas nanoestruturadas com técnicas de formação e redução do tamanho da partícula [STWEARD, 2003].

A aplicação de modelagem molecular, de tecnologias de seleção de agentes de alta permeabilidade (*high-throughput screening*) e de química combinatorial resultou em compostos com propriedades e atividades que se assemelham aos mediadores naturais no corpo e que são projetadas para mimetizar seu sistema de ação. As vias de administração, também participam do projeto de desenvolvimento da partícula [NOORY et al., 2005].

Os sistemas orais, por exemplo, são dependentes do tempo do trânsito gastrointestinal o que diminui a biodisponibilidade; principalmente devido à liberação incompleta do princípio ativo no tempo demasiadamente curto de permanência no trato absorvente. O modo injetável exige, por outro lado, micropartículas erodíveis para a eficácia de administração [KUMAR & KUMAR, 2001].

O planejamento das formas de liberação controlada é cada vez mais voltado à introdução no mercado da molécula já formulada em um novo produto. O segmento do mercado deste tipo de produto farmacêutico destinado à forma oral é de aproximadamente 50%, seguido pelas formas de liberação pulmonar, transdérmicas e injetáveis, cobrindo respectivamente, aproximadamente 20%, 12% e 7% do mercado [NOORY et al., 2005].

No segmento de alimentos, a atenção se volta na otimização de encapsulação de agentes de compostos de aroma incluindo a proteção contra oxidação, perdas por volatilização e liberação controlada no preparo do produto ou no momento de ingestão.

3.5.1 Projeto de uma partícula

As microcápsulas oferecem diversas vantagens como sistemas de liberação sendo a mais importante, o fato de a cinética da liberação da droga poder ser alterada mudando-se as características da microcápsula carregadora. Na engenharia da partícula, para que ela tenha uma liberação apropriada às finalidades propostas, é imprescindível que se conheçam as limitações de aplicação bem como os fatores envolvidos na liberação do ativo, para definir o tipo de sistema a ser formulado: comprimido, cápsula, supositório, emplastro transdérmico ou solução.

PEPPAS & BRANNON-PEPPAS [1996] relataram que partículas visando a incorporação de agentes flavorizantes a serem utilizados como fragrâncias devem ser projetadas para apresentar liberação por períodos de 6 a 12 hrs, taxa de liberação preferivelmente constante, apresentarem-se secas e com tamanho entre 400 a 600 μ m, utilizarem polímeros inertes, não tóxicos e não carcinogênicos e possuírem estabilidade durante a estocagem. Alguns produtos são especialmente formulados para liberar o ingrediente ativo com lentidão, em geral durante doze horas ou mais, mas mesmo com redução da velocidade de dissolução do ativo, devem garanti-la, para que possa haver absorção do ativo. Assim, as partículas do ativo reunidas em uma cápsula podem ser

revestidas com polímeros de espessuras variáveis, e propriedades de barreira diferenciada [PEPPAS, 1997].

No tratamento da liberação assume-se que a distribuição do ativo dentro da partícula pode se encontrar sob duas maneiras. Em sistemas reservatórios (Figura 14B), o ativo concentrado é cercado pela membrana da partícula, já em sistemas matriciais (Figura 14A), o ativo é distribuído através da massa polimérica.

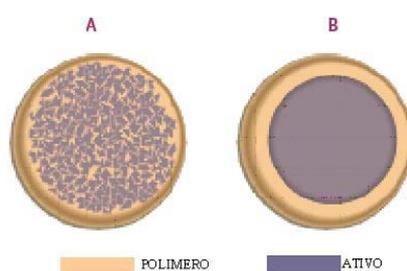


Figura 14. Definição do sistema pela distribuição do ativo. A. sistema matricial, B. sistema reservatório.

Além disso, o estado físico do polímero e da droga (cristalino, amorfo, vítreo, disperso molecularmente) deve ser levado em conta no mecanismo de liberação. Por exemplo, um polímero amorfo terá coeficiente de difusão muito maior comparado ao polímero cristalino [HOMBRERO-PEREZ et al., 2003] e partículas que contêm líquidos tenderão a serem absorvidas mais rapidamente comparadas às que contêm sólidos cristalinos.

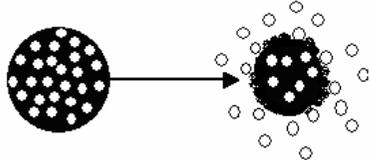
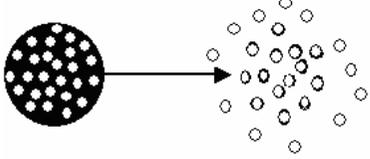
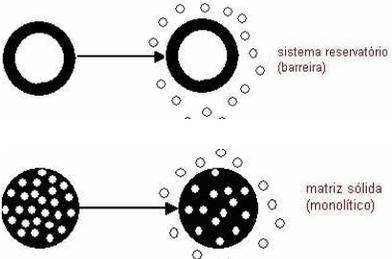
A liberação do composto ativo originalmente incorporado no polímero é limitada por quatro fatores importantes. 1. a carga inicial do óleo no polímero, 2. a solubilidade do óleo no solvente de liberação, 3. o coeficiente de partição do óleo no solvente e no polímero e 4. barreiras difusionais [PEPPAS & BRANNON-PEPPAS, 1996] que são função da estrutura da parede polimérica envolvida. Existem quatro modelos para enquadrar o tipo de liberação em função das características da barreira. 1) a parede da partícula não permite liberação e esta é iniciada pela ruptura da parede causada por uma força externa aplicada ou fatores como calor, luz, pH e degradações químicas da

parede da cápsula. 2) a parede é uma membrana contínua e por isso, supõe-se que a taxa de liberação do material de recheio é constante assim como o gradiente de concentração através da membrana. 3) a parede permite uma migração, porém um efeito adicional de liberação ocasiona pequenos rompimentos na estrutura da cápsula. 4) a parede é como uma membrana semipermeável e seletiva a diferentes pesos moleculares [THIES, 1995].

Assim, a modelagem da liberação deve considerar que a saída do ativo das partículas está sujeita a parâmetros físicos e químicos que incluem os diretamente relacionados com o meio de liberação e as mudanças das características do sistema, como o tamanho da partícula, a espessura da parede, etc [BACHTSI & KIPARISSIDES, 1996].

Três diferentes mecanismos podem ser identificados: os controlados pelo solvente, pela difusão e os quimicamente controlados. Uma representação esquemática é apresentada na Tabela 4 sobre os mecanismos geralmente envolvidos em processos de liberação.

Tabela 4. Possíveis mecanismos de liberação controlada a partir de micropartículas com distribuição matricial ou monolítica do ativo.

Liberação controlada	Mecanismo de liberação	Principal vantagem	Desvantagens	
Sistemas erodíveis-quimicamente controlados (A)	Combinação da quebra do polímero e da difusão do ativo através da matriz	Polímeros degradáveis (método não invasivo para extração)	Dificuldade de recuperar as partículas	
Pela difusão do solvente (B)	O fluxo da água controla a liberação	Difusividade em polímeros inchados permite a difusão da droga fora da matriz	Polímeros tipicamente não degradáveis	
Pela difusão do ativo (C)	Difusão na matriz polimérica (monolítico) ou através de uma barreira	Taxa de difusão definida e controlada pelos simples cálculos da difusão do ativo	São não degradáveis Difusão de moléculas grandes é muito lenta para ser eficaz. Risco de alta dosagem em sistemas de barreira	

Essa classificação representa situações teóricas onde a taxa de difusão é predominantemente controlada por um desses fatores. Obviamente em muitos sistemas práticos, a taxa de liberação pode ser afetada por várias combinações dos mecanismos acima [ZASLAVSKY, 1994].

A. Sistemas biodegradáveis podem ser reservatórios ou matriz e o processo de biodegradação deve gerar componentes atóxicos. Existem duas cinéticas de liberação em sistemas matriciais erodíveis. No primeiro, a partícula é formulada para reduzir a liberação com o tempo, já que a superfície de área do polímero também é reduzida. Estes sistemas são projetados para conter maior quantidade de ativo no interior da partícula que nas proximidades da superfície. Um segundo caso é utilizar-se de polímeros que se degradam lentamente num estágio inicial, mas a taxa de degradação aumenta rapidamente por um processo de auto-catálise e seu interior é erodido num período bastante curto. A liberação, neste caso, pode ser controlada pela difusão, erosão ou ambos e FAISANT, SIEPMANN & BENOIT [2002] propuseram uma teoria matemática simples para explicá-la, considerando o estado tempo-dependente da rede polimérica. O controle químico da liberação da droga é conseguido regulando a degradação do polímero que resulta na liberação da droga encapsulada na matriz do polímero [DHOOT, 2003].

B. O mecanismo da liberação neste caso ocorre pelo inchamento do polímero ou pela criação de poros devido à penetração da água em consequência da pressão osmótica [DHOOT, 2003]. O ativo, antes da inserção da matriz polimérica num meio termodinamicamente compatível, era incapaz de difundir-se. O polímero após a penetração do fluido, passa do estado vítreo a gel, e neste estado a cadeia polimérica é mais móvel permitindo a difusão do ativo mais rapidamente.

C. Num sistema reservatório ou matriz consistindo de polímeros não-degradáveis, a taxa de liberação é estritamente controlada pela difusão da droga através da membrana polimérica [THIES, 1995] e a cinética de liberação

pode ter diferentes perfis, sendo o de primeira ordem freqüentemente encontrado em substâncias microencapsuladas.

Os fenômenos de transporte de massa que ocorrem durante a liberação de partículas formuladas com este tipo de polímero são [HOMBRERO-PEREZ et al., 2003]: i) a inibição do meio de liberação devido aos gradientes de concentração, ii) dissolução do ativo, iii) difusão do ativo através da matriz polimérica e/ ou através de poros, na seqüência e/ou simultaneamente, iv) difusão do ativo através do filme de líquido estagnado na superfície da partícula, v) transporte convectivo e difusivo no meio de liberação.

3.5.2 Modelos matemáticos para o sistema difusivo: Ativo solubilizado e sistema matricial monolítico

A liberação de um agente ativo de um carreador polimérico consiste no movimento desse agente através do polímero, ou melhor, através de uma membrana e é descrito como um processo *multistep*. As moléculas colidem com a superfície do polímero, adsorvem, se difundem através dos poros da cadeia de polímeros e se desorvem. A absorção, o transporte através dos capilares, a penetração nas células, a excreção, são todos exemplos de passagem através de uma membrana. O fenômeno, conhecido como difusão, é principalmente controlado pelas limitações da transferência de massa na camada entre a matriz polimérica e o meio. Ela é passiva, se a força motriz é puramente um movimento molecular browniano, mas difusão pode ser ativada por efeitos externos, como pela influência do meio de liberação, pelo inchamento ou biodegradação, ou por efeito de forças físicas como forças convectivas, osmóticas ou elétricas.

Muitos modelos são baseados no processo difusivo e o fenômeno da difusão está intimamente relacionado à estrutura do material através do qual ocorre a difusão. Desta forma, a morfologia dos materiais poliméricos deve ser cuidadosamente observada para sucesso do modelo. Além disso, de acordo com a dispersão do ativo na matriz, os sistemas projetados enquadram-se como matrizes ou reservatório e as propriedades críticas desses modelos são

as considerações de solubilidade do ativo no polímero e sua difusividade na membrana. As matrizes monolíticas são as mais simples usadas para controlar a liberação das drogas e foram anteriormente descritas como sistemas matriciais (Figura 14). Os interstícios de materiais poliméricos são os principais responsáveis pelo controle da liberação. A expressão matemática que representa o ativo dissolvido na matriz polimérica cuja geometria é esférica pode ser descrita pela segunda lei de Fick como [KIM, 2000]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \left(\frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \right) \quad \text{Equação 5}$$

D = coeficiente de difusão do ativo na membrana; $\partial C/\partial r$ = gradiente de concentração na membrana; r = raio da esfera; $\partial C/\partial t$ = diminuição de concentração ao longo do tempo.

Um grande esforço tem sido feito até agora para desenvolver modelos matemáticos que descrevem uma grande variedade de sistemas de liberação controlada. Os modelos desenvolvidos para o transporte molecular do ativo constituem uma premissa indispensável para a discussão da liberação ou absorção de um ativo encapsulado durante o estágio de fabricação ou na verificação experimental do mecanismo de liberação. No sentido de desenvolver um mecanismo de liberação particular, dados experimentais de significância estatística são comparados à solução do modelo teórico. Portanto, uma combinação de dados acurados e precisos com modelos que reproduzem a situação física pode permitir desenvolver o real mecanismo de liberação [PEPPAS et al., 2000]. Na literatura, a grande maioria dos trabalhos estudou a difusão de substâncias em sistemas aquosos [VANDENBERG et al., 2004; WIELAND-BERGHAUSEN et al., 2002]. Existe, no entanto, uma grande dificuldade em modelar, desenvolver e mensurar um sistema de liberação para ativos hidrofóbicos em meio de liberação aquoso, já que a solubilidade do óleo no meio de liberação é um fator determinante que influencia a taxa de liberação do óleo encapsulado [BACHTSI & KIPARISSIDES, 1996].

3.5.2.1 Fundamentos da difusão

A um nível macroscópico, a difusão caracteriza-se pela passagem de moléculas com agitação intrínseca (movimento browniano) causada principalmente pela diferença de concentração entre dois compartimentos separados por uma superfície. O movimento browniano de uma partícula em suspensão resulta do fato de que ela está continuamente sendo bombardeada pelas moléculas que compõem o meio, as quais estão em constante agitação térmica.

Diversas considerações tem sido implicitamente incorporadas à Equação 5. Primeiramente, a modelagem de Fick é adaptada a sistemas difusionais passivos onde o coeficiente de difusão (D) deve ser suposto constante e independente da concentração, sem modificação das propriedades físico-químicas do polímero durante a liberação. Além disso, algumas premissas podem ser assumidas para gerar modelos adequados a cada caso. Adotando que o diâmetro da partícula não se altere do início ao final do experimento, a Equação 5 pode ser integrada a:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \left(\frac{Dt}{r^2} \right)^{0.5} \left\{ \pi^{-0.5} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \operatorname{ierfc} \frac{nr}{(Dt)^{0.5}} \right\} - \frac{3Dt}{r^2} \quad (\text{Equação 6, CRANK, 1956})$$

Onde, M_t/M_0 é a quantidade fracional liberada do ativo, sendo M_t a massa de soluto liberada no tempo t e M_∞ , a massa de soluto liberada num tempo infinito (ou seja, quando se atinge o equilíbrio). Este método assume como outras hipóteses restritivas que não há contribuição convectiva e que as dimensões da partícula permanecem constantes sem que haja inchamento ou quebras [FAVRE et al., 2001].

Como anteriormente mencionado, o tratamento matemático da difusão depende se a droga está dispersa ou dissolvida no polímero. Considerando que a quantidade de ativo liberado é menor que a condição de saturação do meio de liberação (condições muito diluídas), no sistema matriz, onde a droga é

dissolvida na matriz polimérica, a liberação é representada matematicamente, para uma partícula esférica, pela equação [HENRY et al., 1992]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \left(\frac{Dt}{\pi r^2} \right)^{0,5} - \frac{3Dt}{r^2} \quad \text{Equação 7}$$

Esta equação é válida para os primeiros 70% do ativo total liberado. Após isso, a cinética segue a cinética de ordem zero. A razão pela redução na taxa de liberação é um aumento do caminho difusional [BAKER & LONSDALE, 1974]. Este problema pode ser evitado pelo uso de geometria especial que promove um aumento na área de superfície com o tempo [LANGER, 1980].

Polímeros na forma de bastões, cilindros ou esferas permitem que as moléculas do ativo difundam na matriz, dissolvam-se no polímero e permaneçam solúveis mesmo após a secagem. A droga dispersa no polímero deve estar numa quantidade inferior à seu limite de solubilidade no mesmo. Assim, a taxa de dissolução é governada pela penetração do solvente na matriz que em contato com o ativo dissolve-o imediatamente e a solução insaturada difunde para fora da matriz [KIM, 2000].

O coeficiente de difusão, D , é uma medida da velocidade de movimento das moléculas no polímero. O coeficiente de solubilidade, S , é uma indicação do número de moléculas permeantes que estão difundindo. Juntos, eles descrevem o coeficiente de permeabilidade, P ($P=D \times S$), onde S obedece à lei de Henry [DELASSUS, 1997]. Esta lei deve ser usada para a descrição de um fenômeno transiente onde o perfil de concentração do ativo no polímero não é constante durante a difusão e é linear: por maior que a diferença de concentração entre os dois lados da membrana se torne, o fluxo permanece proporcional ao gradiente, ou seja, não existe um processo de saturação.

O coeficiente de difusão do ativo pode também ser determinada para grandes valores de tempo quando a quantidade de ativo liberada é superior a 70%, ou seja, com $0.7 \leq M_t/M_\infty \leq 1.0$:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} e^{-\frac{\pi^2 D t}{r^2}} \quad \text{Equação 8}$$

3.6 Utilização de tensoativos para alteração de solubilidade no acompanhamento da liberação

O desenvolvimento de um procedimento de dissolução para produtos com solubilidade limitada em água é um desafio para a indústria. A liberação do composto ativo é usualmente o processo limitante para a absorção de compostos com baixa solubilidade. No corpo humano, tensoativos naturais auxiliam na dissolução e subsequente absorção do composto com solubilidade aquosa limitada [BOGNOLO, 1999]. *In vitro*, varias técnicas têm sido usadas para conseguir dissolução adequada de ativos insolúveis ou parcialmente solúveis que dependem da droga e das condições do teste de dissolução como composição e volume do meio de dissolução, pH, tipo de aparato e forma de agitação [GANDER et al., 1985].

No desenvolvimento de um teste de dissolução para compostos insolúveis ou parcialmente solúveis, uma variedade de mecanismos foi usada para aumentar a solubilidade do composto, incluindo adição de álcool [KIDCHOB, KIMURA & IMANISHI, 1996] ou outros solventes orgânicos ao meio aquoso [CHANG et al., 2003], aumentar o volume de liberação e a taxa de agitação. Porém, existe uma falta de relevância fisiológica destes métodos [SHAH et al., 1995].

A Food and Drug Administration (FDA) avaliou o efeito de tensoativos que existem naturalmente e os comparou com os comercialmente disponíveis [SHAH et al., 1989]. Por causa da relevância fisiológica dos tensoativos, a FDA geralmente aceita seu uso em testes de dissolução de drogas com solubilidade limitada. Tensoativos comerciais foram usados com sucesso para aumentar a solubilidade em testes de dissolução de muitas drogas, por exemplo, carbamazepina [CARTHEW et al., 1996], griseofulvina [NYSTROM & WESTERBERG, 1986], flucitosina [BONNY & KYOWA, 1995], sulfametoxazol

[GADALLA & EBRAN, 1986], prednisolona [SCHOTT, KWAN & FELDMAN, 1982], danazol [SHAH et al., 1995], acetato de megestrol [SCHOTT, KWAN & FELDMAN, 1982], prazosina HCl [SCHOTT, KWAN & FELDMAN, 1982], quinesterol [SCHOTT, KWAN & FELDMAN, 1982] e de alguns contraceptivos [NGUYEN et al., 1990].

LARSEN et al. [2001] investigaram a taxa de liberação de uma droga veiculada em solvente oleoso em uma célula de diálise rotativa. Uma correlação log-linear foi estabelecida entre a constante de liberação até o equilíbrio ser atingido (K_{obs}) e o log do coeficiente de partição aparente entre o veículo oleoso e o meio de liberação usando vários ácidos e bases fracos e não-eletrólitos inseridos no meio aquoso.

Microcápsulas de polivinil álcool (PVA) contendo óleo santosol foram preparadas por coacervação simples e a taxa de liberação do óleo em um modelo de solução contendo tensoativo foi investigada. A taxa de liberação do óleo exibiu um modelo cinético de primeira ordem. O coeficiente de permeabilidade mostrou forte dependência com as condições do meio de liberação e com as características morfológicas e físicas das microcápsulas [BACHTSI & KIPARISSIDES, 1996].

3.6.1 Fenômenos superficiais

A tensão superficial de um líquido é uma pressão interna causada pela atração de moléculas que tende a restringir a tendência do líquido de fluir e, quando em contato com outra substância, forma uma interface. Ela também é a responsável pela forma da gota do líquido, que terá suas moléculas com maior tendência a estarem juntas quanto maior a tensão superficial. A tensão superficial de um líquido puro pode ser reduzida pela adição de uma substância conhecida como surfactante.

O termo surfactante é a contração de "agente ativo de superfície" e sua atividade interfacial pode ser explicada em termos de sua estrutura molecular, que promove uma ampla faixa de funções químicas de superfície: agentes

molhantes, solubilizantes, espumantes, lubrificantes e modificadores de reologia. Surfactantes ou tensoativos também possuem papel fundamental na absorção das drogas no corpo [WANG et al., 1996]. Eles são representados esquematicamente por uma cabeça polar e uma cauda apolar onde suas dimensões relativas os identificam qualitativamente quanto à prevalência da fração polar ou apolar na molécula. De acordo com o caráter do grupo hidrofílico, há quatro classificações principais para os surfactantes: aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfotéricos. Um tensoativo não-iônico não apresenta grupos ionizáveis em soluções aquosas. Tensoativos aniônicos são aquossolúveis e dissociam-se em íons negativos (solúveis em água) e íons positivamente carregados. Os tensoativos catiônicos são assim chamados pela fração solúvel dissociada ser positiva. Os surfactantes anfotéricos possuem carga positiva em soluções ácidas, zero em pHs moderados (ponto isoelétrico do surfactante) e negativa, em solução alcalina [GRIFFITHS & CHEUNG, 2002].

A formação de micelas é o mecanismo encontrado pelas moléculas anfifílicas de surfactantes, para compensar as forças naturais de atração e repulsão entre as moléculas [MANIASSO, 2001]. Esta concentração, conhecida por concentração micelar crítica (CMC), é atingida pelo aumento da concentração do tensoativo, que se encontrava predominantemente na forma de monômeros. O arranjo micelar consiste de regiões internas hidrofóbicas rodeadas por regiões hidrofílicas das cabeças dos surfactantes, que estarão expostas ao meio para interação com a água [SEBBA, 1987]. A micela é um mecanismo alternativo de adsorção pelo qual a energia interfacial do sistema diminui e que apresenta o poder de solubilizar os mais variados solutos. A quantidade de soluto solubilizada é, em geral, diretamente proporcional a concentração de surfactante, desde que a concentração seja igual ou superior a CMC [MANIASSO, 2001]. *In vivo* [CRISON et al., 1996; CRISON, WEINER & AMIDON, 1997] tensoativos (aniônicos, não-iônicos ou catiônicos) estão disponíveis para solubilizar drogas. Parâmetros como temperatura, ambiente e o pH também influenciarão a solubilidade de uma droga dentro da micela [CARTHEW et al., 1996].

Tensoativos e polímeros aquossolúveis estão presentes em muitas formulações e processos industriais. O tensoativo é adicionado para melhorar as propriedades do polímero e vice-versa (sinergismo) ou também para produzir propriedades que nem o tensoativo nem o polímero possuem sozinhos. As aplicações e os numerosos usos dos sistemas polímeros/tensoativos foram extensivamente revisadas [MALMSTEN, 2002]. Adicionalmente, mudanças importantes nas propriedades de ambos ocorrem freqüentemente quando estes dois tipos de compostos são usados juntos, o que despertou o interesse por este sistema e o estudo das interações polímero/tensoativo constitui-se em um tópico chamado de ciência do tensoativo.

Trabalhos em sistemas mistos polímero/tensoativos estão sendo publicados em grande número e o campo foi recentemente revisado [GODDARD, 1993; KWAK, 1998]. A maioria dos estudos observa que a interação entre o tensoativo e o polímero é feita não covalentemente, i.e., somente sistemas não associativos são considerados, conforme terminologia introduzida por PICULLEL & LINDMAN [1992]. Entre polímeros aquossolúveis, polímeros neutros têm propriedades de solução menos complexas do que polímeros carregados (polieletrólitos). Não obstante, a interação entre polímeros neutros e tensoativos é menos compreendida do que aquela entre polieletrólitos e tensoativos. Certamente, no segundo tipo, interações eletrostáticas dominam e determinam se uma interação ocorre. No caso do polímero neutro as interações eletrostáticas são muito mais fracas e outros mecanismos são responsáveis pela interação com o polímero [BENRRAOU, BALES & ZANA, 2003].

3.6.2 Balanço Hidrofílico-Hidrofóbico

O balanço hidrofílico-hidrofóbico (HLB) é a determinação quantitativa da relação entre a porção polar (hidrofílica) e apolar (lipofílica). Este índice serve para classificar os tensoativos em grupos dentro dos quais eles desempenham a mesma função (Tabela 5).

Tabela 5. Faixas de aplicação de tensoativos de acordo com o HLB.

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

Adaptado de KOGA et al., 2000

Ele pode ser representado pela massa molecular da parte hidrofílica de toda a molécula de tensoativo dividido por 5. Isto significa que o intervalo de definição da escala de HLB é compreendido de 0 a 20, por exemplos etanol (7,9), monolaurato de sorbitana - span20 (8,6-10), tween 80 (15). Este parâmetro foi introduzido por GRIFFIN [1949, 1954].

Para o cálculo de HLB são propostas outras fórmulas que, especialmente no caso de tensoativos iônicos, nem sempre estão de acordo com os dados obtidos experimentalmente. Por exemplo, o dodecilsulfato de sódio (SDS), por causa de sua ionização mostra um valor de HLB de aproximadamente 40. Outra forma de classificá-los é quanto à função química:

Tensoativos aniônicos: apresentam cargas negativas e seus limites de emprego residem na sensibilidade às cargas de sinais opostos (que podem favorecer a precipitação) e ao pH (devido à dissociação). Geralmente são sabões/detergentes.

Detergentes iônicos, como o SDS, ligam a maioria das proteínas com alta afinidade [REYNOLDS et al., 1967; DECKER & FOSTER, 1966; IKAI, 1976]. As interações são governadas pelo estado de agregação do detergente. Enquanto detergentes monoméricos ligam ao estado nativo como ligantes convencionais, isto é, ligam a um pequeno número de sítios de uma maneira saturável [REYNOLDS E TANFORD, 1970; YONATH et al., 1977; BORDBAR et al., 1997], micelas agem como desnaturantes. Assim o desdobramento global da proteína ocorre geralmente acima da concentração micelar crítica (cmc),

que para o SDS é ~7 mM em água [REYNOLDS et al., 1967; JONES, SKINNER & TIPPING, 1975; TURRO et al., 1995; GIMEL & BROWN, 1996].

A habilidade em desnaturar partes das proteínas deve-se às propriedades anfífilas da proteína e do detergente. Por exemplo, SDS liga-se às proteínas através das interações entre o grupo sulfato e as cadeias laterais positivamente carregadas do aminoácido, e entre o grupo alquil e as cadeias laterais hidrofóbicas [WANG et al., 1996; YONATH et al., 1977].

Tensoativos catiônicos: apresentam carga positiva e possuem limites análogos ao tensoativos aniônicos.

Tensoativos não iônicos: são obtidos acoplando-se a porção apolar a uma função não ionizável mas com características polares.

Tensoativos anfólicos: são constituídos de uma molécula de glicerina onde duas hidroxilas são esterificadas com ácidos graxos, e a terceira hidroxila é acoplada ao ácido fosfórico que por sua vez se encontra ligado à colina. Estas substâncias tem elevada concentração micelar crítica por terem a estrutura ramificada e apresentarem-se solúveis em água.

3.6.3 Toxicidade

Tween 80 pertence à classe de aditivos alimentares também conhecidos como Polisorbatos. Span 80 ou Sorbitana monooleato é um éster de sorbitana amplamente usado em produtos alimentícios e farmacêuticos orais. Ambos são considerados tensoativos não iônicos e são listados na Farmacopéia USP/NF, BP, EP, etc., como um excipiente farmacêutico aprovado para uso em preparações orais [EPIC, 2003].

Tween 80 e Span 80 são aprovados para o uso em produtos alimentícios específicos e são reconhecidos como seguros (GRAS). São praticamente não irritantes possuindo uma toxicidade potencial muito baixa. A ingestão diária em decigrama por quilograma de peso corpóreo, corresponde a um adulto pesando 70 kg consumindo cerca de 1,75mg de Tween 80 diariamente sem qualquer

risco de toxicidade potencial. Tween 80 é aprovado para uso na Austrália, Brasil, China, República Tcheca, União Européia, Índia, Japão, Suíça, USA e muitos outros países [EPIC, 2003].

Dodecilsulfato de sódio (SDS) é muito utilizado em aplicações tópicas apesar de poder causar irritação. Os danos à barreira causada pelo SDS *in vivo* são menores quando o SDS for usado em combinação com outros tensoativos capazes de reduzir sua concentração micelar crítica (CMC) [BENASSI et al., 2003].

3.7 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, mesclas de substâncias orgânicas odoríferas, refringentes, e formam-se num grande número de plantas como subprodutos do metabolismo secundário. São extraídos mediante destilação por vapor de água, extração pura e simples ou outras técnicas (por pressão, por absorção de gorduras em perfumaria, etc.) de plantas frescas ou secas [ASHURST, 1990], onde se acumulam em certos tecidos no seio das células, sob a epiderme dos pêlos, das glândulas ou nos espaços intracelulares [CRAVEIRO, 1993]

O mercado internacional de óleos essenciais é responsável pela movimentação de US\$1 bilhão, dos quais 72% são adquiridos por empresas dos EUA, Europa e Japão. A produção mundial registrada em 1999 foi de 70 mil toneladas, onde a demanda por aromas naturais (80%) foi muito superior aos artificiais (20%) [SINK & LABUDA, 1999].

A indústria de compostos de aroma tornou-se elemento vital no crescimento da indústria de alimentos e bebidas [ASHURST, 1990]. Também são muito utilizados como fonte de fragrâncias em perfumes e loções, e sua composição química pode variar com a parte da planta de onde são extraídos, a variedade, o solo e o clima. A maior parte dos óleos essenciais pode ser representada como uma mistura complexa de compostos polares (álcoois,

ésteres, cetonas, aldeídos, éteres, lactonas, etc.) e apolares (hidrocarbonetos) [LAWRENCE, 1995].

O uso farmacêutico dos óleos essenciais fundamenta-se nas suas propriedades fisiológicas incluindo perfume e sabor, efeito irritante sobre a pele e as mucosas, suas propriedades desinfetantes e sua ação bactericida.

As essências de anis, de funcho, etc. (*Oleum anisi*, *Oleum foeniculi*) são muitas vezes usadas como expectorantes, pois são eliminadas pelos pulmões e desinfetam assim diretamente as vias respiratórias. São usadas também em gargarejos, inalações e gotas nasais. A sua absorção facilita os processos digestivos; atuam como estomacais e expectorante. A maior parte das plantas com essências são usadas como aromatizantes (chicória, funcho, anis, manjerona, tomilho, orégano). O efeito de irritar a pele é aproveitado através de aplicações externas anti-reumatismo.

As essências naturais devem ser conservadas, bem como as plantas que as contêm, em recipientes bem fechados ao abrigo da luz, pois se oxidam rapidamente à luz e ao ar, polimerizam-se, transformam-se em resinas e perdem o odor e a ação que as caracterizam.

3.7.1 Óleo essencial de vetiver

O óleo essencial destilado das raízes do vetiver, uma gramínea muito utilizada com a função de impedir a erosão do solo, é uma mistura complexa de álcoois (khusimol, epiglobulol, spathulenol, khusinol), sesquiterpenos (γ - cadeneno, cloveno, α - amorfeno, aromadendrina, junipeno), cetonas (α e β -vetivona, khusimona) e hidrocarbonetos [DEMOLE, HOLZNER & YOUSSEFI, 1995]. Os constituintes variam de acordo com o lugar de origem. O óleo de Java, por exemplo, pode conter 8-35% de cetonas (vetivonas), 45-65% de vetivenóis, vetivenil vetivenato, ácido vetivênico, ácido palmítico, benzóico e vetiveno [ADAMS et al., 2003].

A alta solubilidade do óleo de vetiver em álcool (1:3 partes de álcool 80%) e na maioria dos óleos facilita sua miscibilidade com os outros materiais

utilizados na confecção de perfumes, o que torna o óleo bastante importante como recurso na área de perfumaria, não existindo nenhum substituto sintético disponível [MERCK,1996].

O óleo de vetiver é o ingrediente principal em 36% de todos os perfumes ocidentais de qualidade e em 20% de todas as fragrâncias para homens. O comércio mundial anual do óleo de vetiver é estimado ser ao redor 250 toneladas, com Haiti, Indonésia (Java), China, Índia, Brasil, Japão sendo os produtores principais, e EUA, Europa, Índia, e Japão os principais consumidores [LAVANIA, 2002].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Gelatina (tipo A, bovina, bloom 244, Leiner Davis, lote LF 21502/04, conforme fornecido pelo fabricante, ponto isoelétrico característico 7-9 [POPPE, 1997]), e os polissacarídeos Pectina cítrica (tipo 8002/R, Citrus Colloids, baixo teor de metoxilação) e Goma-arábica (CNI-Rouen, France, ref. IRX49345) foram usados como materiais formadores de parede. Óleo de vetiver comercial (lote0210222, Dierberger Óleos Essenciais (Barra Bonita-SP-Brasil)), óleo mineral (Nujol, Schering-Plough lote 303), e óleo de amêndoas (*Prunus amygdalus* var. dulce, Bioessencia-Produtos Naturais Ltda, lote 0406291) foram usados como material ativo encapsulado.

4.2 Outros reagentes

Glutaraldeído foi adquirido da Sigma (São Paulo, SP, Brasil), Transglutaminase Activa TG-S® (Interamericana Ind. E Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil, atividade nominal 100U/g) foi cedida por Ajinomoto, marcador Cloreto de Dansila (*5-dimethylamin-1-naphthalenesulfonylchloride* 99%-Avocado Research Chemicals Ltda, Heysham, LA, England). Estearato de metila P.A. foi adquirido da Merck (São Paulo, Brasil). Todos os solventes e os demais reagentes foram de grau analítico e água deionizada foi usada em todos os experimentos.

4.3 Caracterização dos materiais

Os materiais de parede foram caracterizados através da composição centesimal e em minerais [AOAC, 1990]. Os pesos moleculares foram estimados por viscosidade intrínseca. A viscosidade das soluções poliméricas e dos óleos utilizados foi medida a 50°C, em viscosímetro digital Brookfield (mod. LVTDVII, Brookfield Engineering Laboratories, INC, Stoughton, USA). O *spindle* utilizado foi o de nº.00, e a velocidade foi de 30 rpm (solução 2,5% (p/v) de pectina e os óleos) e 60 rpm (soluções 2,5% (p/v) de goma arábica e gelatina).

A densidade real do óleo à temperatura ambiente foi feita com picnômetro (20mL) e a aparente foi relativa a água na mesma temperatura. As medidas de tensão interfacial entre os óleos e a solução 2,5% p/v da gelatina a 50°C - controlada por banho termostático- e superficial entre os óleos e o ar a 25°C foram feitas usando um tensiômetro digital com anel (KSV instruments, model Sigma 701).

4.3.1 Análise do óleo de vetiver

A composição do óleo essencial de vetiver utilizado foi investigada usando Cromatografia Gasosa/Espectrometria de massa (CG/MS) e Cromatografia Gasosa (CG). Análises em CG/MS foram feitas em um cromatógrafo a gás Hewlett Packard-6890 acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard HP 5973 (Hewlett Packard, Milan, Italy). Foi empregada uma coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), fase ligada 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano e usando argônio como gás carreador. O programa de temperatura foi de 110°C-230°C, a 2°C/min. Temperaturas do injetor e detector foram de 200°C e 300°C respectivamente. Injeção de 1 µL de amostra, 100:1 split, fluxo do gás carreador = 1 mL/min a fluxo constante.

Análises em CG/FID foram feitas usando cromatógrafo Hewlett Packard-6890 GC equipado com detectores de ionização de chama (FID). Uma coluna capilar SA-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm, 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano, Sigma-Aldrich) foi usada com mesmo programa de temperatura descrito acima.

Todas as análises foram preparadas em álcool etílico anidro. Índices de retenção dos compostos foram calculados [KOVATS, 1965] pela injeção nas duas colunas de uma amostra contendo uma mistura de *n*-alcanos (C5-C22) nas mesmas condições descritas acima. A tentativa de identificação dos componentes do óleo foi feita por comparação de seus índices de retenção bem como seus padrões de fragmentação de massa com os dados de espectros publicados [ADAMS, 2001; WEYERSTAHL *et al.* 2000 a e b; ANDERSEN, 1970; CAZAUSSUS *et al.*, 1988].

4.3.2 Obtenção do Composto Fluorescente – Dansilato de Khusimila

4.3.2.1 Extração do ácido zizanóico

A extração do ácido zizanóico contido no óleo de vetiver foi feita de acordo com MARTINEZ et al. [2004] com modificações: o óleo de vetiver (15g) foi dissolvido em 40mL de diclorometano e extraído com aproximadamente 25mL de solução 1M de hidróxido de sódio. Este procedimento foi repetido aproximadamente 4x, até que a fase aquosa mantivesse a cor. A fração solúvel em água foi então acidificada a pH 3,0 com HCl (37%) e novamente reextraída com 40 mL de diclorometano. Fez-se a adição de sulfato de sódio anidro para secagem da amostra e após a filtração a amostra foi concentrada em rotaevaporador.

4.3.2.2 Purificação do ácido zizanóico

O ácido zizanóico extraído foi purificado por cromatografia em coluna (50 x 2,5 cm) empacotada com sílica gel (Merck, 70-230 mesh, 60Å). A coluna foi equilibrada com éter de petróleo e eluída com a mistura de éter de petróleo e acetato de etila. Uma alíquota do extrato (5 mL) foi eluída e frações de 75mL foram recolhidas. As três primeiras frações foram isoladas com éter de petróleo puro (250 mL) e as demais frações (4-28) com éter petróleo:acetato de etila (9,5:0,5). Todas as frações foram analisadas em CG e a identificação do ácido feita segundo MARTINEZ et al. [2004]. As frações com maior teor de ácido zizanóico foram misturadas e concentradas.

Análises em CG foi feita usando cromatógrafo Varian, modelo CP-3380, equipado com detectores de ionização de chama (FID) e coluna capilar Supelcowax 10 (polietileno glicol, Supelco Inc., Bellefonte, PA) (30m x 0,25mm i.d x 0,25µm espessura de filme). A injeção de 1,0µL de amostra preparadas em éter etílico (1:1) foi feita em *split mode* (1:50), e o programa de temperatura de 50° a 200°C a 5°C/min. As temperaturas no injetor foram de 220°C e no detector, 250°C. Como gás de arraste foi usado N₂ com fluxo de 0,8 mL/min.

4.3.2.3 Síntese do composto fluorescente

Etapa (I)- Obtenção do álcool

O ácido zizanóico foi reduzido a khusimol através da reação de substituição com LiAlH_4 [PEREZ & GORDILLO, 2003]. Uma solução de 280 nmol de LiAlH_4 em 100 mL de THF seco foi adicionado, gota a gota a 70 nmol de ácido zizanóico sob resfriamento. Ao final da adição, a temperatura foi trazida a temperatura ambiente e agitação foi mantida por 30 minutos adicionais. A reação foi interrompida pela adição de 10 mL de HCl (10%) e 10 mL de água. A agitação foi mantida por 1 hora. A mistura foi filtrada em filtro com celite, colocada num funil de separação para retirar o excesso de água, seca com sulfato de sódio e concentrada em rotaevaporador.

Etapa (II)- Derivatização do álcool

O Khusimol obtido foi esterificado a dansilato de kusimila (khusimyl 5-dimethylamino-1-naphtalenesulfonate (KD)). Cloreto de dansila em piridina (1mmol/mL) foi adicionado em excesso ao álcool (2:1), para garantir que todo o álcool presente fosse derivatizado após 6 horas de reação a frio. A lavagem para a extração da piridina foi feita com éter dietílico (2x /50 mL), HCl (10%) (2x /50 mL) e solução saturada de sulfato de cobre até que a solução deixasse de mudar de cor. O material foi seco em rotaevaporador, transferido para um frasco de vidro, protegido da luz e o solvente residual evaporado com gás inerte. O material foi armazenado a -10°C .

As etapas do processo (Figura 15) foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada. As bandas foram eluídas com acetato de etila e éter de petróleo (2:8) e visualizadas em lâmpada UV (254 nm). Na reação de obtenção do álcool, a revelação foi feita com permanganato de potássio, e a derivatização do álcool foi acompanhada com azul de bromocresol.

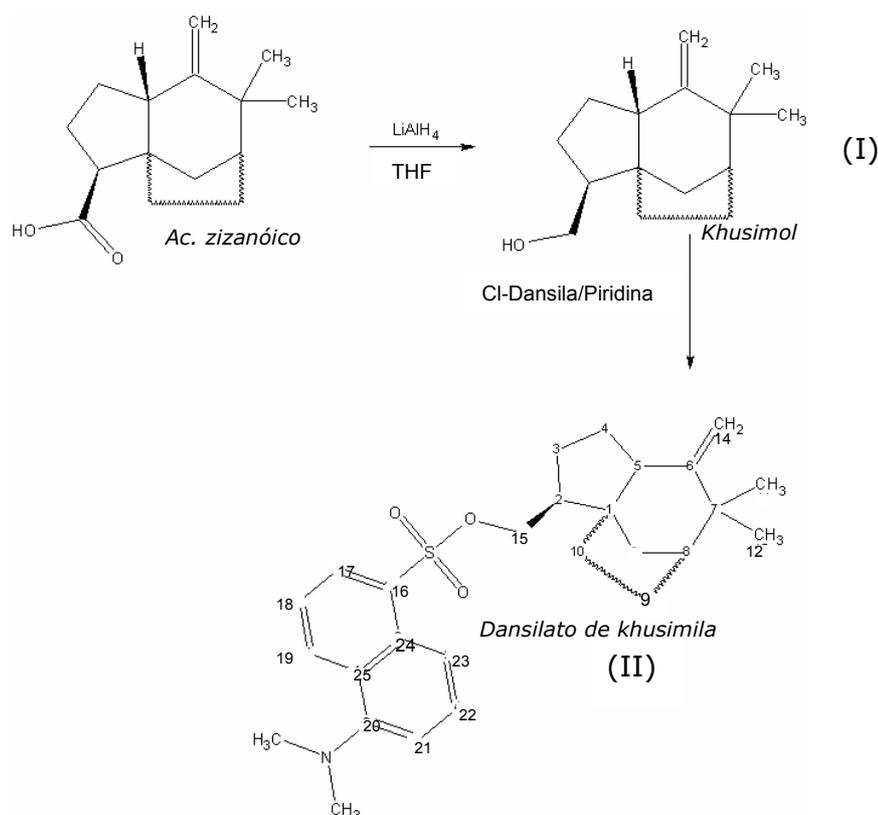


Figura 15. Etapas de produção do KD (dansilato de kusimila) a partir do ácido zizanóico.

Espectroscopia de Ressonância Magnética de Prótons ^1H -RMN

O espectro do dansilato de khusimila foi medido em soluções de deutério-clorofórmio usando um espectrômetro Bruker DPX200, AC250 e DRX400, operando a 400 MHz e 100 MHz para RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente.

4.3.2.4 Preparação do óleo fluorescente

O composto derivatizado, dansilato de kusimila- KD, foi adicionado ao óleo essencial de vetiver antes da fabricação das cápsulas. A quantidade de KD adicionada na fabricação das microcápsulas foi escolhida em função da sensibilidade do equipamento de medida. Portanto, a proporção de KD:Óleo vetiver usada foi de aproximadamente 1:100.

4.4 Estudo do processo de formação

4.4.1 Influência da estequiometria entre os polímeros

As misturas entre os diferentes sistemas Goma Arábica-Gelatina (GA:GE) e Pectina- Gelatina (PE:GE) foram observadas em função da turbidez. O sistema polimérico foi mantido em becker encamisado para controle da temperatura ($45 \pm 5^\circ\text{C}$) e agitado magneticamente. O eletrodo para medida de pH foi introduzido e após alguns minutos de agitação foram feitas as titulações e leituras em espectrofotômetro a 590nm. As dispersões foram tituladas com soluções ácidas de HCl ou alcalinas NaOH até atingir o pH desejado.

O ensaio foi realizado de acordo com ANTONOV & ZUBOVA (2001), com algumas modificações. A mistura dos polímeros foi feita volumetricamente com volume final de 40 mL em diferentes proporções, que variaram entre 1:0,1:1,1:3,1:4,0:1,4:1 de proteína para o polissacarídeo. A quantidade de polímero total foi fixada em 2,5% (p/v) para o par GA:GE e 2% (p/v) para o par PE:GE.

4.4.1.1 Potencial zeta

Os pares poliméricos foram investigados em relação à carga de superfície. Goma arábica e gelatina foram previamente solubilizadas (2,5% p/p), mantidas sob aquecimento (50°C) durante todo o experimento e misturadas nas proporções 1:3, 1:1 e 3:1 (GA:GE). Água deionizada foi acidificada (HCl (1N)) ou alcalinizada (NaOH (1N)) em béqueres (50 mL), para atingir pHs de 3 a 7. As misturas de biopolímeros foram diluídas na água deionizada, no pH de leitura, a 50°C , até a faixa de detecção do equipamento. Todo este processo de leitura foi bastante rápido para evitar geleificação e influência na leitura devido ao esfriamento da solução na linha. O equipamento usado foi o modelo Malvern Zetamaster (Malvern Instruments Ltda).

O potencial zeta nas emulsões foi medido nas etapas do processo de formação das partículas, ou seja, na homogeneização do óleo com água, com a

gelatina (2,5%p/p, 50°C), após a adição da goma arábica (2,5%p/p) na temperatura e pH de coacervação.

4.4.2 Influência do tipo de óleo

Os óleos de diferentes fontes (mineral, vegetal e essencial) foram encapsulados. A coacervação foi feita em etapas, todas a 50°C, pela emulsificação do óleo na gelatina e pela coacervação pela adição da goma arábica a pH 4,0. As etapas foram acompanhadas pela medida do potencial zeta das partículas formadas. A emulsificação em água foi realizada no pH da solução de gelatina, porém a gota não permaneceu estável o suficiente para produzir condições confiáveis de medidas.

4.4.2.1 Caracterização do tamanho da emulsão

A estimativa do tamanho médio da emulsão entre a gelatina e a goma arábica foi feita imediatamente após prepará-la, nas condições de produção de cápsulas adotadas. A técnica usada foi análise de imagem obtidas por microscopia ótica. As imagens foram captadas em microscópio óptico (Jenaval, Carl Zeiss, Germany)- com objetiva de 12,5x e optovar 0,8x, sem projetiva, acoplado à câmara (Hitachi 45-752, Tokyo, Japan) e ligado a um computador equipado com software Global Lab Image A quantificação do tamanho foi feita através do software livre Scion (www.scioncorp.com). O número mínimo para contagem foi estipulado em 200 partículas. As lâminas foram cuidadosamente preparadas e os campos de contagem foram aleatoriamente distribuídos de modo a varrer toda a lâmina.

4.4.3 Influência da formação dos complexos na microencapsulação

A avaliação da influência da ordem de inserção do óleo no processo de coacervação complexa foi avaliada pela produção de micropartículas sem a prévia emulsificação do óleo na solução de gelatina. O óleo foi adicionado à mistura estequiométrica de GA:GE antes do ajuste do pH da solução ao pH de coacervação e após a mistura já estar coacervada, como ilustrado no fluxograma abaixo (Figura 16).

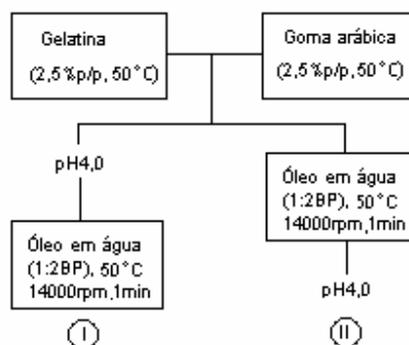


Figura 16. Fluxograma de ensaio da ordem de inserção do óleo sem prévia emulsificação (BP=biopolímero).

4.5 Microencapsulação

A produção de microcápsulas por coacervação complexa foi feita de acordo com a metodologia descrita em LAMPRECHT, SCHÄFER & LEHR [2001]. A produção de micropartículas incluiu as seguintes etapas: (I) Emulsificação de 2,5 g do recheio em 100mL de solução de gelatina (2,5% (p/v)) a 50°C, 14000 rpm por 1 minuto (Ultra turrax, Janke and Kunkel, IKA-Werk, Staufen, Germany) seguido da incorporação a 100 mL de solução de goma arábica (2,5% (p/v)) também a 50°C. (II) Redução lenta do pH da solução para o pH de coacervação do par polimérico (pH 4,0). (III) Resfriamento lento gradual do sistema de 40 a 10 °C - 3horas. O sistema de aquecimento foi desligado para permitir o abaixamento da temperatura a 25 °C e banho de gelo foi usado para abaixar a temperatura do sistema a 10°C. As soluções foram preparadas com água deionizada e a agitação magnética foi mantida durante todo o processo de formação das partículas.

4.5.1 Caracterização do processo

O rendimento do processo de microencapsulação foi calculado através do peso das fases obtidas, após o repouso mínimo de 12 horas em geladeira a 4°C. Após a coacervação, as cápsulas produzidas e precipitadas, e após o repouso, centrifugadas em baixa velocidade (5000 rpm/ 5 min - Damon/ IEC HN-S Centrifuge) para acelerar o processo de compactação, separadas e

pesadas. O conteúdo de umidade das micropartículas foi determinado gravimetricamente [AOAC, 1990]. No caso de partículas contendo óleo essencial, a temperatura de secagem foi de 60°C. A eficiência do processo de microencapsulação foi calculada como porcentagem de material seco precipitado em relação à massa seca inicial (massa dos polímeros em base seca + o recheio oleoso utilizado).

4.5.2 Eficiência da Encapsulação

4.5.2.1 Eficiência de encapsulação do óleo fluorescente

A eficiência de encapsulação (EE) do óleo fluorescente (OF) foi determinada através da quantificação do KD presente nas microcápsulas em relação à quantidade original utilizada para a produção das partículas e expressas percentualmente. A parede da micropartícula foi rompida por ação enzimática da alcalase (NOVOZYMES 2.4L, PLN 05209, 04/09/2003, 0,1% (10 mL/0,3 g microcápsula), pH 8,0 com NaOH 1N). Após aproximadamente 3 horas de incubação a 37°C foi adicionado diclorometano para extrair o OF. O solvente orgânico foi filtrado a vácuo e completamente evaporado. O conteúdo do balão foi redissolvido em álcool, transferido para um balão volumétrico e medido nas condições da curva analítica.

4.5.2.2 Eficiência de encapsulação dos óleos

A quantidade de óleo encapsulado foi determinada gravimetricamente. Aproximadamente 3 g de microcápsulas úmidas foram secas em estufa a 105°C durante a noite. A massa seca foi triturada em almofariz na presença de diclorometano, e transferidas para tubos de 50 mL com tampa. Após agitação vigorosa o solvente foi extraído com o auxílio de uma pipeta Pasteur e sulfato de sódio foi adicionado para a remover a água presente. O solvente orgânico foi filtrado a vácuo num balão pesado e completamente evaporado. A eficiência de encapsulação foi definida como a quantidade de óleo recuperada por grama de cápsula em relação ao óleo inicialmente inserido.

$$\%EE = \frac{(g\acute{o}leo / g\ part\acute{u}cula) \times part\acute{u}culas\ produzidas\ (g)}{Oleo\ inicial(g)} \times 100 \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o\ 9}$$

4.5.3 Influ\~{e}ncia das vari\~{a}veis de processo

Foi realizado um planejamento experimental fatorial fracionado para a forma\c{c}\~{a}o de part\acute{u}culas por coacerva\c{c}\~{a}o complexa a partir dos sistemas polim\~{e}ricos GA:GE e PE:GE. A varredura das vari\~{a}veis foi realizada com \c{a}leo de am\~{e}ndoas e apenas a otimiza\c{c}\~{a}o com o \c{a}leo essencial de vetiver. As imagens das part\acute{u}culas obtidas em todos os pontos do ensaio experimental foram captadas. As part\acute{u}culas finais n\~{a}o sofreram tratamento de reticula\c{c}\~{a}o nem secagem. As part\acute{u}culas foram produzidas de acordo com o item 4.5. A efici\~{e}ncia de encapsula\c{c}\~{a}o foi realizada utilizando o m\~{e}todo gravim\~{e}trico descrito no item 4.5.2.2, e o rendimento realizado de acordo com o item 4.5.1.

4.5.3.1 Planejamento experimental: Varredura dos fatores do processo GA:GE

A primeira matriz consistiu numa varredura de sete fatores experimentais, Tabela 6.

Tabela 6. Par\~{a}metros estudados na etapa de *screening* do sistema GE:GA para o \c{a}leo de am\~{e}ndoas (Planejamento Fatorial Fracion\~{a}rio)

Par\~{a}metros estudados		N\~{i}veis	
		-1	1
Tempo de homogeneiza\c{c}\~{a}o da emuls\~{a}o	X1	1 min	4min
Velocidade de homogeneiza\c{c}\~{a}o da emuls\~{a}o	X2	10000rpm	18000rpm
Temperatura de solu\c{c}\~{a}o polim\~{e}rica	X3	40 \c{a}C	60 \c{a}C
pH de coacerva\c{c}\~{a}o	X4	4	5
Concentra\c{c}\~{a}o de pol\~{i}mero total	X5	2,5%	5%
Propor\c{c}\~{a}o entre pol\~{i}meros (Ge:Ga)	X6	1:2	2:1
Quantidade de ativo	X7	1,25 g	3,75g

A sele\c{c}\~{a}o dos valores reais das vari\~{a}veis foi feita cuidadosamente levando-se em conta a viabilidade de trabalho quando estudadas em faixas mais amplas. Um planejamento experimental fatorial (2^{k-r} , onde k \c{e} o n\~{u}mero de vari\~{a}veis e r, o fator satura\c{c}\~{a}o) foi escolhido. Os sete fatores codificados foram investigados em um planejamento experimental 2^{7-3} , com quatro repeti\c{c}\~{o}es no ponto central. Apenas 20 experimentos foram necess\~{a}rios para

estimar os efeitos principais e as interações de primeira ordem entre os parâmetros estudados no rendimento do processo. Os experimentos foram realizados de forma aleatória.

4.5.3.2 Otimização da Eficiência de Encapsulação e do Rendimento

Partindo das informações obtidas com o planejamento fatorial fracionado que definiu os principais fatores, uma metodologia de superfície de resposta foi usada. O planejamento completo baseou-se nos principais fatores: velocidade de homogeneização, temperatura, proporção entre os polímeros e quantidade de recheio (Tabela 7). Este planejamento forneceu coeficientes de ajustes que geraram um modelo polinomial de segunda ordem. A equação do modelo para a eficiência de encapsulação (Y_2) incluindo termos quadráticos e de interação de cada variável controlada foi da seguinte forma:

$$Y_2 = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n + \beta_{11} X_1^2 + \dots + \beta_{nn} X_n^2 + \beta_{1n} X_1 X_n,$$

Onde n é o número de variáveis estudadas e β o coeficiente fornecido pelo modelo.

A validade do modelo foi verificada por testes estatísticos clássicos [BARROS, SCARMINIO & BRUNS, 1995] e por análise de variância (ANOVA). As influências relativas de alguns parâmetros do processo de coacervação no rendimento (%R) e na eficiência de encapsulação do óleo de vetiver (%EE) foram determinados.

Tabela 7. Variáveis e níveis no planejamento completo para o óleo de vetiver.

	-2	-1	0	1	2
X2(rpm)	6000	10000	14000	18000	22000
X3 (°C)	30	40	50	60	70
X6 (GE:GA)	1:3	1:2	1:1	2:1	3:1
X7(g)	0	2,5	5	7,5	10

4.5.3.3 Planejamento Experimental- varredura dos fatores do processo PE:GE

Os valores reais e os níveis codificados são apresentados na Tabela 8. Os fatores codificados foram investigados em um planejamento experimental

2^{5-2} , com três repetições no ponto central. As variáveis foram selecionadas com base no planejamento experimental feito para o sistema GA:GE, o qual descartou a velocidade de homogeneização e o tempo de homogeneização como variáveis relevantes para análise do rendimento. Os pHs de estudo foram selecionados baseados no estudo de turbidez dos pares poliméricos, item 4.4.1.

Tabela 8. Parâmetros estudados na etapa de *screening* do sistema GE:PE para o óleo de amêndoas (Planejamento Fatorial Fracionário)

Parâmetros estudados		Níveis	
		-1	1
Temperatura de solução polimérica	X1	40 °C	60 °C
pH de coacervação	X2	3	4
Concentração de polímero total	X3	1%	5%
Proporção entre polímeros (Ge:Pe)	X4	1:2	2:1
Quantidade de ativo	X5	1 g	2,5g

4.5.3.4 Otimização do Rendimento

No sistema gelatina-pectina, para o óleo de vetiver, foram avaliadas apenas a proporção entre os polímeros, visto que a concentração de polímero total presente no sistema não pode ser alterada para grandes concentrações e foi mantida a 1,5% de polímero total. As demais variáveis não estudadas foram fixadas nos pontos centrais do experimento feito com o óleo de amêndoas (Tabela 9). A eficiência de encapsulação das partículas formadas não foi avaliada para este sistema.

Tabela 9. Variáveis e níveis no planejamento fatorial do sistema GE:PE para o óleo de vetiver.

	-1,41	-1	0	1	1,41
X4(GE:PE)	1:0,8	1:1	1:1,5	1:2	1:2,21
X2	2,8	3	3,5	4	4,21

4.5.4 Tratamento das partículas

4.5.4.1 Reticulação

Química

Foi utilizada uma relação de 1 mM glutaraldeído / g proteína em água deionizada a partir de uma solução de glutaraldeído (25% vol). A reação de *crosslinking* foi realizada a 25°C durante 15 horas. As microcápsulas insolubilizadas foram lavadas três vezes em água destilada e guardadas em água.

Enzimática

A enzima transglutaminase (Ajinomoto, 100 U/g de atividade) foi adicionada às microcápsulas prontas na proporção 1:4 enzima:microcápsulas para produzir uma relação de 20 U/g de proteína. A reação foi realizada a 25°C durante 15 horas sob agitação constante.

4.5.4.2 Secagem das partículas

A secagem das partículas foi feita em liofilizador (Virtis Freezemobile 25; Virtis, Gardiner, NY, USA). A sublimação, com pressão de 200 mTorr, foi iniciada a -45°C e a temperatura final regulada a 25°C. Antes da liofilização, as partículas coacervadas foram lentamente congeladas em freezer a -10°C. O congelamento de parte das partículas foi também feito rapidamente com nitrogênio líquido, antes da liofilização. A secagem utilizando a técnica de fluido supercrítico foi realizada pela troca gradual da água pelo etanol anidro. O etanol foi removido pelo uso de dióxido de carbono em condições supercríticas, ou seja, 35°C e 72,8 atm, através de um equipamento apropriado.

4.5.5 Caracterização das partículas formadas

4.5.5.1 Microscopia ótica e eletrônica de varredura

A morfologia das microcápsulas úmidas foi observada pelo microscópio ótico NIKON (Eclipse E800, Tokyo, Japan), utilizando-se objetivas de 10x e 20x. A captação de imagens foi realizada pelo software Image Pro Plus 4.0.

Partículas secas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (SEM) (Jeol mod. JMS-T300, Japan) com aceleração de voltagem de 10 kV. As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio com uma fita dupla face e cobertas com uma fina camada de ouro em evaporador Baltzer (Baltec SCD50, Liechtenstein, Áustria), 40 mA/150 s.

4.5.5.2 Microscopia de Varredura Laser Confocal (CLSM)

A distribuição do composto fluorescente foi verificada em microscópio de Varredura Laser Confocal Olympus LSM – Fluoview versão 3.2.5 (Olympus, Tokyo, Japan) a 440 nm de excitação. A leitura foi feita na meia altura da micropartícula.

4.5.5.3 Tamanho médio e distribuição do tamanho de partículas

O tamanho médio e a distribuição de tamanho das microcápsulas úmidas suspensas em água destilada foram inicialmente determinados por difração de luz laser usando um Analisador Mastersizer S (MAM 5005, Malvern, Germany) com unidade de dispersão Sample Suspension Unit. Cada valor resultou de uma determinação, ao mínimo, em triplicata. A quantidade de amostras utilizadas foi ajustada a um nível adequado de refração para a detecção do equipamento.

A técnica da análise de imagem obtida por microscopia ótica foi usada para determinar o tamanho médio e a distribuição de tamanho das microcápsulas, nos diferentes meios de liberação e das gotas da emulsão entre a proteína e os diferentes óleos. As imagens das amostras secas suspensas em

glicerina, úmidas suspensas em água e ambas suspensas nos diferentes meios de liberação usados foram captadas em computador equipado com software Global Lab Image, após 1 hora em microscópio óptico (Jenaval, Carl Zeiss, Germany) com objetiva de 12,5x e optovar 0,8x, sem projetiva, acoplado à câmara (Hitachi 45-752, Tokyo, Japan). A quantificação do tamanho foi feita através do software livre Scion (www.scioncorp.com). O número mínimo para contagem utilizado foi de 150 partículas. As lâminas foram cuidadosamente preparadas e os campos de contagem foram aleatoriamente distribuídos de modo a varrer toda a lâmina. Partículas visivelmente aglomeradas foram excluídas da quantificação.

4.5.5.4 Densidade dos pós

A densidade global (*bulk*) foi determinada colocando-se delicadamente os pós em uma proveta volumétrica ocupando um volume total de 10 mL. A densidade do arranjo compacto (*tap*) foi obtida pela compactação das cápsulas no cilindro, através de batidas no fundo da proveta, até volume constante de 10mL. A compressibilidade pode ser determinada pela relação entre as densidades medidas [VLACHOU *et al.* 2001]:

$$\text{compressibilidade(\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{densidade bulk}}{\text{densidade tap}} \right) \right] \cdot 100$$

4.5.5.5 Capacidade de entumescimento

Inicialmente, o inchamento das cápsulas foi verificado gravimetricamente. Aproximadamente 0,15 g da partícula seca foi inserida em 5 mL do meio de liberação correspondente a 25°C (água, tween 2%, SDS5% e álcool). Após 1 hora, as amostras foram totalmente coletadas, rapidamente filtradas em papel filtro de 4 cm de diâmetro previamente pesado, para remover o excesso de água, e o conjunto foi pesado. O grau de inchamento foi calculado como massa de partículas úmidas após 1 h menos a massa da partícula seca inicialmente pesada em relação à amostra seca. O peso do papel filtro molhado foi descontado do peso das cápsulas úmidas. As medidas foram

realizadas em triplicata. Imagens das amostras após 1, 5 e 24 h em contato com o meio foram captadas em microscópio óptico e analisadas. O grau de inchamento foi também avaliado pela observação da alteração do diâmetro médio das partículas secas e úmidas após inserção nos meios de liberação.

4.6 Estudo da liberação

4.6.1 Modificação do meio

Vários meios foram usados para se realizar a liberação. O meio ideal adotado para analisar o comportamento do composto fluorescente foi o álcool. Além disso, a polaridade foi alterada pela adição de dois tensoativos em meio aquoso (Tween80 e SDS) selecionado com base no HLB.

4.6.2 Estudo da solubilidade do óleo e do composto fluorescente no meio de liberação

A titulação *cloud point* foi usada para estimar a solubilidade do óleo de vetiver nos meios de liberação. Diferentes concentrações de óleo e álcool absoluto foram titulados com água deionizada, a 25°C, sob agitação forte e constante. Após o aparecimento da turbidez, as amostras foram mantidas em agitação para atingir o equilíbrio. A solubilidade foi determinada visualmente pela manutenção da aparência límpida da solução. Sistemas claros foram designados como sistemas solúveis. A solubilidade do óleo de vetiver em solução alcoólica foi avaliada através da construção de um diagrama de fases água/óleo/etanol considerando relações de massa entre os componentes.

A partir do mesmo procedimento, diagramas SDS/água/óleo de vetiver e Tween80/água/óleo de vetiver foram construídos e serviram como base para adotar as concentrações de liberação para cada tensoativo.

A solubilidade de KD em etanol absoluto foi medida através da quantidade solubilizada de KD em etanol anidro no ponto de supersaturação com a presença de cristais de KD em volume conhecido do solvente (1 mL de álcool etílico anidro) de acordo com a metodologia descrita por LARSEN et al.

[2002]. Os coeficientes de partição dos componentes do óleo essencial de vetiver e do KD foram calculados usando o software "ACD/logP calculator" desenvolvido por ACD (Advanced Chemistry Development Inc.) e distribuído por ChemCAD. O software reproduz a partição entre água e octanol, método clássico usado para determinação de coeficientes de partição.

4.6.3 Curva analítica

4.6.3.1 Componentes do óleo de vetiver

Para a quantificação dos 12 compostos de aroma selecionados no óleo de vetiver, cinco diferentes concentrações do óleo (100, 120, 160, 200, 500 mg/mL) em álcool etílico anidro, contendo um padrão interno (estearato de metila, 1mg/mL), foram analisadas por CG/FID. Relações de área composto/padrão interno e de concentração composto/padrão interno foram utilizadas para a construção de curvas analíticas para cada um dos compostos de interesse. A determinação da concentração de cada composto no óleo de vetiver foi feita conhecendo-se a quantidade de vetiver e a média da porcentagem de área nas diferentes concentrações que geraram a curva analítica para cada composto estudado. As curvas analíticas permitiram a determinação de um fator de resposta específico para cada composto, sendo o fator utilizado nas quantificações [DEBBRECHT, 1995]. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.6.3.2 Composto fluorescente

Para cada meio de liberação, foi construída uma curva de calibração com o khusimol marcado a um comprimento de onda de excitação e emissão específicas para cada meio. Em álcool (333/517nm; $R^2 = 0,9997$, $y = 3,0 \cdot 10^8 x + 30,094$), em SDS (330/520 nm; 5%- $R^2 = 0,9999$, $y = 3,0 \cdot 10^8 x + 117,11$) e em Tween 80 (340/540 nm; 2%- $R^2 = 0,9983$, $y = 3,0 \cdot 10^8 x + 431,74$). Os meios usados consistiram de soluções 2% de Tween80 e 5% de SDS, em água deionizada.

A sensibilidade do equipamento determinou a quantidade de KD a ser inserido no óleo e o volume de liberação a ser utilizado de forma que a leitura da alíquota liberada estivesse contida na curva de calibração.

As medidas de intensidade relativa de fluorescência (R.F.I.) foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi (Mod. 7500, Tokyo, Japan), equipado com uma lâmpada de xenônio (150 W) e célula de quartzo de 1×1cm. O controle e a aquisição de dados instrumentais foram obtidos usando o software comercialmente disponível da Hitachi, FL-solutions P/N: 2514070-03.

4.6.4 Liberação "in vitro"

4.6.4.1 Liberação a partir de micropartículas com óleo fluorescente

A taxa de liberação do OF das micropartículas foi determinada pela adição de uma massa de partículas úmidas pesada balança analítica com 4 casas decimais (1 g) e secas (0,5 g) em 300 mL do meio correspondente. As amostras foram colocadas em um suporte cilíndrico com paredes em aço inox e com uma área de 220 cm² em tela (25 µm). O suporte foi ajustado a um béquer de 400 mL e fixado em um Banho Dubnoff (Marconi, Campinas, Brazil) (Figura 17). Os béqueres foram cobertos e a agitação e temperatura (25 °C) foram mantidas constantes durante o experimento.

Alíquotas de 5 mL foram retiradas do béquer a 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 minutos, com reposição de solvente. Amostras após 24 h de experimento também foram analisadas. O experimento foi realizado em triplicata. As curvas de liberação foram expressas como porcentagem liberada do KD (M_t) em relação à quantidade inicial (M_{00}) deste composto presente na massa de cápsulas utilizada versus o tempo, em minutos. A quantidade inicial de KD ($t=0$) foi corrigida pela eficiência de encapsulação do KD determinada nas partículas. A fluorescência do óleo e do solvente foi checada no comprimento de onda de leitura.

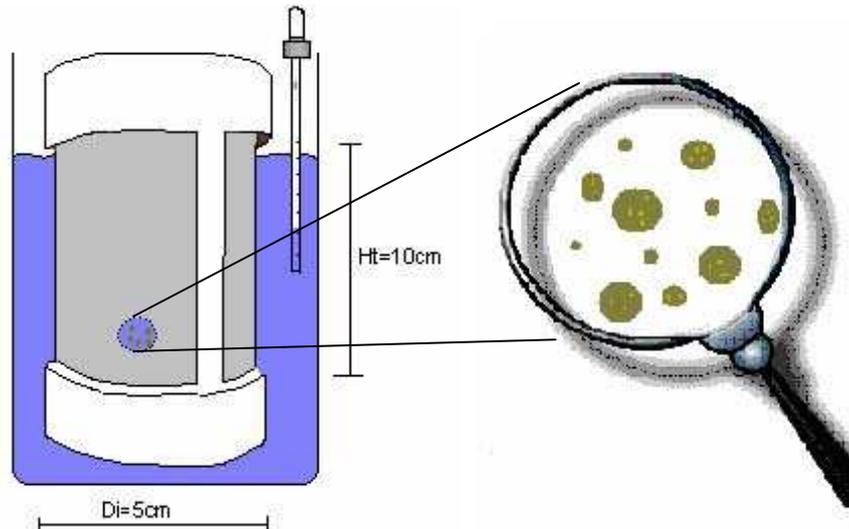


Figura 17. Sistema de liberação elaborado para o estudo com microcápsulas contendo OF.

Cálculo do coeficiente de difusão

Uma difusão fickiana bidimensional a partir de micropartículas (sistema monolítico) formuladas por coacervação complexa pode ser expressa, para tempos iniciais, por:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \left(\frac{Dt}{\pi r^2} \right)^{0,5} - \frac{3Dt}{r^2} \text{ com para } M_t/M_\infty \leq 0,7$$

E para grandes valores de tempo, por:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} e^{-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}} \text{ com } 0,7 \leq M_t/M_\infty \leq 1,0$$

Onde, D é o coeficiente de difusão específico, M_t é a massa de soluto liberada no tempo t e M_∞ , a massa de soluto liberada quando se atinge o equilíbrio. As equações acima são válidas quando se adota como hipótese que não haja contribuição convectiva, que as dimensões da partícula permanecem constantes sem que haja inchamento ou quebras e que as condições

experimentais satisfazem a condição de não saturação do meio (condições muito diluídas).

4.6.4.2 Liberação a partir de micropartículas com óleo de vetiver

Amostras de micropartículas contendo óleo de vetiver foram pesadas (1 g) e colocadas em tubos de ensaio rosqueados contendo 5mL de álcool etílico anidro. Para cada tempo foram preparadas três replicações. Os tubos foram mantidos sob agitação rotativa a temperatura ambiente durante todo o período de duração do experimento. O experimento foi efetuado sem reposição do solvente e cada tubo correspondente a 15, 45, 60, 180, 300 minutos, foi amostrado e descartado. Padrão interno (1 mg/mL) foi adicionado e alíquotas (1 μ L) de cada replicação foram analisadas cromatograficamente. As quantidades liberadas foram calculadas considerando-se a quantidade determinada em cada tempo (em triplicatas independentes) em relação à quantidade do composto inicial no óleo de vetiver presente na quantidade de partículas utilizadas para cada tubo.

4.7 Análise estatística

Os planejamentos experimentais usados para o estudo das variáveis do processo foram analisados pela ANOVA e os gráficos foram gerados pelo Statistic (7,0, USA). Os testes de comparação de médias no trabalho foram feitos pelo método t-Student a 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Influência da estequiometria entre os polímeros

A Tabela 10 apresenta a caracterização dos biopolímeros utilizados na preparação dos coacervados em relação ao teor de proteínas e polissacarídeos, cinzas, lipídeos e umidade.

Tabela 10. Composição dos biopolímeros.

Polímero	Proteína (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)*	pH em solução (2,5% p/p)
GE	86,1 ± 0,9	12,05±0,06	0,90±0,05	-	0,98	5,4
GA	1,98 ± 0,02	13 ± 1	3,28±0,01	0,16±0,03	81,74	4,4
PE	-	14,5 ± 0,1	1,77±0,03	0,32±0,03	83,37	4,5

* Determinado pela diferença centesimal. GE:Gelatina; GA:Goma Arábica; PE:Pectina

As proteínas contribuem para formação de emulsão e para a estabilidade das gotas formadas, os polissacarídeos por sua vez estão presentes como agentes espessantes e agentes retentores de água. No entanto, a presença da fração protéica na goma arábica é responsável por sua atividade emulsificante, o que auxilia na estabilização das gotas coacervadas. Ela se distingue de muitos polissacarídeos por apresentar baixa viscosidade em concentrações consideradas altas. A pectina, no entanto, é muito utilizada na indústria de alimentos por apresentar alta capacidade gelificante mesmo a baixas concentrações. No entanto, a alta viscosidade da solução pode prejudicar a formação dos complexos por reduzir o contato entre as moléculas e a velocidade de sedimentação dos complexos formados.

A relação entre a proteína e o polissacarídeo na formação do complexo deve-se, entre outras variáveis, aos grupos laterais carregados que permitirão a interação entre eles. A gelatina é um polímero biodegradável e biocompatível e carrega tanto grupos amina quanto carboxílicos (zwitteriônico) [TSUNG & BURGESS, 1997]. A goma arábica é um carboidrato que possui grupos

carboxílicos e por isso é negativamente carregada, exceto em pHs baixos onde a dissociação destes grupos é suprimida [BURGESS & CARLESS, 1984].

A premissa da formação de coacervados é que sejam complexos insolúveis, e a velocidade de sedimentação parece estar envolvida neste processo. Se a velocidade de estruturação dos complexos é baixa, o solvente tem a chance de entrar na estrutura formada hidratando os polímeros e competindo por sítios de ligação. A interação dos biopolímeros em condições que favoreçam o aparecimento de cargas opostas provoca a formação de complexos insolúveis. Porém, a textura global e estabilidade dos coacervados dependem não somente das propriedades individuais destes biopolímeros, mas também da natureza e da força de suas interações [DICKINSON & CLEMENTS, 1996].

A caracterização dos materiais poliméricos estudados pode fornecer dados relevantes sobre a probabilidade de interação. OVERBEEK & VOORN [1957], no desenvolvimento de uma teoria para a coacervação complexa entre a gelatina e a goma arábica, identificaram que a densidade de cargas e / ou a massa molecular dos biopolímeros deve ser suficientemente alta para que a coacervação complexa possa ocorrer.

A viscosidade intrínseca foi medida como sendo 57 mL/g para a gelatina, 210 mL/g para a pectina e 12 mL/g para a goma arábica. Os valores de massa molecular encontrados na literatura, compatíveis aos valores de viscosidade intrínseca encontrados, foram 100KDa, para a gelatina [CARVALHO, 2002], 69KDa, para a pectina [MUKAI-CORREA, 2003] e 350KDa, para a goma arábica [conforme fabricante]. A compatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros pode ser predita através do parâmetro de interação de Flory Huggins (χ_{23}), que é inversamente proporcional à massa molecular. Assim, quanto maior a massa molecular, a probabilidade de haver uma separação de fases do sistema, aumenta [FRUGIER, 1991]. Existe, no entanto, uma faixa de alta massa

molecular em que, em vez da coacervação, ocorre precipitação devido às forças de interação entre os polímeros.

O número de íons presentes na mistura dos biopolímeros é um parâmetro importante por interferir na carga livre do sistema e poder alterar significativamente a formação do complexo [BURGESS & CARLESS, 1985]. TAINAKA [1980] observou que o aumento no número de contra-íons acompanhado de um aumento de assimetria das cargas dos polímeros, suprime a coacervação, reduzindo a diferença entre as fases formadas. Existe uma faixa em que a quantidade de íons pode suprimir a coacervação, e embora a força iônica não tenha sido estudada, os materiais utilizados e os sistemas foram sempre constantes e a quantificação de íons iniciais foi determinada a partir da quantificação de micronutrientes, apresentada na Tabela 11. Esta quantificação foi feita apenas para se ter uma idéia da carga iônica natural presente em solução.

Tabela 11. Composição em minerais dos biopolímeros.

mg/100g*	Gelatina A	Pectina	Goma Arábica
Cálcio	139 ± 3	44,4 ± 0,4	545 ± 8
Cobre	<0,025	0,039 ± 0,003	0,115 ± 0,002
Ferro	0,82 ± 0,03	3,05 ± 0,09	0,43 ± 0,01
Potássio	5,6 ± 0,2	25,7 ± 1,2	588 ± 8
Magnésio	21,3 ± 0,1	7,7 ± 0,1	74 ± 1
Manganês	0,041 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,526 ± 0,005
Sódio	227 ± 1	470 ± 6	0,1 ± 1
Zinco	0,027 ± 0,004	0,11 ± 0,01	<0,025

*Determinação em triplicata ± desvio padrão

Inicialmente, foram construídos diagramas de fases para estudar o comportamento dos pares poliméricos. A quantificação dos componentes presentes nas fases formadas (proteína, polissacarídeo e água) foi inviabilizada pela limitação dos métodos adotados. No sobrenadante, a quantidade de polímeros era muito baixa para se utilizar o método de determinação de açúcares, que mostrou alta variabilidade. A determinação de proteína foi prejudicada pela interferência dos polissacarídeos no método de quantificação,

conforme descrito no Apêndice A1. Considerando tais limitações, optou-se pelo método turbidimétrico.

KHOH & TUCKER [1988] investigaram a coacervação complexa entre a gelatina e carboximetilcelulose por análise das fases e rendimento em coacervados e observaram concordância entre os perfis de rendimento em coacervado e o ensaio de turbidez. A mesma concordância foi obtida por THIMMA & TAMMISHETTI [2003] ao encapsularem óleo de cravo e sulfametoxazol em coacervados de carboximetilcelulose-goma guar e gelatina.

A dependência com o pH das misturas de goma-arábica e gelatina e pectina e gelatina (Figura 18 a 20) consegue expressar a tendência à coacervação dos pares poliméricos antes da inserção do óleo e dos demais parâmetros envolvidos no processo de microencapsulação. A variação das proporções entre os polímeros equivale aos eixos correspondentes a um diagrama ternário. O método permite avaliar a intensidade de interação entre os biopolímeros, analisando-os em conjunto pela variação do pH. A vantagem do método é a rápida estimativa da faixa de separação de fases e a determinação do pH ótimo de interação, já que o processo termodinâmico de separação de fases é caracterizado pela turbidez, onde o aumento da turbidez é um indicativo de maior interação polimérica [THIES, 1995]. No entanto, apresenta a exigência de se trabalhar com sistemas diluídos, o que para este caso, especificamente, não foi um problema, já que a produção de microcápsulas por coacervação complexa requer a mesma consideração.

Na Figura 18, é apresentada a mudança na absorvância das misturas de gelatina e goma arábica em diferentes proporções com diferentes pHs. Todas as curvas obtidas estão apresentadas, inclusive as curvas de titulação dos biopolímeros individuais, que como esperado, não apresentaram resposta frente às variações de pH e a intensidade de absorvância, na mesma concentração que os pares poliméricos estudados (2,5% p/v).

Em todas as proporções de polímeros uma faixa limitada de pH favorece a formação de complexos para concentração total de biopolímeros fixa em 2,5% p/v. As mudanças mais significativas na turbidez podem ser visualizadas quando se analisa a Figura 18 no sentido do aumento da concentração de HCl. À medida que se aproxima o pH do sistema ao ponto isoelétrico da gelatina, um aumento na absorbância é observado. Neste ponto, coacervados começam a se formar como resultado da interação de cargas entre os polímeros já ionizados com cargas opostas. Pelo ajuste do pH, através da adição de HCl, diferentes proporções de GA:GE são formadas até que atingem o ponto de máxima interação, ou seja o equilíbrio de cargas.

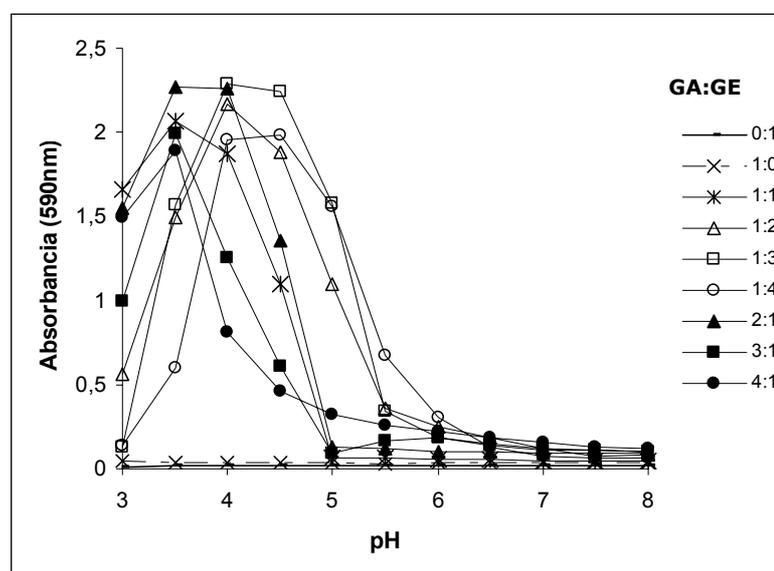


Figura 18. Comportamento do par polimérico Goma arábica (GA): Gelatina (GE) em diversas proporções, com 2,5% (p/v) de polímero total, como função do pH.

Pode-se observar que a faixa de coacervação ótima ocorre com pH variando de 3,5 a 4,5. BURGESS & CARLESS [1984] observaram uma pequena diferença na faixa de coacervação quando se utilizou gelatina tipo A ou tipo B com a goma arábica. O processo de fabricação da gelatina a partir do colágeno

animal altera o ponto isoelétrico da proteína [POPPE, 1997], alterando assim o balanço de cargas.

No sentido de verificar o pH ótimo de coacervação predito pelo método de turbidez, a carga dos complexos formados em diferentes pHs foi medida através do potencial zeta e está apresentado na Figura 19. Foram variadas três proporções entre os polímeros, e pode-se observar a eletroneutralidade dos complexos formados quando as curvas traçadas cortam o eixo do pH (ponto 0 para o potencial zeta). Quando se trabalhou com mesma proporção entre goma arábica e gelatina, o pH de eletroneutralidade dos complexos foi próximo a 4,0.

O potencial zeta corresponde ao potencial eletrocinético da partícula medido na superfície da partícula entre sua capa iônica e o meio que a envolve. A medida do potencial possibilita a determinação da faixa de pH apropriada para coacervação. O surgimento de turbidez é usualmente atribuído ao aparecimento de gotas coacervadas no meio [DUCEL et al., 2004].

A goma arábica é carregada negativamente numa ampla faixa de pH, e pela medida do potencial zeta quando se trabalha com maior proporção do polissacarídeo, verifica-se que a gelatina começa a ser suficiente para a goma arábica formada em pHs abaixo de 4,0. O complexo atinge o ponto de neutralidade de cargas em 3,5 e a partir daí começa a se observar um excesso de cargas positivas na solução.

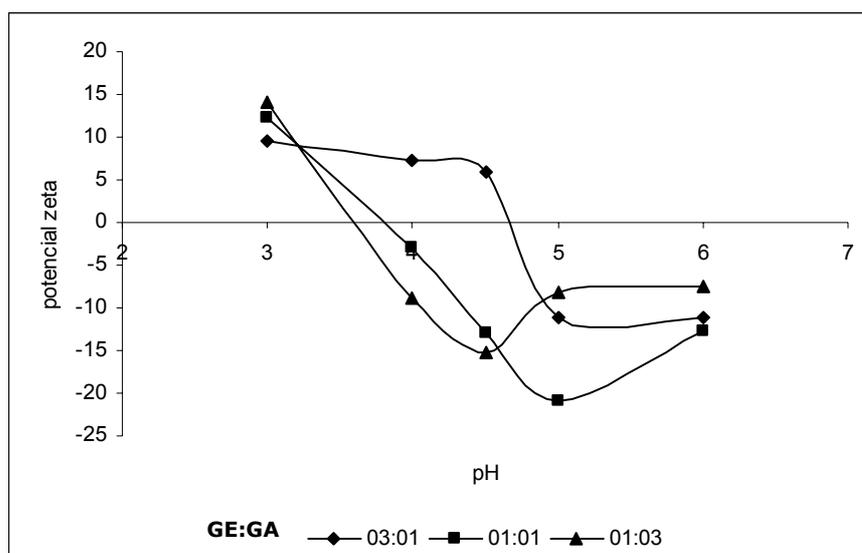


Figura 19. Potencial zeta para misturas de gelatina:goma arábica em diferentes proporções.

Gelatinas, como outras proteínas, podem agir como ácido ou base, dependendo do pH do meio. Em soluções ácidas, apresenta-se positivamente carregada e, o contrário ocorre em soluções alcalinas [POPPE, 1997]. Isto fica evidente quando se usa um excesso da proteína, o sistema atinge a eletroneutralidade rapidamente, em pH próximo a 4,5, porque todos os sítios de ligação do polissacarídeo foram saturados. Os dados obtidos pelo potencial zeta estão em concordância com os obtidos por turbidimetria, evidenciando a potencialidade da técnica. Não foi possível utilizar a técnica de medida de cargas para a solução de pectina e gelatina na mesma concentração em que se fez as medidas turbidimétricas em função da alta capacidade geleificante da pectina, o que provocou formação de agregados com a falta de controle da temperatura do equipamento utilizado.

Nas curvas de absorvância *versus* pH da mistura polimérica GE:GA, apresentadas na Figura 20a e Figura 20b, quando a razão de gelatina é maior que a do polissacarídeo, o pico de interação se encontra em pH 4,5. O aumento da concentração da goma arábica além de provocar uma redução da

faixa de alta absorção, desloca o pH ótimo, e o maior rendimento é obtido a pH 3,5 (Figura 20a). Vários autores [TOLSTOGUZOV, 1986; RABISKOVA et al., 1994; JIZOMOTO et al., 1993; TAKENAKA, KAWASHIMA & LIN, 1980, XING et al., 2005; JOUZEL et al., 2003; LAMPRECHT, SCHÄFER & LEHR, 2001] utilizam em seus experimentos a proporção de GE:GA de 1:1 em pH 4. Observa-se que nesta faixa e com esta proporção realmente existe uma alta absorbância e que se variando o pH de 4 a 4,5, para esta proporção de polímeros, obtém-se a região ótima para que ocorra a coacervação. Uma redução na intensidade de coacervação pode ser observada independente da proporção entre os biopolímeros, com pHs inferiores a 3,5. A adição de ácido à solução de goma arábica provoca a abertura e ionização dos grupos (NH_2 e COOH) deste polieletrólito aniônico, porém em meios fortemente ácidos ocorre uma inibição desta ionização, diminuindo a intensidade de interação com a proteína carregada positivamente.

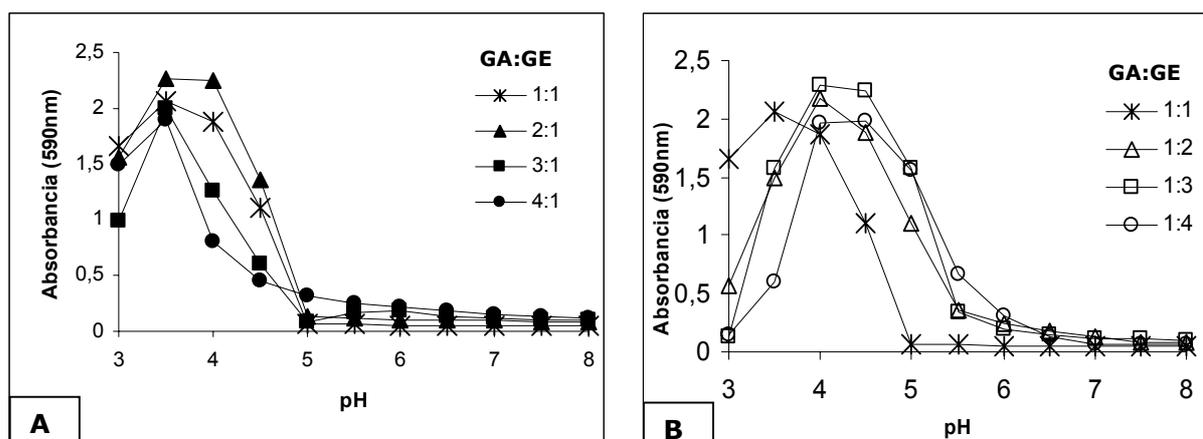


Figura 20. Efeito do pH na mudança de absorbância a 590 nm dos pares poliméricos Goma arábica (GA) : Gelatina (GE) em diversas proporções, com 2,5% (p/v) de polímero total, como função do pH. A. Proporção fixa de gelatina, B. Proporção fixa de goma arábica.

É sugerido por este estudo que o fator determinante na composição de fases do sistema gelatina:goma arábica é a densidade de cargas sendo esta muito mais influenciada pelo pH que por concentrações e proporções entre os

biopolímeros. Apesar disto, o balanço de cargas depende da estrutura dos polímeros e de suas capacidades de ionização, para abertura das cadeias e exposição dos grupos reativos.

Como previsto pela teoria da massa molecular, o sistema goma arábica/gelatina apresentou maior tendência à separação de fases. O estudo feito com o par gelatina/pectina mostrou um pH ótimo de interação (3,5), porém, a intensidade de separação de fases mostrou-se inferior quando comparada ao sistema clássico. A luz dispersa pela presença dos coacervados é dependente da concentração de coacervados formados, mas também do tamanho destes complexos. Se o par pectina-gelatina forma complexos muito menores que no caso da goma arábica, as curvas não podem ser comparadas entre si por intensidade de absorvância. O resultado aqui obtido para a pectina, indica que soluções mais diluídas deveriam ser testadas.

A intensidade de separação de fases não é dada apenas pela absorvância no pH ótimo. Deve-se levar em conta a absorvância do complexo nos pHs menos favorecidos também. Na Figura 21, as intensidades relativas estão em torno de 1,5 de absorvância e a região ótima de coacervação para este par polimérico mostrou ser independente da relação entre a proteína e a pectina, pois a maioria das misturas apresentaram exatamente o mesmo perfil, na região ótima, apesar de o aumento da concentração de proteína provocar um aumento na absorvância, o que indica uma melhora no rendimento. Ao contrário do observado por ANTONOV & ZUBOVA (2001) para o sistema ternário gelatina (3%)-pectina (0,2%)-água, o sistema apresentou alta absorvância na faixa do pI da gelatina, apesar da alta concentração em pectina (2%).

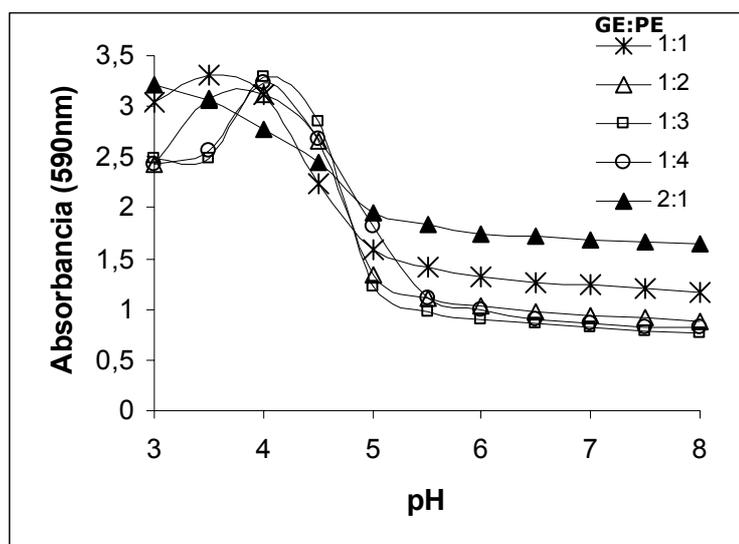


Figura 21. Efeito do pH na mudança de absorção a 590 nm dos pares poliméricos Gelatina (GE): Pectina (PE) em diversas proporções, com 2,0%(p/v) de polímero total, como função do pH.

A gelificação do sistema pectina/gelatina com 2,5% p/v provocou a formação de agregados não homogêneos o que inviabilizou o estudo com esta concentração. Houve também, um aumento na viscosidade do sistema GE:PE em pHs ácidos (abaixo de 4,0), que ficou mais evidente quanto maior a razão da pectina. Este comportamento é provavelmente devido a um aumento no volume hidrodinâmico do polímero já que esta propriedade dos polímeros em solução é diretamente proporcional à sua viscosidade intrínseca.

5.2 Influência do tipo de óleo

A coacervação é um fenômeno físico-químico de interação que pode ser usado para microencapsular recheios oleosos. As muitas variáveis envolvidas no processo de separação de fases dependem principalmente das propriedades dos polímeros de parede, já que a interação ocorrerá entre eles. Porém existem poucos estudos sobre a influência do tipo de óleo no processo de produção de cápsulas por este método.

O estudo de microencapsulação por coacervação complexa utilizando-se óleos de uma fonte vegetal (óleo de amêndoas), mineral (óleo de parafina) e um óleo essencial mostrou ser determinante nas características físicas das partículas e do processo como pode ser observado na Figura 22 e Tabela 12.

Tabela 12. Características do processo de formação de partícula.

Óleo	Coacervado úmido (g)	Sólidos (%)	Rendimento em massa seca (%)*	EE (%)
Vetiver	40 ± 3	17,2 ± 0,8	89,6 ± 0,1	91,8 ± 5,3
Amêndoas	33 ± 3	20,2 ± 2,2	89,3 ± 0,1	70,6 ± 0,1
Mineral	58 ± 2	5,6 ± 1,1	46,4 ± 0,1	38,0 ± 0,1

*Partículas produzidas com 2,5% (p/v) de gelatina e goma arábica (1:1) e 2,5 g de óleo (50%). EE: Eficiência de encapsulação.

Sabe-se que o processo de formação de partículas é altamente dependente das características físico-químicas dos componentes da solução [BURGESS & CARLESS, 1984, RABISKOVA & VALASKOVA, 1998], porém as diferenças entre os óleos, por mais que as condições de processo não se alterem, podem interferir diretamente na formação das partículas. A partir das mesmas condições de coacervação complexa, diferentes tipos de óleos produziram partículas diferentes quanto à eficiência de encapsulação e às características morfológicas. As partículas produzidas com óleo mineral apresentaram-se mononucleadas e as de vetiver e óleo de amêndoas multinucleadas (Figura 22).

A coacervação feita em condições ótimas para que os pares poliméricos tenham cargas opostas, deve apresentar alto rendimento em coacervados. Isto pode ser constatado no alto rendimento em massa seca (Tabela 12) do processo quando usou-se óleo de vetiver ou óleo de amêndoas. Grande parte dos polímeros de parede foi precipitada na forma de partículas para estes óleos. Contrariamente, o óleo mineral prejudicou o rendimento do processo ficando em torno de 46,4% frente a 89%, obtido com os demais óleos. Houve a formação de uma grande quantidade de massa coacervada para o óleo mineral indicando a complexação dos polímeros, porém como boa parte do

óleo não foi encapsulada (Figura 22), o coacervado apresentou-se altamente hidratado, indicando que as propriedades do óleo não impedem a coacervação, porém ele prejudica a encapsulação.

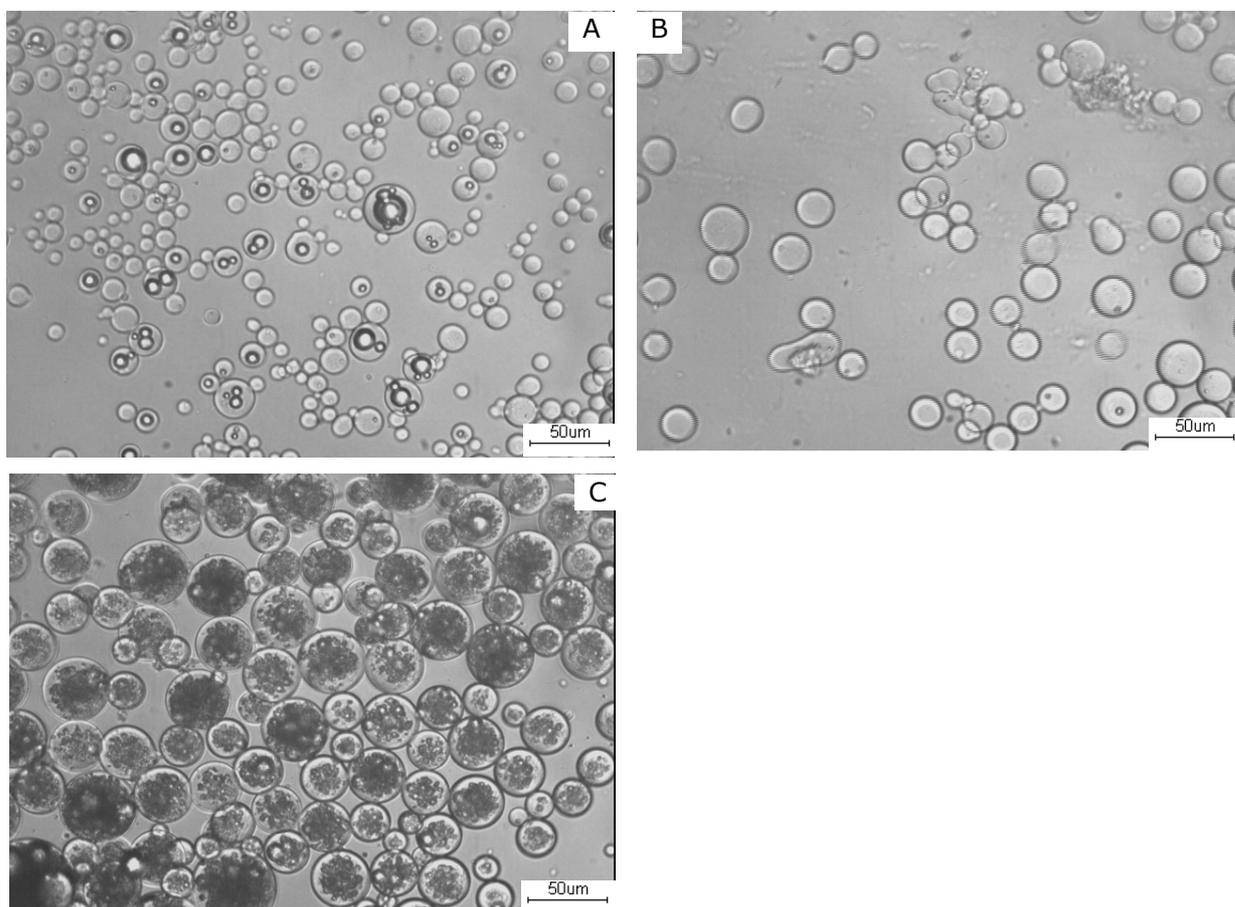


Figura 22. Micropartículas produzidas por coacervação complexa de GE:GA com 50% de recheio. A. Óleo de amêndoas, B. Óleo mineral, C. Óleo de vetiver.

As partículas com óleo mineral mostraram-se praticamente vazias, sendo que no processo pôde-se ver óleo não encapsulado sob a forma de espuma e o aspecto extremamente oleoso da partícula ao toque indicou a presença de óleo na superfície externa da mesma. Nos sistemas produzidos com os três óleos, não foi observada flotação das partículas.

A eficiência de encapsulação também foi influenciada pelo tipo de óleo. Partículas formadas com óleo de vetiver e de amêndoas apresentaram as maiores eficiências, como se a eficiência de encapsulação parecesse depender da "hidrofilicidade" do óleo, parâmetro que pode ser relacionado com a molhabilidade do óleo. O óleo de vetiver possui propriedades físicas muito diferentes do óleo mineral como reflexo de sua composição química. O óleo mineral é basicamente constituído por hidrocarbonetos, e por isso, muito mais apolar. O óleo de vetiver é uma complexa mistura de compostos de funções químicas diversas, que inclui compostos bastante hidrofílicos como álcoois, ácidos, cetonas e por isso pode agir como um tensoativo, melhorando a eficiência de encapsulação.

RABISKOVA & VALASKOVA [1998] investigaram uma ampla faixa de materiais e perceberam que as propriedades de superfície dos óleos, em particular sua hidrofobicidade relativa, influenciam significativamente sua inserção no coacervado.

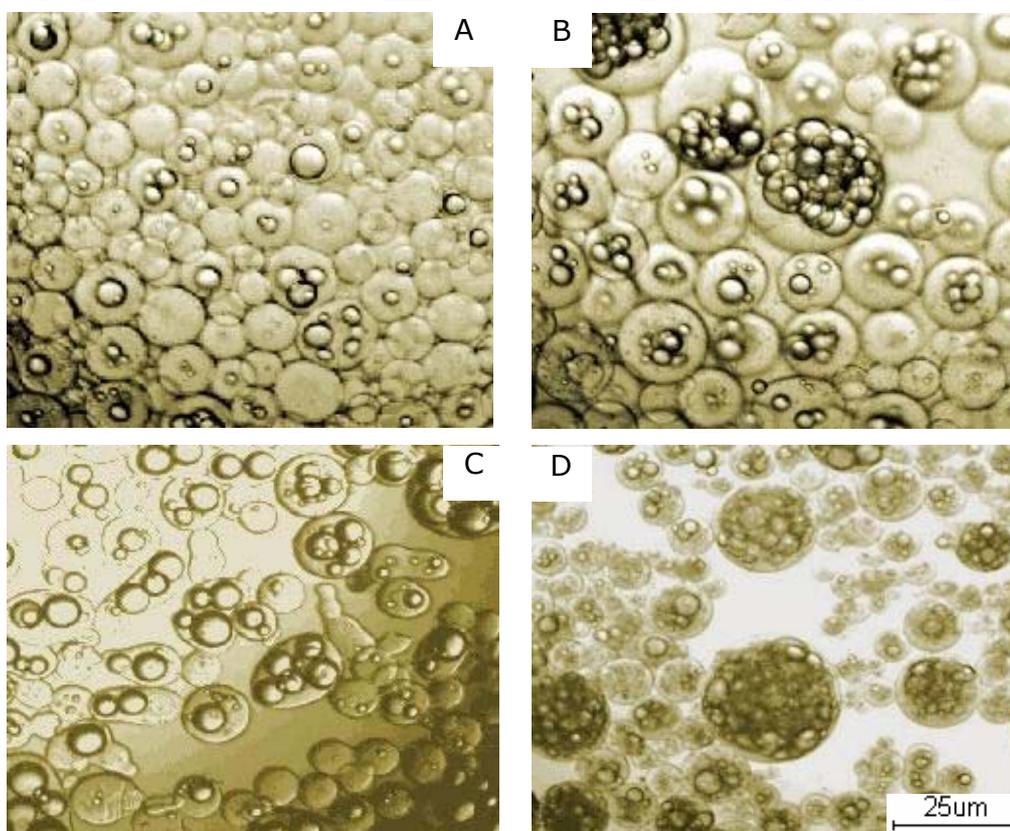


Figura 23. Microcápsulas coacervadas com óleo mineral em três concentrações: A. 25%, B. 50%, C. 75%. e D. 50% de uma composição (1:1 óleo mineral: óleo vetiver).

A alternativa de testar a quantidade de óleo com o intuito de melhorar a eficiência de encapsulação não funcionou para o óleo mineral. As partículas contendo óleo mineral (Figura 23) apesar de aumentarem o número de núcleos, mostraram-se muito heterogêneas quanto a forma, tamanho e ao número de núcleos por partícula, sendo que muitos coacervados foram formados sem encapsular óleo algum. Este comportamento pôde ser observado nas três concentrações de óleo testadas (25%, 50% e 75%), indicando que a baixa eficiência de encapsulação deste óleo não se deve à quantidade presente.

WIELAND-BERGHAUSEN et al. [2002] prepararam microcápsulas de etilcelulose por coacervação simples e observaram que a proporção ativo-material polimérico foi um fator importante na eficiência de encapsulação. Ao se diminuir a concentração de ativo, há maior chance de os polímeros cobrirem as gotas de material encapsulante, o que permite maior eficiência de encapsulação. Adicionalmente, verificaram que melhores eficiências foram obtidas em sistemas mais viscosos. BURGESS [1994] reportou que a alta viscosidade do coacervado resulta em cápsulas mais estáveis, mas se a viscosidade é muito alta, a encapsulação pode ser prejudicada.

No entanto, micropartículas produzidas com até 75% de óleo de vetiver, em relação à massa de polímeros, apresentaram-se bastante túrgidas e as gotas de óleo foram completamente cobertas pelos polímeros em solução. Com este óleo, pôde-se avaliar a capacidade do complexo de polieletrólitos em suportar grandes quantidades de óleo, pois apesar de o complexo não parecer elástico, visto que o diâmetro das partículas não se alterou significativamente (Figura 23C), ele foi capaz de reter uma grande quantidade do ativo. As micropartículas apresentaram forma esférica bem definida e, mesmo na menor concentração de óleo (Figura 23A) houve uma distribuição uniforme do óleo no interior das partículas.

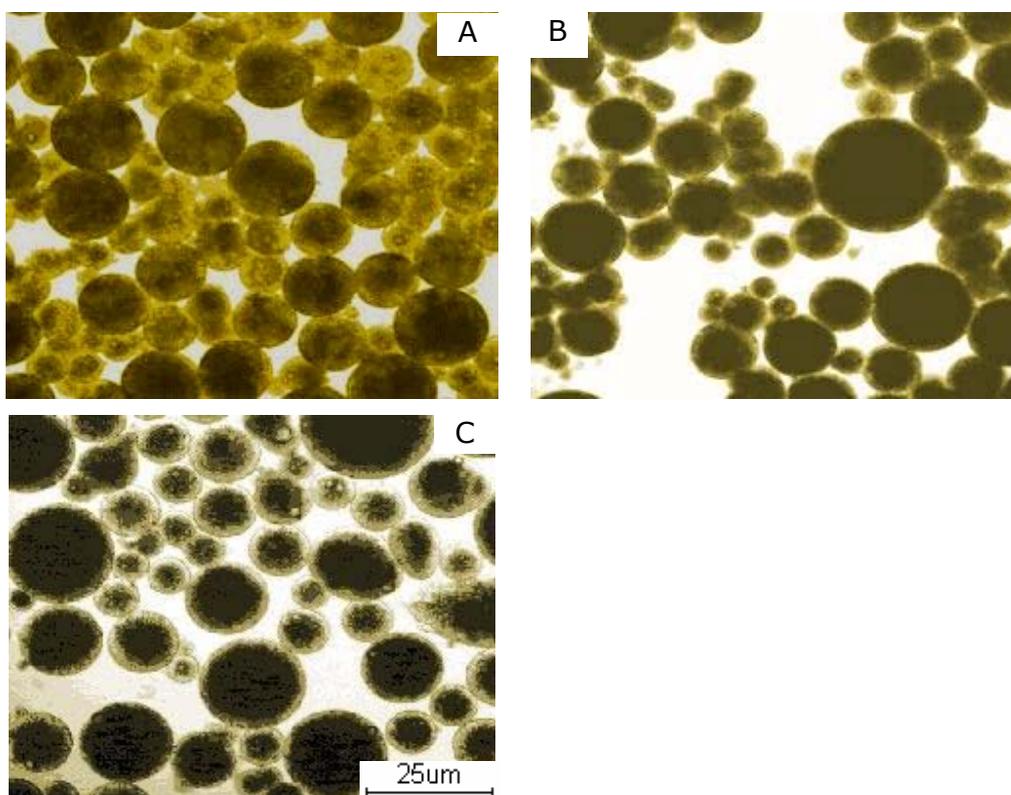


Figura 24. Microcápsulas coacervadas com óleo essencial de vetiver com três concentrações: A. 25%, B. 50%, C. 75%.

A emulsificação é o passo preliminar do processo de coacervação e as características das gotas emulsionadas podem ser mantidas após a complexação dos polímeros. Além disso a molhabilidade e a espalhabilidade da emulsão têm uma grande importância na encapsulação [MADAN, LUZZI & PRICE, 1972; IJICHI et al., 1997; THOMASIN, MERKLE & GANDER, 1997]. A medida do potencial zeta foi feita a cada passo da coacervação complexa, para os três óleos. As medidas do potencial das emulsões formadas em água não puderam ser obtidas em função da desestabilização das gotas de óleo.

Tabela 13. Potencial zeta nos passos formadores da micropartícula com diferentes óleos.

	<i>amêndoas</i>	<i>mineral</i>	<i>vetiver</i>
água	*	*	*
Emulsão gelatina /óleo	20,1±1,39	3,16±0,76	20,78±1,53
Adição da goma arábica	12,2±0,91	13±0,62	18,51±1,75

* Não foi possível fazer a medida.

Pode-se observar pela Tabela 13, que apesar da carga superficial das gotas emulsionadas em gelatina serem positivas, o óleo mineral apresenta uma grande diferença de medida de carga em relação às emulsões formadas com os outros óleos. A carga superficial é um indicativo de adsorção, e quanto maior a carga, maior quantidade de sítios de goma arábica (negativamente carregada neste pH) poderão se ligar. A medida do potencial zeta, após a inserção do polissacarídeo, constatou ainda um excesso de cargas positivas após a formação dos coacervados (Tabela 13). A proporção entre proteína e polissacarídeo adotada no estudo envolvendo a medida de carga por potencial zeta foi de 1:1.

As propriedades físicas dos óleos usados para o estudo da coacervação complexa estão apresentadas na Tabela 14. Apesar da tensão superficial dos óleos não apresentarem diferenças significativas ($p < 0,05$), a tensão da mistura de vetiver e óleo mineral em qualquer proporção, tende a aproximar-se da tensão do óleo mineral sozinho e isto se refletiu na distribuição do óleo na partícula. Micropartículas produzidas com as misturas apresentaram a mesma característica de distribuição de gotas que a partícula do óleo mineral (Figura 23D), sendo esta completamente diferente do óleo de vetiver (Figura 24).

As tensões interfaciais dos óleos com a solução de gelatina 2,5% (p/p) a 50°C, mimetizam a situação de produção de emulsão antes do passo de complexação com o polissacarídeo. Quanto maior a tensão interfacial, maior o tamanho da gota e menor a área de contato com a solução de proteína. Assim,

de acordo com os dados obtidos deve-se esperar que o óleo de vetiver (29,52 N/m) apresente as menores e mais cineticamente estáveis gotas de emulsão, seguido do óleo mineral (15,14 N/m) e, por último, o óleo de amêndoas (8,53 N/m). Os óleos praticamente não diferiram quanto a densidade e viscosidade.

Tabela 14. Propriedades físicas dos óleos estudados.

	Tensão Superficial (25 °C, N/m)	Tensão Interfacial (50°C, N/m)	Densidade Relativa (25 °C)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (50°C, cP)
Mineral (M)	34,566±0,005	15,1±0,5	0,8507	0,887±0,003	31,7
25%(V),75%(M)	34,966±0,005				
50%(V),50%(M)	35,294±0,005				
75%(V),25%(M)	34,686±0,004				
Vetiver (V)	39,104±0,009	29,52±0,03	1,027	1,009±0,004	24,7
Amêndoas	36,596±0,005	9 ± 2	0,9193	0,932±0,003	24,2

A Figura 25 comprova as diferenças entre as tensões interfaciais da gelatina e dos óleos pela visualização das gotas de emulsão (2,5% p/v da gelatina) formada com os diferentes óleos. As gotas emulsionadas com o óleo de vetiver apresentaram os menores diâmetros de gotas emulsionadas, 5,9 µm, comparados a 9,2 µm com óleo de amêndoas e 33,9 µm com óleo mineral.

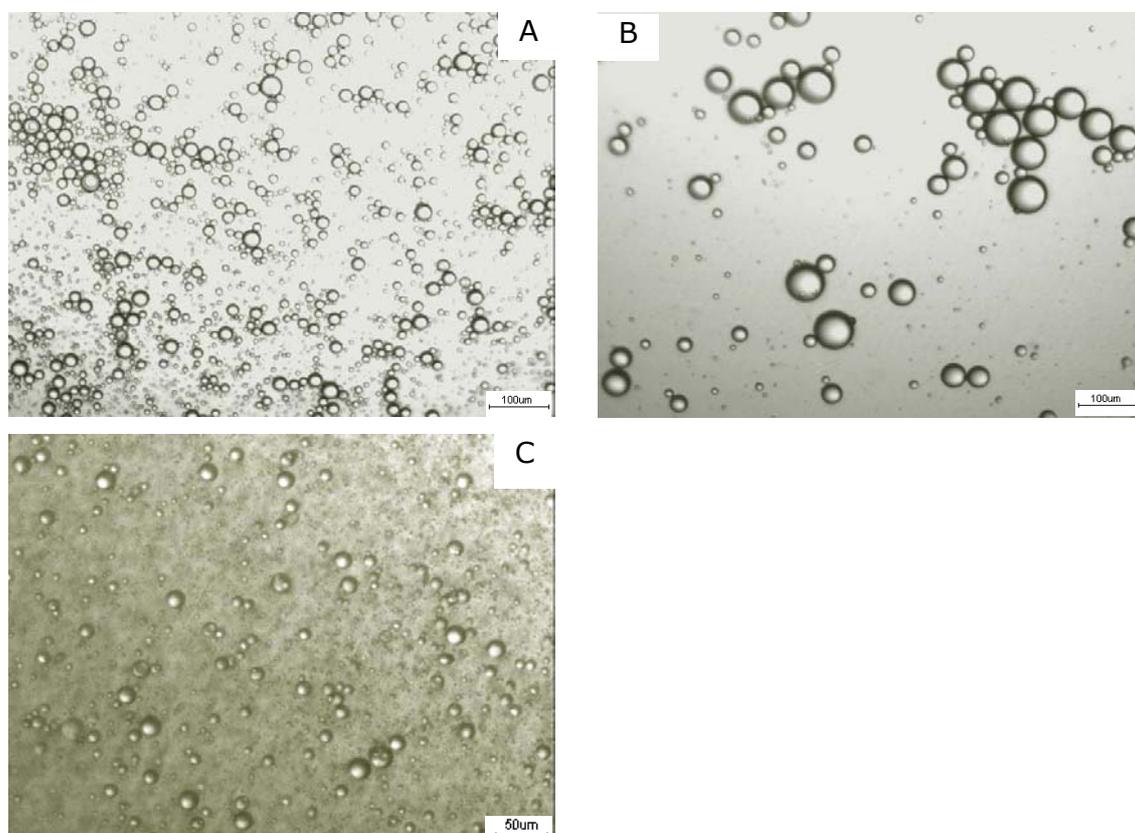


Figura 25. Emulsão de amêndoas (A)-9,20 μm , mineral (B)-33,94 μm (12,5x) e vetiver (C)-5,87 μm (25x), em solução de gelatina (2,5% p/v).

No entanto, uma análise de tamanho médio das partículas coacervadas indicou que as partículas produzidas com o óleo de vetiver apresentaram-se maiores (43,5 μm) comparadas às partículas com óleo mineral (35,0 μm) e óleo de amêndoas (19,2 μm) (Figura 27). O fato de as gotas de emulsão do óleo de vetiver serem muito pequenas permite que o polímero coacervado englobe muitas delas, caracterizando-as como partículas multinucleadas. Por outro lado, quando as gotas apresentam-se maiores, forma-se um filme ao redor de uma única gota, e a cápsula torna-se mononucleada (Figura 26).

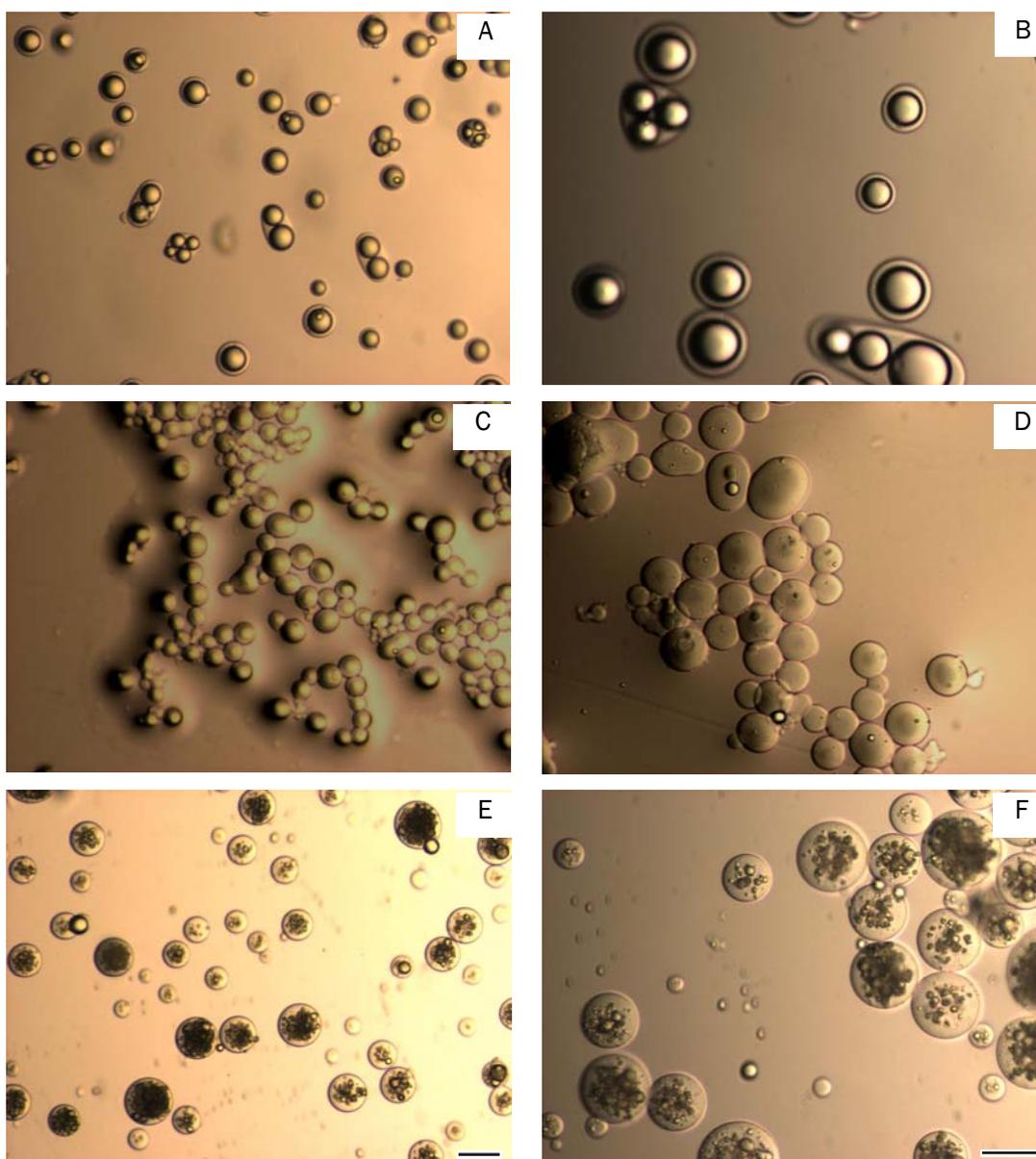


Figura 26. Microscopia óptica das partículas produzidas com óleo de amêndoas (A,B), óleo mineral (C,D) e óleo de vetiver (E,F). As barras representam 40µm.

Assim, quando JEGAT & TAVERDET [2003] observaram que a morfologia das partículas é influenciada em sua densidade, eles se referiram à formação de uma massa coacervada que incorpora gotículas de emulsão e que sedimentam. Como nenhuma das partículas produzidas neste trabalho flutuou,

atribui-se a densidade das partículas mononucleadas aos filmes espessos coacervados em torno da gota de óleo.

O mesmo efeito foi observado por WEINBRECK et al. [2004b], num sistema coacervado de goma arábica e proteínas do soro de leite. Grandes gotas de óleo de laranja formadas pelo uso de agitador magnético foram individualmente cobertas por uma fina camada de coacervados e as pequenas gotas, obtidas pela agitação em ultra-turrax, foram encapsuladas em uma matrix coacervada multinucleada.

Os experimentos realizados nesse trabalho, em concordância com a literatura, podem sugerir que a formação de microcápsulas (mononucleadas) ou micropartículas (multinucleadas) depende principalmente do tamanho das gotas da emulsão, que por sua vez dependem da intensidade de agitação.

A Figura 27 apresenta a distribuição de tamanho das partículas produzidas com os diferentes óleos. As partículas produzidas com o óleo mineral apresentaram um comportamento diferente das demais. Atribui-se ao primeiro pico de distribuição de tamanho, encontrado na faixa de 1 a 10 μ m, o óleo não encapsulado aderido às paredes das partículas. As amostras de vetiver apresentaram maior homogeneidade de tamanho que as partículas com óleo de amêndoas e as duas partículas apresentaram perfil unimodal.

Os diâmetros médios observados para as partículas úmidas foram de 19,2 μ m, para as amostras com óleo de amêndoas, 34,9 μ m com óleo mineral e 43,5 μ m para o óleo de vetiver.

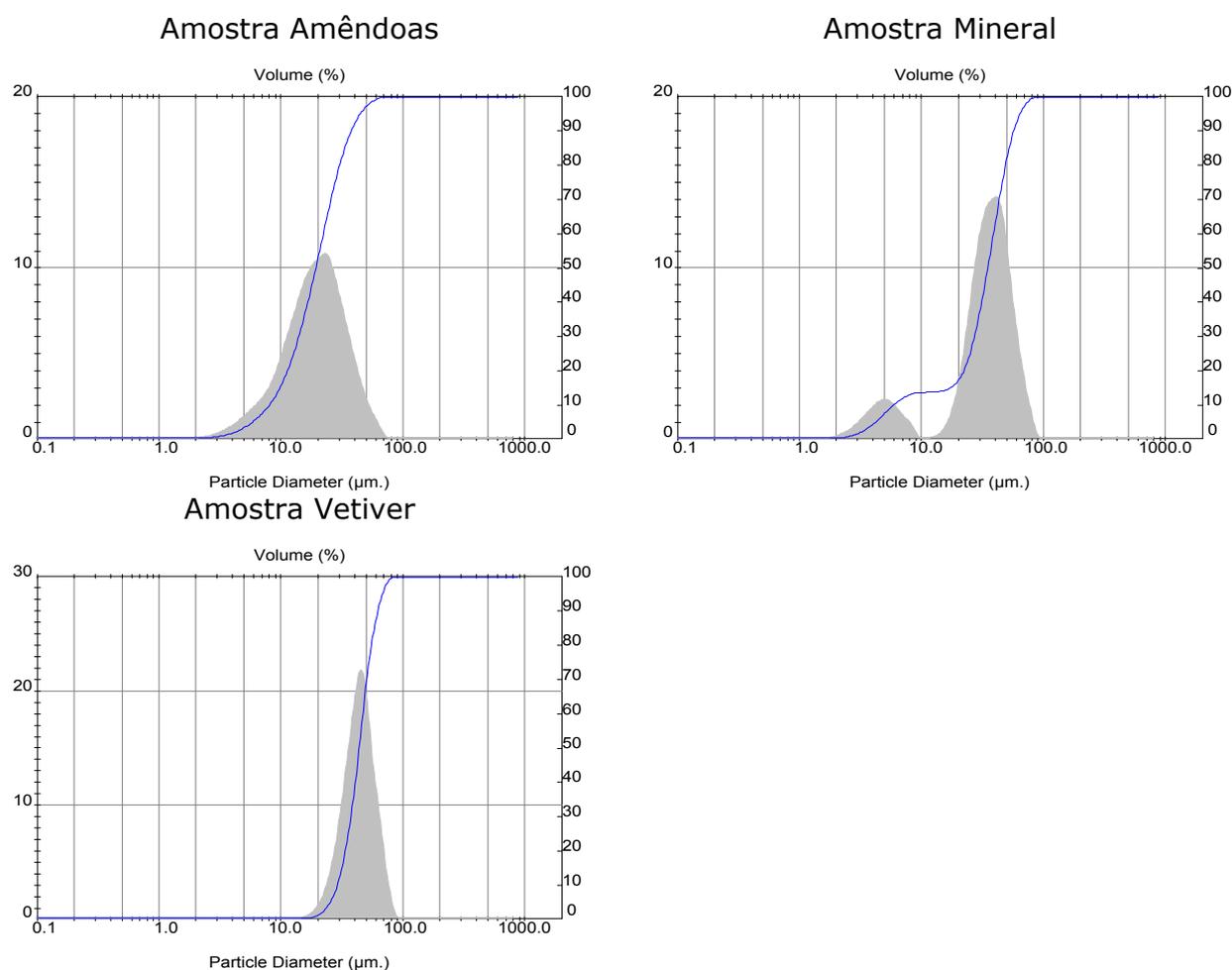


Figura 27. Distribuição de tamanho das partículas com tamanho médio de Amêndoas (19,23µm), Mineral (34,99µm), Vetiver (43,49µm).

A liofilização das partículas produziu amostras similares quanto à superfície e quanto à forma. As partículas mantiveram esfericidade apesar de estarem conectadas entre si (Figura 28), efeito provocado pela secagem por liofilização, mas que após hidratadas readquiriram a fluidez observada nas cápsulas úmidas, ou seja, voltaram à forma original.

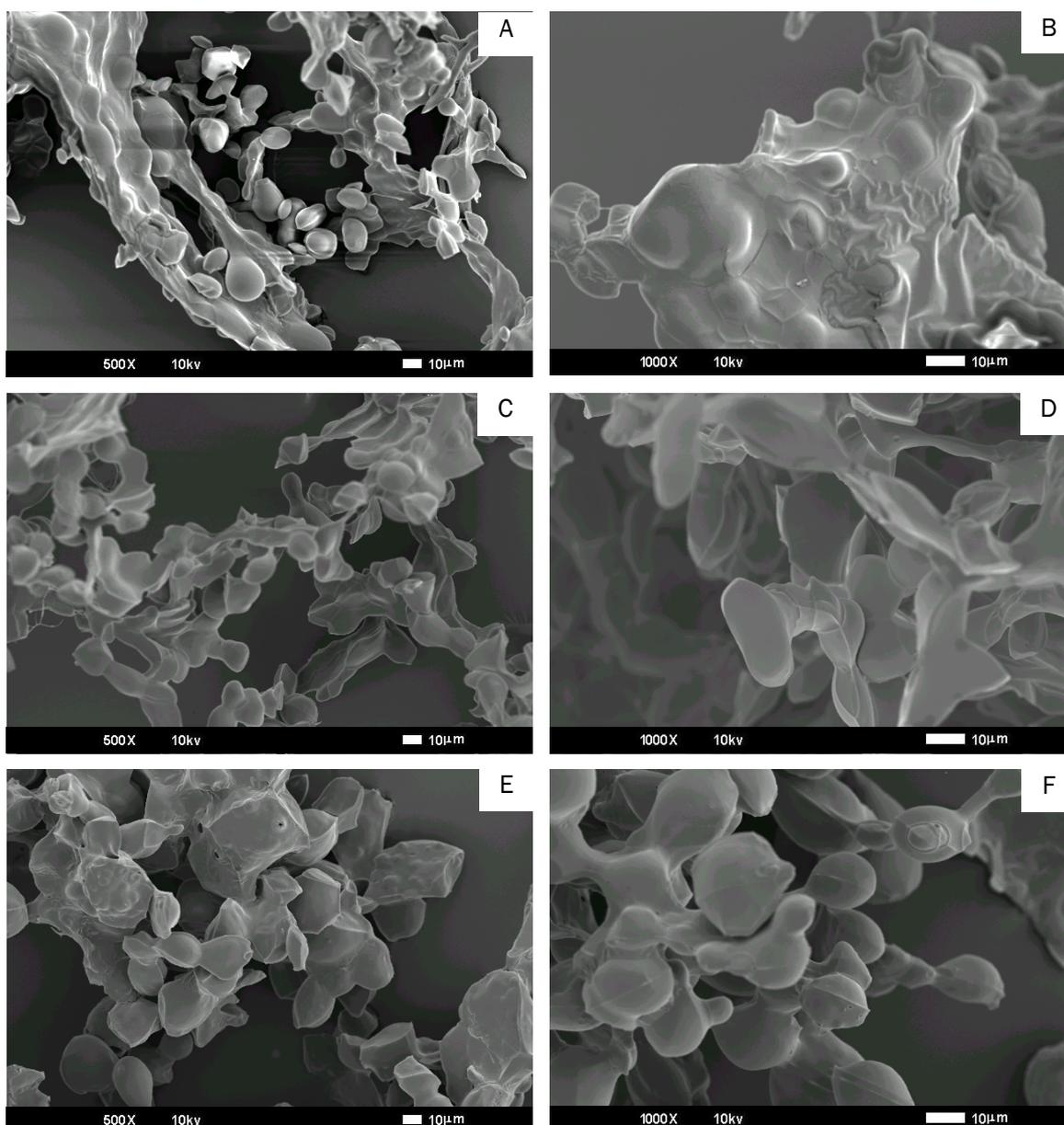


Figura 28. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das partículas liofilizadas. A e B partículas com óleo de amêndoas, C e D partículas com óleo mineral, E e F partículas com óleo de vetiver.

5.3 Discussão sobre a Teoria da Coacervação

Existem duas principais teorias para explicar a formação das microcápsulas por coacervação complexa. As teorias posteriores aprimoram as

teorias basais de Veis e Aranyi e de Voorn e Overbeek, modificando parâmetros teóricos de concentração e distribuição de cargas.

O modelo de Voorn e Overbeek prediz que as moléculas são livres para moverem-se no estado líquido (cargas distribuídas na solução de maneira homogênea) e desta maneira, os coacervados seriam formados ao redor das gotas de óleo e se acumulariam como um processo único.

O modelo de agregação da fase diluída, proposto por Veis e Aranyi, por sua vez, considera a coacervação como um processo em dois passos. Inicialmente, as moléculas de gelatina e goma arábica agregam-se de maneira solúvel e depois se rearranjam lentamente para formar a fase coacervada. De acordo com esta teoria, os coacervados são previamente formados, sem que haja a necessidade da adsorção da gelatina sobre a gota de óleo para que o polissacarídeo se complexa e forme as partículas.

Para verificar a influência da ordem de adição do óleo e tentativamente explicar como os coacervados são formados na técnica de microencapsulação, a mistura dos biopolímeros foi coacervada alternando-se a ordem de inserção do óleo. O óleo foi adicionado antes (Figura 29A) e após (Figura 29B) o ajuste de pH. Nos dois casos o processo de emulsificação da fase óleo na solução de gelatina não ocorreu. A ordem de inserção de óleo foi determinante para a encapsulação.

Os métodos testados verificaram que as micropartículas são formadas, mas precisam da superfície do óleo para encapsulá-lo. Como dito anteriormente, a formação de partículas é uma extensão do processo de coacervação complexa, portanto, pôde-se observar a formação de coacervados complexos nos dois casos, porém, a encapsulação do óleo foi mais eficiente quando a situação de cargas opostas foi atingida após o contato do óleo com o agente emulsificante. Este fato parece comprovar a não validade da teoria de Voorn, pois se os coacervados tivessem liberdade de movimento eles

encapsulariam o óleo independentemente da ordem de inserção. Adicionalmente, JOUZEL et al. [2003] mostraram a importância da emulsificação na preparação das partículas. Eles compararam partículas formadas com a adição do óleo antes ou após a adição da goma arábica e verificaram a redução do tamanho das partículas neste último caso. Eles atribuem esse comportamento à diferente interface formada entre a emulsão e o filme coacervado formado.

A boa formação das micropartículas com óleo essencial de vetiver sem que o sistema fosse emulsificado parece decorrer da composição do óleo que contém componentes hidrofílicos que podem ter ajudado na compatibilidade óleo-proteína. Além disso, diferentemente do óleo mineral que apresenta uma tendência em formar grandes gotas com nítida separação da fase aquosa, o óleo de vetiver se apresenta em pequenas gotículas dispersas no meio aquoso - gotas não coalescidas.

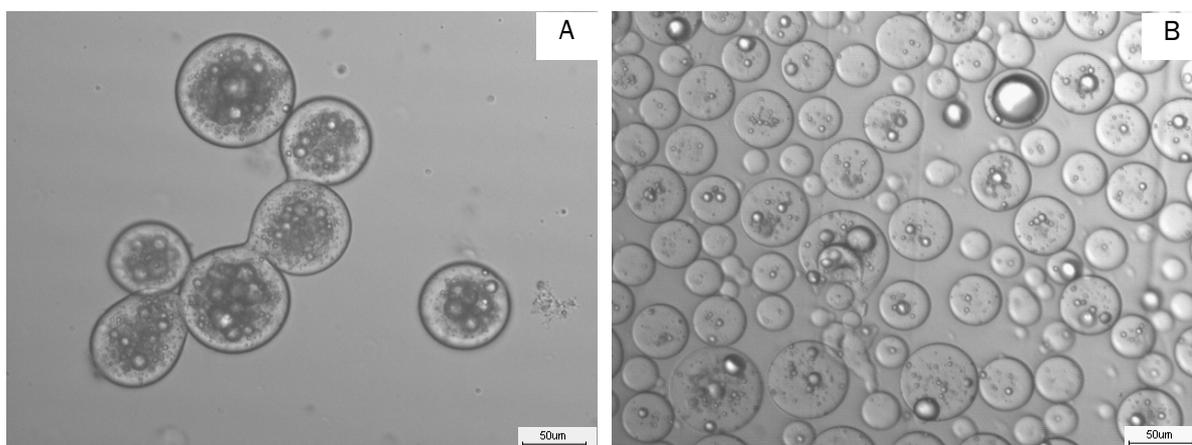


Figura 29. Microcápsulas coacervadas sem emulsificação, pH 4,0, 50°C. A ordem de acerto de pH foi alterada A. Após a adição do óleo, B. Antes da adição do óleo.

5.4 Testes de eficiência de encapsulação

Três métodos para extração/quantificação do óleo contido nas micropartículas foram testados. Método gravimétrico (extração com três

solventes), método cromatográfico e método enzimático. Os resultados obtidos estão no Apêndice A2 e, no desenvolvimento deste trabalho, a partir dos resultados preliminarmente obtidos, foram adotados os métodos: gravimétrico com o uso do diclorometano, quando a partícula não continha o reagente fluorescente, e enzimático e detecção por fluorimetria, neste caso.

A eficiência de encapsulação do composto fluorescente KD foi alta, atingindo 95%. Para que a eficiência de encapsulação fosse quantificada, anteriormente o método de extração do composto fluorescente foi testado e validado com a adição de óleo fluorescente (OF) livre em quantidade conhecida a uma mistura de soluções poliméricas nas mesmas quantidades utilizadas na produção de micropartículas coacervadas. A extração de KD livre adicionado à mistura polimérica foi bastante eficiente, com recuperação de 98,7%, não se observando interferência da adição da enzima, pH de incubação ou do óleo de vetiver na quantificação por fluorescência do composto dansilado.

LAMPRECHT, SCHÄFER & LEHR [2001] produziram microcápsulas por coacervação com 80% de eficiência de encapsulação, sendo cápsulas tipo matriz. Neste trabalho os autores utilizaram enzima proteolítica para romper a cápsula coacervada e hexano para extrair o óleo. A utilização do método fluorimétrico para quantificação do composto conduz a resultados bem mais precisos que o gravimétrico. São evitadas perdas decorrentes da evaporação e da sensibilidade da balança em relação à quantidade de material extraído.

Apesar disso, RABISKOVA et al. [1994] obtiveram altas porcentagens de encapsulação de esqualeno com tensoativos de baixo HLB em cápsulas coacervadas de goma arábica/gelatina. A eficiência de 93,2 a 99,6% foi obtida por gravimetria utilizando hexano para extração. Em outro trabalho, no mesmo tipo de partícula, eficiências de encapsulação variaram entre 75-80% para diferentes óleos (soja, oliva ou amendoim com tensoativos) [RABISKOVA & VALASKOVA, 1998]. A eficiência de extração está diretamente relacionada com o número de extrações e o tipo de solvente utilizado.

Extração com solventes (hexano, éter dietílico ou clorofórmio), hidrodestilação e extração supercrítica foram avaliados para a extração de óleo de limão encapsulado em ciclodextrina, obtendo-se melhor eficiência de extração quando hexano foi utilizado, com porcentagens de extração variando de 80,6 a 100% entre a primeira e a terceira extração sucessivas [PADUKA et al, 2000].

5.5 Análise das variáveis do processo

A importância das principais variáveis do processo de coacervação foi avaliada, analisando seus efeitos simultâneos através de um planejamento experimental seqüencial, o qual possibilitou a execução com um número reduzido de ensaios. Este método permite a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e a modelagem empírica dos resultados, em função das variáveis escolhidas.

A temperatura do processo, pH de coacervação, velocidade e tempo de homogeneização da emulsão, quantidade de ativo adicionada, quantidade e proporção entre os polímeros de parede formaram as variáveis independentes do processo. A taxa de resfriamento e o tempo de coacervação também foram monitorados.

A escolha das variáveis para a otimização do método de preparação das partículas foi baseada nas curvas estequiométricas (Figura 18 e Figura 21). O rendimento em coacervados formados foi avaliado conjuntamente com a caracterização microscópica das partículas produzidas. Por outro lado, a otimização da eficiência de encapsulação foi feita apenas quando os parâmetros de produção das cápsulas de goma-arábica-gelatina foram ajustados.

Os polímeros usados foram o sistema clássico goma-arábica-gelatina e o pectina-gelatina. A primeira seqüência de ensaios (varredura das variáveis) foi realizada na formação da partícula com óleo de amêndoas, tendo em vista que o rendimento em coacervados produzidos com este óleo não difere significativamente do óleo de vetiver. A otimização da produção das partículas (2ª. Parte dos experimentos) foi realizada com o óleo de vetiver e a eficiência de encapsulação foi medida.

5.5.1 Planejamento Experimental

5.5.2 Sistema goma-arábica-gelatina

A otimização do processo de produção de micropartículas de goma arábica e gelatina foi baseada no rendimento em coacervados (Y1), já que volume máximo da fase coacervada é produzido quando ocorre a neutralização das cargas das macromoléculas do sistema. Os resultados obtidos com a primeira matriz contendo 7 variáveis e cinco níveis para o óleo de amêndoas está apresentado na Tabela 15. Os níveis codificados foram apresentados em Materiais e Métodos.

Tabela 15. Planejamento fatorial fracionado para o óleo de amêndoas avaliando o rendimento em coacervados (Y1).

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	Y1
1	1	1	40	4	2,5	1:2	1,25	13,58
2	4	1	40	4	5	1:2	3,75	20,5
3	1	18	40	4	5	2:1	1,25	37,71
4	4	18	40	4	2,5	2:1	3,75	41,16
5	1	1	60	4	5	2:1	3,75	44,59
6	4	1	60	4	2,5	2:1	1,25	77,6
7	1	18	60	4	2,5	1:2	3,75	9,85
8	4	18	60	4	5	1:2	1,25	56,35
9	1	1	40	5	2,5	2:1	3,75	40,98
10	4	1	40	5	5	2:1	1,25	0
11	1	18	40	5	5	1:2	3,75	0
12	4	18	40	5	2,5	1:2	1,25	0
13	1	1	60	5	5	1:2	1,25	0
14	4	1	60	5	2,5	1:2	3,75	0
15	1	18	60	5	2,5	2:1	1,25	86,59
16	4	18	60	5	5	2:1	3,75	91,47
17	2,5	14	50	4,5	3,25	1:1	2,5	51,81
18	2,5	14	50	4,5	3,25	1:1	2,5	49,46
19	2,5	14	50	4,5	3,25	1:1	2,5	40,89
20	2,5	14	50	4,5	3,25	1:1	2,5	61,42

(X1) Tempo de homogeneização da emulsão (min); **(X2)** Velocidade de homogeneização da emulsão (x1000rpm); **(X3)** Temperatura de solução polimérica (°C); **(X4)** pH de coacervação; **(X5)** Concentração de polímero total (%); **(X6)** Proporção entre polímeros (GE:GA); **(X7)** Quantidade de ativo (g).

Todas as partículas formadas foram observadas microscopicamente (Figura 31). Para efeito ilustrativo, entre os ensaios que apresentaram a mesma morfologia foi selecionada somente uma micrografia. Assim, ensaios 1, 2 e 7 foram representados pela micrografia do ensaio 1; ensaios 3-6, representados pela micrografia do ensaio 4; ensaios 10-14, pela micrografia do ensaio 14 e ensaios 15 e 16, pela micrografia do ensaio 15. O efeito dos fatores foi determinado pelo método de mínimos quadrados e a importância relativa destes efeitos foi graficamente representada através de um gráfico de Pareto (Figura 30).

A Figura 30 mostra que as variáveis significativamente importantes foram a proporção entre a gelatina e a goma arábica, temperatura, velocidade de homogeneização e pH. As interações lineares não foram apresentadas, mas

as mais importantes são consequência da interação entre o tempo de homogeneização com a concentração de polímeros, temperatura e pH.

A faixa de pH ótima foi anteriormente determinada pelo ensaio de turbidez. Identificada a faixa de pH (4 a 5) onde a coacervação efetivamente ocorria, o efeito das demais variáveis foi estudado. Assim, as variáveis que influenciaram na formação puderam ser analisadas quase que independentemente do pH. Por isso, esta variável não entrou como significativa mas mostrou a tendência em prejudicar o rendimento quando o pH é aumentado. Os ensaios feitos em pH 5 não formaram partículas e as imagens correspondentes aos ensaios 10-14, mostraram o óleo sem a cobertura dos polímeros. Este comportamento também foi observado na curva de absorvância em função do pH (Figura 20). WEINBRECK et al. [2004a] observaram a mesma supressão de coacervados trabalhando com proteína do soro de leite e goma-arábica, constatando que a agregação das cápsulas foi dependente do pH de formação. Esses autores observaram ainda, que na região de pH de 3,0 - 4,5, as cápsulas apresentavam tendência a aglomerarem-se sem agitação. Autores que trabalharam com o sistema goma arábica/gelatina observaram que a faixa de coacervação ocorria entre valores de pH de 3,5 a 4,5 [THIES, 1995; BURGESS & CARLESS, 1985; LAMPRECHT, SCHÄFER & LEHR, 2001].

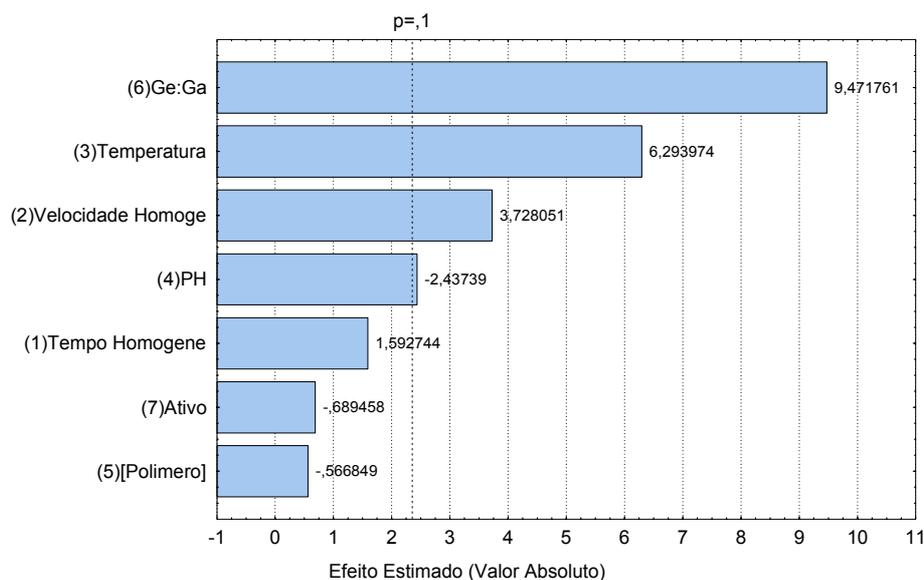


Figura 30. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias do planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} para partículas produzidas com GE:GA e óleo de amêndoas. $R^2= 0,92$.

O maior rendimento foi obtido nos ensaios 15 e 16, tendo respectivamente 86,6 e 91,5% dos polímeros inseridos sob a forma de cápsulas. Incluindo estes dois ensaios, os ensaios 3, 4, 5 e 6 foram os que apresentaram visualmente (Figura 31) as melhores partículas e os sobrenadantes límpidos. Os ensaios relacionados acima foram constituídos de duas partes de gelatina para uma de goma arábica.

Esta relação de proteína: polissacarídeo foi anteriormente reportada e é altamente dependente do pH. TSUNG & BURGESS [1997] prepararam coacervados a partir do complexo gelatina e heparina e observaram que a relação otimizada para o complexo usando gelatina tipo A em pH 2,7, que é onde existe a maior diferença de cargas entre os polímeros, consistiu de duas partes de gelatina para uma de heparina, já que a gelatina apresenta a metade das cargas da heparina. Do mesmo modo, KOH & TUCKER [1988] verificaram que o aumento do pH desloca o ponto ótimo da curva de produção de coacervados para uma menor quantidade de CMC. O aumento do pH aumenta

o número de cargas aniônicas da CMC e diminui as catiônicas na gelatina, e portanto, menor quantidade de CMC é necessária para uma interação equivalente com a gelatina.

Os ensaios que apresentaram os mais baixos rendimentos em coacervados eram constituídos de maior proporção de polissacarídeo em relação à proteína. Portanto, o fator limitante quando se trabalha com sistemas gelatina-polissacarídeo, em pHs abaixo do isoeletrico, será geralmente a concentração de gelatina, já que ela não desenvolve uma carga de rede positiva suficiente para associação eletrostática de mesma razão com o polissacarídeo.

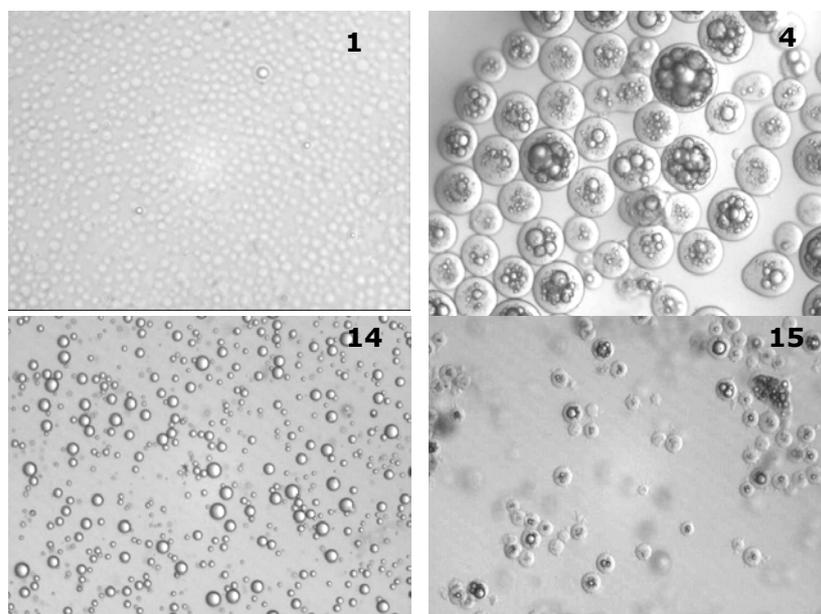


Figura 31. Partículas produzidas com óleo de amêndoas e goma arábica-gelatina a partir do planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} . Os números representam os ensaios.

A concentração de polímeros total na faixa estudada, ou seja até 5%, não interferiu no processo mas mostrou uma tendência a prejudicar o rendimento quando se aumentou a quantidade de polímeros no meio. Os resultados obtidos estão de acordo com TSUNG & BURGESS [1997] que

observaram uma redução na produção de coacervados com concentrações de biopolímeros totais acima de 2,25%. TOLSTOGUZOV [1986] afirma que não é possível formar coacervados com concentrações de biopolímeros totais superiores a 4% (p/p). De fato um aumento de concentração pode causar uma dificuldade de interação em função da redução do volume livre necessário para que haja a abertura e eficiente exposição dos grupos carregados. Além disso, a viscosidade aumentada nesta fase do experimento pode reduzir a mobilidade das macromoléculas de forma que a competição com as moléculas do solvente torna-se maior [BURGESS, 1994]. Porém uma viscosidade mínima é interessante para produzir cápsulas mais estáveis [WEINBRECK et al., 2004c]. Além disso, um aumento na concentração de polímeros pode alterar a espessura do filme coacervado formado ao redor da gota de óleo. WEINBRECK et al. [2004c] verificaram essa alteração na parede da partícula com concentração acima de 1%.

A temperatura é outro parâmetro extremamente importante na separação de fases e muitos trabalhos sugerem que temperaturas mais baixas favorecem a separação de fases. REMUÑÁN-LÓPEZ & BODMEIER [1996] constataram uma redução no rendimento em coacervado entre quitosana e gelatina tipo B a altas temperaturas e atribuem esta redução a um aumento na solubilidade dos polímeros e conseqüentemente dos complexos formados. No entanto, no par polimérico estudado, o aumento da temperatura, de 40 a 60 °C mostrou uma melhora no rendimento de coacervados. As partículas formadas com esta temperatura precipitaram mais rapidamente.

GILSENAN, RICHARDSON & MORRIS [2003] estudaram o efeito do pH e da proporção de mistura nas interações associativas (eletrostáticas) entre gelatina (tipo B; pI = 4,9) e pectina LM (DE 31,1) por DSC. Duas transições térmicas foram encontradas para misturas preparadas no pH de coacervação (pH ~3.5), uma coincide com a fusão da gelatina (abaixo de ~35 °C) e a outra a maiores temperaturas (~50 °C), o que pode justificar a interação entre a proteína e o polissacarídeo nesta faixa de temperatura. KHOMUTOV et al.

[1995] verificaram separação de fases entre gelatina e amido (2:1) de 35 a 70°C. O aumento da temperatura causou modificações conformacionais, principalmente na proteína, expondo grupos reativos que poderiam melhorar a solubilidade devido a aminoácidos hidrofílicos ou carregados favorecendo também ligações eletrostáticas. LIN et al. [2005] verificaram que a transição termo-induzida de agregados da estrutura secundária (β -sheet) de um hexapeptídeo PGAIPG (Pro-Gly-Ala-Ile-Pro-Gly), em solução aquosa ocorreu devido interações de pontes de hidrogênio intermoleculares entre os fragmentos hidrofóbicos de PGAIPG induzidos por coacervação. HARDING et al. [1993] observaram que a formação de complexos entre o polímero ASB e o alginato acontece em uma faixa descontínua. Além da faixa a temperatura ambiente, quando se trabalhou com temperaturas acima do ponto de desnaturação da proteína, a complexação voltou a ocorrer.

5.5.2.1 Otimização da eficiência de encapsulação do óleo de vetiver .

Pelo planejamento anterior, os ensaios foram focalizados na proporção entre os polímeros, taxa de homogeneização, temperatura e quantidade de material de recheio. O planejamento completo com o óleo de vetiver foi feito em pH 4,0 considerando a influência negativa de valores superiores ao ponto isoelétrico sobre o rendimento do processo. O tempo de homogeneização foi fixado no ponto central (2min) pois, apesar de não ser significativo, mostrou uma tendência de melhorar o rendimento. A quantidade de polímero total foi fixada no nível inferior (2,5% p/p) . A Tabela 16 apresenta os resultados de eficiência de encapsulação (Y2) e rendimento em coacervados (Y1), obtidos.

Tabela 16. Planejamento fatorial completo para o óleo de vetiver, sistema GE:GA, sobre o rendimento em coacervados (Y1) e a eficiência de encapsulação (Y2).

	X2	X3	X6	X7	Y2	Y1
1	10	40	1:2	2,5	30,67	36,23
2	18	40	1:2	2,5	17,42	18,9
3	10	40	1:2	7,5	50,12	37,65
4	18	40	1:2	7,5	47,93	42,72
5	10	40	2:1	2,5	74,6	50,93
6	18	40	2:1	2,5	53,1	45,05
7	10	40	2:1	7,5	45,7	56,78
8	18	40	2:1	7,5	64,54	20,59
9	10	60	1:2	2,5	25,94	10,1
10	18	60	1:2	2,5	23,6	24,53
11	10	60	1:2	7,5	25,08	50,54
12	18	60	1:2	7,5	17,5	63,3
13	10	60	2:1	2,5	64,79	72,24
14	18	60	2:1	2,5	35,74	75,08
15	10	60	2:1	7,5	46,66	56,4
16	18	60	2:1	7,5	72,58	72,64
17	14	50	1:1	5	58,6	92,56
18	14	50	1:1	5	32	73,47
19	14	50	1:1	5	31,28	72,74
20	14	50	1:1	5	36,21	72,63
21	14	30	1:1	5	-	50,44
22	14	70	1:1	5	-	82,1
23	14	50	1:3	5	-	4,55
24	14	50	3:1	5	-	47,66
25	14	50	1:1	0	-	76,39
26	14	50	1:1	10	-	67,07
27	6	50	1:1	5	-	63,93
28	22	50	1:1	5	-	86,41

(X2) Velocidade de homogeneização da emulsão (x1000rpm); **(X3)** Temperatura de solução polimérica (°C); **(X6)** Proporção entre polímeros (GE:GA); **(X7)** Quantidade de ativo (g).

Na otimização da coacervação (Figura 32), a importância dos fatores não se alterou para o rendimento do processo de coacervação, indicando que a formação das partículas independeu do tipo de óleo usado (amêndoas ou vetiver) apesar de alterar as características morfológicas das mesmas (Figura 29).

As mesmas observações puderam ser feitas para a proporção entre os polímeros, em que a concentração de gelatina apresenta influência limitante na formação e eficiência das cápsulas. A temperatura das soluções está entre os principais fatores que interferem na conformação das moléculas do complexo, sendo um parâmetro chave para a encapsulação.

As melhores partículas foram formadas com temperatura mais baixa e/ou maior proporção de gelatina em relação à goma arábica (ensaios 5 a 8, representados pela micrografia do ensaio 5 e ensaios 13 a 16, representados pela micrografia do ensaio 13, na Figura 33), ao contrário, partículas com alta temperatura e proporção inversa de gelatina:goma-arábica, produziram partículas sem formas e com baixo rendimento em coacervado (ensaios 9 a 11 representados pela micrografia do ensaio 9 na Figura 33). O menor rendimento foi obtido no ensaio 23, quando se utilizou a menor proporção de gelatina:goma arábica onde as partículas obtidas parecem estar vazias (Figura 33 (ensaio 23)). Os ensaios 17 a 20 são representados pela micrografia do ensaio 18 e os ensaios 1 e 2 representados pela micrografia do ensaio 1 na Figura 33.

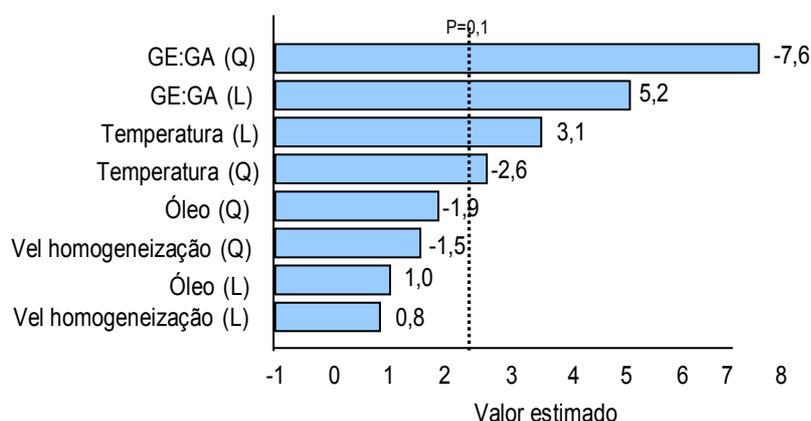


Figura 32. Gráfico de Pareto de rendimento do processo do óleo de vetiver (Y1), no sistema GE:GA. $R^2 = 0,84$.

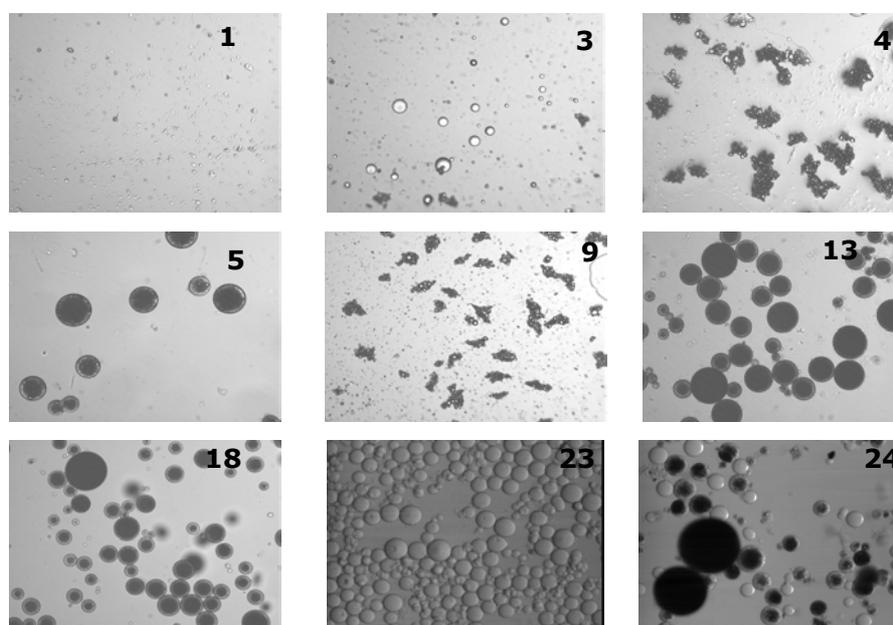


Figura 33. Micropartículas formadas a partir de um planejamento completo 2^3 para partículas produzidas com GE:GA e óleo de vetiver. Os números correspondem aos ensaios.

Como para uma alta eficiência de encapsulação, os complexos devem estar na forma de coacervados e não de precipitados, a eficiência de encapsulação das microcápsulas formadas no planejamento utilizando-se óleo essencial de vetiver, Figura 34, foi dependente principalmente da proporção entre os polímeros, seguido da quantidade de ativo adicionada, sendo que o aumento da quantidade de óleo adicionada até 7,5 g aumentou a eficiência de encapsulação. Ou seja, as microcápsulas produzidas com 2,5% de polímeros foram capazes de encapsular até 150 % de óleo em relação aos sólidos totais.

O tempo de homogeneização não foi estudado por não interferir no rendimento de coacervados, além disso, alguns trabalhos na literatura [JOUZEL et al., 2003; LAMPRECHT et al., 2004] admitem que esta variável não é relevante para a eficiência de encapsulação.

A quantidade de ativo adicionada no planejamento realizado com óleo de amêndoas foi muito inferior ao estudado com óleo de vetiver (1,25-3,75g), e a influência do ativo, apesar de não significativa nesta faixa de estudo, apresentou um efeito negativo com o aumento da quantidade de óleo adicionada. No planejamento com óleo de vetiver, usando-se 2,5-7,5g de óleo o efeito apareceu como positivo, ou seja, o óleo passou a ter mais importância no processo quando se ampliou a concentração de estudo. A quantidade de óleo no sistema mostrou-se importante na eficiência de encapsulação, e um aumento deste parâmetro apresentou a tendência em melhorar a eficiência de encapsulação.

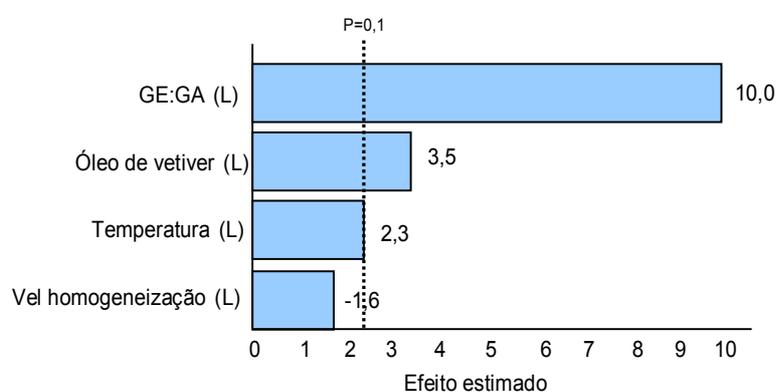


Figura 34. Gráfico de Pareto para Eficiência de Encapsulação das partículas produzidas com GE:GA e óleo de vetiver. $R^2 = 0,58$.

Apesar de a eficiência do processo estar associada à conformação dos biopolímeros, a composição do óleo é um fator adicional. O óleo de vetiver apresenta porções hidrofóbicas e hidrofílicas o que auxilia no processo de emulsificação, além de apresentar alta tensão superficial, que evita a coalescência das gotas. A velocidade de homogeneização não entrou como variável significativa no processo, contrariamente ao planejamento com óleo de amêndoas. A velocidade de homogeneização foi varrida em uma ampla faixa de velocidades (6000 a 22000 rpm) e mesmo assim não se apresentou como variável significativa na eficiência de encapsulação. JOUZEL et al. [2003] trabalhando com óleo de bacalhau constataram que a redução das gotas de

emulsão formadas com a solução de gelatina ocorreu linearmente com o aumento da velocidade de homogeneização. A temperatura de 60°C foi a melhor para a coacervação independentemente do óleo usado. A condição otimizada para a produção de coacervados sem avaliar a eficiência de encapsulação foi de três partes de gelatina para uma de goma arábica e temperatura de 60°C. ($x_1=2,5$ min, $x_2=14000$ rpm, $x_4=4,0$, $x_5=2,5\%$, $x_7=2,5$ g). Apesar dos parâmetros estabelecidos, os ensaios 17-20, relativos aos pontos centrais, apresentaram alto rendimento em coacervados e visualmente as partículas apresentaram-se esféricas e homogêneas em quantidade de recheio, sendo considerados satisfatórios como método de produção de partículas.

A análise do planejamento completo permite que se extraia o modelo matemático para o rendimento em função das variáveis significativas. Ele representa a influência das variáveis na resposta, pela aplicação do teste F, que é a comparação entre a resposta dos experimentos com os erros obtidos, sejam eles intrínsecos ao processo ou erros experimentais. O delineamento experimental apresentou como F (relação entre resíduos e regressão) 4,89. A comparação com o F tabelado (2,04) para o caso em que se tem 14 e 13 graus de liberdade, respectivamente para regressão e resíduos, e 90% de confiabilidade, é equivalente a 2,4, ou seja, duas vezes e meia maior que o valor tabelado. O modelo gerado prediz valores que são razoavelmente similares aos resultados experimentais. O ajuste para a eficiência de encapsulação ($R^2 = 0,58$) não foi tão bom quanto o do rendimento ($R^2 = 0,84$). Os valores positivos dos parâmetros representam influências positivas dos mesmos no rendimento e na eficiência de encapsulação. As superfícies de resposta para rendimento em coacervados são apresentadas na Figura 35, em função das principais variáveis do processo.

$$Y_1 = 77,9 + 14,9X_3 + 21,0X_6 - 10,5X_3^2 - 30X_6^2 + 12,6X_2X_3 - 17,7X_6X_7$$

$$Y_2 = 49,9 + 5,7X_3 + 24,8X_6 + 8,2X_7$$

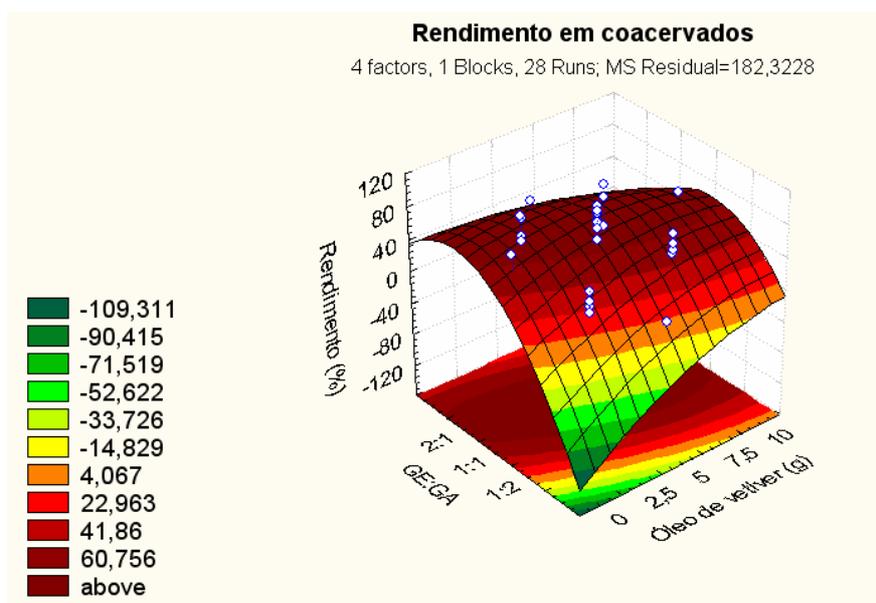
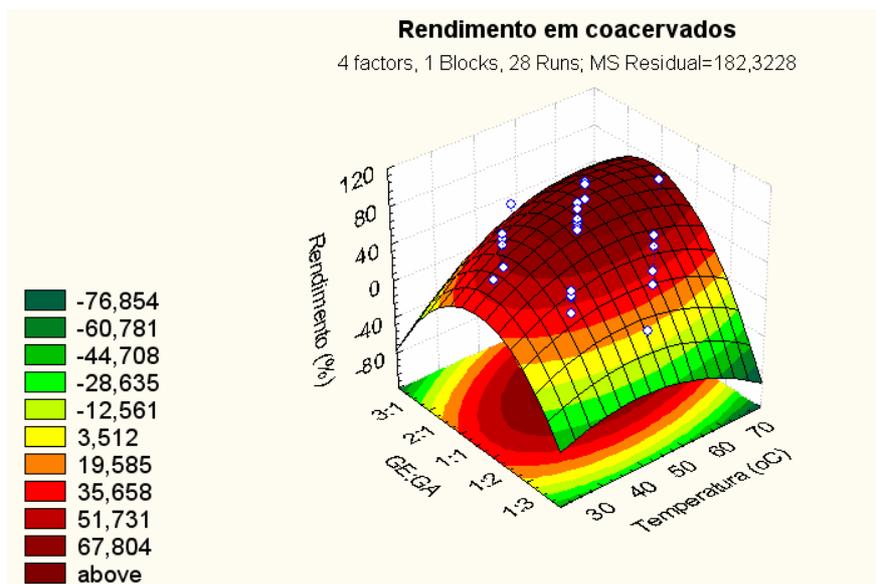


Figura 35. Superfícies de contorno obtidas a partir do planejamento experimental completo de partículas produzidas com GE:GA e óleo essencial de vetiver.

5.5.3 Sistema Gelatina- Pectina

A Tabela 17 apresenta as condições dos ensaios e os resultados de rendimento (Y1) obtidos para 11 ensaios experimentais entre os biopolímeros gelatina e pectina.

Tabela 17. Planejamento fatorial fracionado GE:PE para o óleo de amêndoas.

	X1	X2	X3	X4	X5	Y1
1	40	3	5	2:1	1	35,53
2	40	3	1	2:1	2,5	27,65
3	60	3	1	1:2	1	91,97
4	60	3	5	1:2	1	77,09
5	40	4	5	1:2	2,5	0
6	40	4	1	1:2	1	0
7	60	4	1	2:1	1	0
8	60	4	5	2:1	2,5	0
9	50	3,5	2,5	1:1	1,25	29,58
10	50	3,5	2,5	1:1	1,25	50,21
11	50	3,5	2,5	1:1	1,25	44,20

(X1) Temperatura de solução polimérica (°C); **(X2)** pH de coacervação; **(X3)** Concentração de polímero total (%); **(X4)** Proporção entre polímeros (GE:PE); **(X5)** Quantidade de ativo (g).

As condições experimentais foram selecionadas com base no planejamento experimental fatorial discutido acima e por isso, o tempo e a velocidade de homogeneização foram fixados nos valores dos pontos centrais do sistema goma arábica-gelatina, ou seja, 2,5 min e 14000 rpm. As demais variáveis (temperatura da solução polimérica (x1), pH de coacervação (x2), concentração total de polímero no sistema (x3), proporção entre a gelatina e a pectina (x4) e quantidade de ativo (x5)) foram estudadas através de um planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-3} , com três repetições no ponto central.

Como descrito em materiais e métodos, as condições de concentração de polímero total e proporção entre os polímeros foram modificadas em relação

ao sistema de goma-arábica e gelatina, em função da alta viscosidade provocada pela pectina.

As variáveis que apresentaram influência no rendimento de coacervados foram temperatura, pH e proporção entre os polímeros. O aumento da temperatura, de 40 para 60°C, tende a melhorar a coacervação. Apesar da estreita faixa de pHs, adotada em função do estudo de absorvância, a alteração do pH para 4,0 prejudicou significativamente o processo, para este par polimérico. Ao contrário do caso da gelatina e goma arábica, aumentar a quantidade de proteína não favoreceu a formação de coacervados, indicando que a pectina, nestas condições, apresenta uma quantidade de cargas baixa e quase insuficiente para coacervar, e em consequência, o rendimento médio ficou em torno de 32,4% (Figura 36).

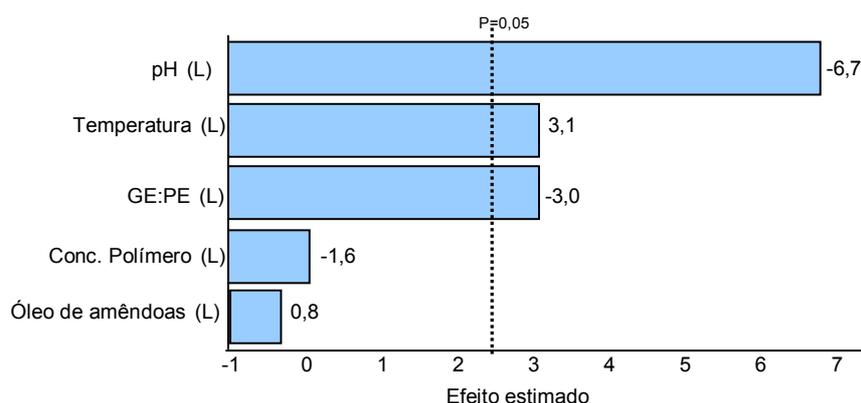


Figura 36. Gráfico de Pareto para rendimento em coacervados, do planejamento de partículas produzidas com GE:PE e óleo de amêndoas. $R^2=0,93$. Média de rendimento em coacervados 32,4%.

O óleo de vetiver foi encapsulado e foram avaliadas apenas as proporções entre os polímeros e uma faixa mais estreita de pH. A concentração de polímero total não pode ser alterada para grandes concentrações e foi mantida a 1,5% de polímero total, a temperatura e a quantidade de óleo foram fixadas nos pontos centrais do experimento feito com o óleo de amêndoas, ou seja, $x_1=50^\circ\text{C}$ e $x_5= 1,75\text{ g}$.

Tabela 18. Planejamento fatorial completo para o óleo de vetiver com o par pectina-gelatina.

	X2	X4	Y1
1	3	1:1	0,9294
2	4	1:1	0,4712
3	3	1:2	0,5710
4	4	1:2	0,1384
5	2,8	1:1,5	0,5629
6	1,41	1:1,5	0,4520
7	3,5	1:0,8	0,9616
8	3,5	1,41	0,2952
9	3,5	1:1,5	0,4385
10	3,5	1:1,5	0,3074
11	3,5	1:1,5	0,4156

(X2) pH de coacervação; (X4) Proporção entre polímeros (GE:PE)

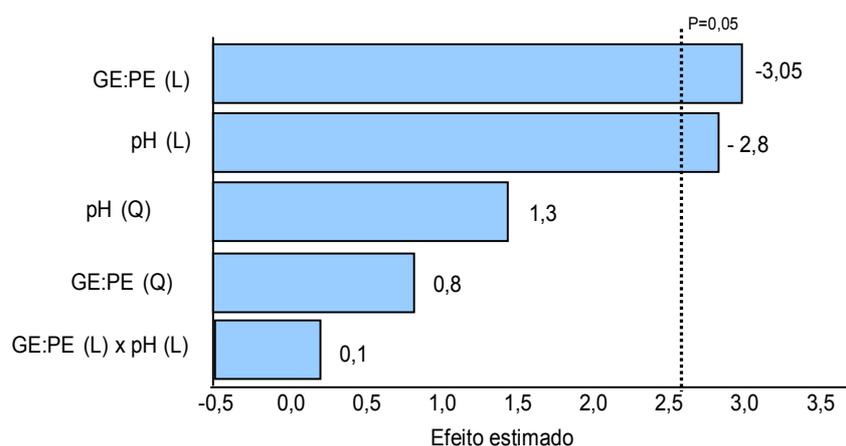


Figura 37. Gráfico de Pareto para o rendimento em coacervados, do planejamento de partículas produzidas com GE:PE e o óleo de vetiver. $R^2 = 0,79$.

Na situação otimizada, o rendimento médio ficou em torno de 40%. As partículas formadas mesmo em condições de alto rendimento (ensaio 7 (96,2%) e ensaio 1 (92,9%)) apresentaram-se sem forma definida (Figura 38). Devido à similaridade entre as morfologias obtidas, duas micrografias, correspondentes aos ensaios 6 (similar aos ensaios 1, 2, 10 e 11) e ao ensaio

9 (similar aos ensaios 3 a 5; 7 e 8) foram representativas do comportamento observado nesta seqüência de experimentos.

O coacervado foi formado na forma de precipitado e esse precipitado foi o responsável pelo aprisionamento do óleo na fase coacervada. Não houve a formação de um filme em torno da gota de óleo ou de uma matriz esférica como no caso da goma arábica, situações que caracterizam a técnica de microencapsulação. Em função disso, a eficiência de encapsulação não foi avaliada para este sistema.

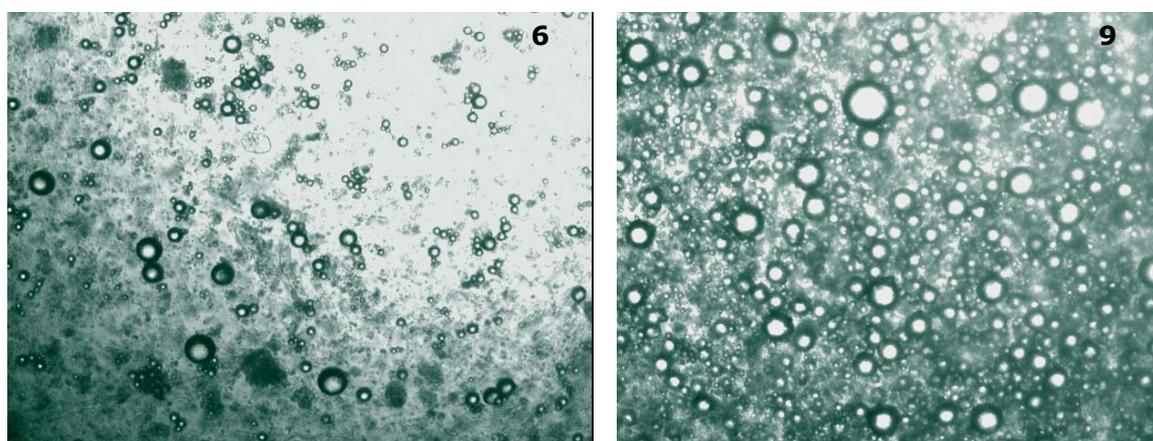


Figura 38. Micropartículas formadas a partir de um planejamento completo 2³ para o óleo de amêndoas com pectina-gelatina. Os números correspondem aos ensaios realizados

Como mencionado anteriormente, a massa molecular do carboidrato pode alterar a intensidade de interação entre ele e a proteína. Alguns autores atribuem este fator à influência que a estrutura do polissacarídeo apresenta nas propriedades de superfície das proteínas [TSAPKINA et al., 1992; DICKINSON & SEMENOVA, 1992; PAVLOVSKAYA et al., 1993; ANTIPOVA & SEMENOVA, 1997a; DICKINSON, 2003].

DICKINSON et al. [1998], num estudo sobre a influência da pectina na estabilização de emulsões de caseína, estabeleceram que as interações

termodinamicamente favoráveis entre proteínas (caseína α_{s1} e β) e polissacarídeos (pectina) são responsáveis pela diminuição drástica na atividade de superfície da proteína, especialmente nas regiões hidrofóbicas. Por sua vez, podem causar o aumento na viscosidade de superfície dos filmes de proteína adsorvidos e o cremeamento das emulsões estabilizadas na presença dos polissacarídeos [DICKINSON et al., 1998; SEMENOVA et al., 1999].

Outro fator que pode ser responsável pela não formação de cápsulas com a pectina é o volume livre das moléculas em solução. TOLSTOGUZOV [1997] considera que o efeito do volume excluído pela molécula provoca um aumento na taxa de geleificação de géis mistos com proteína. A exclusão do biopolímero faz com que cada um comporte-se como se estivesse numa concentração muito maior no mesmo volume e que para formar cápsulas tendo a pectina como polissacarídeo, é necessário trabalhar numa concentração muito diluída do polímero.

5.6 Ensaios de secagem, reticulação e reidratação

Testes de secagem foram realizados nas microcápsulas contendo o óleo de vetiver. Os métodos adotados devem garantir que a água saia sem deformar a parede da microcápsula e sem que haja perda de compostos voláteis. Portanto, em razão da fragilidade da parede da partícula e da dificuldade de usar altas temperaturas, foram escolhidos como processo de secagem, a liofilização e a secagem com CO₂ supercrítico. As partículas geradas a partir da secagem pelos dois processos podem ser visualizadas nas a 41. A liofilização exige o congelamento da água presente nas microcápsulas e a remoção é feita pela sublimação em função da redução de pressão (vácuo) do sistema. O congelamento foi feito de duas maneiras: rapidamente com o uso de nitrogênio líquido (Figura 39) e lentamente, em freezer (Figura 40).

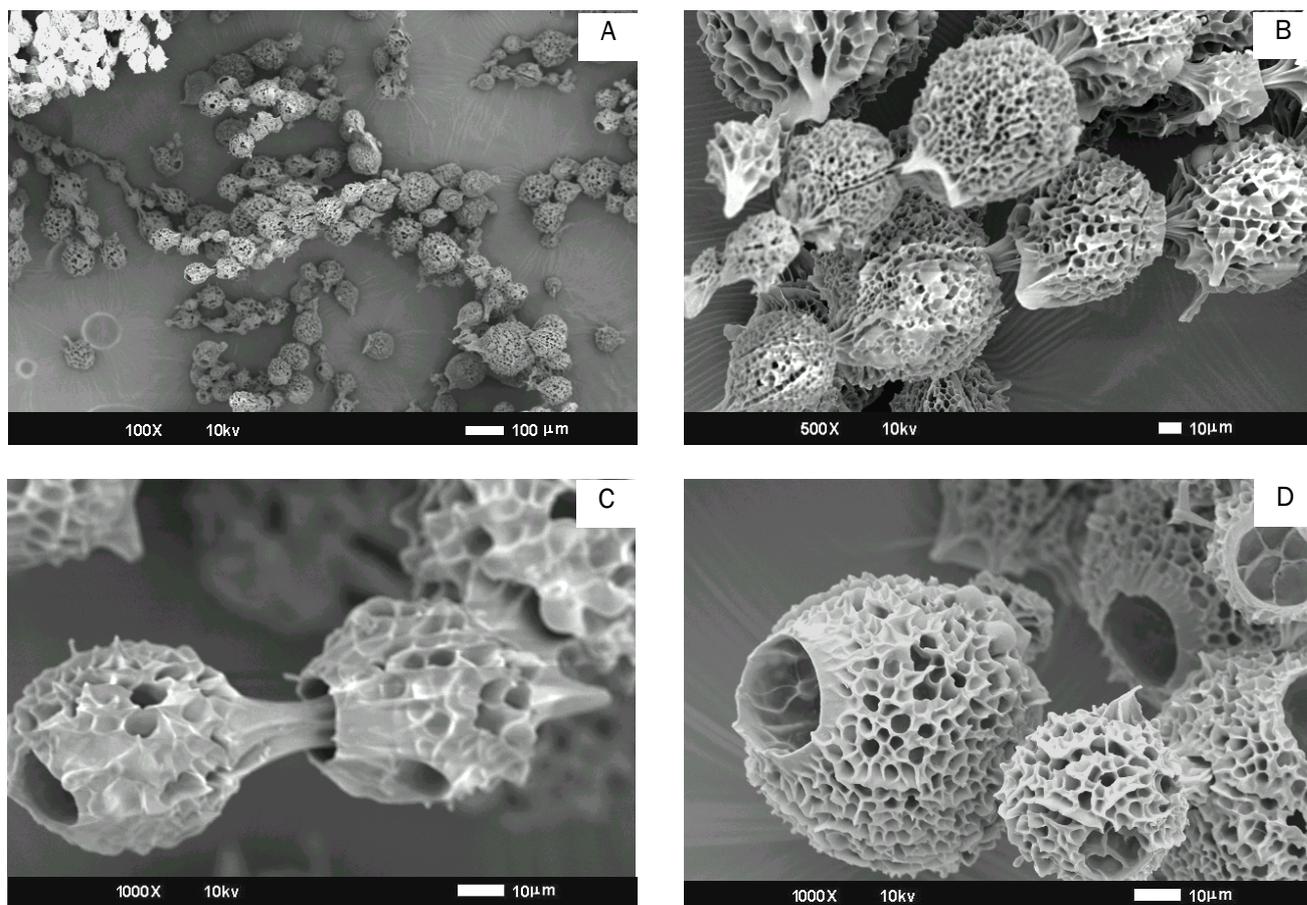


Figura 39. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microcápsulas de óleo de vetiver (2,5%p/v, 1:1 GA:GE, pH4,0) liofilizadas a partir de um congelamento com nitrogênio líquido. Aumentos de 100x (A), 500x (B), 1000x (C, D).

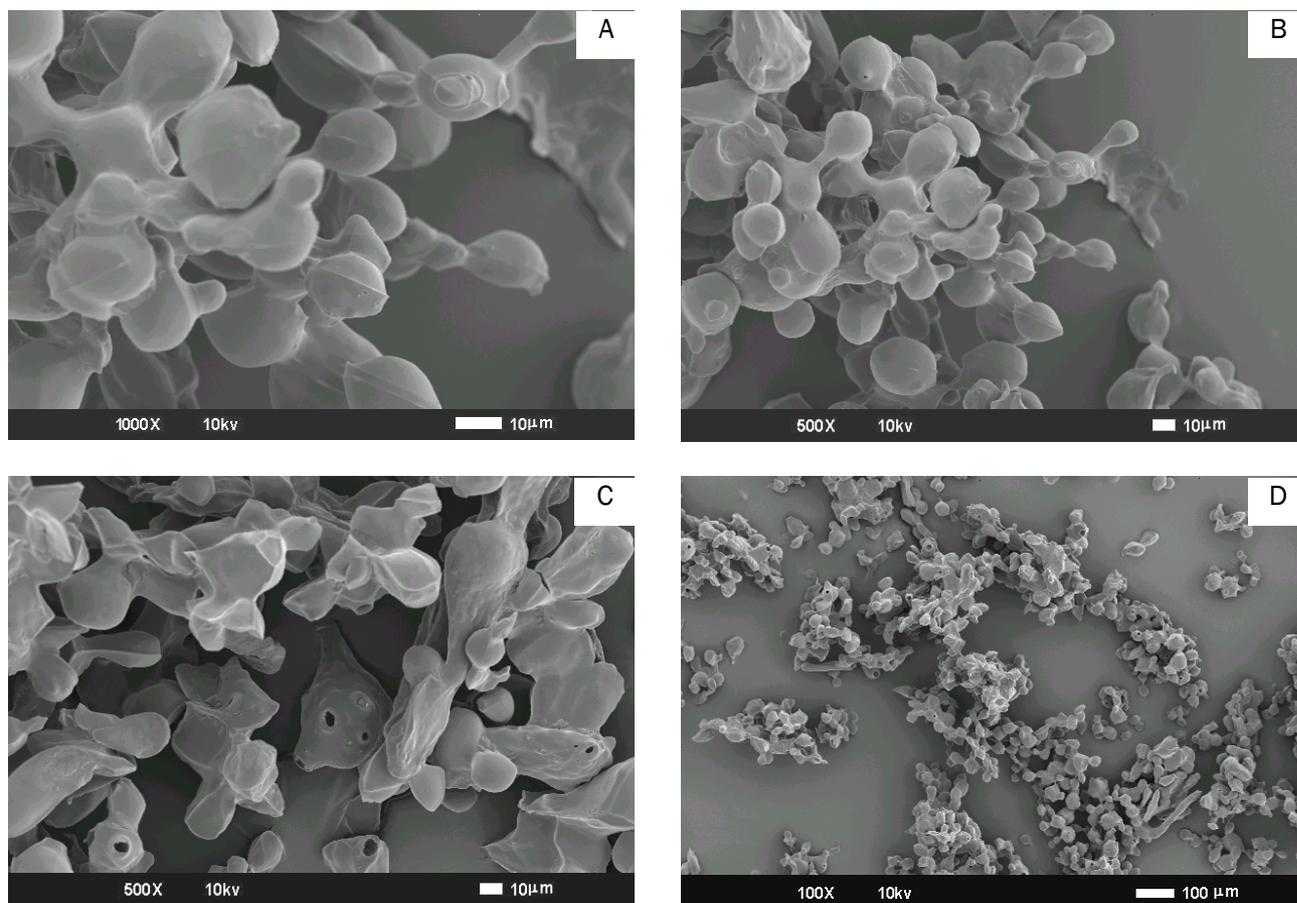


Figura 40. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microcápsulas de óleo de vetiver (2,5%p/v, 1:1 GA:GE, pH4,0) liofilizadas a partir de um congelamento gradual. Aumentos de 1000x (A), 500x (B, C), 100x (D).

A taxa de congelamento alterou bastante a morfologia externa das partículas. O passo de congelamento é de fundamental importância por determinar a estrutura dos cristais formados [DAWSON & HOCKLEY, 1991; KRAMER et al., 2002]. As características da matriz congelada no mínimo influenciam a taxa de secagem primária e secundária, a recristalização do produto e a agregação protéica [SEARLS et al., 2001].

O congelamento rápido, acontece de maneira descontrolada e a transferência de calor através da suspensão provoca uma nucleação e crescimento de cristais de gelo não uniformes causando portanto uma heterogeneidade de poros [OBRIEN et al., 2004]. Assim, poros conectados da superfície ao interior da partícula puderam ser observados quando a taxa de congelamento das partículas foi muito rápida. Acredita-se que neste caso, nem toda a água foi congelada e que o processo de desorção da água residual (secagem secundária) provocou a interconexão dos poros com a superfície da partícula (Figura 39).

As partículas produzidas com o congelamento lento apresentaram-se bastantes lisas e, ao acaso, algumas estruturas possuíam orifícios grandes e escassos para serem considerados poros. Elas mantiveram a forma esférica, apesar de apresentarem pontes ligando as micropartículas, efeito provocado pelo processo de secagem utilizado (Figura 40).

DAWSON & HOCKLEY [1991] examinaram, por microscopia eletrônica de varredura (SEM), a estrutura de algumas preparações liofilizadas baseadas em proteínas. Eles variaram a taxa de congelamento de muito rápida (150°C/min) a muito lenta (1°C/min) e as observações microscópicas evidenciaram uma variedade de estruturas que estavam provavelmente relacionadas à direção de crescimento do cristal de gelo.

Quando elevadas temperaturas e pressão atmosférica ou vácuo são aplicadas, a presença de duas fases (uma líquida e uma vapor) permite a

evolução de pressão capilar dentro dos poros. Conseqüentemente, quebras podem ocorrer na matriz mudando a estrutura original [ORLOVIJ et al., 2005].

A secagem por CO₂ supercrítico é uma alternativa aos métodos convencionais por utilizar condições brandas de temperatura (pouco maior que 31,1°C) e pressão (pressão crítica do solvente 72,8atm). Além disso, ela consiste na evaporação de um solvente, cuja fase vapor possui uma tensão superficial menor que o vapor d'água, o que produz uma pressão capilar muito baixa.

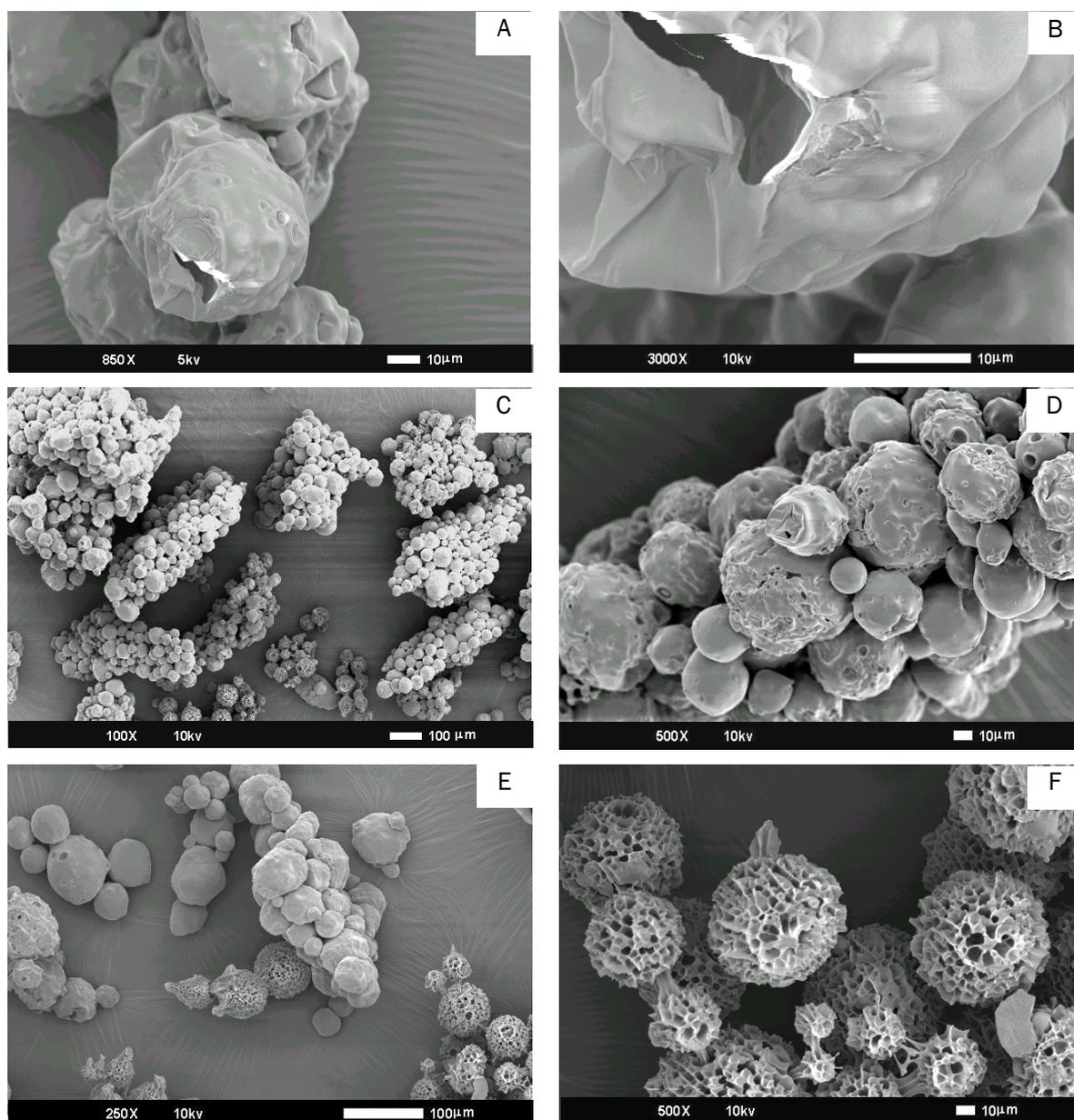


Figura 41. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microcápsulas de óleo de vetiver após a secagem por CO₂ supercrítico, em diferentes campos do stab. Aumentos de 100x (C), 250x (E), 500x (D,F), 850x (A) e 3000x (B).

Quando uma substância na fase líquida a uma pressão maior que sua pressão crítica é aquecida, ela passa da transição de um líquido para um fluido

supercrítico a uma temperatura crítica. Os critérios adotados para se escolher um fluido para secagem supercrítica é que ele deva ser quimicamente inerte e possuir uma temperatura supercrítica baixa. O processo é realizado pela troca gradual da água pelo álcool, realizada pela imersão seqüencial das partículas em meios com porcentagens de álcool variando de 10 a 100%, a troca do álcool pelo gás carbônico fluido (temperatura ambiente), aquecimento a 35 °C e posterior arraste do dióxido de carbono.

As microcápsulas secas por fluido supercrítico apresentaram-se de duas maneiras: umas lisas e outras porosas. Apesar de porosas, quando se analisou ampliadamente esses poros, pode-se verificar que eles estavam fechados por uma fina película (Figura 41B). Este comportamento similar a uma esponja também foi observado nas amostras liofilizadas por congelamento rápido (Figura 39).

5.6.1 Caracterização das matrizes reticuladas

As partículas foram reticuladas com dois agentes diferentes, a transglutaminase e o glutaraldeído e as características físicas estão explicitadas na Tabela 19. Os agentes utilizados para a reticulação da proteína formadora do complexo com a goma arábica provocaram mudanças na densidade das partículas. As partículas reticuladas com transglutaminase e desidratadas apresentaram-se mais soltas que as originais desidratadas, o que implicou numa compressibilidade maior. As partículas reticuladas com glutaraldeído, por sua vez, não apresentaram diferenças de densidade mas visualmente eram bem mais escuras que as partículas sem reticulação.

Tabela 19. Propriedades de densidade e compressibilidade das partículas reticuladas.

	<i>Densidade global (g/mL)</i>	<i>Densidade do arranjo compacto (g/mL)</i>	<i>Compressibilidade (%)</i>	<i>Umidade (%)</i>
Sem reticulação	0,14±0,01 ^a	0,225±0,009 ^a	38,66	10,2±0,2
Glutaraldeído	0,158±0,005 ^a	0,26±0,01 ^a	38,23	8,6±0,3
Transglutaminase	0,081±0,005 ^b	0,144±0,013 ^b	43,47	11,48±0,02

*Média de triplicatas. Comparação estatística entre colunas ($p < 0,05$).

As partículas reticuladas e desidratadas foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura. A Figura 40, contendo as microscopias eletrônicas de tais partículas, indica que embora as reticuladas tenham mantido alguma esfericidade, elas apresentaram algumas pontes sólidas entre elas, o que sem dúvida pode ter influenciado nos resultados de densidade dos pós.

As medidas de tamanho das partículas reticuladas foram inicialmente realizadas por dispersão de partículas e detecção de luz espalhada (*Laser Light Scattering*). A possibilidade de aglomeração das partículas durante a secagem por liofilização, devido aos processos de reticulação ou ao introduzir as partículas nos meios de liberação escolhidos sugeriu que a medida por microscopia óptica pudesse apresentar melhores resultados para avaliar o tamanho médio ou o inchamento das partículas. Isto pôde ser confirmado através da comparação entre a medida obtida por difração de luz e a obtida em microscópio ótico.

A Figura 42 apresenta as distribuições de tamanho obtidas por espalhamento de luz utilizando laser, para partículas reticuladas úmidas em água, no tempo inicial e após cinco minutos sob agitação. A Figura 42A apresenta os histogramas da transglutaminase e indica que houve uma alteração no perfil de distribuição de tamanho passando de unimodal para uma distribuição bimodal, mesmo que com pouca variação no tamanho médio. Essa

tendência de aglomeração das partículas ocasionou uma leitura irreal do tamanho médio ($86,87\mu\text{m}$) frente ao observado microscopicamente ($51,56\mu\text{m}$) [Tabela 20]. No segundo caso, partículas úmidas reticuladas com glutaraldeído (Figura 42B), apesar de manterem a distribuição unimodal, apresentaram um tamanho médio de partícula muito superior ($223\mu\text{m}$) ao obtido pela microscopia ótica ($39,1\mu\text{m}$) [Tabela 20]. Assim, as medidas de tamanho e inchamento foram realizadas em microscópio ótico por análise de imagem.

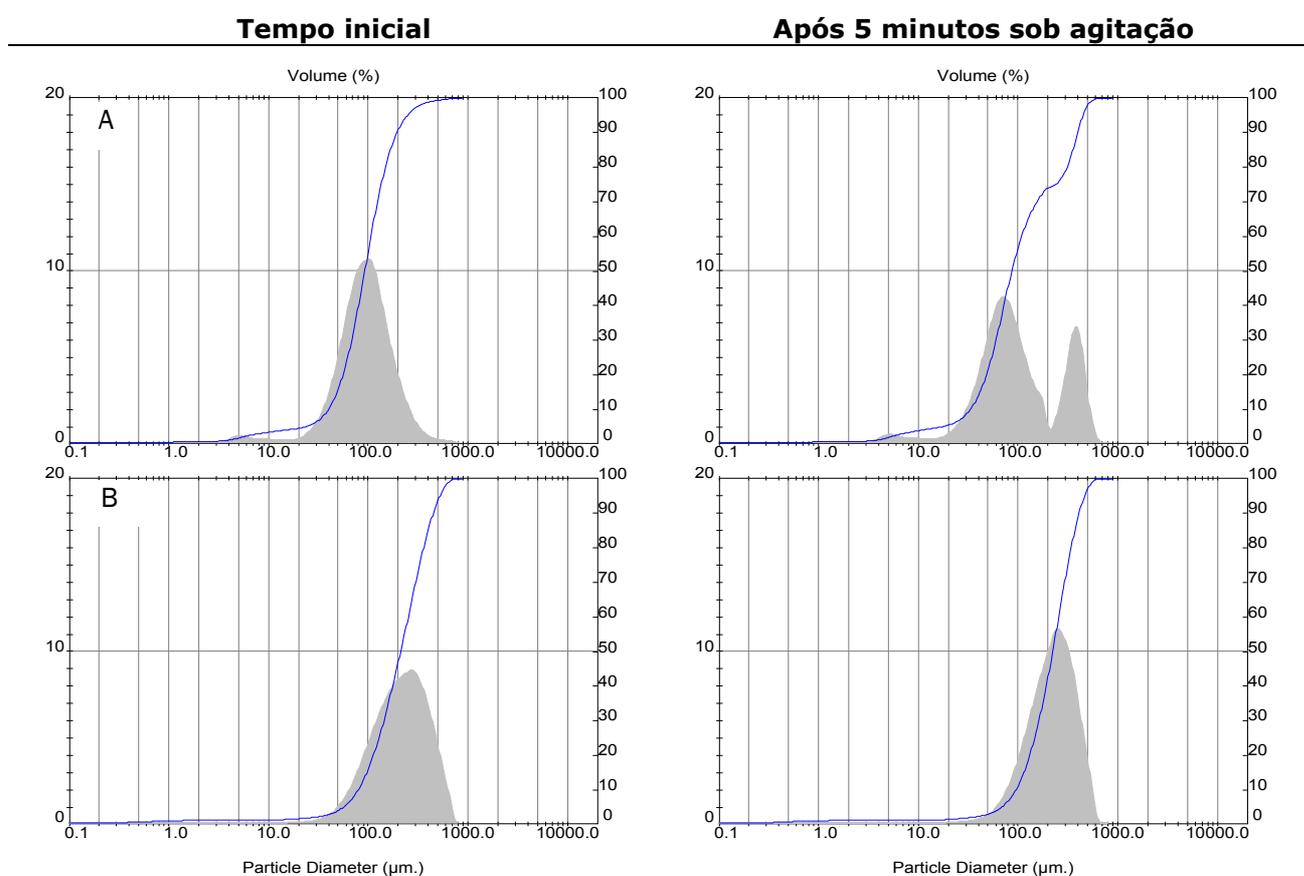


Figura 42. Distribuição de tamanho e diâmetro médio: D0- inicial e D5- após 5 minutos. (A) transglutaminase D0=81,07 μm e D5=86,87 μm . (B) glutaraldeído D0=220,7 μm e D5=223 μm

A escolha da microscopia ótica para a medida dos tamanhos médios, embora tenha apresentado desvios padrão altos (Tabela 20), permitiu que aglomerados visíveis pudessem ser excluídos da medida de tamanho médio.

A ação dos agentes reticulantes sobre as propriedades de permeação de diferentes solventes na matriz polimérica foi avaliada. A Tabela 20 apresenta os diâmetros médios das partículas secas (em glicerina), úmidas (em água) e partículas secas e úmidas, nos meios de liberação testados: álcool, SDS (5 %) e Tween 80 (2%).

Tabela 20. Média do diâmetro (μm) das partículas úmidas e liofilizadas após 1h de suspensão em diferentes meios.

	<i>Transglutaminase</i>		<i>Sem reticulação</i>		<i>Glutaraldeído</i>	
	Úmidas	Secas*	Úmidas	Secas	Úmidas	Secas
Água	52 \pm 7	45 \pm 15	44 \pm 9	39 \pm 13	39 \pm 9	33 \pm 13
Álcool	54 \pm 15	43 \pm 22	19 \pm 6	36 \pm 16	38 \pm 15	36 \pm 14
SDS 5%	121 \pm 40	142 \pm 85	-	-	73 \pm 33	33 \pm 8
Tween 2%	114 \pm 35	123 \pm 42	47 \pm 16	57 \pm 50	69 \pm 29	29 \pm 9

* determinação em glicerina. Média de 150 partículas.

As partículas desidratadas, independentemente do tratamento de reticulação utilizado, puderam ser novamente hidratadas, voltando ao seu tamanho original. A ligeira diminuição observada entre os diâmetros das partículas úmidas e secas em água, não é estatisticamente significativa ($p < 0,5$).

No entanto, todas as partículas úmidas e as secas, com exceção das reticuladas com glutaraldeído, incharam quando colocadas em soluções de tensoativos e os maiores diâmetros foram observados para partículas reticuladas com transglutaminase, que praticamente triplicaram o tamanho em relação às originais. A variação de tamanho das micropartículas úmidas sem reticulação, ao serem colocadas em Tween80 2%, foi menor que as partículas reticuladas. Apesar do aumento do diâmetro, independentemente do tensoativo e da concentração do mesmo, o SDS mostrou uma tendência em inchar mais as partículas, mas deve-se ressaltar que o método utilizado apresentou alta variabilidade indicando que o número de partículas medido deveria ter sido aumentado para diminuir o desvio padrão.

Com base nas partículas originais (em água) úmidas sem reticulação, o tratamento da matriz polimérica com glutaraldeído diminuiu ligeiramente o tamanho médio das partículas enquanto que a reticulação enzimática provocou um aumento no tamanho médio. A reticulação com glutaraldeído provocou um comportamento diferente nas partículas, que após desidratadas, não atingiram o mesmo tamanho que a respectiva partícula úmida, quando reidratadas nos diferentes meios. Este comportamento pode indicar uma maior reticulação com o agente químico que com a transglutaminase.

BACHTSI & KIPARISSIDES [1996] mostraram que um aumento no grau de *crosslinking* com glutaraldeído resultou em uma redução tanto da taxa de volume de equilíbrio de inchamento (EDVS) quanto da liberação do ativo, quando microcápsulas de PVA (álcool polivinílico) com óleo de santosol foram obtidas por coacervação. Este efeito foi atribuído à redução do tamanho de poro molecular na matriz.

O grau de inchamento de micropartículas é dependente da natureza química do agente reticulante, mas a ação típica deste agente é reduzir a mobilidade de cadeias macromoleculares e, portanto, diminuir o grau de inchamento de micropartículas em relação as micropartículas sem reticulação [RAMARAJ & RADHAFRISHNAN, 1994; AGNIHOTRI & AMINABHAVI, 2004; VANDELLI et al., 2001]. Porém, KAKUGO et al. [2005] já haviam observado a diferença entre os níveis de reticulação quando diferentes agentes são usados. Os géis de miosina reticulados com hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminoprolila) carbodiamida, glutaraldeído ou transglutaminase apresentaram alta atividade Mg-ATPase mas os géis ligados pela transglutaminase mostraram as mais altas sensibilidades e mobilidades de filamentos de actina, quase como a miosina nativa.

Esta diferença entre as ações dos agentes reticulantes estão evidenciadas nos resultados apresentados na Tabela 20. Apesar disso, a determinação do número de grupos aminas livres, condição que quantifica a

reticulação, não foi feita neste trabalho. Portanto, as diferenças entre as partículas existem, mas nada pode ser afirmado em relação aos agentes usados, já que as condições adotadas para reticulação não garantem que o mesmo número de grupamentos esteja inter cruzado.

Os níveis de incorporação de glutaraldeído na reticulação de tecidos protéicos de bovinos foram avaliados por GOLOMB et al. [1987]. Eles verificaram que a quantidade do agente reticulante controla a extensão das ligações transversais até um valor crítico. Pequenas quantidades de glutaraldeído (até 150 ng/mg) resultaram em reticulação limitada (26,1 resíduos de lisina livre /1000 aa). Em contraste, o aumento do glutaraldeído induziu mais ligações transversais (8,2 resíduos de lisina livre/1000 aa) e maior estabilidade frente a ação da colagenase (95% do peso residual após digestão frente a 4% do primeiro tratamento).

O efeito desidratante do álcool foi observado pela redução do diâmetro médio das partículas não-reticuladas. Em microscópio, essas partículas desidratadas pelo efeito do álcool exibiram superfícies derivadas das partículas esféricas originais porém distorcidas pela perda de volume interno, como um resultado do processo de desidratação rápido provocado pelo contato com o álcool. Apesar do processo de liofilização ser um processo de desidratação, a velocidade de retirada de água influencia de tal maneira na estrutura da partícula que as amostras úmidas e secas não reticuladas quase não tiveram alteração de diâmetro médio (Tabela 20). No entanto, a amostra úmida quando desidratada pelo efeito do álcool, apresenta uma redução drástica de tamanho, e apesar disso, ao ser reidratada, a partícula volta ao tamanho e forma originais.

As micropartículas úmidas que sofreram reticulação, após serem inseridas em álcool, praticamente não apresentaram variação de tamanho, independentemente do agente de reticulação utilizado. Isto pode ser uma indicação de que o *crosslinking* deve ter alterado a porosidade da matriz

polimérica úmida, dificultando assim a saída de água das partículas reticuladas.

Após a secagem por liofilização, as micropartículas apresentaram o mesmo comportamento observado para as partículas úmidas, com a seguinte ordem de tamanho, medido com as partículas suspensas em glicerol: partículas reticuladas com glutaraldeído < partículas sem reticulação < reticuladas com transglutaminase (Tabela 20). Os diâmetros das partículas secas quando em contato com o álcool não sofreram alterações drásticas por não possuírem grande quantidade de água.

O inchamento das partículas secas também foi acompanhado pela medida da variação de peso, após uma hora de imersão das partículas nos diferentes meios estudados (Tabela 21). Embora o método também apresente limitações especialmente quanto à quantidade de água presente no papel de filtro após a filtração das suspensões de partículas, os desvios padrões foram menores que os observados para a medida direta dos diâmetros médios.

Considerando a massa média das partículas secas, o aumento de peso após entumescimento representou variações de 1,1 vezes até 13,8 vezes o peso inicial de partículas secas, dependendo do tipo de agente reticulante e da característica do meio. Estes extremos podem ser visualizados nas microscopias inseridas na Tabela 21 e correspondem às partículas reticuladas com glutaraldeído e colocadas em álcool (menor inchamento) e partículas reticuladas com transglutaminase colocadas em SDS 5% (maior inchamento) e em ambos os casos, é possível observar que as cápsulas se apresentavam íntegras e aparentemente esféricas.

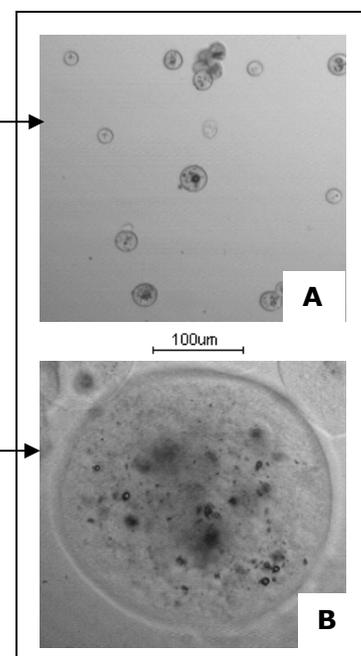
As ordens de grandeza observadas entre as partículas foram semelhantes às medidas apresentadas na Tabela 20, onde partículas reticuladas com glutaraldeído apresentaram menor inchamento que as partículas sem reticulação, enquanto as reticuladas com transglutaminase

apresentaram as maiores variações de peso comparadas aos pesos secos iniciais.

Tabela 21. Inchamento das micropartículas secas observado pela variação de peso nos meios de liberação estudados*

Meio de liberação	Tipo de reticulação	Variação de peso
Álcool	Glutaraldeído	1,1 ± 0,1f
Álcool	Sem reticulação	1,4 ± 0,5ef
Água	Glutaraldeído	2,5 ± 0,1de
Tween 2%	Glutaraldeído	2,8 ± 0,1d
Água	Sem reticulação	2,9 ± 0,4d
Tween 2%	Sem reticulação	3,0 ± 0,1d
Água	Transglutaminase	3,6 ± 0,3bcd
Álcool	Transglutaminase	3,7 ± 0,3bc
Tween 2%	Transglutaminase	3,9 ± 0,2bc
SDS 5%	Glutaraldeído	4,4 ± 1,1b
SDS 5%	Transglutaminase	13,8 ± 0,3a

*Micrografias inseridas na Tabela representam situações de mínima e máxima variação de peso. Partículas reticuladas com glutaraldeído, em álcool (A) e partículas reticuladas com transglutaminase, em SDS 5% (B).



No caso das partículas liofilizadas que apresentaram inchamento, o processo de absorção de água ocorreu de forma extremamente rápida, acompanhado por microscopia ótica, porém não apresentado neste trabalho, observando-se que as partículas inchavam em tempo não superior a 1 minuto.

Parece que o inchamento das partículas está associado a reticulação. A taxa de entrada do solvente é maior que a de saída. Esse fenômeno fica mais evidente em partículas reticuladas com transglutaminase e inseridas em tensoativo aniônico. Provavelmente, as diferenças de reticulação entre os agentes possam ser explicadas pelo glutaraldeído, pois apesar da reticulação nos dois casos poder ocorrer intra e intermolecularmente, o agente químico entra entre os grupos ionizáveis das proteínas e forma uma capa rígida que não permite a elasticidade para o inchamento e nem o fluxo de substâncias tão facilmente como a transglutaminase, que é apenas um catalisador da reação.

CHEN, HO & SHEU [2005] examinaram o efeito da MTGase no *crosslinking* de matrizes colaginosas e verificaram a dependência com fatores de reação como pH das soluções de colágeno, temperaturas de incubação e concentração de enzima. As matrizes com pHs entre 3 e 4 exibiram maiores resistências à tensão que as com maiores pHs. A temperatura de desnaturação das matrizes com transglutaminase aumentaram, comparadas às não tratadas e a enzima não causou citotoxicidade. Assim, as condições de reticulação para a utilização da transglutaminase, como agente modificador de barreira, devem ser otimizadas.

Mesmo assim, LASTOWKA, BROWN & MAFFIA [2005] verificaram o efeito das potencialidades de técnicas químicas (glutaraldeído), físicas (secagem desidrotérmica) e enzimática (transglutaminase) de *crosslinking* no colágeno moído. Eles avaliaram o grau de reticulação de cada técnica, pela medida de amina livre, a resistência à hidrólise pela enzima colagenase e o tamanho dos complexos formados. Concluíram que o glutaraldeído é o agente que provoca o maior grau de reticulação, com menos aminas livres, os agregados formados possuíam os maiores tamanhos e eram mais estáveis. A transglutaminase também formou agregados grandes, ou seja, possui capacidade de reticulação, mas uma menor quantidade destes agregados pareceram estáveis à degradação da colagenase. A reticulação física testada produziu agregados tão suscetíveis à ação da enzima colagenase quanto o colágeno sem tratamento.

Este fato é confirmado pelas curvas de liberação que mostram que, em todos os meios estudados, o glutaraldeído ofereceu maior resistência à liberação do composto fluorescente.

5.6.1.1 Efeito do tensoativo na estabilidade da partícula

A Figura 43 mostra a desestabilização da matriz coacervada pela competição do tensoativo iônico na concentração acima da micelar crítica.

Como esperado, micropartículas úmidas não reticuladas ao serem colocadas em solução de SDS (5%), foram erodidas rapidamente, desfazendo-se totalmente em pouco tempo (2 minutos). Somente as cápsulas que sofreram *crosslinking* mantiveram-se aparentemente íntegras nos meios contendo o tensoativo aniônico. Na Figura 43A é possível observar que as partículas úmidas sem reticulação foram totalmente desfeitas na captação feita após cinco horas. O efeito já era perceptível após 10 seg de imersão das partículas não reticuladas em SDS 5% (Figura 43). O meio contendo Tween 80 não apresentou problemas de erosão para partículas sem reticulação ou reticuladas (Figura 44).

O efeito da interação do SDS na estrutura da gelatina foi anteriormente relatado por alterar a conformação e dimensão da molécula de gelatina em solução. Isto pode ser refletido na consistência das soluções e géis de gelatina [GAUTAM & SCHOTT, 1994], espessura, estrutura e entumescimento de filmes [WUSTNECK & MULLER, 1986; SEEBOTH, WUSTNECK & OTTO 1990], adsorção na interface, estrutura e porosidade de microcápsulas formadas por gelatina [SOVILJ *et al.*, 1993; SUZUKI & KONDO, 1982; SOVILJ, 1998].

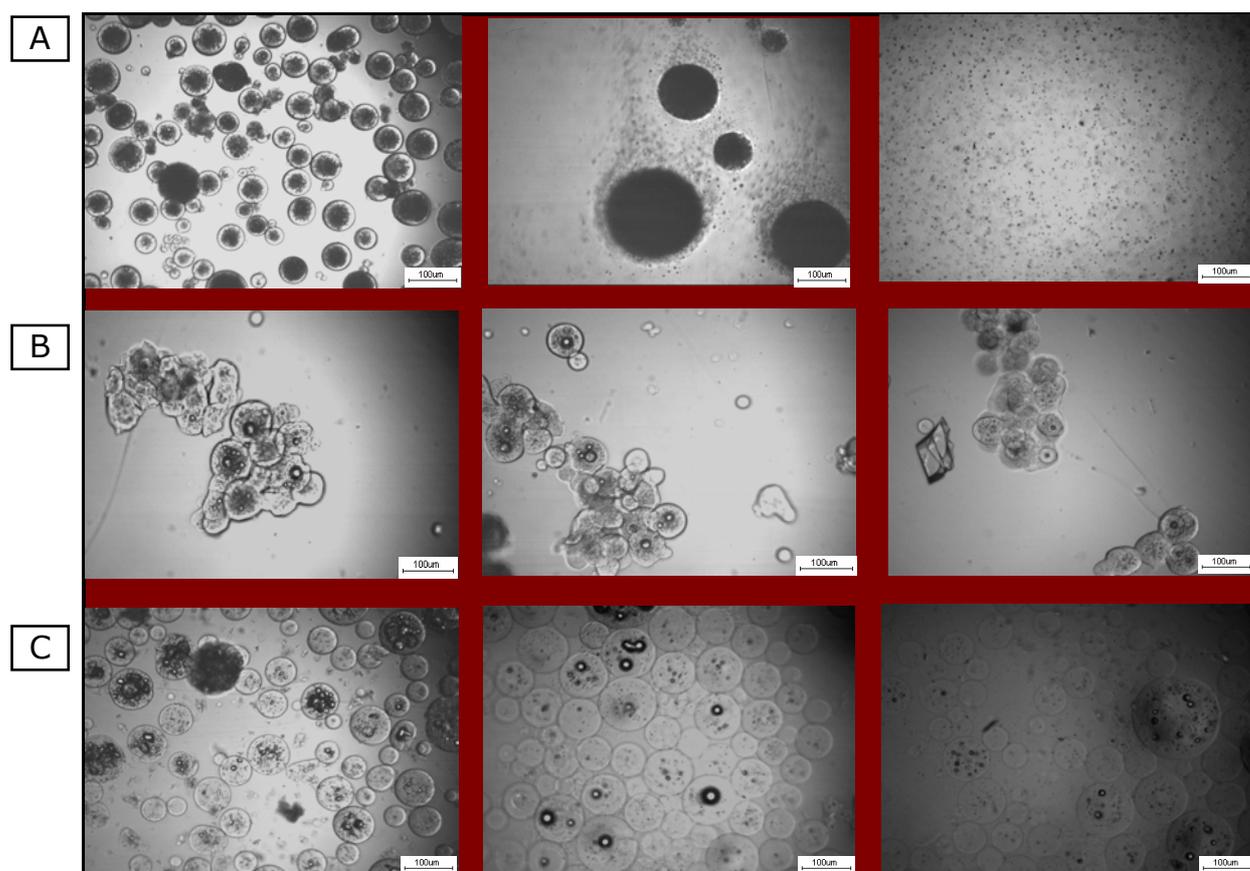


Figura 43. Microcápsulas de vetiver sem reticulação (A), com glutaraldeído (B), com transglutaminase (C). Os meios da esquerda pra direita são água (coluna 1), em SDS 5% após 10s (coluna 2) e em SDS 5% após 24h (coluna3).

A matriz não se desfez quando agentes reticulantes foram usados para estabilizar as ligações covalentes. Este comportamento de competição não ocorre com tensoativos sem carga como é o caso do Tween 80. A Figura 44 apresenta as partículas sem reticulação e reticuladas imersas em soluções de Tween 80 com diferentes concentrações.

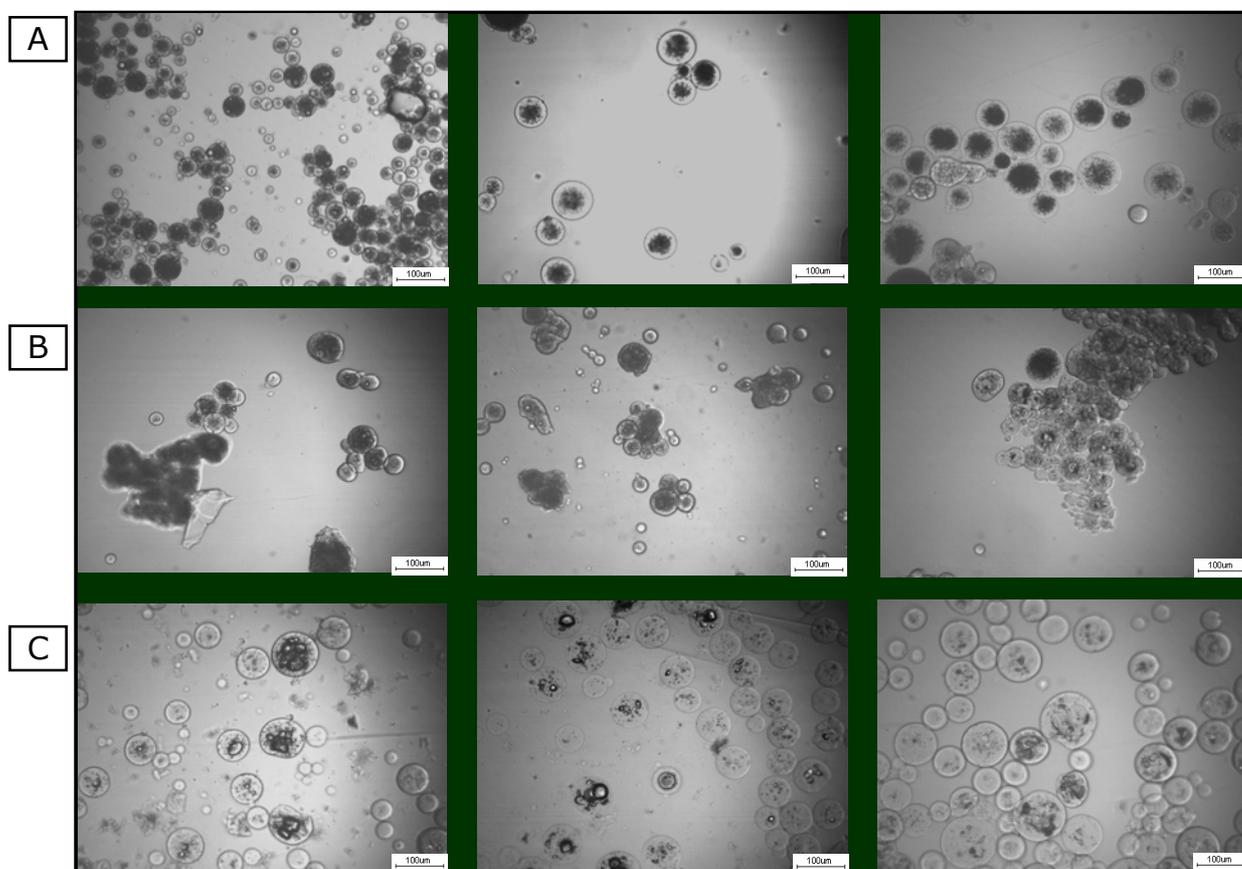


Figura 44. Microcápsulas de vetiver sem reticulação (A), com glutaraldeído (B), com transglutaminase (C). Os meios da esquerda pra direita são água (coluna 1), em Tween 2% após 10s (coluna 2) e em Tween 2% após 24h (coluna 3).

5.7 Estudo de Liberação

Neste estudo, foi sistematicamente investigado o comportamento de liberação do marcador fluorescente (KD) de micropartículas coacervadas com porosidade modificada pela ação de dois agentes reticulantes diferentes, mas que fazem uso do mesmo grupo (lisina) para reticularem. Além disso, o efeito da escolha de três meios diferentes foi avaliado nas propriedades de liberação do composto. A liberação de KD solubilizado foi modelada e o coeficiente de difusão foi estimado para todos os casos mencionados. A medida de liberação foi examinada por espectroscopia de fluorescência.

As condições de liberação como agitação, temperatura e quantidade de partículas/volume de solvente não foram exaustivamente estudados mas foram utilizadas condições que garantem a não saturação do meio e da superfície externa das partículas. Assim sendo, a escolha das condições de liberação bem como do solvente foi baseada no estudo de solubilidade do material encapsulado no solvente de liberação.

Diagramas ternários de fases entre o veículo (óleo de vetiver), água e os meios foram construídos com base em relações mássicas entre os constituintes (Figura 45 a Figura 47) e a área hachureada representa os pontos em que a solução manteve-se límpida e em uma única fase.

A Figura 45 mostra o diagrama de fases para o sistema vetiver-água-álcool. Para quantidades inferiores a 60% de óleo na mistura, foi possível a adição de água até, aproximadamente 20%, máxima quantidade de água incorporada. No sistema ternário obtido, a máxima porcentagem de óleo essencial solubilizada foi de 44% quando se utilizou a mistura álcool etílico anidro: água (44:12%).

Apesar do caráter hidrofílico parcial de alguns componentes do óleo de vetiver, não foi possível a inserção de qualquer quantidade de água quando o óleo estava em concentrações superiores a 60%, o que acarretou o

aparecimento de turbidez no sistema. O etanol anidro foi solúvel no óleo de vetiver em todas as proporções. O óleo de vetiver apresenta alta solubilidade em álcool etílico (1:3 óleo:álcool 80%) [MERCK INDEX, 1996].

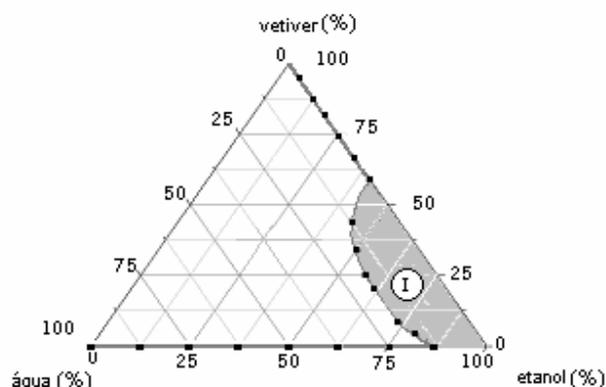


Figura 45. Diagrama de fase parcial do vetiver nos solventes água e etanol. I. Região onde a mistura dos três componentes se encontra solubilizada. Linhas pontilhadas indicam também situação de solubilidade.

A solubilidade do composto fluorescente no álcool etílico anidro foi medida fluorimetricamente a partir da supersaturação do composto no solvente até se obter a precipitação cristalina do mesmo. A solubilidade medida foi de 36,3 mg KD/mL de etanol anidro, quantidade muito superior às utilizadas nos ensaios de liberação ($2,08 \cdot 10^{-3}$ mg KD/mL etanol).

Os resultados observados no diagrama de fases da Figura 45 e na medida de solubilidade do KD garantem que a quantidade de composto fluorescente e de óleo de vetiver utilizado podem ser totalmente solubilizados no volume de solvente utilizado nos experimentos de liberação.

A capacidade de solubilização do óleo de vetiver por tensoativos de classes diferentes também foi verificada. A Figura 46 apresenta a faixa de solubilização do vetiver em concentrações diferentes de Tween80 em água deionizada. Uma quantidade bem menor de óleo pode ser solubilizada com o uso deste tensoativo em relação ao álcool. No entanto, a redução da tensão interfacial entre o óleo e a água é mais forte neste caso, sendo que uma maior

quantidade de água pode ser incorporada ao sistema de modo que o óleo permaneça solúvel. O aumento da concentração de Tween 80, aumenta a quantidade de vetiver que pode ser dissolvido em um volume constante de fluido.

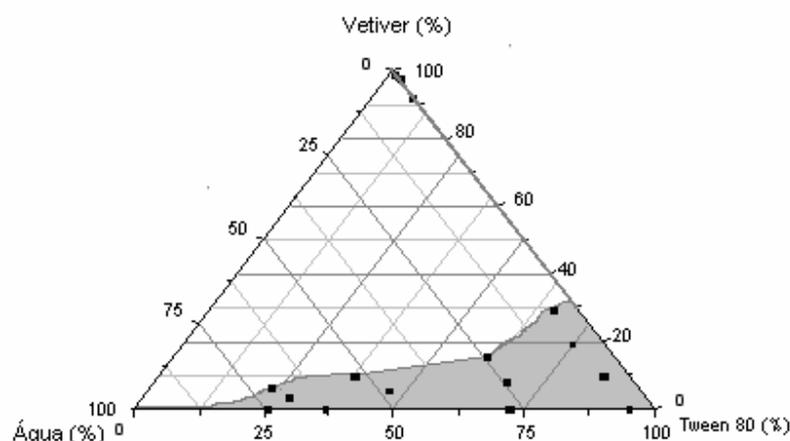


Figura 46. Diagrama de fase parcial do vetiver em água e Tween 80. A região hachurada representa situação onde a mistura dos três componentes se encontra solubilizada em uma fase.

A faixa de solubilidade na Figura 47, ou seja, com o tensoativo iônico SDS, foi muito restrita. O sistema demorou dias até atingir o equilíbrio, e por isso a concentração usada foi muito maior que a do tensoativo não iônico. Compostos hidrofóbicos podem reagir diferentemente a um dado tensoativo dependendo de suas propriedades químicas. Geralmente, o estudo de dissolução de drogas (bem menos apolares e com cadeias de comprimento menores que a dos óleos) faz uso de concentrações baixas de tensoativos com a intenção de aumentar a dissolução e não maximizá-la.

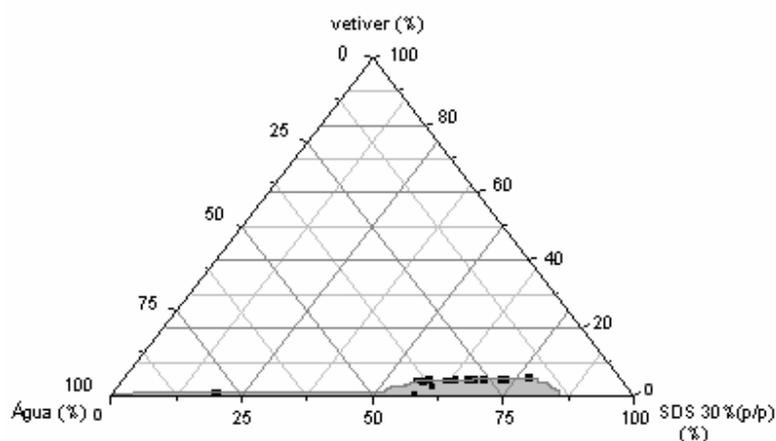


Figura 47. Diagrama de fase parcial do vetiver nos solventes água e SDS. A região hachurada representa situação onde a mistura dos três componentes se encontra solubilizada em uma fase.

Foram escolhidas como concentrações para serem adotadas como meio de liberação 2% (p/v) de Tween80 e 5% (p/v) de SDS. Esses valores foram selecionados de modo a se trabalhar com a menor concentração que provocasse a maior solubilização do veículo oleoso e que apresentasse a menor interferência na medida fluorimétrica.

Geralmente para se manter as condições *sink*, quando a quantidade do composto encapsulado é bem inferior à solubilidade do composto no meio, a quantidade do meio de liberação usada não deve ser menor que três vezes a quantidade necessária para formar a solução saturada do composto considerado. Neste caso em especial, por não se conhecer exatamente a solubilidade do composto fluorescente no meio de liberação, foi utilizada a mesma condição adotada para o meio alcoólico – aproximadamente 0,002mg de droga/ mL de meio).

5.7.1 Caracterização das partículas produzidas com o óleo fluorescente

5.7.1.1 Produção do composto fluorescente

A metodologia adotada para extração/purificação do ácido zizanóico e subsequente conversão a álcool, permitiu um rendimento médio de extração de 19,6% (p/p) e de 81,9% (mol/mol) de eficiência de conversão.

O fato do cloreto de dansila ser freqüentemente usado para aumentar a sensibilidade a UV e fluorescência de poliaminas alifáticas [HEIMBECHER et al.,1998] determinou a escolha como agente de derivação e, embora a eficiência de marcação do KD não tenha sido quantificada, a cromatografia em papel frente a um padrão contendo apenas khusimol, mostrou total conversão nas condições utilizadas.

O composto formulado, dansilato de kusimila, foi identificado através de seu espectro de RMN. Os resultados confirmam que a síntese foi efetuada com sucesso. Sob condições normais o álcool- khusimol- tem máxima absorção na região de $\delta = 4,44-4,61$. A ligação do composto dansilado pode ser vista pela confirmação da absorção referente aos picos de C16 a C25, na Figura 48.

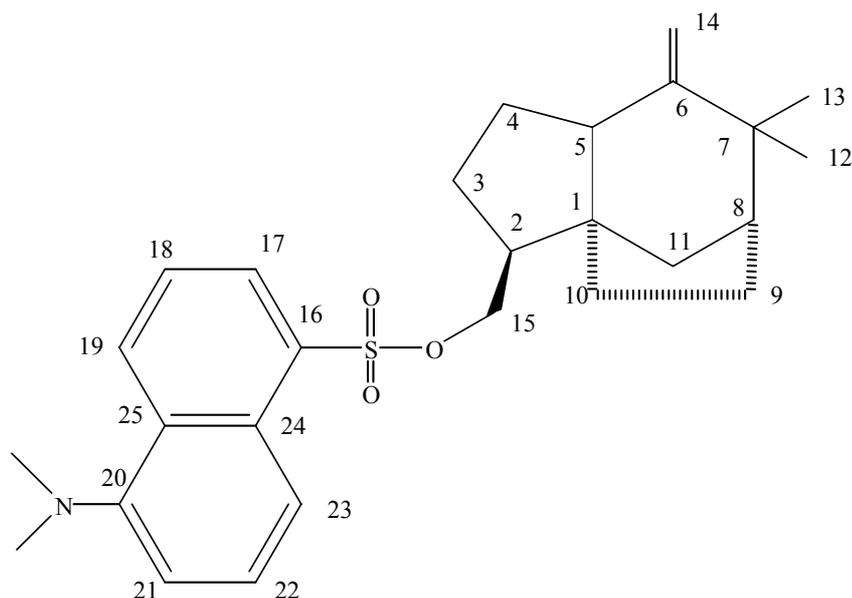


Figura 48. Espectro de RMN do composto fluorescente formulado através da ligação de khusimol (1-15) com cloreto de dansila (16-25).

^1H NMR CDCl_3 / 400 MHz: δ (ppm): 0,88, 0,92 (2s, 6H, $-\text{CH}_3$ -12,13); 0,80-1,36 (m, 2H, $-\text{CH}_2$ -10); 1,22-1,38 (m, 2H, $-\text{CH}_2$ -9); 1,22-1,71 (m, 2H, $-\text{CH}_2$ -4); 1,30-1,65 (m, 2H, $-\text{CH}_2$ -11); 1,48 (m, 2H, $-\text{CH}_2$ -3); 1,63 (m, 1H, $-\text{CH}$ -8); 1,95 (m, 1H, $-\text{CH}$ -2); 2,23 (m, 1H, $-\text{CH}$ -5); 3,80-3,96 (dd, 2H, $-\text{CH}$ -15, $J_{2-15} = 6,7$ Hz, $J_{\text{gem}} = 9,4$ Hz); 4,44-4,61 (2s, 2H, $-\text{CH}_2$ -14); 7,14 (d, 1H, $-\text{CH}$ -21, $J_{21-22} = 7,52$ Hz); 7,50 (m, 2H, $-\text{CH}$ -22,23); 8,22 (m, 2H, $-\text{CH}$ -18,19); 8,55 (d, 1H, $-\text{CH}$ -17, $J_{17-18} = 8,35$ Hz).

^{13}C NMR CDCl_3 / 100 MHz: δ (ppm): 24,79 (C3); 25,22 (C9); 25,73 (C12); 26,31 (C4); 28,21 (C13); 32,98 (C10); 35,60 (C11); 40,04 (C7); 44,63 (C2); 45,34 (CH_3)₂N-); 48,47 (C5); 49,10 (C8); 52,89 (C1); 73,59 (C15); 105,46 (C14); 115,51 (C21); 123,04 (C23); 128,43 (C18); 129,71 (C17); 129,86 (C22); 130,24 (C24, C25); 131,25 (C16); 131,61 (C20); 155,73 (C6).

A produção do KD foi uma alternativa à valorização do óleo essencial de vetiver, já que o ácido zizanóico presente em grande quantidade no óleo de vetiver brasileiro deprecia sua qualidade sensorial. A partir da extração do mesmo pôde-se aproveitar o "resíduo" e formular um composto fluorescente. A principal aplicação do composto marcador foi usá-lo como instrumento de estudo do comportamento da parede de uma partícula coacervada. No caso de

óleos essenciais, existem muitos compostos presentes no mesmo dificultando a avaliação da liberação por espectrofotometria. A inserção do composto marcado no óleo, antes da encapsulação, é uma alternativa razoável para a avaliação das propriedades de barreira das partículas obtidas.

5.7.1.2 Produção das partículas com óleo fluorescente

Na produção das partículas coacervadas contendo OF (óleo de vetiver + composto fluorescente) observou-se nítida separação de fases. O mesmo rendimento obtido com o óleo de vetiver foi obtido com este óleo. A partir de um sistema inicial contendo 7,5 g de sólidos totais (polímeros:OF, 2:1) foram obtidos 40,2 g de partículas com teor de umidade de $82,8 \pm 0,8\%$. O rendimento mássico de produção das cápsulas coacervadas foi de 89,6%. Rendimentos semelhantes (89%) foram obtidos por BURGESS, KWOK & MEGREMIS [1991], para o par polimérico goma arábica-albumina, enquanto LAMPRECHT, SCHÄFER & LEHR [2001] obtiveram valores variando de 32,0 a 84,2% de acordo com os agentes de endurecimento utilizados nas microcápsulas coacervadas de gelatina/goma arábica. A eficiência de encapsulação do composto fluorescente KD foi alta atingindo 95%.

As características morfológicas das partículas úmidas e secas foram acompanhadas por microscopia ótica e estão apresentadas na Figura 49. As partículas produzidas por esta técnica apresentaram tamanho médio de 43,5 μm . Diâmetro médio semelhante (52,5 μm) foi obtido por NAKAGAWA et al. [2004] na produção de microcápsulas coacervadas de gelatina e goma arábica com óleo de soja. Aparentemente, o tamanho não foi influenciado pelo tipo de ativo encapsulado, mas foi anteriormente comentado que as propriedades do ativo podem alterar não só o tamanho como a forma, a eficiência de encapsulação e de processo.

Foi considerado que o composto KD estava amorfo ou molecularmente disperso na matriz polimérica pela alta solubilidade que possui no óleo de

vetiver e pela conseqüente distribuição do óleo nas partículas (Figura 49A). As gotas do óleo fluorescente apresentaram-se visualmente líquidas, o que indicou ausência de cristalinidade nas micropartículas. Esta característica é particularmente vantajosa porque a concentração do ativo e o tempo de estocagem podem alterar o estado físico do composto encapsulado na formulação, com efeitos indesejáveis na taxa de dissolução do mesmo.

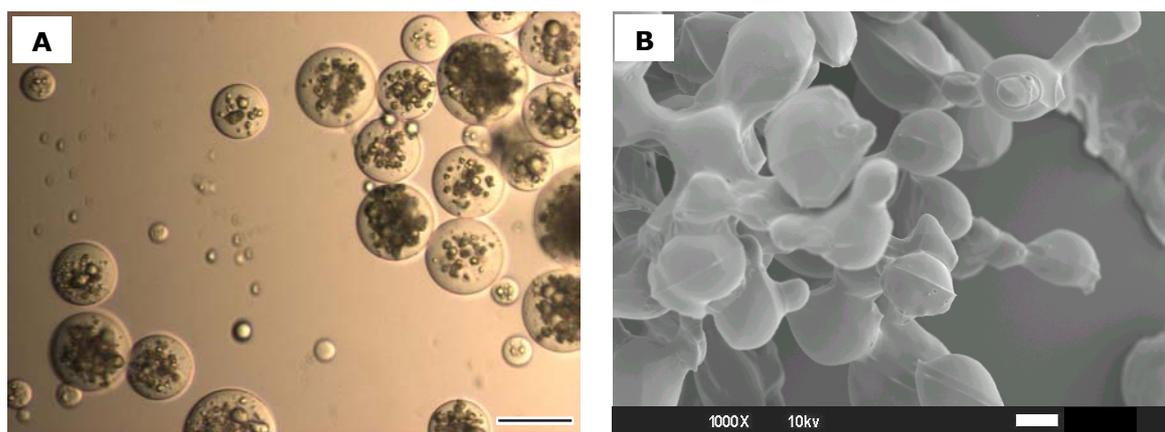


Figura 49. (A) Microscopia óptica de micropartículas de óleo essencial de vetiver. A barra de medida corresponde a 40 μ m. (B) Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microcápsulas de óleo de vetiver liofilizadas. A barra de medida corresponde a 10 μ m.

A análise da imagem do microscópio eletrônico de varredura indica que a forma esférica das partículas originais foi parcialmente mantida para as partículas liofilizadas (Figura 49). Isto indica a presença de pontes responsáveis por manter a forma original, caso contrário seriam inteiramente fundidas em uma massa amorfa. As partículas liofilizadas exibiram morfologia esférica e superfície lisa sem qualquer ruptura ou poro mais evidente, tão bem como distribuição de tamanho monodisperso o que pode ter influenciado no maior controle da liberação apresentado por este material.

5.7.1.3 Fluorimetria

A inclusão do dansilato de kusimila ao vetiver permitiu alta sensibilidade na detecção ($\mu\text{g/ml}$) do derivado KD no solvente de liberação mensurado fluorimetricamente. Não foi observada interferência do etanol e do óleo de vetiver na intensidade de fluorescência do KD nas condições de liberação.

Para o cálculo da quantidade inicial de dansilato de kusimila presente nos sistemas utilizados para a liberação foi utilizada a quantidade determinada para as micropartículas úmidas não reticuladas corrigida pela eficiência de encapsulação e pelo teor de umidade das partículas. Isto foi necessário uma vez que o método de extração enzimático não foi eficiente para as cápsulas reticuladas com glutaraldeído.

Dificuldades iniciais para a dispersão das partículas em álcool etílico anidro foram observadas para as cápsulas úmidas que mostravam forte aglomeração ao serem colocadas no solvente. O problema foi contornado pela suspensão das partículas em 1 mL de água, meio original das partículas, antes da adição ao recipiente contendo álcool (300 mL), já posicionado no banho em agitação. Estratégia semelhante foi anteriormente adotada [POULIN et al., 2003] Isto é possível pois este sistema trabalha com grande volume de álcool, muito superior à quantidade de saturação da droga, e pelo fato de não requerer grandes quantidades de micropartículas. O estudo de liberação foi conduzido em condições *sink*.

5.7.2 Liberação em etanol anidro

Os perfis de liberação do KD das partículas úmidas e secas em meio alcoólico são apresentados na Figura 50. A barra de erro representa os desvios da média de diferentes amostras ($n=3$ para cada preparação). Estudos preliminares de liberação em soluções alcoólicas de concentrações variadas foram efetuados e os resultados obtidos apresentados no APÊNDICE A3.

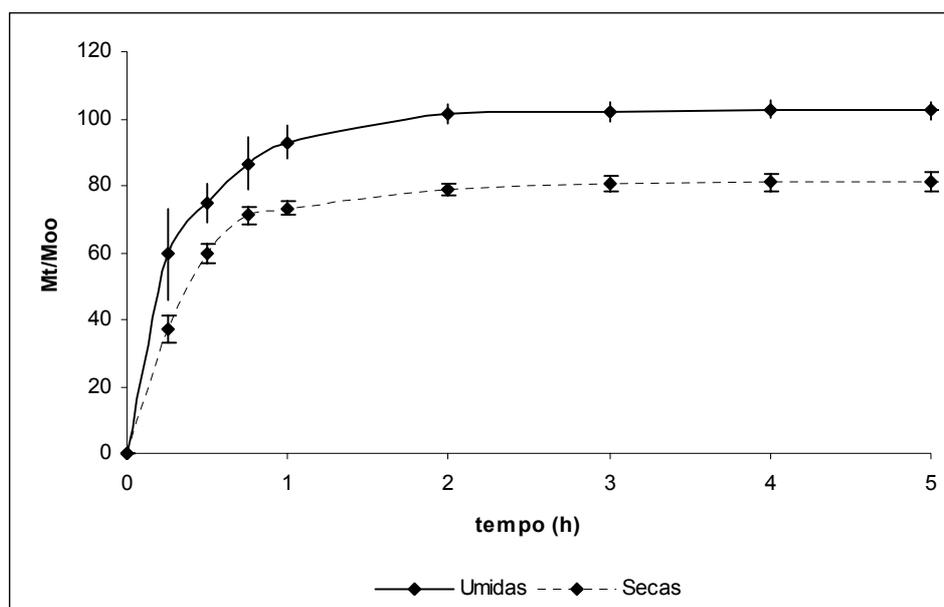


Figura 50. Curva de liberação kusimol-dansila em álcool (333/517nm).

As partículas coacervadas de gelatina e goma arábica mostraram-se semipermeáveis controlando a liberação do composto de baixo peso molecular durante as 5 primeiras horas de experimento. No entanto, houve diferença de retenção do composto entre as partículas secas e as úmidas. Pode ser visto que o KD é liberado das micropartículas após 2 horas. Aproximadamente 90% e 70% do composto encapsulado é liberado durante a primeira hora, para partículas úmidas e secas, respectivamente. Embora não apresentado no gráfico, a liberação foi medida também após 24 horas de ensaio observando-se que para as partículas úmidas houve liberação total do KD e para as secas, a máxima liberação foi de $83,00 \pm 5,3\%$. Apesar da diferença de retenção do ativo, as partículas apresentaram o mesmo perfil de liberação.

Este resultado pode ser atribuído à possível diferença de estrutura entre as partículas, inerentes ao processo de desidratação observado. Isto pode indicar que o acesso do solvente ao composto ocorre de maneira diferente ou que houve redução da porosidade da cápsula com o processo de secagem. A maior variabilidade interindividual associada às partículas úmidas sugeriu que

o grau de dispersão das mesmas pode também contribuir para estes resultados. Uma outra possibilidade é que o processo de secagem tenha permitido alguma interação não covalente entre o KD e os materiais de parede.

Partículas contendo o OF foram observadas por microscopia confocal. Através da Figura 51, e pode-se observar a distribuição do ativo fluorescente na matriz polimérica. Existe uma grande concentração do composto ao longo do diâmetro da partícula e muito próximo à borda externa. Acredita-se, portanto, que a difusão, no caso das partículas úmidas é controlada principalmente pela penetração do meio através da matriz polimérica. As partículas possuem os canais hidratados o que impede em parte, a interação do composto fluorescente com a matriz polimérica- já que este é um composto hidrofóbico - e permite que o solvente acesse o KD mais rapidamente, liberando o composto inteiramente.

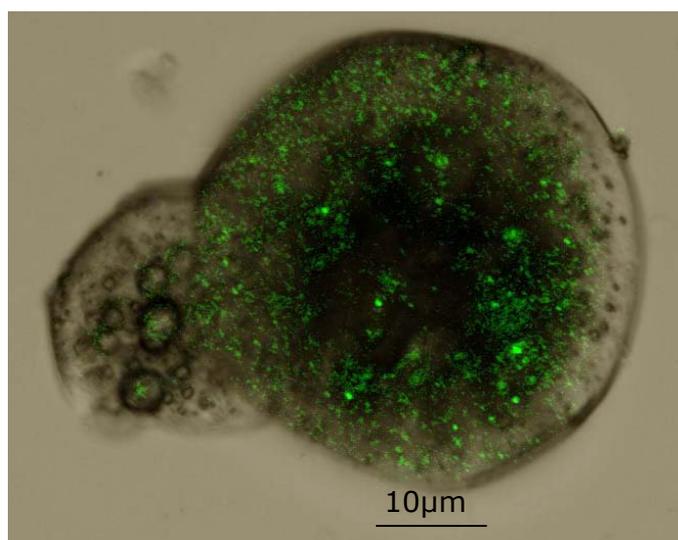


Figura 51. Micropartícula produzida com OF observada por microscopia confocal.

CHANG et al. [2003] observaram um comportamento de liberação completamente diferente ao usar metanol ou acetona como meio de liberação. Pôde-se descrever um modelo para prever a liberação do corante azo

misturado a um ativo hidrofóbico dioctilftalato, no metanol e em misturas deste com acetona. No entanto, a acetona pura não permitiu que houvesse liberação devido à interação com o ativo encapsulado. Isto indica, que o meio de liberação a ser adotado deve satisfazer, além do que já foi citado, que não haja interação química com o composto a ser liberado.

Ainda na curva de liberação, observa-se uma fase inicial cuja fração do KD encapsulado foi liberado com efeito *burst*. O *burst*, neste caso, pode estar associado à adsorção das moléculas de KD na superfície das micropartículas que tendem rapidamente a difundir nos primeiros tempos de incubação, já que esta não foi lavada com solvente orgânico para remoção, caso houvesse, de composto não encapsulado.

Numa segunda fase, o composto foi lentamente liberado, provavelmente devido somente a efeitos difusivos. Este tempo *lag* poderia ser relacionado à formação de aglomerados das partículas o que diminuiria a liberação da droga. A terceira fase foi marcada por um aumento gradual até tornar-se constante.

Liberações do tipo *burst* têm sido atribuídas a uma variedade de fatores de formulação envolvidos em vários passos dos processos de manufatura, bem como propriedades físico-químicas inerentes aos polímeros e às drogas [LANGER, 1980; PEPPAS & COLOMBO, 1997]. A adsorção da droga na superfície da matriz, uma distribuição desigual da droga na matriz e morfologias porosas desta são os principais fatores cogitados por serem os responsáveis pela rápida liberação da droga em ensaios de liberação [RAFATI et al., 1997; TAKAHATA et al., 1998].

Observa-se que o teor de 60% do óleo liberado após 15 minutos em contato com o meio nas partículas úmidas foi drasticamente reduzido (30%) para as partículas secas. Como os dados da taxa de liberação foram determinados sob as mesmas condições experimentais, as hipóteses

relacionadas à diferença de liberação estão associadas às propriedades de barreira das partículas e/ou à interação material de parede/ recheio.

No caso das partículas úmidas, a permissão de uma difusão facilitada (menor resistência) através do filme estagnante, também está associada à porosidade do gel, pelo fato dos canais estarem desobstruídos. A alteração estrutural provocada pelo processo de liofilização geralmente é citada por provocar um aumento no tamanho de poros [NAKAGAWA et al., 2004]. No entanto, as cápsulas liofilizadas produzidas por congelamento lento apresentaram superfície bastante lisa e sem poros visíveis (Figura 40). O processo de secagem pode ter alterado a porosidade da micropartícula aumentando sua propriedade de barreira.

Adicionalmente o estudo de inchamento mostrou que as partículas secas introduzidas em etanol não apresentaram aumento de tamanho (Tabela 20) indicando que se houve alteração na porosidade devido ao processo de secagem, ela se manteve após a introdução no meio etanólico anidro, contribuindo para a redução da liberação observada nas partículas secas. Uma outra possibilidade é que a secagem pode ter permitido um aumento das interações hidrofóbicas do derivado fluorescente com o material de parede.

As partículas úmidas e secas também foram reticuladas e nas duas partículas pode-se observar o mesmo comportamento dos agentes reticulantes. Eles não alteraram o perfil de liberação, sendo que uma liberação *burst* inicial pôde ser observada e o glutaraldeído foi o responsável por reter maior quantidade de ativo na partícula. A transglutaminase, nas condições utilizadas apresentou pouca ação reticulante, permitindo que o composto fosse liberado quase que na mesma taxa que a partícula não tratada (Figura 52).

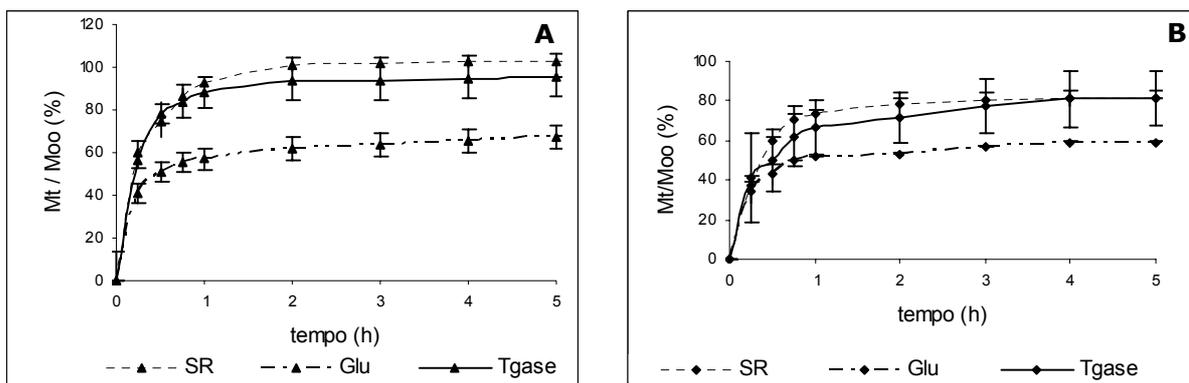


Figura 52. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas úmidas (A) e secas (B). SR- sem reticulação, Glu- reticuladas com glutaraldeído, Tgase- com transglutaminase, em álcool.

5.7.2.1 Análise cromatográfica

A análise química do óleo essencial de vetiver comercial foi feita por cromatografia em fase gasosa (GC e GC-MS), nas condições descritas anteriormente, resultando no cromatograma apresentado na Figura 53. Os picos cromatográficos numerados de 1 a 25 foram tentativamente identificados por comparação entre os índices de Kovats obtidos em CG-MS com os espectros disponíveis na literatura [ADAMS et al., 2003, SELLIER et al., 1991, CAZAUSSUS et al., 1988; WEYERSTAHL et al., 2000a, b] e estão apresentados na Tabela 22, sendo as quantidades expressas em porcentagem relativa de área obtidas em CG.

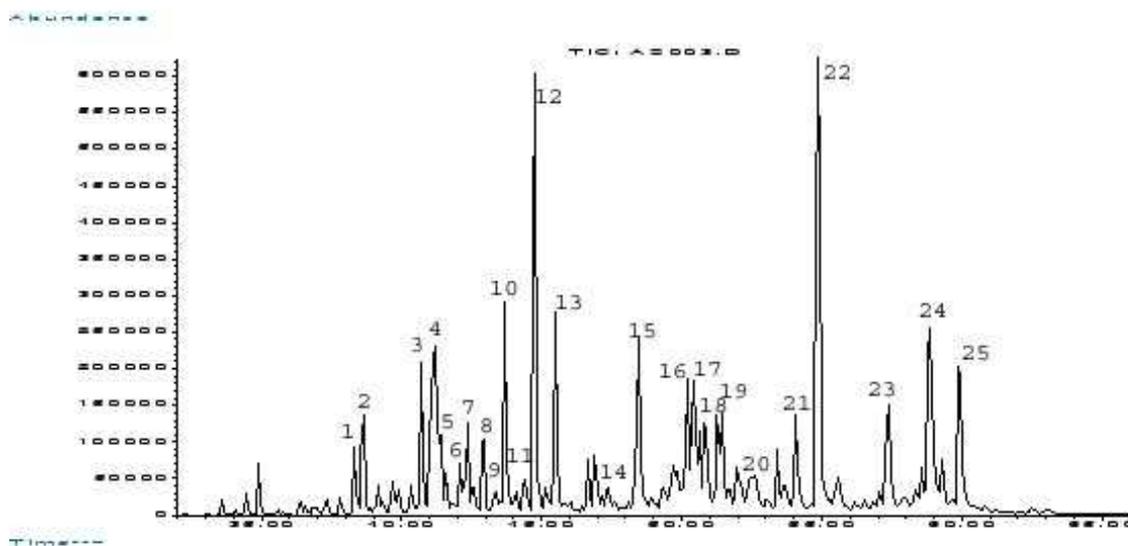


Figura 53. Cromatograma do óleo essencial de vetiver.

Pode-se observar a complexidade do óleo essencial de vetiver, exclusivamente constituído por sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados. Dos constituintes identificados, os mais importantes incluem o khusimol (10,5%) e seu derivado ácido (ácido zizanóico) caracterizado por uma estrutura triclovetivena. O segundo maior composto é o β -vetiveneno (8,7%) que possui um esqueleto hidrocarboneto eremofilano acompanhado por seu segundo isômero γ -vetiveneno (3,3%) e pelo álcool primário derivado isovalencenol (2,7%). Os sesquiterpenos do tipo eudesmeno são igualmente encontrados em quantidades relevantes na forma de *cis*-eudesma-6,11-dieno (4,8%) e *trans*-eudesma-4(15)-7-dienol (2,4%). Em pequena quantidade foram identificados alguns sesquiterpenos com o esqueleto cadineno (α e δ amorfeno, γ e δ -cadineno e α -calacoreno). A abundância relativa destes compostos normalmente estabelece a qualidade do óleo.

A composição química do óleo de vetiver varia consideravelmente com a localização e a variedade da planta [ADAMS et al., 2003]. O óleo disponível comercialmente no Brasil possui uma quantidade de ácido zizanóico (4,3%)

muito acima da encontrada nos óleos essenciais de vetiver do Haiti e Ilha da Reunião (2%) [ADAMS et al., 2003], que são considerados os mais atrativos para a fabricação de perfumes. Todos os compostos individualmente e coletivamente contribuem com a característica de odor do vetiver [LAVANIA et al., 2004], mas α -vetivona, β -vetivona e khusimol podem ser consideradas as impressões digitais do óleo de vetiver [DEMOLE, HOLZNER & YOUSSEFI, 1995].

Tabela 22. Nomenclatura dos compostos analisados no óleo comercial de vetiver

Nro pico		Area(%)	IK*	IK+
1	preziza-7(15)-eno	1,0	1432	1448
2	ziza-6(13)-ene (khusimeno)	2,0	1437	1453
3	α - amorfeno	2,6	1472	1473
4	<i>cis</i> - Eudesma-6,11-dieno	4,8	1480	1484
5	β -vetispireno (spirovetiva-1,7(11),10(14)-trieno)	1,6	1484	1486
6	nootkateno	0,8	1494	
7	δ -amorfeno	1,5	1500	1497
8	γ -cadineno	1,4	1509	1512
9	δ -cadineno	0,7	1517	1517
10	γ -vetiveneno (eremophila-1(10),6,11-trieno)	3,3	1522	1517
11	α -calacoreno	0,8	1535	
12	β -vetiveneno(eremophila-1,7(11),9-trieno)	8,7	1541	1547
13	N.I.	3,5	1554	
14	khusimona (12-nor-Ziza-6(13)-en-2-ona)	0,9	1587	1577
15	N.I.	4,7	1607	1603
16	b-eudesmol (?)	1,9	1639	
17	α -eudesmol (?)	1,9	1641	
18	ziza-6(13)-en-3 α -ol	1,1	1658	1668
19	khusian-2-ol (heliofolan-2-ol)	1,5	1661	1687
20	ziza-6(13)-en-3-ona	0,8	1667	
21	<i>Trans</i> -eudesma-4(15)-7-dienol	2,4	1710	1704
22	khusimol	10,5	1725	1726
23	isovalencenol	2,7	1775	1771
24	ácido zizanoico+Bvetivona	4,3	1804	1788
25	α -vetivona	4,3	1823	1813

*IK- em FID para coluna HP-5; IK+: WEYERSTAHL et al., 2000a,b, coluna CP Sil 5 CB (25m).

Muitos perfumes contêm componentes como álcoois terciários, secundários ou primários que devido sua alta volatilidade podem ser

percebidas por um período de tempo muito curto em aplicações clássicas da perfumaria funcional. Para melhorar a performance destes compostos está sendo desenvolvida para a indústria de compostos de aroma e fragrâncias, uma variedade de novos produtos com objetivo de liberação controlada [DE SAINT LAUMER, FREROT & HERRMANN, 2003].

Além da medida de liberação do composto fluorescente no solvente modelo – etanol anidro- como estimativa indireta da porosidade da partícula e da potencialidade do derivado fluorescente neste tipo de estudo, foi também avaliada a liberação dos compostos presentes no óleo de vetiver.

Existem pelo menos vinte e dois diferentes compostos em quantidades consideráveis no óleo [MARTINEZ et al., 2004] apresentando diferentes funcionalidades químicas e conseqüentemente coeficientes de partição diferenciados o que pode provocar uma liberação preferencial de algum composto em relação a outro dependendo do meio de liberação adotado.

A liberação de alguns dos componentes presentes no óleo essencial de vetiver encapsulado em micropartículas úmidas sem reticulação foi realizada utilizando-se etanol anidro como meio de liberação conforme descrito em Materiais e Métodos. A análise das quantidades liberadas foi feita cromatograficamente com o auxílio de curvas analíticas para componentes individuais em presença de padrão interno. Alíquotas do material liberado foram retiradas nos tempo de 15, 45, 60, 120 e 300min. Embora o óleo de vetiver apresente um grande número de diferentes componentes, o estudo de liberação avaliou compostos identificados que apresentavam alguma relevância quantitativa no óleo, pico cromatográfico bem definido, correlação entre os picos no CG-MS e no FID e bom ajuste da curva de calibração. Pode-se observar que alguns dos principais compostos do vetiver não foram considerados, porém a análise dos resultados em termos de função química e do coeficiente de partição podem ser extrapoladas para esses compostos.

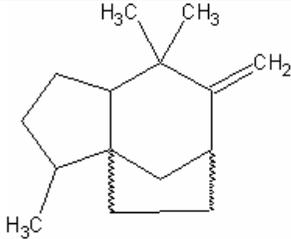
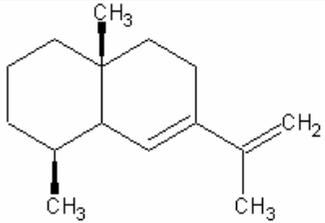
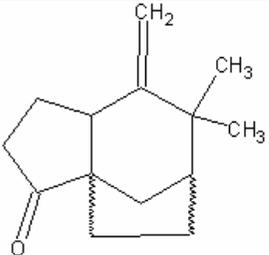
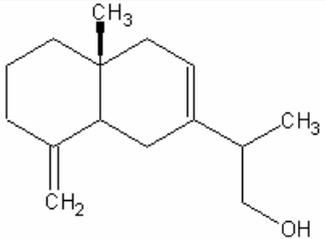
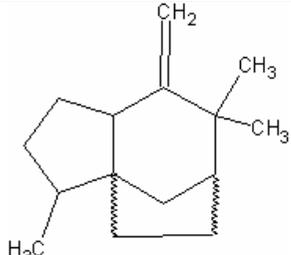
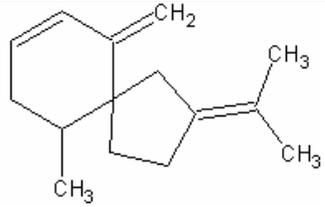
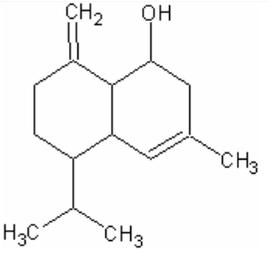
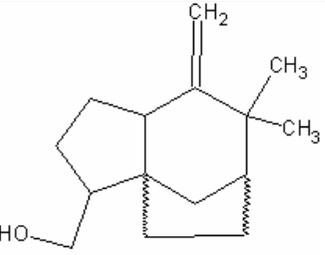
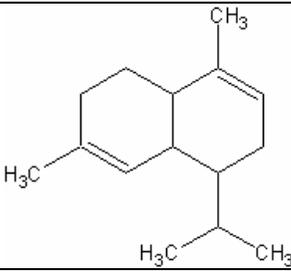
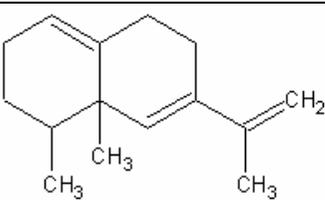
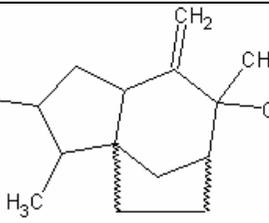
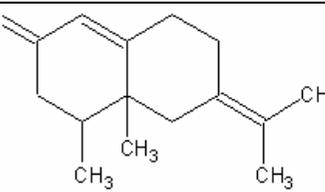
A Tabela 23 apresenta os principais resultados cromatográficos obtidos, as informações referentes às curvas de calibração e os valores calculados de log P para os componentes selecionados estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 23. Caracterização cromatográfica dos compostos liberados. CG-MS e CG (% de área, tempo e índice de retenção), fatores de resposta das curvas de calibração e conteúdo médio percentual.

Compostos selecionados	MS			FID			Curva Analítica		
	%area	tr	IK	%area	tr	IK	fator de resposta	R ²	Conteúdo Médio* (%)
prezizaeno (PZZN)	0,83	10,93	1450	1,07	15,01	1453	0,9342	99,8	1,12±0,10
khusimeno (KMNO)	1,38	11,09	1454	1,39	15,22	1458	0,9353	99,7	1,30±0,03
α-amorfeno (AMFO)	3,13	12,12	1482	2,30	16,34	1484	0,9350	99,8	2,17±0,09
cis-eudesm-6,11-dieno (EDMN)	4,31	12,35	1489	2,69	16,60	1490	0,9348	99,8	2,53±0,13
vetispireno (VTPO)	3,28	12,52	1493	3,29	16,84	1496	0,9360	99,7	3,05±0,03
γ-vetiveneno (GVTV)	2,97	14,02	1530	2,31	18,48	1532	0,9351	99,7	2,21±0,07
khusimona (KMONA)	3,37	16,96	1600	2,76	22,62	1620	0,9383	99,4	2,95±0,31
khusinol (KNOL)	2,11	19,79	1661	2,48	24,13	1651	0,9422	97,7	2,41±0,28
ziza-6(13)-en-3-ol (ZNOL)	3,82	20,33	1673	1,56	25,12	1671	0,9353	99,7	1,54±0,04
transeudesmadienol (TEOL)	2,37	22,45	1718	2,21	27,51	1721	0,9362	99,7	2,11±0,04
khusimol (KMOL)	8,41	23,24	1735	9,33	28,52	1742	0,9354	99,7	9,02±0,14
α-vetivona (AVONA)	3,79	27,68	1830	3,57	33,12	1838	0,9310	99,9	3,58±0,11

*Média entre as quantidades detectadas com a variação da concentração do óleo de vetiver.

Tabela 24. Estrutura química e log P de alguns compostos do óleo de vetiver.

Compostos	PZZN	EDMN	KMONA	TEOL
Estrutura química				
Log P*	6,37±0,34	5,55±0,39	3,43±0,41	4,73±0,26
Compostos	KMNO	VTPO	KNOL	KMOL
Estrutura química				
Log P*	6,37±0,34	6,19±0,39	4,72±0,32	4,36±0,35
Compostos	AMFO	GTVT	ZNOL	AVONA
Estrutura química				
Log P*	6,56±0,23	5,91±0,36	4,37±0,35	4,42±0,35

*log P calculado por ACD/log P calculator

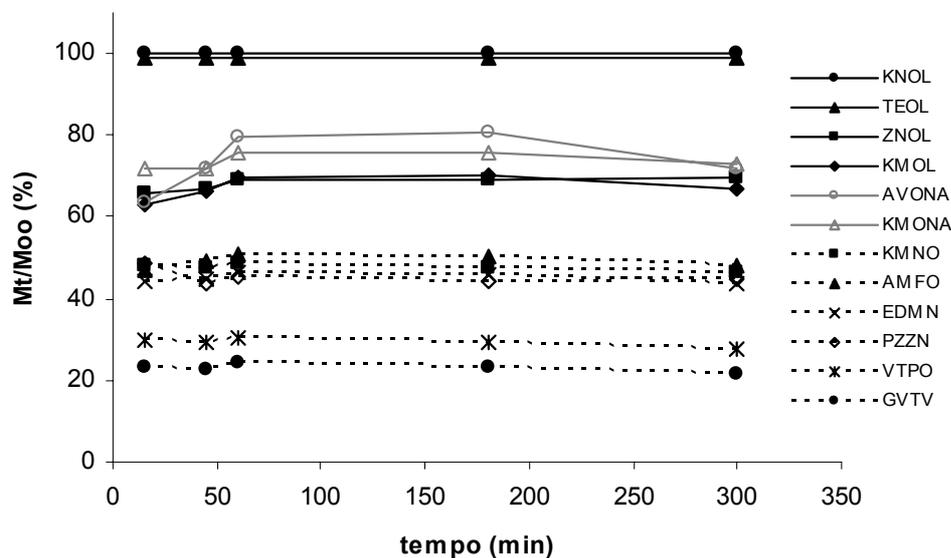


Figura 54. Porcentagem de liberação de compostos presentes no óleo essencial de vetiver após 15 e 300 minutos de ensaio em etanol anidro.

Embora tenha sido observada liberação diferenciada em consequência de diferentes funcionalidades químicas entre os compostos, onde álcoois e cetonas, de uma forma geral, apresentaram liberação superiores a 60% e hidrocarbonetos inferiores a 50%, a Figura 54 indica que não houve diferença significativa entre a liberação inicial e final (15 e 300 minutos) quando cada constituinte foi analisado individualmente. Para qualquer das curvas obtidas, as moléculas foram liberadas logo após os primeiros 15 minutos em contato com o etanol, indicando que a partícula coacervada não apresentou suficiente barreira para modular a liberação.

Isto parece corroborado pelos coeficientes de partição calculados para os compostos (Tabela 24), indicando que a solubilidade dos diferentes compostos no meio de liberação foi o fator determinante nas diferentes liberações observadas. Os compostos com menores log P apresentam maior solubilidade

em água e deveriam também apresentar maior solubilidade em etanol, um solvente com características bastante hidrofílicas. Os resultados apresentados na Figura 54, mostraram que os compostos com função álcool e cetona, apresentaram as maiores porcentagens de liberação, onde o khusinol e o trans-eudesmadienol foram totalmente liberados, enquanto os compostos com função hidrocarboneto apresentaram as menores porcentagens de liberação entre os compostos estudados.

É necessário enfatizar que neste experimento de liberação as partículas não foram reticuladas o que poderia ter contribuído para diminuir a porosidade e possivelmente determinar menor liberação dos compostos *fingerprint* (khusinol, a-vetivona e b-vetivona). A introdução de ligações cruzadas nas cadeias ou entre as cadeias de gelatina via enzimática ou química poderia ser uma alternativa para melhor estruturar a matriz polimérica [BABIN & DICKINSON, 2001]. Adicionalmente, o *crosslinking* também aumenta a resistência mecânica das partículas evitando o aparecimento de rachaduras que podem contribuir para liberações iniciais acentuadas do tipo *burst*, nem sempre desejadas.

Embora meios alcoólicos sejam utilizados em alguns estudos de liberação e como base para a incorporação de agentes de aroma em perfumes, a utilização do meio alcoólico para estudar a liberação tem pouca relevância biológica. A maior parte dos estudos de liberação disponíveis na literatura de compostos de aromas encapsulados utiliza a medida da liberação no *headspace* [PEPPAS & ENDE, 1997], utilizando condições controladas de temperatura e umidade relativa.

5.7.3 Liberação com tensoativos

A alteração das características de um meio de liberação aquoso foi estudada através da liberação do composto fluorescente formulado (KD). Nesta seqüência, micropartículas reticuladas com glutaraldeído ou transglutaminase,

úmidas ou secas por liofilização foram utilizadas para acompanhar a liberação, adicionalmente às partículas não reticuladas. Marcadores fluorescentes encontram aplicações principalmente na medicina, como forma de acompanhar uma via de ação ou de atingir órgãos-alvo. Sua utilização para acompanhar a liberação controlada de uma droga modelo, que muitas vezes apresenta absorvância em comprimento de onda específico, ainda é muito restrita.

O transporte das moléculas difundidas, a partir da superfície da partícula, deve ser eficiente a fim de manter o gradiente de concentração. As condições *sink* para compostos com baixa solubilidade são obtidas através de estratégias como alteração do meio pela adição de solventes orgânicos, adsorventes ou misturas de água e solventes miscíveis em água, uso de grandes volumes de meio e aumento da taxa de agitação são citados na literatura [WALKLING *et al.*, 1979]. Estas técnicas são algumas vezes necessárias pela dificuldade de quantificação da droga que precisa estar numa proporção bastante grande na partícula para que a quantidade liberada possa ser detectada. A grande vantagem do uso do composto fluorescente como auxiliar no estudo da potencialidade dos tensoativos como meio de liberação é sua sensibilidade analítica, que reduz algumas possíveis complicações provocadas pelas estratégias de dissolução.

O uso dos tensoativos escolhidos para compor o meio de liberação, SDS e Tween 80, é permitido em alimentos e eles estão presentes em muitas formulações cosméticas e farmacêuticas. Fragrâncias possuem base alcoólica, mas a maioria das formulações cosméticas possui tensoativos para melhorar a estabilidade ou como promotor de absorção. Assim, as principais vantagens vinculadas à escolha deste meio é a não utilização de solventes orgânicos, que pode ocasionar irritações ou limitações de aplicação e a redução da tensão superficial da água, o que permite a saída do composto hidrofóbico encapsulado.

A Tabela 25 apresenta os coeficientes de difusão obtidos para partículas (sistema monolítico), considerando o diâmetro constante ao longo do ensaio de liberação, uma vez que o inchamento ocorreu quase que instantaneamente. Podem ser observados os menores coeficientes de difusão para partículas reticuladas com glutaraldeído liberadas em tensoativos. Comparativamente entre as partículas, os menores coeficientes de difusão foram obtidos para as partículas secas, com exceção da transglutaminase em álcool anidro.

Tabela 25. Coeficientes de difusão (D)*10⁻¹⁰ cm²/s (média±SD)

Meio de liberação	umidas	secas
	<i>Sem reticulação</i>	
<i>Etanol anidro</i>	0,691	0,146
<i>Tween 80 (2%)</i>	0,310	0,157
	<i>Com transglutaminase</i>	
<i>Etanol anidro</i>	0,687	1,58
<i>Tween 80 (2%)</i>	0,349	0,294
<i>SDS (5%)</i>	1,51	0,201
	<i>Com glutaraldeído</i>	
<i>Etanol anidro</i>	0,351	0,235
<i>Tween 80 (2%)</i>	0,0441	0,00209
<i>SDS (5%)</i>	0,0144	0,00181

O KD usado como agente fluorescente para a quantificação da liberação e estudo da potencialidade dos tensoativos na liberação de compostos lipofílicos foi examinado e o perfil de liberação deste composto em micropartículas coacervadas é mostrado na Figura 55, em SDS 5% e na Figura 56, em Tween80. Resultados preliminares de medida de fluorescência do meio de liberação contendo água deionizada e partículas úmidas sem reticulação não apresentaram respostas. Deve-se considerar que a fluorescência do composto livre apresenta resposta em água muito baixa na faixa de excitação/emissão utilizada nos sistemas.

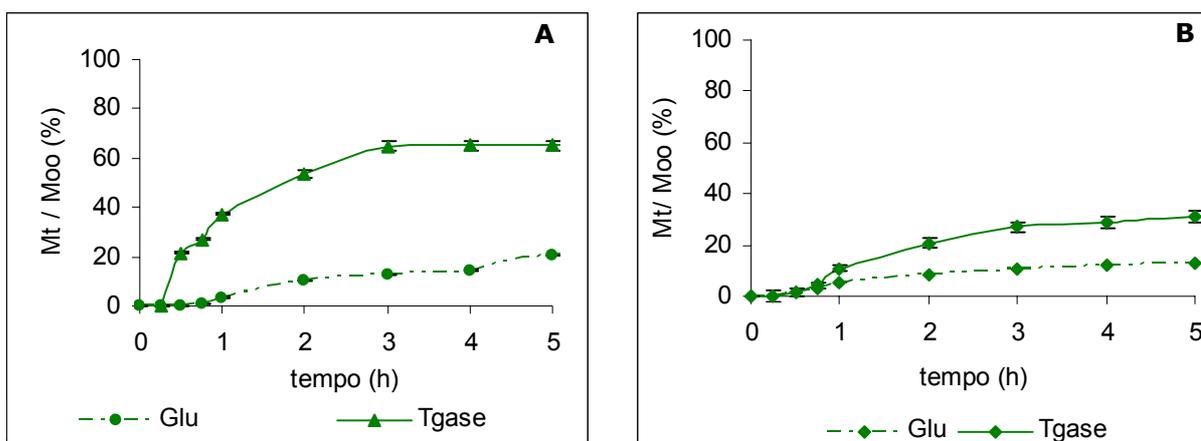


Figura 55. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas úmidas (A) e secas (B) em SDS 5%p/v reticuladas com glutaraldeído (Glu), e com transglutaminase (Tgase).

Os testes de liberação de partículas não reticuladas não puderam ser efetuados com SDS. As partículas são formuladas a partir da complexação dos polieletrólitos e a presença do tensoativo iônico concorre pelas cargas complexadas [GREENER, CONSTESTABLE & BALE, 1987] e desestabilizam o complexo biopolimérico rapidamente. Acredita-se que a maioria dos resíduos catiônicos como arginina e lisina sejam atraídos para a superfície micelar do SDS [MILLER et al., 1994]. Por isso, além da maior estabilidade estrutural que a reticulação promove, os agentes reticulantes usados também indisponibilizam a maioria dos resíduos requeridos para interação com o tensoativo aniônico.

A liberação controlada do ativo de formulações poliméricas, seja do tipo reservatório ou monolítica, depende da estrutura física do material polimérico e do tamanho do soluto a ser liberado, e neste sentido, o efeito da reticulação deve ser observado pelo tipo de agente reticulante bem como a quantidade adicionada durante a preparação e o tempo de reticulação.

O mecanismo de reticulação entre o glutaraldeído e a transglutaminase é diferente e, apesar do grau de reticulação não ter sido medido, as diferenças

são evidenciadas nas curvas de liberação, tanto com partículas secas quanto úmidas (Figura 55), onde os coeficientes de difusão apresentaram-se cerca de dez vezes maior com partículas reticuladas pela enzima (Tabela 25). O glutaraldeído passa a fazer parte da estrutura reticulada ligando-se a duas aminas protéicas pela substituição dos oxigênios aldeídicos terminais, enquanto a enzima promove o crosslinking mas não participa da estrutura. É possível que a estrutura carbônica formada pela reticulação com glutaraldeído seja menos flexível comparado à estrutura formada pela transglutaminase que apenas catalisa a ligação entre a amina e a carboxiamida das proteínas.

A reticulação com transglutaminase permitiu uma entrada de solvente maior que o glutaraldeído e o SDS mostrou alguma interação nestas partículas coacervadas. As modificações das propriedades da gelatina pela ação do tensoativo iônico foram anteriormente relatadas na alteração da estrutura e porosidade de microcápsulas de gelatina, na consistência de soluções e géis, espessura, estrutura e inchamento de filmes de gelatina e na adsorção na interface [SOVILJ, 1998]. As partículas secas, como mostrado na Tabela 21, quando em contato com SDS 5% foram as que ganharam mais peso, e em particular as com transglutaminase, foram estatisticamente diferentes das de glutaraldeído, atingindo 13,8 vezes o seu peso original. Além disso, tanto as úmidas quanto as secas reticuladas com transglutaminase quase triplicaram seus diâmetros médios (Tabela 20).

Parâmetros de inchamento e tamanho das micropartículas são extremamente importantes na cinética de liberação [BRAZEL & PEPPAS, 2000] e os coeficientes de difusão apresentados na Tabela 25 foram obtidos a partir do ajuste de modelo que não consideraram o inchamento das partículas, já que este efeito do tensoativo no tamanho das mesmas foi instantâneo.

O efeito do entumescimento é especificamente dominante nos casos onde o ativo possui baixa difusividade através da matriz polimérica e sua liberação pode ocorrer através do arraste causado pela entrada do fluido e o

inchamento do polímero [VLACHOU et al., 2001]. As mudanças na estrutura da camada de adsorção devido à interação influenciam a porosidade e a permeabilidade da parede das microcápsulas, regulando assim a liberação do conteúdo da partícula [HELLEBUST, BLOKHUS & NILSSON, 2004, YOSHIMURA, NAGATA & ESUMI, 2004]. No entanto, apesar do alto grau de inchamento das partículas secas reticuladas com transglutaminase, seu perfil de liberação global foi inferior ao da partícula úmida, permanecendo a hipótese de que possa ter havido alguma interação do composto fluorescente com o material polimérico.

O efeito *burst*, atribuído ao composto encapsulado próximo à superfície e aderido à parte externa da partícula, não pôde ser observado para as partículas reticuladas com glutaraldeído. Isto pode ser uma evidência de que a reticulação com o glutaraldeído além de ter sido mais eficiente na retenção do composto fluorescente foi também eficiente para evitar o efeito *burst*, independentemente da localização física do KD na partícula. Da mesma forma, RHEINHART & PEPPAS [1984] quando estudaram a liberação de BSA macromolecular de matrizes de hidrogel de álcool polivinil (PVA) reticuladas com diferentes extensões de glutaraldeído verificaram uma diminuição da liberação difusional com o aumento do grau de reticulação da matriz.

Um estudo reológico mostrou que tensoativos aniônicos, em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), apresentaram um maior aumento na viscosidade de soluções de gelatina que com tensoativos catiônicos e que os não iônicos tiveram pouco efeito na viscosidade de soluções de gelatina [HOWE et al., 1992]. De fato, as partículas reticuladas, quando em solução de tensoativo não iônico, apresentaram menor inchamento, e as partículas não reticuladas apresentaram-se estáveis, sem alteração da estrutura física, durante o tempo total do experimento (24 horas). A Figura 56 compara os perfis de liberação obtidos para as partículas reticuladas ou não, secas e úmidas em solução 2% de Tween 80.

As partículas úmidas reticuladas com transglutaminase apresentaram liberação inferior ($D = 0,349 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$) comparadas ao SDS 5% ($D = 1,51 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$), provavelmente em decorrência do efeito de inchamento da partícula. Porém, as partículas secas ($D = 0,294 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$) apresentaram perfis idênticos ao das amostras secas em SDS 5% ($D = 0,201 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$). Em nenhum dos casos o composto encapsulado foi completamente solubilizado. Provavelmente o processo de liberação é mais longo e pode demorar dias para que o composto fluorescente seja liberado na totalidade.

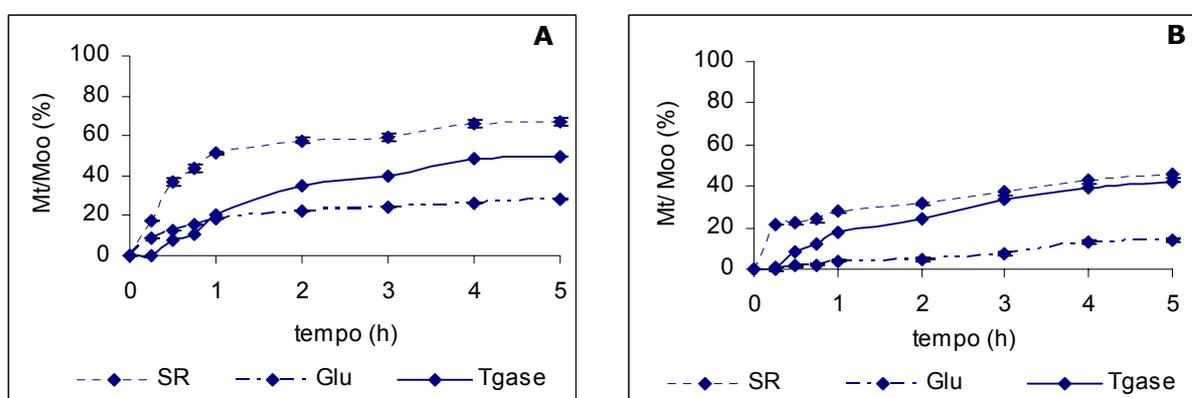


Figura 56. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas úmidas (A) e secas (B) em Tween 80 (2%*p/v*). SR- sem reticulação, Glu- reticuladas com glutaraldeído, Tgase- com transglutaminase

A Figura 57 e Figura 58 comparam a liberação obtida com os tensoativos iônico e aniônico e o meio etanólico anidro, para as partículas sem reticulação úmidas e secas. O meio de dissolução com o tensoativo consegue melhor modular as taxas de liberação que o etanol anidro. No entanto, produtos que fazem uso de álcool na formulação utilizam em sua maioria, soluções hidroalcoólicas e não anidra, o que reduz significativamente a taxa de liberação do composto encapsulado podendo atingir a liberação obtida com o tensoativo.

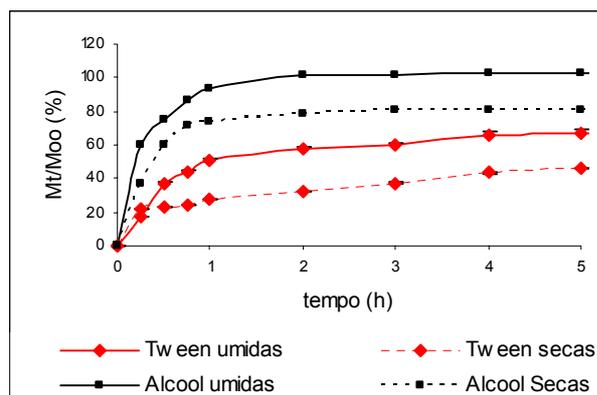


Figura 57. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas sem reticulação úmidas e secas em Tween 80 (2%p/v) e álcool anidro.

Os estudos de liberação mostraram que micropartículas reticuladas, independentemente do tipo de solvente usado como meio de liberação, apresentaram liberação mais lenta que as partículas que não receberam o tratamento químico ou enzimático (Figura 57). Além disso, outro comportamento comum aos ensaios foi a maior eficiência de retenção do composto fluorescente nas partículas desidratadas por liofilização (Figura 57 e Figura 58).

Na Figura 58, pode-se observar que as partículas reticuladas com glutaraldeído podem ser divididas em dois grupos distintos. As partículas inseridas em meio alcoólico apresentaram 60% de liberação máxima e as partículas em meio aquoso permaneceram agrupadas com liberação máxima de 10-20% em tensoativos.

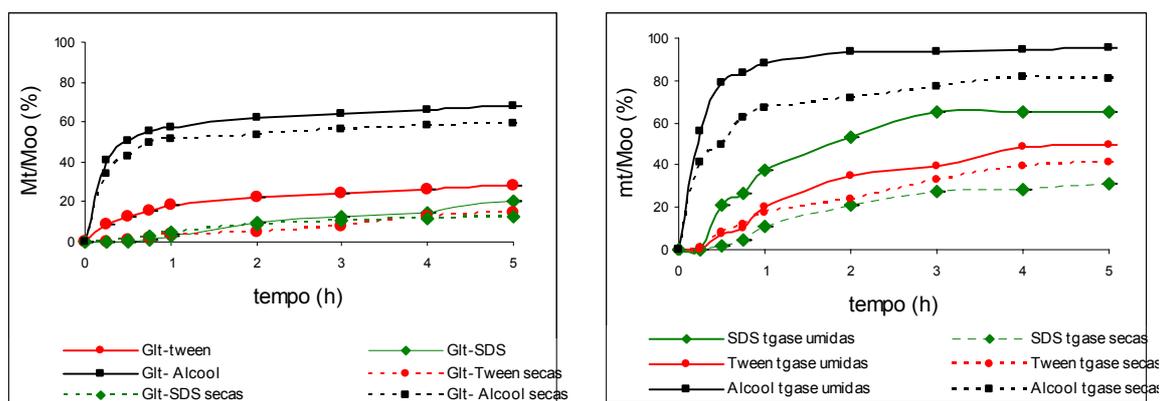


Figura 58. Liberação acumulada (M_t/M_∞) de partículas reticuladas com glutaraldeído (A) e transglutaminase (B) úmidas e secas em Tween 80 (2%*p/v*), SDS e em álcool anidro.

Em todos os casos, os meios aquosos adotados foram capazes de modular a liberação do composto fluorescente da partícula formulada tendo o óleo de vetiver como veículo oleoso. Uma liberação estendida, com parte da curva de liberação apresentando taxa praticamente constante, foi obtida em todos os experimentos, com partículas úmidas, secas, reticuladas ou não. Os sistemas investigados podem ser considerados como modelos para aplicações práticas. A espectroscopia de fluorescência é uma técnica apropriada para acompanhar os comportamentos de liberação e dissolução de micropartículas cujas propriedades de barreira são completamente desconhecidas.

No corpo humano, os tensoativos naturais fazem o papel de solubilizar drogas parcialmente solúveis e ajudar no processo de absorção. Por isso, o uso do tensoativo no meio de liberação é fisiologicamente mais relevante em comparação a solventes orgânicos, pois um meio de dissolução contendo tensoativo pode melhor simular o ambiente do trato gastrointestinal que um meio contendo um solvente orgânico ou outra substância não fisiológica.

A dissolução de drogas parcialmente solúveis em água por intermédio de tensoativos é bem documentada, seja co-encapsulando ou no meio de liberação [BARREIRO-IGLESIAS et al., 2003; KOGA et al., 2000; NYSTROM &

WESTERBERG, 1986]. Porém, idealmente deseja-se um tensoativo que promova a melhor combinação de solubilidade, molhabilidade, mínima interferência de ensaio e efetividade de custo e que promova um perfil de dissolução modulado e reprodutível [MAGGI et al., 1996].

O uso da mistura de tensoativos na solubilização de compostos é citado na literatura como sendo bastante efetivo na solubilização de óleos [McCLEMENTS, 1997; GARTI et al., 2001; KUNIEDA, NAKANO & PÉS, 1995]. TOKUOKA et al. [1995], no entanto, estudaram a solubilização de eugenol, linalol, acetato de benzila, α -ionona, α -hexilcinamaldeído e *d*-limoneno pela mistura de dodecilsulfato de sódio (SDS)/ésteres de hexadecil polioxietileno e observaram que a quantidade de compostos solubilizados nas micelas aumentou com o aumento da hidrofiliicidade dos compostos e que a solubilização dos compostos na mistura diminuiu comparada à solubilização de tensoativos individuais. Portanto, utilizar a mistura de tensoativos como uma maneira de aumentar a solubilidade dos compostos envolve um estudo detalhado para determinar os componentes e sua composição ideal de mistura.

6. CONCLUSÕES

A proporção ótima determinada para a coacervação complexa utilizando gelatina-goma arábica ocorreu quando maior proporção de gelatina em relação à goma arábica foi utilizada (2:1; 3:1; 4:1) e pH de coacervação de 4,5 a 60°C. Para o par pectina-gelatina não foi possível se obter partículas bem definidas nas concentrações avaliadas. O rendimento em coacervados foi principalmente influenciado pela estequiometria entre os polímeros, temperatura e velocidade de homogeneização, em ordem de significância. As outras variáveis e as interações entre as mesmas não foram significativas.

A utilização da técnica de coacervação complexa para microencapsular o óleo essencial de vetiver foi altamente eficiente, produzindo em torno de 97% do material polimérico e oleoso na forma de coacervado e 89% do óleo encapsulado. As partículas apresentaram tamanho médio de 43,5µm e forma esférica bem definida.

Entre os óleos estudados, o óleo mineral, com características acentuadamente hidrofóbicas, apresentou baixo rendimento em massa de coacervado (46,4%) e eficiência de encapsulação (38%) inferiores aos obtidos quando as partículas foram produzidas com óleo essencial de vetiver ou óleo de amêndoas.

As partículas foram efetivamente reticuladas com a utilização de glutaraldeído ou transglutaminase com melhor efeito para o aldeído. A utilização de álcool anidro apresentou forte efeito desidratante somente observado para as partículas úmidas não reticuladas.

A secagem por liofilização produziu partículas sem poros aparentes, geometria esférica e apresentando pontes sólidas entre algumas partículas quando congelamento lento foi utilizado. Congelamento rápido produziu

partículas com paredes porosas. Partículas secas apresentaram inchamento instantâneo quando colocadas em meio aquoso, exceto as reticuladas com glutaraldeído.

A produção do composto fluorescente, dansilato de kusimila, foi bem sucedida e permitiu aumento na sensibilidade e rapidez de detecção nos estudos de liberação.

As propriedades de barreira das partículas foram diferentemente alteradas de acordo com a natureza do agente reticulante. Partículas reticuladas com glutaraldeído apresentaram menor liberação em qualquer dos meios estudados em relação às reticuladas com a enzima e às não reticuladas

Entre os meios de liberação maiores taxas foram obtidas com álcool anidro. Entre os meios aquosos, taxas superiores de liberação foram observadas para o SDS em relação ao tween80. Os perfis de liberação do composto fluorescente, entretanto foram semelhantes para todos os meios estudados.

A liberação dos componentes do óleo essencial de vetiver em etanol anidro, de partículas úmidas não reticuladas, foi diferenciada de acordo com sua hidrofobicidade. Porcentagens mais altas foram observadas para álcoois e cetonas seguido por hidrocarbonetos. A liberação do composto fluorescente para partículas úmidas em meio alcoólico foi completa. Partículas secas apresentaram capacidade de modulação, liberando 80% de KD no mesmo intervalo de tempo.

7. AVALIAÇÃO CRÍTICA DOS RESULTADOS E SUGESTÕES DE CONTINUIDADE

Influência da estequiometria entre os polímeros

O método de turbidez, adotado para estimar a faixa de coacervação dos pares poliméricos, já havia sido comparado na literatura com o método de volume de fase coacervado. Neste trabalho, a técnica turbidimétrica mostrou concordância com as cargas medidas nas diferentes proporções dos pares poliméricos através do potencial zeta, e os pHs ótimos de coacervação foram coincidentes entre os dois métodos.

A proporção ótima encontrada para a coacervação complexa entre gelatina e goma arábica foi diferente das comumente citadas na literatura (1;1, pH4,0), enquanto situações otimizadas ocorreram com maior proporção de gelatina em relação à goma arábica no coacervado (2:1; 3:1; 4:1; GE:GA), com pH de coacervação de 4,5. A inversão desta relação, maior quantidade de goma arábica, desloca o ponto ótimo da curva para pH 3,5 e restringe a faixa de coacervação.

O estudo com o par pectina:gelatina não apresentou resultados tão evidentes devido à alta concentração (2% p/p) do polissacarídeo, que modificou a textura da solução impedindo que a separação de fases ocorresse rapidamente ou que as moléculas tivessem espaço suficiente para se desdobrar e expor seus grupos em solução.

Sugestões para continuidade: A lacuna observada no trabalho está relacionada ao par pectina-gelatina. Concentrações excessivamente altas inviabilizaram a otimização da produção de partículas. Menores concentrações de pectina devem ser avaliadas.

Influência do tipo de óleo

A microencapsulação por coacervação complexa não depende apenas da associação entre os polímeros de parede envolvidos, como é o caso da separação de fases. A encapsulação de óleos com características químicas diferentes, a partir das mesmas condições de fabricação, produziu partículas com distribuição de ativo, tamanho e número de núcleos diferenciados. Além disso, o rendimento do processo e a eficiência de encapsulação foram muito afetados.

As propriedades de superfície dos óleos foram decisivas para uma maior eficiência de encapsulação. A emulsão dos óleos formada com a gelatina apresentou carga superficial muito mais baixa para o óleo mineral comparada aos outros óleos testados (amêndoas e vetiver). Isto indicou menor carga na superfície disponível para a interação com a goma arábica, o que reflete também no rendimento em coacervados. Entre os óleos estudados, o óleo mineral, com características acentuadamente hidrofóbicas, apresentou baixo rendimento em massa de coacervado e eficiência de encapsulação, e quando uma mistura óleo mineral/óleo de vetiver foi utilizada o sistema foi regido pelas características físico-químicas do óleo mineral.

O número de núcleos formados na partícula aparentemente obedece a uma regra simples. Quanto menor a gota de emulsão formada maior é o número de núcleos na partícula. Isto porque o material de parede consegue envolver várias gotas muito pequenas de emulsão enquanto as gotas grandes são individualmente recobertas pelos polímeros. No entanto, a capacidade de formar gotas maiores ou menores, a partir de uma mesma energia fornecida, deve-se às propriedades físicas do componente oleoso a ser encapsulado.

A utilização da técnica de coacervação complexa para microencapsular o óleo essencial de vetiver foi altamente eficiente, produzindo em torno de 97% do material polimérico e oleoso na forma de coacervado e 89% do óleo

encapsulado. As partículas apresentaram tamanho médio de 43,5µm e forma esférica bem definida. Também foram eficientes na proteção do óleo encapsulado e o processo não ocasionou perda de voláteis.

Sugestões para continuidade: Óleos com diferentes características de hidrofobicidade mostraram-se importantes no rendimento mássico e na eficiência de encapsulação das partículas coacervadas. O estudo de óleos – modelo recompostos com componentes puros e de hidrofobicidade conhecida podem contribuir para identificar a relevância deste parâmetro na produção otimizada das partículas. Óleos essenciais são largamente utilizados como agentes de flavor, apresentando em sua composição constituintes bastante voláteis. O estudo de liberação através de headspace pode ampliar a possibilidade de utilização das partículas.

Teoria da Coacervação Complexa

A ordem de inserção do óleo no sistema determina a eficiência de encapsulação. Sistemas não emulsificados mostraram nitidamente maior eficiência quando os polímeros e óleo foram misturados antes do ajuste do pH em comparação ao ajuste de pH das misturas e conseqüente adição do óleo, embora, nas duas situações os coacervados sejam formados, indicando que a hipótese de formação dos coacervados proposta por Voorn e Overbeek foi constatada.

Análise das variáveis do processo

O estudo dos parâmetros envolvidos no processo de coacervação complexa (velocidade e tempo de homogeneização, temperatura, proporção entre os polímeros, quantidade de ativo, pH, quantidade total de polímero) através dos planejamentos experimentais seqüenciais definiu uma situação otimizada de produção de microcápsulas com alta eficiência de encapsulação e rendimento em coacervados.

Para o par gelatina:goma arábica, a temperatura de 60°C mostrou-se a melhor para coacervação independentemente do óleo utilizado. Considerando o rendimento em coacervados e a morfologia das partículas, a melhor estequiometria foi a de 3:1 (GE:GA), corroborando os resultados obtidos pela medida da turbidez. O rendimento em coacervados foi principalmente influenciado pela estequiometria entre os polímeros, temperatura e velocidade de homogeneização, em ordem de significância. As outras variáveis e as interações entre as mesmas não foram significativas.

A seqüência de planejamentos realizada para se determinar a faixa de melhor formação de partículas para o par pectina e gelatina, determinou que aumentar a proporção de gelatina na mistura prejudica o rendimento da massa coacervada. As medidas de turbidez não apresentaram sensibilidade para diferenciar as curvas em diferentes condições estequiométricas e os planejamentos experimentais avaliados através da morfologia mostraram que não ocorreu a formação de partículas coacervadas bem definidas, como observado para o sistema gelatina-goma arábica. As altas concentrações de pectina utilizadas nos dois tipos de experimento parecem ter sido responsáveis por estes comportamentos. A conformação linear da pectina em solução, comparada a um maior grau de ramificação apresentado pela goma arábica, pode também ter sido responsável pela não formação das partículas.

Influência da técnica de secagem, reticulação e reidratação das partículas

A secagem por liofilização produziu partículas com superfície sem poros aparentes e geometria semelhante a esferas porém apresentando pontes sólidas entre algumas partículas quando congelamento lento foi utilizado. O congelamento rápido produziu partículas com parede porosa inviabilizando sua utilização nos estudos de liberação. A secagem utilizando CO₂ supercrítico produziu morfologia intermediária às obtidas com o congelamento rápido e lento e também foram descartadas.

As partículas foram efetivamente reticuladas com a utilização de glutaraldeído ou transglutaminase com melhor efeito para o aldeído, conforme pôde ser observado pela manutenção da integridade da parede das partículas quando em solução contendo sódio dodecilsulfato, onde partículas não reticuladas foram rapidamente solubilizadas. A utilização de álcool anidro apresentou forte efeito desidratante somente observado para as partículas úmidas não reticuladas.

As partículas secas, de forma geral, apresentaram inchamento instantâneo quando colocadas em meio aquoso, exceto as reticuladas com glutaraldeído. Embora reticuladas, quando transglutaminase foi utilizada, as partículas obtidas com este tratamento apresentaram acentuado grau de inchamento atingindo um tamanho pelo menos duas vezes maior que as partículas não reticuladas e re-hidratadas nos meios aquosos.

Sugestões para continuidade: Contrariando as informações disponíveis na literatura onde o congelamento lento produz danos acentuados à parede celular de alimentos no processo de secagem por liofilização, os resultados indicaram melhor desempenho das partículas quando o congelamento lento foi utilizado. O aprofundamento de informações relativas à velocidade de congelamento é recomendável. Um dos resultados relevantes e pouco disponíveis na literatura obtidos neste trabalho foi referente a reticulação das partículas. A possibilidade de substituição da reticulação química pela enzimática com propósitos de aplicação em alimentos é fortemente desejável. O comportamento apresentado pelas partículas reticuladas enzimaticamente necessita melhor conhecimento quanto à forma como o crosslinking ocorre e como ele determina as características de porosidade da partícula. Maiores informações sobre uma eventual toxicidade do material reticulado, bem como sua indisponibilização nutricional são também necessárias.

Liberção

A medida da liberação de recheios hidrofóbicos encapsulados apresenta ainda um grau de dificuldade considerável. A produção bem sucedida e a utilização do composto fluorescente (dansilato de kusimila) permitiram um grande aumento na sensibilidade e rapidez de detecção do material liberado, possibilitando aprofundar a investigação das propriedades de barreira das micropartículas.

A secagem das partículas por liofilização funcionou como um agente modulador da liberação do composto fluorescente estudado. Como comportamento geral, partículas secas, reticuladas ou não, apresentaram menores taxas de liberação do composto fluorescente que as partículas úmidas.

As propriedades de barreira das partículas foram diferentemente alteradas de acordo com a natureza do agente reticulante. Partículas reticuladas com glutaraldeído apresentaram menor liberação em qualquer dos meios estudados em relação às reticuladas com a enzima e às não reticuladas.

Entre os meios de liberação estudados, maiores taxas de liberação foram obtidas com álcool anidro como conseqüência da hidrofobicidade do composto fluorescente. Do mesmo modo, entre os meios aquosos, taxas superiores de liberação foram observadas para o SDS em relação ao tween80. Embora apresentando diferentes porcentagens, a forma dos perfis de liberação do composto fluorescente e a ordem em que eles ocorrem (glutaraldeído < transglutaminase ~ não reticuladas) nos diferentes meios foram mantidas, indicando a potencialidade de utilização destes tensoativos para avaliar as propriedades de barreira das partículas contendo recheios hidrofóbicos. Soluções aquosas contendo tensoativos podem ser fisiologicamente mais significativas comparadas ao uso do álcool, para a aplicação destes sistemas.

A liberação do óleo essencial de vetiver, veículo para o composto fluorescente, em etanol anidro, foi diferenciada de acordo com as características de hidrofobicidade dos compostos presentes no óleo. De maneira geral, porcentagens de liberação mais altas foram observadas para álcoois e cetonas e menores porcentagens foram obtidas para os hidrocarbonetos.

Sugestões para continuidade: Um segundo item relevante apontado por este trabalho foi a utilização dos meios com polaridades alteradas pelo uso de surfactantes. A ampliação de informações considerando um número maior de surfactantes bem como de suas misturas é necessária. A inclusão de alguns surfactantes naturais e com significância em sistemas biológicos também deve ser objeto de estudo. O conhecimento da estabilidade do material de recheio frente ao meio de liberação também é sugerido. A introdução de marcador fluorescente no composto utilizado como recheio mostrou-se bastante eficiente. A construção de novos compostos fluorescentes com características de tamanho diferenciadas e bem definidos pode ser proveitosa para estudos da porosidade das partículas. Finalmente, o aprofundamento dos fatores determinantes no coeficiente de difusão e na cinética de liberação necessita mais estudos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectrometry. Allured publishing Corp., Carol Springs, IL 2001.
- ADAMS, R.P.; PANDEY, R.N.; JAMES, S.A.; DAFFORN, M.R. Vetiver DNA-fingerprinted cultivars: Effects of environment on growth, oil yields and composition. **Journal of Essential Oil Research: JEOR**, v.15, p.365-371, Nov/Dec, 2003.
- ADAMS, R.P.; PANDEY, R.N.; JAMES, S.A.; DAFFORN, M.R. Vetiver DNA-fingerprinted cultivars: Effects of environment on growth, oil yields and composition. **Journal of Essential Oil Research: JEOR**, v.15, p.365-371, Nov/Dec, 2003.
- AGNIHOTRI, S.A.; AMINABHAVI, T.M. Formulation and evaluation of novel tableted chitosan microparticles for the controlled release of clozapine. **Journal of Microencapsulation**, v.21, n.10, 709-718, 2004.
- ALKORTA, M.; LLAMA, M.J.; SERR, J.L. Interferente by pectin in protein determination. *Food Science and Technology-Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, v.27, n.1, p.39-41, 1994.
- ALVES, M. M.; ANTONOV, Y. A.; GONÇALVES, M. P. The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. **Food Hydrocolloids**, v.13,n.2, p.157-166, 1999.
- AMIET-CHARPENTIER, C.; BENOIT, J.P.; GADILLE, P.; RICHARD, J. Preparation of rhizobacteria-containing polymer microparticles using a complex coacervation method **Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v.144, n. 1-3, p. 179-190, 1998 .
- ANDERSEN, N.H. The structures of zizanol and vetiselinenol. **Tetrahedron Letters**, v..21, p. 1755-1758, 1970.
- ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.10, p. 2613-2617, 1989.
- ANTIPOVA, A.; SEMENOVA, M. Effect of neutral carbohydrate structure in the set glucose/sucrose/maltodextrin/dextran on protein surface activity at the air/water interface. **Food Hydrocolloids**, v.11, p. 71-77, 1997a.

- ANTONOV, Y.A.; GONÇALVES, M.P. Phase separation in aqueous gelatin–n carrageenan systems. **Food Hydrocolloids**, v.13, p.517-524, 1999.
- ANTONOV, Y.A.; LASHKO, N.P.; GOLOTOVA, T.; MALOVIKOVA, A.; MARKOVICH, O. Effect of structural features of pectins and alginates on their thermodynamic compatibility with gelatin in aqueous media. **Food Hydrocolloid**, v. 10, p. 1-9, 1996.
- ANTONOV, Y.A.; ZUBOVA, O.M. Phase state of aqueous gelatin–polysaccharide (1) polysaccharide (2) systems. **International Journal Biology Macromolecular** v.29, p.67 –71, 2001.
- AOAC, Ed. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed.; Association of Analytical Chemists, Inc.: Arlington, VA, 1990; p 834.
- ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, v.10, n.4, p.413-435, 1993.
- ASHURST, P. R., **Food Flavorings**. 3a. Ed, 487p., Springer - Verlag., 1990.
- ASPINALL, G.O.; COTTRELL, I.W.; MOLLOY, J.A.; UDDIN, M. Lemon-peel pectin .3: Fractionation of pectic acids from lemon-peel and Lucerne. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 48, n.8, p. 1290-&, 1970.
- AXELOS, M.A.V.; THIBAUT, J.F. Influence of the Substituents of the Carboxyl Groups and of the Rhamnose Content on the Solution Properties and Flexibility of Pectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.13, n.2, 77-82, 1991.
- BABIN, H.; DICKINSON, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n.3, p. 271-276, 2001.
- BACHTSI, A.R.; KIPARISSIDES, C. Synthesis and release studies of oil-containing poly(vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. **Journal of Controlled Release**, v. 38, n. 1, p. 49-58, 1996.
- BAKER, R.W.; LONSDALE, H. K., 1974. In Controlled release of biologically active agents (Eds, Tanquary, A. C. and Lacey, R. C.). Plenum Press, New York, pp. 15-71.
- BAKKER, M.A.E.; KONING, M.M.G.; VISSER, J. Fatty ingredients, WO Patent Application 94/14334, Unilever, 1994.
- BALL, V.; WINTERHALTER, M.; SCHWINTE, P.; LAVALLE, P.; VOEGEL, J.C.; SCHAAF, P. Complexation mechanism of bovine serum albumin and

- poly(allylamine hydrochloride). **Journal of Physical Chemistry B**, v.106, n.9, p.2357 –2364, 2002.
- BARREIRO-IGLESIAS, R.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Controlled Release of Estradiol solubilized in Carbopol/Surfactant Aggregates. **Journal of Controlled Release**, v.93,p. 319-330, 2003.
- BARROS, N.B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Editora da Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, Campinas, Series manuais, p. 395, 1995.
- BECHARD, S.; MCMULLEN, J.N. Pectin gelatin microglobules - effect of a cross-linking agent (formaldehyde) on *in vitro* dissolution rate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 31, n.1-2, p. 91-98, 1986.
- BEMILLER J.N.; WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: Fennema, O.R. (Ed.), Food Chemistry, 3rdEd., Marcel Dekker, New York, 1996.
- BENASSI, L.; BERTAZZONI, G.; MAGNONI, C.; RINALDI, M.; FONTANESI, C.; SEIDENARI, S. Decrease in toxic potential of mixed tensides maintained below the critical micelle concentration: An *in vitro* study, **Journal of Pharmacological and Biophysical Research**, v.13, n.3, p. 156-164, 2003.
- BENRRAOU, M.; BALES, B.; ZANA, R. Effect of the nature of the counterion on the interaction between cesium and tetraalkylammonium dodecylsulfates and poly(ethylene oxide) or poly(vinylpyrrolidone) **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 267 , p.519–523, 2003.
- BIESHEUVEL, P.M., STUART, M.A.C. Electrostatic free energy of weakly charged macromolecules in solution and intermacromolecular complexes consisting of oppositely charged polymers. **Langmuir** , v.20, n.7, p. 2785-2791, 2004.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physico. Chem. Eng. Aspects**, v.152, n. 1–2, p.41–52, 1999.
- BONNY, J.D.; KYOWA, M. Use of *in vitro* release tests for the prediction of the *in vivo* behavior and the development of flucytosine controlled-release capsules. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 84, n.5, p. 619-623, 1995.
- BORDBAR, A.K.; SABOURY, A.A.; HOUSAINDOKHT, M.R.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. Statistical effects of the binding of ionic surfactant to protein. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.192, p.415-441, 1997.

- BOURRIOT, S.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J.L. Micellar-casein -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. **Carbohydrate Polymers** , v.40, p.145-157, 1999.
- BOZKIR, A.; SAKA, O.M. Chitosan Nanoparticles for Plasmid DNA Delivery: Effect of Chitosan Molecular Structure on Formulation and Release Characteristics. **Drug Delivery**, v.11, p.107-112, 2004.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n.1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAZEL, C.S. Microencapsulation: Offering Solutions in the Food Industry, **Cereal Foods World**, v.44, p. 388-393,1999.
- BRAZEL, C.S., PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from swellable polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, n.1, p. 47-58, 2000.
- BUBNIS, W.A.; OFNER, C.M. The determination of epsilon-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid **Analytical Biochemistry**, v.207, n.1, p.129-133, 1992.
- BUFFO, R.A.; REINECCIUS, G.A.; OEHLERT, G.W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.15, n.1, p. 53-66, 2001.
- BURGESS, D.J. Complex coacervation: micro-capsule formation. In *Macromolecular complexes in chemistry and biology* . Springer-Verlag: Berlim, 1994 , p. 285-325, cap. 17.
- BURGESS, D.J. Practical analysis of complex coacervate systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 140, n.1, p. 227-238, 1990.
- BURGESS, D.J., PONSART, S. beta-Glucuronidase activity following complex coacervation and spray drying microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n.5, p. 569-579, 1998.
- BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 27, n.1, p.61-70, 1985.
- BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. **Journal of Colloid and Interface Science** v.98, n.1, p. 1-8, 1984.

- BURGESS, D.J.; KWOK, K.K.; MEGREMIS, P. T. Characterization of albumin – acacia complex coacervation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.43, n.4, p.232-236, 1991.
- BUROVA, T.V.; GRINBERG, N.V.; GRINBERG, V.Y.; DE KRUIF, C.G. Conformational changes in n- and L-carrageenans induced by complexing with h-casein. Submitted for publication 2004.
- BUROVA, T.V.; GRINBERG, N.V.; GRINBERG, V.Y.; LEONTIEV, A.L.; TOLSTOGUZOV, V.B. Effects of polysaccharides upon the functional-properties of 11-s globulin of broad beans. **Carbohydrate Polymers**, v.18, n.2, p.101-108, 1992.
- CARLSSON, F.; LINSE, P.; MALMSTEN, M. Monte Carlo simulation of polyelectrolyte-protein complexation. **Journal of Physical Chemistry B**, v.105, p.9040-9049, 2001.
- CARTHEW, D.L.; BUCKTON, G.; PARSONS, G.E.; POOLE, S. Effect of temperature on the surfactant nature of an adsorbed layer of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) block polymers. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n.11, p. 1730-1733, 1996.
- CARVALHO, R.A. Elaboração e caracterização de filmes a base de gelatina modificada enzimática e quimicamente. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, 227p., 2002.
- CAZAUSSUS, A., PES, R., SELIER, N., TABET, J.C. GC-MS and GC-MS-MS analysis of complex essential oil. **Chromatographia**, v.25, n.10, p.865-869, 1988.
- CHANG, C.P; KIMURA, M.; YAMAMOTO, T.; NOBE, M.; DOBASHI, T. Effect of dispersing medium on permeability of microcapsule membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 30, n. 1-2, p.123-127, 2003.
- CHEN, R.N.; HO, H.; SHEU, M.T. Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. **Biomaterials**, v.26, n. 20, p. 4229-4235, 2005.
- CHILVERS, G.R.; MORRIS, V.J. Coacervation of gelatin – gellan gum mixtures and their use in microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v.7, n.2, p.111-120, 1987.
- COMPTON, S.J.; JONES, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry** , v. 151, n.2, p. 369-374, 1985.

- CRANK, J. The mathematics of diffusion. Clarendon Press, Oxford, 1956; 347p.
- CRAVEIRO, A.A., Óleos essenciais e química fina. **Revista Química Nova**, v.16, p. 224-228, 1993.
- CRISON, J.R.; SHAH, V.P.; SKELLY, J.P.; AMIDON, G.L. Drug dissolution into micellar solutions: development of a convective diffusion model and comparison to the film equilibrium model with application to surfactant-facilitated dissolution of Carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.85, n.9, p.1005-1011, 1996.
- CRISON, J.R.; WEINER, N.D.; AMIDON, G.L. Dissolution media for in vitro testing of water-insoluble drugs: effect of surfactant purity and electrolyte on in vitro dissolution of Carbamazepine in aqueous solutions of sodium lauryl sulfate. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.86, n.3, p.384-388, 1997.
- DAUTZENBERG, H. Polyelectrolyte complex formation an highly aggregating systems: methodical aspects and general tendencies. In: Radeva T, editor. Physical chemistry of polyelectrolytes. Surfactant science series vol. 99. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 743 -92.
- DAWSON, P.J.; HOCKLEY, D.J. Scanning electron microscopy of freeze-dried preparations: Relationship of morphology and freeze-drying parameters. **Developments In Biological Standardization**, v. 74, p.185-192, 1991
- DE JONG, B.H.G. Morphology of coacervates. In *Colloid Science*; Kruyt H. R., Ed.; Elsevier Publishing Company: Amsterdam, 1949, Vol. II, Chapter XI, p. 433-480.
- DE KRUIF C.G.; TUINIER R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids** v.15, n. 4-6, p. 555-563, 2001.
- DE KRUIF, C.G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.9, n.5, p.340-349, 2004.
- DE SAINT LAUMER, J.Y., FREROT, E., HERRMANN, A. Controlled Release of Perfumery Alcohols by Neighbouring Group Participation. Comparison of the Kinetic Rate Constants for the Alkine Hydrolysis of 2-Acyl-, 2-Hydroxymethyl-, and 2-Carbamoylbenzoates. **Helvetica Chimica Acta**, v.86, n.8, p.2871-2899, 2003.
- DEBBRECHT, F. J. Qualitative and quantitative analysis by gas chromatography; sample preparation and trace analysis. In *Modern*

- Practice of Gas Chromatography*; Grob, R.L. Ed.; New York, 1995; pp 393-468.
- DECKER, R.V.; FOSTER, J.F. Interaction of bovine plasma albumin with detergent anions. Stoichiometry and mechanism of binding of alkylbenzenesulfonates. **Biochemistry**, v. 5, n.4, p.1242-1249, 1966.
- DELASSUS PT, Barrier polymers *in*: The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology, Ed. Brody, A.L.; Marsh K.S.. John Wiley & Sons, Inc., New York, p 71-77, 1997.
- DEMOLE, E.P., HOLZNER, G.W., YOUSSEFI, M.J. Malodor formation in alcoholic perfumes containing vetiveryl acetate and vetiver oil. **Perfumer & Flavorist**. v.20, p.35-40. 1995.
- DHOOT, N.O. Microencapsulation for therapeutic applications. http://dspace.library.drexel.edu/retrieve/47/dhoot_thesis.pdf, ultimo acesso em 10/08/2005.
- DICKINSON, E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization, **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 10, p. 334-339, 1997.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v.17, n. 1, p.25-39, 2003.
- DICKINSON, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n.10, p. 347-354, 1998.
- DICKINSON, E., SEMENOVA, M.G., ANTIPOVA, A.S., PELAN, E.G. Effect of high-methoxy pectin on properties of casein-stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.12, n.4, p.425-432, 1998
- DICKINSON, E.; MCCLEMENT, D.J. Molecular Basis of Protein Functionality. In *Advances in Food Colloids*, Blackie Academic: London, 1996 , p. 27-76.
- DICKINSON, E.; PAWLOWSKY, K. Effect of i-carrageenan on flocculation, creaming, and rheology of a protein-stabilized emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.45, p. 3799-3806, 1997. DICKINSON, 1997
- DICKINSON, E.; SEMENOVA M. Emulsifying behavior of protein in the presence of polysaccharide under conditions of thermodynamic incompatibility. **Journal of Chem. Soc. Faraday Trans.**, v.88, n.6, p. 849-854, 1992.

- DONG C.J.; ROGERS J.A. Acacia-gelatin microencapsulated liposomes: preparation, stability and release of acetylsalicylic-acid. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n.1, p.141-146, 1993.
- DUBOIS, M; GILLES, K.A; HAMILTON, J.K; REBBERS, P.A; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1958.
- DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. **Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, n.2-3, p. 239-247, 2004.
- DZIEZAK, J. D. A focus on gums. **Food Technology**, v.45, n.3, p. 115-121, 1991.
- DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**. v. 4, p. 136 - 157, 1988.
- EDMOND, E.; OGSTON, A.G. An approach to the study of phase separation in ternary aqueous systems. **Biochemical Journal**, v.109, n.4, p. 569-576, 1968.
- ELGINDY, N.A.; ELEGAKEY, M.A. Carbopol-gelatin coacervation: influence of some variables. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.7, n.5, p.587-603, 1981.
- EPIC, ultimo acesso em 19/09/2003.
<http://www.epic4health.com/tween80isits.html>
- FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; BENOIT, J.P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, n.4, p. 355-366, 2002.
- FAVRE, E.; LEONARD, M.; LAURENT, A.; DELLACHERIE, E. Diffusion of polyethyleneglycols in calcium alginate hydrogels. **Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects** v. 194, n.1-3, p. 197-206, 2001.
- FEENEY, R.E.; WHITAKER, J.R. Chemical Modifications of Proteins. **Journal of The American Oil Chemists Society**, v.61, n.4, p. 644-644, 1984.
- FOLK, J.E.; CHUNG, S.I. Transglutaminases. **Methods In Enzymology**, v.113, p.358-375, 1985

- FRUGIER, D., AUDEBERT, R. Interaction between oppositely charged low ionic density polyelectrolytes - complex-formation or simple mixtures. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 201, p. 293-POLY Part 2, 1991.
- GADALLA, M.A.; EBIAN, A.R. A study of some factors affecting the dissolution rate of sulfamethoxazole by crystallization in aqueous surfactant solutions, **Pharmazie**, v.41, n.11, p. 787-789, 1986.
- GALAZKA, V. B.; SMITH, D.; LEDWARD, D. A.; DICKINSON, E. Complexes of bovine serum albumin with sulfated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. **Food Chemistry**, v.64, p.303-310, 1999.
- GANDER, B.; VENTOURAS, K.; GURNY, R.; DOELKER, E. In vitro dissolution medium with supramicellar surfactant concentration and its relevance for in vivo absorption. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 27, n.1, p.117-124, 1985.
- GAO, S.Y.; CHEN, J.N.; DONG, L.; DING, Z.; YANG, Y.H.; ZHANG, J.F. Targeting delivery of oligonucleotide and plasmid DNA to hepatocyte via galactosylated chitosan vector **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.60, n.3, p. 327-334, 2005.
- GARTI N, YAGHMUR A, LESER ME, CLEMENT V, WATZKE HJ. Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.5, p.2552-2562, 2001.
- GAUTAM, J., SCHOTT, H. Interaction of anionic compounds with gelatin .2. Effect on some physicochemical properties of gelatin. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v.83, n.3, p. 316-321, 1994.
- GERRARD, J.A. Protein-Protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science A: Technology**, v.13, p.391-399, 2002.
- GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213-224, 1999.
- GILBERT, D.L.; KIM, S.W. Macromolecular release from collagen monolithic devices **Journal Of Biomedical Materials Research**, v.24, n.9, p. 1221-1239, 1990.
- GILSENAN, P.M.; RICHARDSON R.K.; MORRIS E.R. Associative and segregative interactions between gelatine and low-methoxy pectin: Part 1.

- Associative interactions in the absence of Ca²⁺. **Food Hydrocolloids**, v.17, p. 723– 737, 2003.
- GIMEL, J.C.; BROWN, W. A light-scattering investigation of the sodium dodecyl sulfate-lysozyme system. **Journal of Chemical Physical**. v.104, p.8112-8117, 1996.
- GIRARD, M.; TURGEON, S.L.; GAUTHIER, S.F. Thermodynamic parameters of b-lactoglobulin-pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 4450-4455, 2003.
- GIROD, S.; BOISSIERE, M.; LONGCHAMBON, K.; BEGU, S.; TOURNE-PETHEIL, C.; DEVOISELLE, J.M. Polyelectrolyte complex formation between iota-carrageenan and poly(L-lysine) in dilute aqueous solutions: a spectroscopic and conformational study. **Carbohydrate Polymer**, v. 55,n.1, p. 37–45, 2004.
- GODDARD, D.E. In: Goddard, D.E., ANANTHAPADMANABHAN K.P. (Eds.), Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins, CRC Press, Boca Raton, FL,1993.
- GOLOMB, G., SCHOEN, F.J., SMITH, M.S., LINDEN, J., DIXON, M., LEVY, R.J. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. **American Journal of Pathology** , v.127, n.1, p. 122-130, 1987.
- GREEN, N.S., REISLER, E., HOUK, K.N. Quantitative evaluation of the lengths of homobifunctional protein cross-linking reagents used as molecular rulers. **Protein Science**, v. 10, n.7, p. 1293-1304, 2001.
- GREENER, J. CONSTESTABLE, B.A., BALE, M.D. Interaction Of Anionic Surfactants With Gelatin - Viscosity Effects. **Macromolecules**, v. 20, n.10, p. 2490-2498, 1987
- GRIFFIN, W.C. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 5, p. 259, 1954.
- GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p.311, 1949.
- GRIFFITHS, P.C.; CHEUNG, A.Y.F. Overview: Interaction between surfactants and gelatin in aqueous solutions. **Materials Science and Technology** v. 18, p. 591-599, 2002.

- GRINBERG, V.Y.; TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, v.11, p.145-158, 1997.
- GUROV, A.N.; GUROVA, N.V.; LEONTIEV, A.L.; TOLSTOGUZOV, V.B. Equilibrium and non-equilibrium complexes between bovine serum albumin and dextran sulphate: I. Complexing conditions and composition of non-equilibrium complexes, **Food Hydrocolloids**, v.2, n.4, p.267-283, 1988.
- HAPPI, <http://www.happi.com/litshowcase.php>, ultimo acesso out/2005
- HARDING, S.; JUMEL, K.; KELLY, R.; GUDO, E.; HORTON J.C.; MITCHELL J.R. The structure and nature of protein-polysaccharide complexes. In *Food Protein, Structure and Functionality*, VCH: Weinheim, p. 216-226, 1993.
- HAUG, I.; WILLIAMS, M.A.K.; LUNDIN, L.; SMIDSRBD, O.; DRAGET K.I. Molecular interactions in, and rheological properties of, a mixed biopolymer system undergoing order/disorder transitions. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.439- 444, 2003.
- HEIMBECHER, S., LEE, Y.C., TABIBI, S.E., YALKOWSKY, S.H. Mechanism of dansylation of the polyamine pentaazapentacosane center dot 5 HCl. **International Journal Of Pharmaceutics** , v.160, n.1, p.21-29, 1998.
- HELLEBUST, S., BLOKHUS, A.M., NILSSON, S. Associative and segregative phase behaviour of a mixed aqueous cationic surfactant and anionic hydrophilic polymer system. **Colloids and surfaces a-physicochemical and engineering aspects**, v. 243, n.1-3, p.133-138, 2004.
- HENRY, B.T.; ADLER, J.; HIBBERD, S.; CHEEMA, M.S., DAVIS, S.S.; ROGERS, T.G. Epi-fluorescence microscopy and image analysis used to measure diffusion coefficient in gel systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.44, p.543-551, 1992.
- HERNANDEZ, E.R.S.; GUZMAN I.V. Review: functional foods and ingredients derived from milk. **Archives Latinoamerican Nutrition** v.53, n.4, p.333-347, 2003.
- HIEMENZ, P.C.; RAJAGOPALAN, R. Principles of colloid and surface science 3rd Edition, Marcel Dekker: New York, 1997, 670 p.
- HOMBREIRO-PEREZ, M.; SIEPMANN, J.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic

- drug: preparation, characterization and drug release modeling. **Journal of Controlled Release** , v.88, n.3, p.413-428, 2003.
- HOWE, A.M., WILKINS, A.G., GOODWIN, J.W. The Interactions Between Gelatin And Surfactants - A Rheological Study. **Journal Of Photographic Science**, v.40, n.5-6, p. 234-243, 1992.
- HUGERTH, A.; CARAM-LELHAM, N.; SUNDELOF, L.O. The effect of charge density and conformation on the polyelectrolyte complex formation between carrageenan and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.34, n.3, p.149-156, 1997.
- IJICHI, K.; YOSHIZAWA, H.; UEMURA, Y.; HATATE, Y. Multi-layered gelatin/Acacia microcapsules by complex coacervation. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.30, n.5, p.793-798, 1997.
- IKAI, A. Stepwise degradation of serum low density lipoprotein by sodium dodecyl sulfate. **Journal Of Biochemistry** , v.79, n.3, p. 679-688, 1976.
- IKEDA, S.; KUMAGAI, H.; SAKIYAMA, T.; CHU, C.H.; NAKAMURA, K. Method for analyzing pH- sensitive swelling of amphoteric hydrogels – application to a polyelectrolyte complex gel prepared from xanthan and chitosan. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.8, p.1422-1427, 1995.
- IMBERTY, A.; PEREZ, S. Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations. **Chem. Rev.** v.100, p.4567–4588, 2000.
- IMESON, A. P.; LEDWARD, D. A.; MITCHELL, J. R. On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. **Journal Science of Food Agricultural**, v.28, p.661-667, 1997.
- ISLAM, A. M.; PHILLIPS, G. O.; SLJIVO, A.; SNOWDEN, M. J.; WILLIAMS, P. A.. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p.493-505, 1997.
- ISRAELACHVILI, J. Intermolecular and surface forces 2nd Edition, Academic Press Inc: London, 1991, 450 p.
- JABOBS, I.C.; MASON, N. S. Polymer delivery systems concepts. In Polymeric Delivery Systems ; El-Nokaky; M.A., Piatt, D.M., Charpentier, B.A. Eds.; American Chemical Society: Washington, 1993; p. 1-17.

-
- JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the Food-Industry . **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 24, n.4, p. 289-297, 1991.
- JEGAT, C.; TAVERDET, J.L. Stirring speed influence study on the microencapsulation process and on the drug release from microcapsules. **Polymer Bulletin**, v. 44, n.3, p.345-351, 2000.
- JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n.8, p.1115-1122, 1993.
- JOHNSTON-BANKS, F.A. 1990. Gelatine. In Food Gels, ed. P. Harris. Elsevier Applied Science, New York, NY, pp. 233-289.
- JONES, M.N.; SKINNER, H.A.; TIPPING E. The interaction between bovine serum albumin and surfactants. **Biochemical Journal**, v.147, p.229-234,1975.
- JOUZEL, B., PENNARUN, A.L., PROST, C., RENARD, D., PONCELET, D., DEMAÏMAY, D. Encapsulation of a lipid precursor, the eicosapentaenoic acid, to study the development of the *Crassostrea gigas* oyster flavours. **Journal of Microencapsulation**, v.20, n.1, p.35-46, 2003.
- KAKUGO, A., SUGIMOTO, S., SHIKINAKA, K., GONG, J.P., OSADA, Y. Characteristics of chemically cross-linked myosin gels. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, v.16, n.2, p.203-218, 2005.
- KANGA, V. Skin Care delivery systems. <http://www.happi.com/current/Jan052.htm>, ultimo acesso 10/08/2005
- KAZMIERSI, M.; WICKER, L.M. Corredig, Interactions of h-lactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. **Journal of Food Science**, v.68, n.5, 1673-1679, 2003.
- KELLY, R.; GUDO, E.S.; MITCHELL, J.R.; HARDING, S.E. Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with alginate and a pectin. **Carbohydrate Polymer**, v.23, p.115-120, 1994.
- KHOMUTOV, L.I., LASHEK, N.A., PTITCHKINA, N.M., MORRIS, E.R. Temperature-composition phase diagram and gel properties of the gelatin-starch-water system. **Carbohydrate Polymers** , v.28, n.4, p. 341-345, 1995.

- KIDCHOB, T., KIMURA, S., IMANISHI, Y. Preparation, structure and release profile of polypeptide microcapsules. **Journal of Controlled Release**, v.40, n.3, p.285-291, 1996
- KIM, C. Controlled release dosage form design. Technomic Publishing Co., Lancaster, p. 14-82, 2000.
- KIRBY, C.J.; WHITTLE, C.J.; RIGBY, N.; COXON, D.T.; LAW, B.A. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 26, p.437-449, 1991.
- KIRPOTIN, D.B.; KINNE, R.; MILTON, A.; PALOMBOKINNE, E.; EMMRICH, F. Magnetic targeting of a therapeutic antibody using magnetotropic microspheres of the interpolyelectrolyte coacervation complex . **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.122, n. 1-3, p. 354-359, 1993.
- KJØNIKSEN, A.L.; HIORTH, M.; NYSTRÖM, B Temperature-induced association and gelation of aqueous solutions of pectin. A dynamic light scattering study. **European Polymer Journal**, v. 40, p.2427-2435, 2004.
- KOGA, K.; OHYASHIKI, T.; MURAKAMI, M.; KAWASHIMA, S. Modification of ceftibuten transport by the addition of non-ionic surfactants **European Journal Of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.49, n.1, p. 17-25, 2000.
- KOH, G.L.; TUCKER, I.G. Characterisation of sodium carboxymethylcellulose-gelatine complex coacervation by viscosity, turbidity, and coacervate wet weight and volume measurement. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.40, p.233-236, 1988a
- KOH, G.L.; TUCKER, I.G., Characterisation of sodium carboxymethylcellulose – gelatine complex coacervation by chemical analysis of the coacervate and equilibrium fluid phases. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.40, p.309-312, 1988b.
- KOVATS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Adv. Chromatogr.** v.1, p.229-247, 1965.
- KRAMER, M, SENNHENN, B, LEE, G. Freeze-Drying Using Vacuum- Induced Surface Freezing. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 91, n.2, p. 433-443, 2002.
- KUMAR, M.N.V.R.; KUMAR, N. Polymeric controlled drug delivery systems: Perspective issues and opportunities. **Drug Devices Industrial Pharmaceutics**, v.27, p.1-30, 2001.

- KUNIEDA, H., NAKANO, A., PÉS, M.A. Effect of Oil on the Solubilization in Microemulsion Systems Including Nonionic Surfactant Mixtures **Langmuir**, v.11, p.3302-3306, 1995.
- KURASHI, C.; YAMAZAKI, K. SUSU, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v.17, n.2, p.221-246, 2001.
- KWAK J.C.T. (Ed.), Polymer-Surfactant Systems, Surfactant Science Series, Vol. 77, Marcel Dekker, New York, 1998.
- LAMPRECHT, A., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, H., KAWASHIMA, Y. pH-sensitive microsphere delivery increases oral bioavailability of calcitonin. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n.1, p. 1-9, 2004.
- LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.F.; LEHR, C.M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for $\dot{U} - 3$ unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **Journal of Microencapsulation**, v.18, n.3, p.347-357, 2001.
- LANEUVILLE, S.I.; PAQUIN, P.; TURGEON, S.L. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey proteins-xanthan gum complexes. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.305- 314, 2000.
- LANGER, R. Polymeric delivery systems for controlled drug release. **Chem. Eng. Commun.**, v. 6, p. 1-48, 1980.
- LARSEN, D.B.; PARSHAD, H.; FREDHOLT, K.; LARSEN, C. Characteristics of drug substances in oily solutions. Drug release rate, partitioning and solubility. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 232, p.107-117, 2002.
- LARSEN, S.W.; THOMSEN, A.E.; RINVAR, E.; FRIIS, G.J.; LARSEN, C. Effect of drug lipophilicity on in vitro release rate from oil vehicles using nicotinic acid ester as model prodrug derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 216, p.83-93, 2001.
- LASTOWKA, A.M., BROWN, E.M., MAFFIA, G.J. A Comparison of chemical, physical and enzymatic cross-linking of bovine type I collagen fibrils. **Journal of American Leather Chemists Association**. V.100, n.5, p.196-202, 2005
- LAVANIA, U.C., LAVANIA, S., YIMALA, Y. Vetiver system ecotechnology for water quality improvement and environmental enhancement. **Current Science**, v. 86, n.1, p.11-14, 2004. LAVANIA, U.C. Vetiver Root - Oil and Its Utilization, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow, India, 2002.

- LAWRENCE, B.M. The Isolation of Aromatic Materials from Natural Plant Products, pp. 57-154. In: A Manual on the Essential Oil Industry, Editor K. Tuley De Silva, UNIDO, Vienna, Austria (1995).
- LE HÉNAFF, S. Microparticules de complexes de protéines de lactosérum et de xanthane comme substitut de matière grasse. Mémoire de maîtrise, 1996, Université Laval, Québec.
- LEE, S.J.; ROSENBERG, M. Preparation and properties of glutaraldehyde cross-linked whey protein-based microcapsules containing theophylline. **Journal Of Controlled Release**, v.61, n.1-2, p. 123-136, 1999.
- LEONG, K.W.; MAO, H.Q.; TRUONG-LE, V.L.; et al. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. **Journal of Controlled Release**, v.53, n.1-3, p.183-193, 1998.
- LI, Y.J.; DUBIN, P.L.; DAUTZENBERG, H.; et al. Dependence of Structure Of Polyelectrolyte/Micelle Complexes Upon Polyelectrolyte Chain-Length And Micelle Size. **Macromolecules**, v.28, n.20, p.6795-6798, 1995.
- LI, Z.S.; RAMAY, H.R.; HAUCH, K.D.; XIAO, D.M.; ZHANG, M.Q. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.26, n.18, p.3919-3928, 2005.
- LII, C.Y.; LIAW, S.C.; LAI, V.M.F.; TOMASIK, T. Xanthan gum-gelatin complexes, European Polymeric Journal, v.38, p. 1377- 1381, 2002.
- LIM, S.T.; MARTIN, G.P.; BERRY, D.J.; BROWN, M.B. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. **Journal of Controlled Release**, v.66, n.2-3, p.281-292, 2000.
- LIN, S.Y.; HSIEH, T.F.; WEI, Y.S. PH- and thermal-dependent conformational transition of PGAIPG, a repeated hexapeptide sequence from tropoelastin. **Peptides**, v. 26, n.4, p.543-549, 2005.
- LISERRE, A.M. Microencapsulação de Bifidobacterium lactis para aplicação em leites fermentados. São Paulo, 2005. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP. 79p.
- LOOTENS, D.; CAPEL F.; DURAND D.; NICOLAI T.; BOULENGUER P.; LANGENDORFF, V. Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin, **Food Hydrocolloids**, v.17, p. 237-244, 2003.

- LOPEZ, J.M.; IMPERIAL, S.; VALDERRAMA, R.; NAVARRO, S. An improved Bradford protein assay for collagen proteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 220, n.1, p.91-100, 1993.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p. 265-275, 1951.
- LSBU, ultimo acesso em 05/09/05 <http://www.lsbu.ac.uk/water/hypec.html>
- MADAN, P.L., LUZZI, L.A., PRICE, J.C. Factors influencing microencapsulation of a waxy solid by complex coacervation. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.61, p.1586-1588, 1972.
- MAGDASSI, S.; VINETSKY, Y. Microencapsulation: methods and industrial applications. In Microencapsulation of oil-in-water emulsions by proteins; Benita S., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1997, p. 21-33.
- MAGGI L, TORRE ML, GIUNCHEDI P, CONTE U Supramicellar solutions of sodium dodecyl sulphate as dissolution media to study the in vitro release characteristics of sustained-release formulations containing an insoluble drug: Nifedipine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.135, n.1-2, p.73-79, 1996.
- MALMSTEN, M. Surfactants and Polymers in Drug Delivery, ed Marcel Dekker, New York, 356p., 2002.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.81-93, 2001.
- MAO, H.Q.; ROY, K.; TROUNG, L.V.L.; JANES, K.A.; LIN, K.Y.; WANG, Y.; AUGUST, J.T.; LEONG, K.W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n.3, p.399-421, 2001.
- MARSHALL, M.C.; WELLINGHOFF, S.; BRAZEL, C.; ALEXANDER, M.; AKATAGAWA, S. Controlled Delivery of Pesticides through Synthetic Biodegradable Polymer Compositions, in H. Scher, ed. Controlled Release Delivery Systems for Pesticides, New York: Marcel Dekker, Inc., p. 363-394, n.1999.
- MARTINEZ, J.; ROSA, P.T.V.; MENUT, C.; LEYDET, A.; BRAT, P.; PALLET, D.; MEIRELES, M.A.A. Valorization of Brazilian vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) oil. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p.6578-6584, 2004.

- MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GRAZU, J.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins **Enzyme and Microbial Technology xxx (2005) xxx-xxx**
- MATHEIS, G.; WHITAKER, J.R., A review: enzymatic *crosslinking* of proteins applicable to foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, n.4, p. 309-327, 1987.
- MATTISON, K.W., DUBIN, P.L., BRITTAIN, I.J. Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: effect of polymer charge density. **Journal of Physical Chemistry B**, v.102, p.3830-3836, 1998.
- MATTISON, K.W.; BRITTAIN, I.J.; DUBIN, P.L. Protein-polyelectrolyte phase boundaries. **Biotechnology Progress**, v.11, p. 632-637, 1995.
- McCLEMENTS, D.J Solubilization of oil droplets by micellar surfactant solutions. **Adv Exp Med Biology**, v.415, p.149-159, 1997.
- MCMULLEN, J.N., NEWTON, D.W., BECKER, C.H. Pectin gelatin complex coacervates .2. Effect of microencapsulated sulfamerazine on size, morphology, recovery, and extraction of water-dispersible microglobules **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n.12, p.1799-1803, 1984.
- MENGER, F.M.; SYKES, B.M. Anatomy of a coacervate. **Langmuir**, v.14, n.15, p. 4131-4137, 1998.
- MERCK INDEX, 12 th Edition, Merck & CO, Inc., 1996.
- MICHON, C.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B.; PARKER, A.; TAKERKART, G. Study of the compatibility/incompatibility of gelatin/iota-carrageenan/water mixtures . **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n.4, p. 333-336, 1995.
- MILES, C.A.; AVERY, N.C.; RODIN, V.V.; BAILEY, A.J. The Increase in Denaturation Temperature Following Cross-linking of Collagen is Caused by Dehydration of the Fibres **Journal of Molecular Biology**, v. 346, p.551-556, 2005.
- MILLER, D.D., LENHART,W., ANTALEK, B.J. WILLIAMS, A.J. , HEWITT, J.M. The use of NMR to Study Sodium Dodecyl-Sulfate Gelatin Interactions. **Langmuir**, v.10, n.1, p. 68-71, 1994.

- MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing **Trends In Food Science & Technology**, v.9, n.5, p. 204-210, 1998.
- MUKAI-CORREA, R., PRATA, A.S., GROSSO, C.R.F. Microcapsules obtained by ionic polymerization. 2. Release of casein encapsulated in alginate and pectin. **World Aquaculture**, 2003.
- MWANGI, J.W.; OFNER, C.M. Crosslinked gelatin matrices: release of a random coil macromolecular solute. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, n.2, p. 319-327, 2004.
- NAKAGAWA, K.; IWAMOTO, S.; NAKAJIMA, M.; SHONO, A.; SATOH, K. Microchannel emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation. **Journal Of Colloid And Interface Science**, v.278, n.1, p.198-205, 2004.
- NAKAJIMA, A.; SATO, H. Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. **Biopolymers**, v.10, p. 1345-1355, 1972.
- NEBEL, R. L., SAACKE. R. G. Technology and applications for encapsulated spermatozoa. **Biotechnology Advances**, v.12, n.1, p.41-48, 1994.
- NG, L.T., SWAMI, S. IPNs based on chitosan with NVP and NVP/HEMA synthesised through photoinitiator-free photopolymerisation technique for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n.4, p. 523-528, 2005.
- NGUYEN, H.T.; SHIU, G.K.; WORSLEY, W.N.; SKELLY J.P. Dissolution Testing of Norithendrone:Ethinyl Estradiol; Norithendrone:Mestranol; and Norithendrone Acetate:Ethinyl Estradiol Combination Tablets. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.79, n.2, p.163-167, 1990.
- NOORY, C.; TRAN, N.; OUDERKIRK, L.; SHAH, V. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products <http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200articles/200art3.html>, ultimo acesso 10/08/2005
- NYSTROM, C.; WESTERBERG, M. The use of ordered mixtures for improving the dissolution rate of low solubility compounds. *Journal of Pharm. Pharmacol.*, v.38, n.3, p.161-165, 1986.
- O'BRIEN, F.J.; HARLEY, B.A.; YANNAS, I.V.; GIBSON, L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**, v.25, n.6, p.1077-1086, 2004.

- ORLOVIJ, A.; PETROVIJ, S.; SKALA, D. Mathematical modeling and simulation of gel drying with supercritical carbon dioxide. **Journal Serb. Chem. Society**, v.70, n.1, p. 125-136, 2005.
- OSMAN, M.E.; WILLIAMS, P.A.; MENZIES, A.R.; PHILLIPS, G.O. Characterization of commercial samples of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n.1, 71-77, 1993
- OVERBEEK, J. T. G.; VOORN, M. J. Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of Complex Coacervation. **J. Cell. Comp. Physiology**, v.49, n.1, p. 7-26, 1957.
- PADUKKA, I.; BHANDARI, B.; D'ARCY, B. Evaluation of Various Extraction Methods of Encapsulated Oil from B-Cyclodextrin-Lemon Oil Complex Powder. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, n. 1, p. 59-70, 2000. PASQUEL, A Gomas: una aproximación a la industria de alimentos. **Revista Amazónica de Investigación Alimentaria**, v.1, n. 1, p. 1 - 8, 2001.
- PAVLOVSKAYA, G., SEMENOVA, M., TSAPKINA, E., TOLSTOGUZOV, V. The influence of dextran on the interfacial pressure of adsorbing layers of 11S globulin vicia faba at the planar n-decane/aqueous solution interface. **Food Hydrocolloids**, v. 7, p. 1-10, 1993.
- PEDROZA-ISLAS, R. Alimentos encapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. In:Cruz-Suárez, L.E. et al. **Avances en Nutrición Acuícola** v.I. p. 438-447, 2002.
- PEPPAS, N.A. Hydrogels and drug delivery. **Current Opinion in Colloid and Interface Science** , v.2 , p.531-537, 1997.
- PEPPAS, N.A., COLOMBO, P. Analysis of drug release behavior from swellable polymer carriers using the dimensionality index. **Journal of Controlled Release**, v. 45, n.1, p. 35-40, 1997.
- PEPPAS, N.A., ENDE, D.J., Controlled Release of Perfumes from Polymers. II. Incorporation and Release of Essential Oils from Glassy Polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v.66, p.509-513, 1997.
- PEPPAS, N.A.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of fragrances from polymers I. Thermodynamic analysis. **Journal of Controlled Release**, v. 40,p. 245-250, 1996.
- PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W., ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** , v.50 , p.27-46, 2000

- PEREZ, N.; GORDILLO, B. Rapid synthesis of (\pm)-r-7-benzyloxymethyl-cyclopenta-cis-[4,5][1,3]-oxazolo[3,2-a]pyrimidinones versatile carbocyclic nucleoside precursors. **Tetrahedron**, v.59, n. 5, p.671-676, 2003.
- PÉREZ, S.; MAZEAU K.; HERVÉ DU PENHOAT, C. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 37-55, 2000.
- PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M.A.; DOCO, T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. **Biochimie**, v. 85, p.109-121, 2003.
- PETERS, H.J.W.; VAN BOMMEL E.M.; GFOKKENS., J.G. Effect of gelatin properties in complex coacervation processes, **Drug Device Ind. Pharm.**, v.18, n.1, p. 123– 134, 1992.
- PETERSON, G.L. Simplification of protein assay method of Lowry et al.- which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v.83, n.2, p. 346-356, 1977.
- PICULLEL, L.; BERGFELDT, K.; NILSSON, S. Factors determining phase behavior of multicomponent polymer systems. In *Biopolymer Mixtures*; Nottingham University Press: Nottingham, p 13-36, 1995.
- PICULLEL, L.; LINDMAN, B. Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer surfactant, and surfactant surfactant mixtures - similarities and differences. **Advances In Colloid And Interface Science**, v. 41, p. 149-178, 1992.
- PLASHCHINA, I.G.; MRACHKOVSKAYA, T.A.; DANILENKOM, A.N.; KOZHEVNIKOV, G.O.; STARODUBROVSKAYA, N.Y.; BRAUDO, E.E.; SCHWENKE, K.D. Complex formation of Faba bean legumin with chitosan: surface activity and emulsion properties of complexes, in: E. Dickinson, R. Miller, *Food Colloids, Fundamentals of Formulation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, p. 332–341.
- POLYAKOV, V.I., KIREYEVA, O.K., GRINBERG, V.Y.A., TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic compatibility of proteins in aqueous media. Part. I. Phase diagrams of some water-protein A-protein B systems. **Nahrung**, v. 29, n.2, p.153-160, 1985.
- POLYAKOV, V.I., POPELLO, I.A., GRINBERG, V.Y., TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic compatibility of proteins in aqueous media. **Nahrung**, v.30, p.365-368, 1986a.

- POLYAKOV, V.I., POPELLO, I.A., GRINBERG, V.Y., TOLSTOGUZOV, V.B.. Thermodynamic compatibility of proteins in aqueous media. 3. Studies on the role of intermolecular interactions in the thermodynamics of compatibility of proteins according to the data of dilution enthalpies. **Nahrung**, v.30, p.81-88, 1986b.
- POLYAKOV, V.I.; GRINBERG, V.Y.; TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic incompatibility of proteins. **Food Hydrocolloids**, v.11, p.171-180, 1997.
- POPPE, J. Gelatin, In: Thickening and gelling agents for food, New York, Ed. Alan Imeson, Blackie Academic & Professional, Cap. 7, p. 144-168, 1997.
- POPPELWELL, L.M.; BLACK, J.M.; NORRIS, L.M.; PORZIO, M. Encapsulation system for flavors and colors. **Food Technology**, v. 49, p. 76-82, 1995.
- POULAIN, N., DEZ, I., PERRIO, C., LASNE, M., PRUD'HOMME, M., NAKACHE, E. Microspheres based on inulin for the controlled release of serine protease inhibitors: preparation, characterization and in vitro release, **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 27-38, 2003.
- PRAKASH, A.J.M.; MANGINO, M.E. The effects of added proteins on the functionality of gum arabic in soft drink emulsion systems. **Food Hydrocolloids**, v.4, n.3, p.177-187, 1990.
- PRAUSNITZ, J.M.; LICHTENTHALER, R.N.; DE AZEVEDO, E.G. Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria 3rd Edition, Prentice-Hall inc.: New Jersey, , p 9-117, 213-453, 1999
- RABISKOVA, M., VALASKOVA, J. The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v.15, n.6, p. 747-751, 1998.
- RABISKOVA, M.; SONG, J.; OPAWALE, F.O.; BURGESS, D.J. The influence of surface-properties on uptake of oil into complex coacervate microcapsules, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, n.8, p.631-635, 1994.
- RADEK, J.T.; JEONG, J.M.; MURTHY, S.N.; INGHAM, K.C.; LORAND, L. Affinity of human erythrocyte transglutaminase for a 42-kDa gelatin-binding fragment of human plasma fibronectin. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.90, n.8, p.3152-3156, 1993.
- RAFATI, H.; COOMBES, A.G.A.; ADLER, J.; HOLLAND, J.; DAVIS, S.S. Protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral

- administration: Formulation, structural and release characteristics. **Journal of Controlled Release** v.43, n.1, p. 89-102, 1997
- RALET, M.C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H. C.; THIBAUT, J.F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. **Carbohydrate Research**, v.336, p. 117-125, 2001.
- RAMARAJ, B.; RADHAKRISHNAN, G. Modification of the dynamic swelling behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels in water through interpenetrating polymer networks (IPNS). **Polymer**, v.35, n.10, p. 2167-2173, 1994.
- RANDALL, R.C.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. Fractionation and characterization of gum from *Acacia Senegal*. **Food Hydrocolloids**, v. 3, n. 1, p. 65-75, 1989.
- RAY-NENG, C.; HSIU-O, H.; MING-THAU, S. Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. **Biomaterials**, v.26, p. 4229-4235, 2005.
- RÉ, M.I. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes. Último acesso em 28/11/2003. <http://www2.uol.com.br/cienciahoje/chmais/pass/ch162/microcap.pdf>
- READ, S.M.; NORTHCOTE, D.H. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue-g dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v.116, n.1, p. 53-64, 1981.
- REINHART, C.T., PEPPAS, N.A. Solute Diffusion In Swollen Membranes .2. Influence of Crosslinking On Diffusive Properties. **Journal of Membrane Science**, v.18, (MAR), p.227-239, 1984.
- REMUNAN-LOPEZ, C.; BODMEIER, R. Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. **International Journal of Pharmaceutics**, v.135, n.1-2, p. 63-72, 1996.
- RENARD, D.; ROBERT, P.; LAVENANT, L.; MELCION, D.; POPINEAU, Y.; GUEGUEN, J.; DUCLAIROIR, C.; NAKACHE, E.; SANCHEZ, C.; SCHMITT, C. Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.242, n.1-2, p. 163-166, 2002.
- REYNOLDS, J.A., S. HERBERT, H., POLET, J., STEINHARD T. The binding of divers detergent anions to bovine serum albumin. **Biochemistry**, v.6, p.937-943, 1967.

- REYNOLDS, J.A., TANFORD C. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. **Journal of Biol. Chem.**, v. 245, p.5161-5165, 1970
- RODRIGUEZ N.; A molecular simulation approach to control crystallization of pharmaceutical compounds during dissolution. <http://best.com/~worktree/f/28/263f.htm> ultimo acesso 10/08/2005.
- ROGOVINA, L. Z., Approaches to multicomponent systems of biopolymers. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 3, p. 325-331, 1998.
- ROLIN, C.; DE VRIES, J. In Food Gels, ed Harris P., p.401, London, New York, Elsevier Applied Science, 1990.
- RONG Y, WU G, CHEN HZ, WANG, M. Preparation of electrophoretic ink microcapsules and electrophoretic display prototype **Chemical Journal Of Chinese Universities-Chinese**, v. 26, n. 5, p. 982-984, 2005
- SANCHEZ, C. DESPOND, S., SCHMITT, C., HARDY, J. Effect of heat and shear on h-lactoglobulin-acacia gum complex coacervation, in: E. Dickinson, R. Miller, Food Colloids, Fundamentals of Formulation, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, p. 332- 341.
- SANCHEZ, C. MEKHOLOUFI, G. SCHMITT, C. RENARD, D. ROBERT, P. LEHR, C.M. LAMPRECHT A., HARDY J., Self-assembly of h-lactoglobulin and acacia gum in aqueous solvent: structure and phase-ordering kinetics, **Langmuir** , v.8, p. 10323- 10333, 2002a.
- SANCHEZ, C. RENARD, D. Stability and structure of protein-polysaccharide coacervates in the presence of protein aggregates, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 319-324, 2002b
- SANCHEZ, C.; RENARD, D; ROBERT, P.; SCHMITT, C.; LEFEBVRE, J. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p.257-267, 2002.
- SCHMITT C, SANCHEZ C, THOMAS F, HARDY, J. Complex coacervation between beta-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloid**, v.13 n.6, p. 483-496, 1999.
- SCHMITT, C., SANCHEZ, C., DESOBRY-BANON, S., HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polissacarídeo Complexes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n. 8, p. 689-753, 1998.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; LAMPRECHT, A.; RENARD, D.; LEHR, C.M.; DE KRUIF, C.G.; HARDY, J. Study of h-lactoglobulin/acacia gum complex

- coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy, **Colloids Surfaces, B Biointerfaces**, v.20, p. 267-280, 2001.
- SCHMITT, C; SANCHEZ, C; DESPOND, S; RENARD, D.; THOMAS, F.; HARDY, J. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between α -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. **Food Hydrocolloids**, v.14, p. 403-413, 2000.
- SCHOTT, H., KWAN, L.C., FELDMAN, S. The role of surfactants in the release of very slightly soluble drugs from tablets. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.71, n.9, p.1038-1045, 1982
- SCHROOYEN, P. M. M.; VAN DER MEER, R.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 475-479 2001.
- SEARLES, J.A., CARPENTER, J.F., RANDOLPH, T.W. The Ice Nucleation Temperature Determines the Primary Drying Rate of Lyophilization for Samples Frozen on a Temperature-Controlled Shelf. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 90, n.7, p. 860-871, 2001
- SEBBA, F. Foams and Biliquid Foams- Aphrons John Willey e Sons, Chester, England, 236p., 1987.
- SEDMAK, J.J.; GROSSBERG, S.E. Rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, v.79, n.1-2, p. 544-552, 1977.
- SEEBOTH, A.; WUSTNECK, R.; OTTO, K. The Influence Of Surfactants On The Structure Of Transparent Gelatin Films. **Colloid and Polymer Science**, v.268, n.3, p. 286-289, 1990.
- SELLIER, N.; CAZAUSSUS, A.; BUDZINSKI, H.; LEBON, M. Structure determination of sesquiterpenes in Chinese vetiver oil by gas-chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.577, p. 451-458, 1991.
- SEMENOVA, M.; BELYAKOVA, L.; ANTIPOVA, A.; JUBANOVA, M. Influence of maltodextrins with different dextrose equivalent on the thermodynamic properties of legumin in a bulk and at the air-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.12, p.287-297, 1999.
- SEMENOVA, M.G. Factor determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems. In **Macromolecular Interactions in Food Technology**, ACS Symposium Series 650: Washington DC, 1996 , pp 37-49.

-
- SEMENOVA, M.G. Some Ways of Controlling the Functionality of Food Biopolymers in Multicomponent Colloidal Food Systems by Means of Intermolecular Interactions **Progress in Food Biopolymer Research** Vol. 1,P. 1-22, 2005. <http://www.ppti.usm.my/pfbr>
- SHAH, V.P.; KONECNY, J.J.; EVERETT, R.L.; MCCULLOUGH, B.; NOORIZADEH, A.C.; SKELLY, J.P. In vitro dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants. **Pharmaceutical Research**, v.9, n.7, p.612-618, 1989.
- SHAH, V.P.; NOORY, A.; NOORY, C.; MCCULLOUGH, B.; CLARKE, S.; EVERETT, R.L.; NAVIASKY, H.; SRINIVASAN, B.N.; FORTMAN, D.; SKELLY, J.P. In Vitro Dissolution of Sparingly water-Soluble Drug Dosage Forms. **International Journal of Pharmaceutics**,v.125, p.99-106, 1995.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 33, n.6, p.501-547, 1993.
- SHIH, X; CARUSO, F. Release Behavior of Thin-Walled Microcapsules Composed of Polyelectrolyte Multilayers. **Langmuir**, v.17, p.2036-2042, 2001.
- SHUMILINA, E.V., SHCHIPUNOV, Y.A. Chitosan-carrageenan gels. **Colloid Journal**, v.64, p. 372-378, 2002.
- SINGH, M.; RATHI, R.; SINGH, A.; HELLER, J.; TALWAR, G.P.; KOPECEK, J. Controlled Release Of Lhrh-Dt From Bioerodible Hydrogel Microspheres. **International Journal Of Pharmaceutics**, v.76, n.3,185-188, 1991.
- SINGH, O. N.; BURGESS, D. J. Characterisation of albumin-alginic acid complex coacervation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.41, p.670-673, 1989
- SINK, G., LABUDA, M. The flavor industry's response to heath trends. **Perfumer & flavoristt**, v.24, p.13-17, 1999.
- SINKO, P; KOHN, J. Polymeric Drug Delivery Systems: An Overview. Cap2 In. **Polymeric Delivery Systems:Properties and Applications**.p.18-41. El-Nokaly, M.A., Piatt, D.M.; Charpentier, B.A.American Chemical Society, Washington, 1993.
- SOUZA, M.S.M. Ativos microencapsulodos encontram mais aplicações. Último acesso em 28/11/2003. <http://www.quimica.com.br/revista/qd388/microencap2.htm>

- SOVILJ, V. Conductometric and potentiometric investigations of ionic surfactant-gelatin interaction. **Colloid and Polymer Science**, v.276, n.4, p. 328-334, 1998.
- SOVILJ, V.; DJAKOVIC, L.; DOKIC, P. Influence of surfactant-protein interaction on the wall structure of microcapsules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.158, n.2, p. 483-487, 1993.
- SPARKS, R.E. Microencapsulation. In "Encyclopedia of Chemical Technology" ed. Kirk-Othemer. 3rd ed., v. 15, p.470. John Wiley and Sons, Inc., NewYork. 1981.
- STAINSBY, G. Proteínaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. **Food Chemistry**. v. 6, p.3-14, 1980.
- STEWART, P.A. Review of Pharmaceutical Controlled Release Methods and Devices, http://www.initium.demon.co.uk/rel_nf.htm#Drug_Deliv, última revisão em 08/06/1998. Acesso em 05/05/2003.
- STOSCHECK, C.M. Increased uniformity in the response of the coomassie blue g-protein assay to different proteins. **Analytical Biochemistry**, v.184, n.1, p.111-116, 1990.
- SUZUKI S, KONDO T. Interactions of gelatin-acacia microcapsules with surfactants **Colloids And Surfaces**, v. 4, n.2, p. 163-171, 1982
- TAINAKA, K. Effect of contra-íons on complex coacervation. **Biopolymers**, v. 19, p.1289-1298, 1980.
- TAINAKA, K. Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. Salt free systems. **Journal of the Physical Society of Japan**, v.46, n. 6, p. 1899-1906, 1979.
- TAKAHATA, H.; LAVELLE, E.C.; COOMBES, A.G.A.; DAVIS, S.S. The distribution of protein associated with poly(DL-lactide co-glycolide) microparticles and its degradation in simulated body fluids. **Journal of Controlled Release**, v.50, n.1-3, p.237-246, 1998.
- TAKENAKA H, KAWASHIMA Y, LIN SY Micromeritic properties of sulfamethoxazole microcapsules prepared by gelatin - acacia coacervation. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.69, n.5, 513-516, 1980.
- TAN, C. Beverage Emulsions in: Food Emulsions, Second Edition, eds. K. Larsson and S.E. Friberg, New York: Marcel Dekker, 1990, p. 445 - 478.

- TANAKA, H.; MATSUMURA, M.; VELIKY, I.A. Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads. **Biotechnology Bioeng.** v.26, p.53-58, 1984.
- THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin--a review. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v.37, n.1, p.47-73, 1997.
- THEVENET, F. Acacia gums. Stabilizers for flavor encapsulation. Chap.5 in: Flavor Encapsulation, ACS Symposim Series 370, Risch, S.J.; Reineccius, G.A. eds, American Chemical Society, DC, USA, p. 37-44, 1988.
- THIES, C. How to Make Microcapsules Lecture and Laboratory Manual. St. Louis, Missouri, Cap 2, p.28-31,1995.
- THIMMA R.T., TAMMISHETTI S., Study of complex coacervation of gelatin with sodium carboxymethyl guar gum: microencapsulation of clove oil and sulphamethoxazole, **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n.2, p.203- 210, 2003.
- THOMASIN, C.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. A. Physico – chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 147, p.173-186, 1997.
- TIRKKONEN, S., TURAKKA, L., PARONEN, P. Microencapsulation of Indomethacin by Gelatin Acacia Complex Coacervation In The Presence Of Surfactants. **Journal of Microencapsulation**, v. 11, n.6, p. 615-626, 1994.
- TOKUOKA, Y.; USHIYAMA, H.; ABE, N.; CRISTIAN, S.D. Solubilization of some synthetic perfumes by anionic-nonionic mixed surfactant systems 1. **Langmuir**, v.11, p. 725-729, 1995.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of food proteins and role of protein – polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, v.4, n.6, p. 429-468, 1991.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Phase behaviour of macromolecular components in biological and food systems. **Nahrung**, v.44, n.5, p. 299-308, 2000.
- TOLSTOGUZOV, V. B.; GRINBERG, V. Y.; GUROV, A. N. Some physicochemical approaches to the problem of protein texturization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n.2,p.151-159, 1985
- TOLSTOGUZOV, V. B.; IZJUMOV, D. B.; GRINBERG, V. Y.; MARUSOVA, A. N.; CHEKHOVSKAYA, V. T. Method of making protein-containing foodstuffs resembling minced meat, US Patent Application 3, 829, 587, 1974.

- TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 1-23, 2003.
- TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.22, n.2, p.89-174, 2002.
- TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamic aspects of dough formation and functionality. **Food Hydrocolloids**, v.11, p.181-193, 1997
- TOLSTOGUZOV, V.B., Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In "Functional Properties of Food Macromolecules" (J. R. Mitchell and D. A. Ledward, eds.) p. 385-415. Elsevier Appl.Sci., London, 1986.
- TORRE, M.L., FAUSTINI, M., NORBERTI, R., STACCHEZZINI, S., MAGGI, L., MAFFEO, G., CONTE, U., VIGO, D. Boar semen controlled delivery system: storage and in vitro spermatozoa release. **Journal of Controlled Release**, v.85, n. 1-3, p.83-89, 2002.
- TRUBIANO, P.C.; LACOURSE, N.L. Emulsion-stabilizing starches: use in flavor encapsulation. In: Flavor Encapsulation, (S.J. Risch and G.A. Reineccius, eds). ACS Symposium Series 370. pp. 5-54, 1989.
- TSAPKINA E., SEMENOVA M., PAVLOVSKAYA G., LEONTIEV A. AND TOLSTOGUZOV V. The influence of incompatibility on the formation of adsorbing layers and dispersion of n-decane emulsion droplets in aqueous solution containing a mixture of 11S globulin from *Vicia faba* and Dextran, **Food Hydrocolloids**, v.6, p. 237-251, 1992.
- TSOGA, A., RICHARDSON, R.K., MORRIS, E.R. Role of cosolutes in gelation of high methoxy pectin. Part 1. Comparison of sugars and polyols. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 907-919, 2004.
- TSUNG M., BURGESS, D.J. Preparation and stabilization of heparin/gelatin complex coacervate microcapsules **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n.5, p.603-607, 1997.
- TURGEON, S.L., BEAULIEU, M., SCHMITT, C., SANCHEZ C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.. 8, p.401-414, 2003.
- TURRO, N. J., LEI, X.G., ANANTHAPADMANABHAN, K.P., ARONSON, D.M. Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: the BSA/SDS system. **Langmuir**. V.11, p.2525-2533, 1995.

- VAN DE WEERT, M., ANDERSEN, M.B., FROKJAER, S. Complex Coacervation of Lysozyme and Heparin: Complex Characterization and Protein Stability, **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 12, p. 2354-2359, 2004.
- VANDELLI, M.A.; RIVASI, F.; GUERRA, P.; FORNI, F.; ARLETTI, R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L- glycerinaldehydes as a potential drug delivery systems: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v.215, p.175-184, 2001.
- VANDENBERG, G. W., DROLET, C., SCOTT S. L., DE LA NOÛE, J. Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. **Journal of Controlled Release**, v. 77, n. 3, p. 297-307, 2001.
- VANDEVELDE, M.C., FENYO, J.C. Macromolecular Distribution Of Acacia-Senegal Gum (Gum Arabic) By Size-Exclusion Chromatography. **Carbohydrate Polymers** , v.5, n.4, p.251-273, 1985.
- VASILIU S, POPA M, RINAUDO M Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers **European Polymer Journal**, v.41, n.5, p.923-932, 2005.
- VEIS, A.; ARANYI, C. Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. **Journal of Physic. Chemistry**, v.64, p.1203-1210, 1960.
- VEIS, A.; BODOR, E.; MUSSELL, S. Molecular weight fractionation and the self-suppression of complex coacervation. **Biopolymers**, v. 5, p.37-59,1967.
- VERNON-CARTER, E.J. Stability of Capsicum annum oleoresin-in-water emulsions containing Prosopis and Acacia gums. **Journal of Texture Studies**, v.29, n.5, p.553-567, 1998.
- VIKELOUDA, M. KIOSSEOGLU V., The use of carboxymethylcellulose to recover potato proteins and control their functional properties, **Food Hydrocolloids**, v.18, p.21-27, 2004.
- VLACHOU, M.; NASEEF, H.; EFENTAKIS, M.; TARANTILI, P. A.; ANDREOPOULOS, A. G. Swelling Properties of Various Polymers Used in Controlled Release Systems. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 15, p. 293-306, 2001.
- VOORN, M.J. Complex Coacervation .1. General Theoretical Considerations **Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal Of The Royal Netherlands Chemical Society** , v.5, n.3, p. 317-330, 1956.

- WALKLING, W.D., NAYAK, R.K., PLOSTNIEKS, J., CRESSMAN, W.A. Partially Organic Dissolution Medium For Griseofulvin Dosage Forms. **Drug Development And Industrial Pharmacy** , v.5, n.1, p. 17-27, 1979.
- WANG, J.Y., YEH, T.F., LIN, Y.C., MIYAMURA, K., HOLMSKOV U., REID K.B.. Measurement of pulmonary status and surfactant protein levels during dexamethasone treatment of neonatal respiratory distress syndrome. **Thorax**, v. 51, n.9, p. 907-913, 1996
- WANG, Y. F.; GAO, J. Y.; DUBIN, P. L. Protein separation via polyelectrolyte coacervation: selectivity and efficiency. **Biotechnology Progress**, v.12,p. 356-362, 1996
- WATANABE, M.; SUZUKI, T.; IKEZAWA, Z.; ARAI, S. Controlled Enzymatic Treatment Of Wheat Proteins For Production Of Hypoallergenic Flour. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n.2, p.388-390, 1994.
- WATSON, P.F. The potential impact of sperm encapsulation technology on the importance of timing of artificial insemination: a perspective in the light of published work. **Reproduction, Fertility & Development**, v.5, n.6, p. 691-699, 1993
- WEINBRECK F., NIEUWENHUIJSE H., ROBIJN G.W., DE KRUIF C.G., Complex formation of whey proteins–exocellular polysaccharide EPS B40, **Langmuir**, v.19, p.9404– 9410, 2003a
- WEINBRECK F., NIEUWENHUIJSE H., ROBIJN, G.W. DE KRUIF, C.G. Complexation of whey proteins with carrageenan, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.11, p. 3550– 3555, 2004.
- WEINBRECK F., TROMP R.H., DE KRUIF C.G., Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates, **Biomacromolecules**, v.5, n.4, p.1437– 1445, 2004a
- WEINBRECK, F. DE VRIES, R. SCHROOYEN P., DE KRUIF C. G., Complex coacervation of whey proteins and gum arabic, **Biomacromolecules**, v.4, n.2, p. 293– 303, 2003.
- WEINBRECK, F. ROLLEMA, H.S. TROMP, R.H. Diffusivity of whey protein and gum arabic in their coacervates, **Langmuir**, v. 20, n.15, p. 6389–6395, 2004b
- WEINBRECK, F. WIENTJES R.H.W., NIEUWENHUIJSE, H. ROBIJN G.W.,. DE KRUIF C.G, Rheological properties of whey protein/gum Arabic coacervates. **Journal Of Rheology**, v.48, n.6, p.1215-1228, 2004c

- WEN, S.; YIN, X.N.; STEVENSON, W.T.K. Preparation And Characterization Of Polyelectrolyte Copolymers Containing Methyl-Methacrylate And 2-Hydroxyethyl Methacrylate .1. Polymers Based On Methacrylic-Acid. **Journal of Applied Polymer Science** , v.42, n.5, p.1399-1406, 1991.
- WEYERSTAHL, P., MARSCHALL, H., SPLITTGERBER, U., WOLF, D. Analysis of the polar fraction of Haitian Vetiver Oil. **Flavor and Fragrance Journal**, v.15, p.153-163, 2000a.
- WEYERSTAHL, P., MARSCHALL, H., SPLITTGERBER, U., WOLF, D., SURBURG, H. Constituents of Haitian Vetiver Oil. **Flavor and Fragrance Journal**, v.15, p.395-412, 2000b.
- WHISTLER, R.L.; DANIEL, J.R. Carbohydrates. In:Fennema O.R. (Ed.). Food chemistry. 2ndEd., Marcel Dekker, New York, 1985.
- WIELAND-BERGHAUSEN, S., SCHOTE, U., FREY M., SCHMIDT F. Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCl. **Journal of Controlled Release**, v. 85, n. 1-3, p. 35-43, 2002.
- WUSTNECK R, MULLER HJ Characterization Of Gelatin-Surfactant Interaction By Thickness Measurements Of Foam Films. **Colloid And Polymer Science** , v.264, n.1, p. 97-102 ,1986.
- XIA, J.; DUBIN, P.L. Protein-polyelectrolyte complexes. In: Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology , Springer Verlag: Berlin, 1994 , pp 247-271
- XING FB, CHENG GX, YI KJ, MA, L.R. Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia, and tannins **Journal of Applied Polymer Science**, v.96, n.6, p. 2225-2229, 2005
- XING, F., CHENG, G., YANG B., MA L. Microencapsulation of capsaicin by the complex coacervation of gelatin, acacia and tannins, **Journal of Applied Polymer Science**. v.91, n. 4, p. 2669-2675, 2004.
- YAN, X.L., KHOR, E., LIM, L.Y. Chitosan-alginate films prepared with chitosan at different molecular weights. **Journal of Biomedical Materials Research**., v. 58, n.4, p. 358-365, 2001
- YONATH, A., PODJARNY, A., HONIG, B., SIELECKI, A., TRAUB, W. Crystallographic studies of protein denaturation and renaturation. 2. Sodium dodecyl sulfate induced structural changes in triclinic lysozyme. **Biochemistry**. v.16, p.1418-1424, 1977.

- YOSHIMURA, T., NAGATA, Y. ESUMI, K. Interactions of quaternary ammonium salt-type gemini surfactants with sodium poly(styrene sulfonate) **Journal Of Colloid And Interface Science** , v.275, n.2, p.618-622, 2004.
- YOSHIOKA, T., STERNBERG, G.B., FLORENCE, A.T. Preparation and Properties of Vesicles (Niosomes) of Sorbitan Monoesters (Span-20, Span-40, Span-60 And Span-80) And A Sorbitan Triester (Span-85) **International Journal Of Pharmaceutics**, v.105, n.1, p1-6, 1994.
- ZASLAVSKY, B.Y. Aqueous two-phase partitioning. **Physical, Chemistry and Bioanalytical Applications**, New York, 1994, 696p.
- ZHOU CH, ZHOU JF, WU ZS, ZHANG ZJ, ZHANG PY Synthesis and characterization of copolymer(core)-silver(shell) composite microspheres **Chinese Journal Of Chemistry** , v.23, n.8, p.1071-1075, 2005.
- ZHU, Y, RINZEMA, A., TRAMPER, J., BOT, J. Microbial transglutaminase- a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.277-282, 1995.
- ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. **Analytical Biochemistry**, v.236, n.2, p. 302-308, 1996.
- ZUCKERKANDL, E. The Appearance of New Structures in Proteins During Evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v.7, p.1-57, 1975.

A. RESULTADOS PRELIMINARES

A.1 Diagrama de fases

A construção do diagrama de fases foi preliminarmente ensaiada. Interferência nos métodos adotados para a quantificação das proteínas e limitações no método de análise dos polissacarídeos forçaram a procura de outro método de determinação e otimização da separação de fases.

A análise das fases para construção do diagrama foi realizada pela mistura dos polímeros em diversas proporções, agitados magneticamente por 1 minuto. O pH e temperatura de trabalho foram definidas para pH 4,0 e T=50°C. Após acertar o pH, o sistema foi mantido em agitação por dez minutos.

A dispersão foi transferida para tubos UltraClear-Beckman e ultracentrifugados a 35000g por uma hora. As fases foram separadas, pesadas e no sobrenadante foram analisados o teor de sólidos [AOAC, 1990] e a quantidade de polissacarídeo [DUBOIS et al., 1958]. Na fase fundo, foram realizadas análises de umidade. A proteína foi determinada por diferença centesimal.

A.1.1 Determinação do teor de polissacarídeo

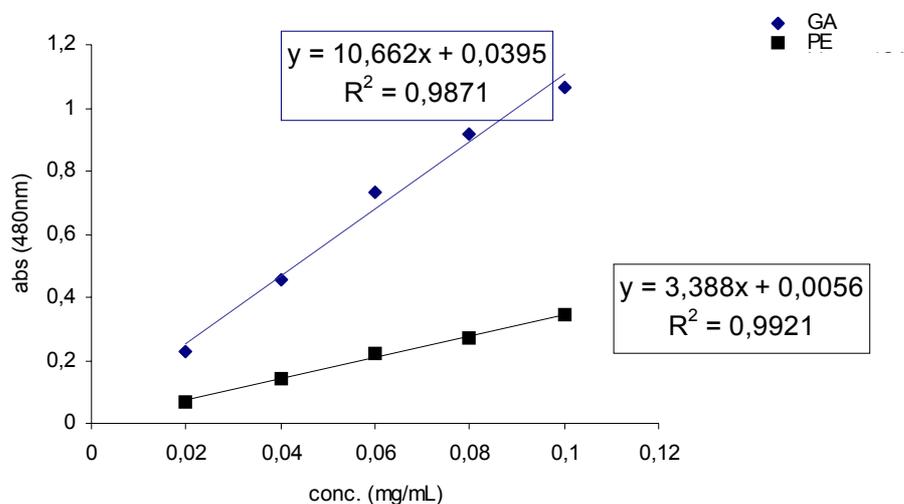


Figura 59. Curvas de calibração para determinação da goma arábica (GA) e pectina (PE).

As curvas de calibração para determinação do teor de polissacarídeos para a goma arábica e a pectina foram construídas e estão apresentadas na Figura 59. O método adotado para determinação de polissacarídeo possui alguns inconvenientes. Ele faz uso de ácido sulfúrico concentrado que gera resíduos extremamente poluentes. Além disso, a quantidade de compostos cromóforos formados deve-se à velocidade de adição do ácido sulfúrico à mistura a ser quantificada causando uma variabilidade muito grande entre as leituras.

A.1.2 Escolha do método de análise de proteína

As soluções dos biopolímeros a serem utilizadas na construção dos diagramas de fase foram analisadas quanto a possível interferência na determinação de proteína por espectrofotometria com leitura no comprimento de onda na faixa ultravioleta a 280nm. Nas duas faixas de concentração estudada (0 a 1 e 1 a 10mg/mL), os polissacarídeos interferiram na resposta

obtidas para a gelatina (Figura 60), sendo que a pectina, em especial, apresentou resposta a 280 nm muito maior que a própria gelatina.

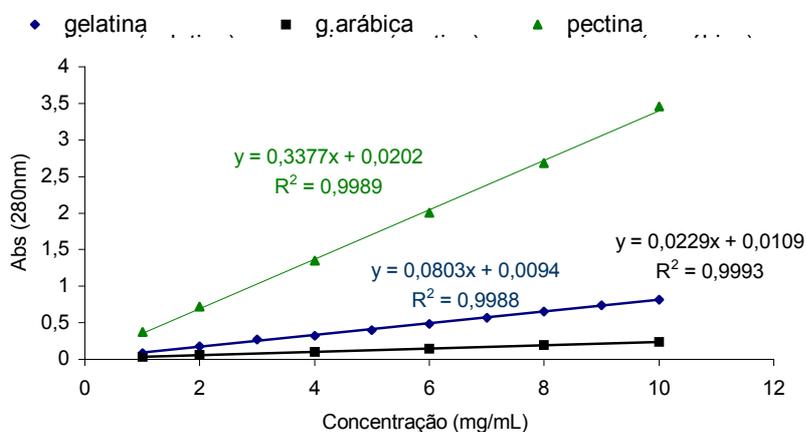


Figura 60. Curva de absorção a 280nm de (♦) gelatina, (■) goma arábica e (▲) pectina

Este é o método mais simples utilizado para a determinação de proteínas e analisa absorção de grupos aromáticos. Através de um *scanning* da absorção de luz pelos polissacarídeos, determinou-se a impossibilidade de se trabalhar com este método para a determinação da proteína presente nas fases, pois a pectina apresentava picos coincidentes com os picos de gelatina e de maior intensidade (Tabela 26).

Tabela 26. Varredura dos comprimentos de onda dos polissacarídeos e da proteína.

	ABS (nm)	intensidade
Gelatina	272	0,813
	266	0,812
	222	4,681
Pectina	318	2,397
	276	3,413
	222	4,681
G. arábica	272	0,238
	208	3,258

Uma outra tentativa é usar um método que complexa alguns resíduos da proteína. Os métodos colorimétricos de determinação de proteína que fazem uso do corante Coomassie Blue (CBBG) apresentam vantagens de serem rápidos (incubação de aproximadamente três minutos), não sofrerem ação de muitos interferentes químicos e utilizarem uma pequena quantidade de amostra.

Apesar disso, apresentam limitações com relação à variação de cor obtida por diferentes proteínas. Sabe-se que o CBBG existe como duas espécies (vermelho e azul) [BRADFORD, 1976; READ & NORTHCOTE, 1981, SEDMAK & GROSSBERG, 1977]. O corante livre na solução está na forma catiônica e tem um máximo de absorvância em 470 nm (vermelho). A complexação ocorre pela ligação preferencial da forma aniônica do corante, que tem um máximo de absorvância em 595 nm (azul), com a arginina e outros grupos amino da proteína. Os grupos básicos (Hys e Lys) e resíduos aromáticos (Tyr, Try, Phe) também sofrem complexação, mas apresentam resposta de cor menos intensa [COMPTON & JONES, 1985]. Por isso, no ensaio de Bradford padrão, certas proteínas produzem comparativamente níveis mais baixos de absorção. Isto foi observado com a gelatina neste ensaio e pode ser visualizada na Figura 61. Observa-se que variar a proporção de corante ou de proteína não apresentou efeito algum sobre a resposta do complexo formado a 595nm, como esperado.

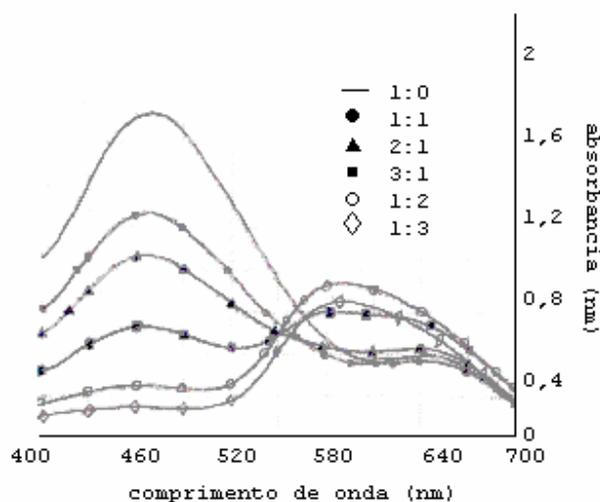


Figura 61. Resposta da gelatina à complexação com o corante de Bradford (corante:proteína).

LOPEZ et al. [1993] verificaram grande variação na cor produzida por diferentes proteínas e relacionaram este fato, principalmente a amostras contendo quantidades significantes de colágeno onde a aplicação direta dos métodos de LOWRY et al. [1951] e BRADFORD [1976] implicou em valores subestimados. Eles observaram que a adição de pequenas quantidades de SDS (0,035%) em soluções diluídas do CBBG causou um aumento de 4 vezes na resposta de cor de proteínas colaginosas e além disso, uma redução na absorção de várias proteínas não-colaginosas.

Além da inclusão de SDS no ensaio, diversas modificações para reduzir a variação de coloração produzida foram sugeridas e incluem o uso de ácido perclórico ou hidrocloreico na preparação do reagente [SEDMAN & GROSSBERG, 1977], aumento da concentração de corante ou redução da concentração de ácido fosfórico na solução de ensaio [READ & NORTHCOTE, 1981]. ZOR & SELINGER [1996] observaram que se pode aumentar a linearidade da resposta com a concentração de proteína e a sensibilidade do ensaio em dez vezes, apenas fazendo a relação entre as duas formas do corante.

STOSCHECK [1990] encontrou que mesmo a altos níveis de gelatina, a resposta de cor é extremamente baixa e que a adição de hidróxido de sódio ao reagente de Bradford melhorou em 4 vezes a absorção do complexo formado com esta proteína. Além da composição da proteína, a interação do corante parece ser uma função da concentração de H^+ [SEDMAK & GROSSBERG, 1977]. Portanto quanto mais ácida a solução, o complexo desenvolverá menor intensidade na cor azul [READ & NORTHCOTE, 1981].

Desta forma, o método proposto por SEDMAK & GROSSBERG [1977] foi adotado com algumas alterações para aumentar a resposta da gelatina e manter a simplicidade do método. A alternativa mais simples, de acordo com a literatura revisada é de aumentar o pH do corante que era em torno de 0,4.

Dos pHs testados (0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7), o pH 0,6 foi o que apresentou maior diferença entre o reagente puro e complexo reagente-proteína (1mg/mL). As diferenças encontradas entre o corante comumente usado e o que possui o pH alterado pode ser ilustrado pela Figura 62.

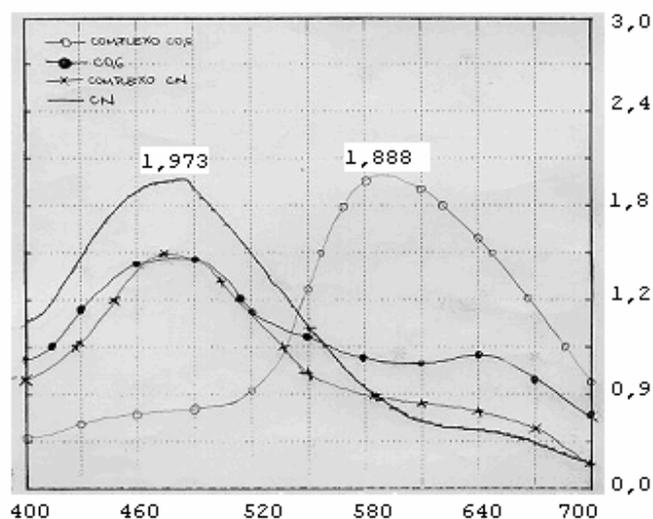


Figura 62. Varredura da absorção dos compostos em comprimentos de onda no espectro visível.

A absorção a 460nm, indica que todo o corante está sob a forma vermelha. A adição da solução de proteína ao corante com pH 0,6, permitiu a leitura da concentração do complexo a 590nm, ou seja, a proteína complexada com o corante desenvolveu cor azul.

A concentração da proteína, bem como a proporção entre a solução de proteína a ser analisada e o corante também foram avaliados como um modo de evitar que a proteína presente em solução não seja quantificada pela falta de corante necessário para complexá-la. A Tabela 27 e a Tabela 28 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 27. Variação da concentração com o espectro de absorção.

	<i>Espectro</i>	<i>ABS (nm)</i>	<i>intensidade</i>
Corante 0,6	Azul	642	0,381
	Vermelho	470	1,480
Corante 0,6+agua	Azul	644	0,367
	Vermelho	466	0,922
Corante 0,6+1mg/mL	Azul	642	0,418
	Vermelho	466	0,888
Corante 0,6+10mg/mL	Azul	588	0,838
	Vermelho	466	0,742

Com o corante produzido neste pH é possível aumentar a concentração de proteína de 1 mg/mL para 10 mg/mL. Nesta faixa ainda existe um excesso de corante que pode interagir com as proteínas. Este fato pode ser observado pela absorbancia do corante na faixa de 470nm, que diminui com a adição da solução mais concentrada porém o pico não é eliminado.

Pela análise dos resultados obtidos na Tabela 28, a proporção ideal de adição do reagente à solução de proteína é acima de 1:1. Quando se tem um excesso de proteína em solução (1:3), a intensidade do pico a 460 nm diminui muito, requerendo portanto se utilizar uma proporção em que haja ainda corante não complexado como medida de segurança. As proporções indicadas são 1:1 e 1:2 de reagente: solução de proteína.

Tabela 28. Resposta do complexo formado e do corante não complexado às variações de proporções entre reagente:proteína e concentração de proteína.

Reagente:Proteína	Espectro	1mg/mL		10mg/mL	
		ABS (nm)	intensidade	ABS (nm)	intensidade
1:0	Azul	638	0,374		
	Vermelho	470	1,544		
3:1	Azul	644	0,412	626	0,606
	Vermelho	466	1,043	466	0,958
2:1	Azul	640	0,433	586	0,749
	Vermelho	466	0,906	466	0,787
1:1	Azul	586	0,571	594	0,931
	Vermelho	464	0,555	462	0,436
1:2	Azul	684	0,590	592	0,962
	Vermelho	460	0,252	448	0,188
1:3	Azul	588	0,631	592	0,834
	Vermelho	454	0,135	420	0,108

A curva padrão encontrada para a gelatina na faixa de 0,1 a 1mg/mL está apresentada na Figura 63.

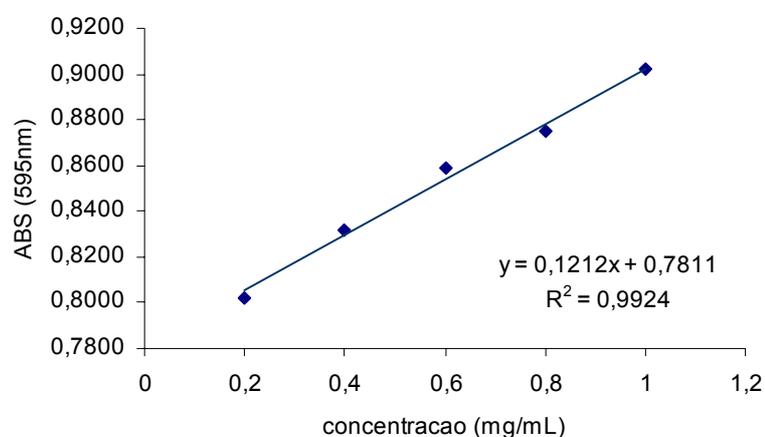


Figura 63. Curva analítica de gelatina com Bradford pH 0,6.

De acordo com ALKORTA, LLAMA & SERR [1994], a pectina interfere na estimativa de proteínas pelo uso de métodos colorimétricos como os descritos por LOWRY et al. [1951], BRADFORD [1976] e PETERSON [1977]. Porém, os autores encontraram que apesar da pectina interagir com os reagentes usados

e promover o desenvolvimento de uma coloração significativa e linearmente relacionada com a quantidade de pectina adicionada, somente afetou o procedimento usado por Bradford em concentrações de pectina maiores que 5g/L. Conseqüentemente, o uso do método de Bradford é admissível para quantificar proteína na presença de pectina desde que seus interferentes possam ser extraídos ou minimizados.

A.2 Teste de eficiência de encapsulação

O rompimento da parede das partículas foi estudado por três métodos: ação mecânica, enzimática e físico-química.

As partículas úmidas e secas foram moídas em almofariz na presença de diferentes solventes. As partículas secas foram mais facilmente rompidas em contato com etanol, metanol ou éter que as úmidas. O material coletado foi evaporado em balão previamente pesado ou quantificado cromatograficamente com a injeção de um padrão interno. Os resultados são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29. Comparação dos métodos de eficiência de encapsulação para o óleo de vetiver.

EE(%)	Gravimetria		Cromatográfico	
	Eter	Etanol	Metanol	Etanol
Sobrenadante	96,23			
Coacervado	83,68	91,2%	91,46	91,06

O óleo contido no sobrenadante também foi tentativamente extraído, porém, a pequena quantidade de óleo em solução impõe uma grande margem de erro na determinação.

Apesar da utilização do éter ser mais vantajosa, por ser mais facilmente evaporado que o etanol e não solubilizar a água contida na microcápsula, ele apresentou um poder extrator inferior aos demais solventes. A determinação por cromatografia foi bastante eficiente, porém é um método mais demorado e trabalhoso.

As microcápsulas são produzidas com o intuito de preservar as características do material encapsulado entre outras. O óleo essencial possui compostos muito voláteis e que podem ser perdidos durante o processo de produção das microcápsulas, pois apesar de não se utilizar solventes, utiliza-se uma condição branda de temperatura mas que poderia ser suficiente para

que houvesse perdas destes voláteis e com isso, o óleo encapsulado teria característica odorífera diferente. A Figura 64 mostra que não houve diferença entre a composição do óleo de vetiver livre e do óleo extraído da microcápsula. Não foram detectadas grandes diferenças em relação à composição do ativo, os picos eram coincidentes e a proporção entre eles foi mantida.

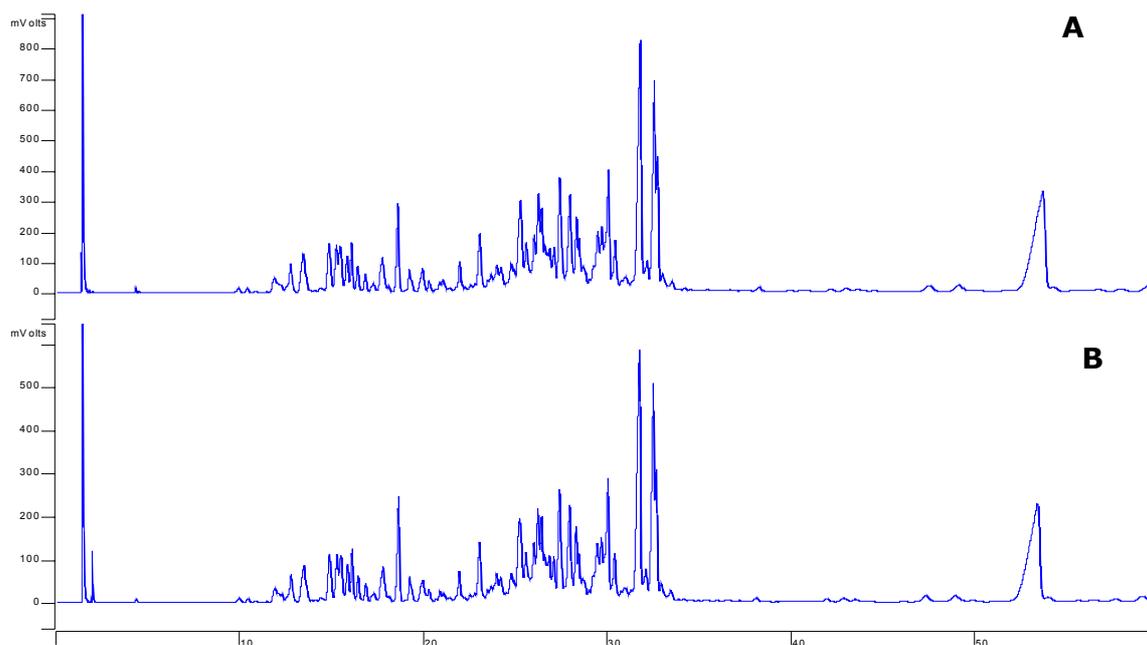


Figura 64. Comparação do óleo comercial livre (A) e encapsulado extraído com éter(B).

A parede das partículas também foi rompida pela ação da temperatura e do pH, que tendem a desestabilizar o coacervado formado. Os resultados estão evidenciados na Figura 65.

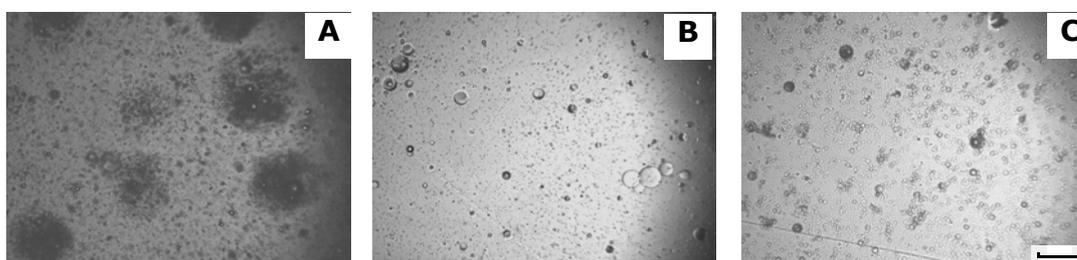


Figura 65. A.pH 1, B. pH 10, C. T=60°C por 15 minutos. A barra representa 100µm.

Pode-se observar que a temperatura e o pH alcalino apresentaram maior tendência em romper a parede formada. O método de rompimento enzimático com uma enzima proteolítica foi bastante eficiente, porém, as enzimas apresentaram dificuldade em acessar a proteína com matrizes reticuladas, mais evidente com o glutaraldeído, usado como agente reticulante.

Tabela 30. Eficiência de encapsulação pelo método fluorimétrico das partículas reticuladas.

<i>EE (%)</i>	<i>Úmidas</i>	<i>Secas</i>
Sem reticulação	95,37	94,88
Transglutaminase	93,80	84,43
Glutaraldeído	75,64	64,21

A.3 Liberação em solução etanólica

Para o estudo da liberação, algumas condições devem ser satisfeitas. O meio adotado para se realizar a liberação deve ser capaz de solubilizar o óleo encapsulado, não deformar a parede da microcápsula e estar num volume que garanta que se todo o óleo sair, seja alcançada uma concentração inferior à condição de saturação do óleo no meio.

A micropartícula úmida produzida foi colocada em etanol (0,8 g de microcápsulas em 6 mL de diferentes soluções apolares) a fim de verificar o efeito do solvente na estrutura da partícula. As análises de tamanho foram anteriormente discutidas para a inserção em álcool anidro. A Figura 66 mostra que os meios testados (soluções de graduações alcoólicas e óleo mineral) não apresentaram efeito algum na morfologia da partícula. Os meios testados foram preliminarmente cogitados para verificação da liberação. O óleo mineral foi descartado como alternativa em função da viscosidade, o que poderia alterar o fluxo e dificultar a modelagem além da quantificação do óleo liberado. As soluções alcoólicas não foram avaliadas devido à baixa solubilidade do óleo de vetiver em água.

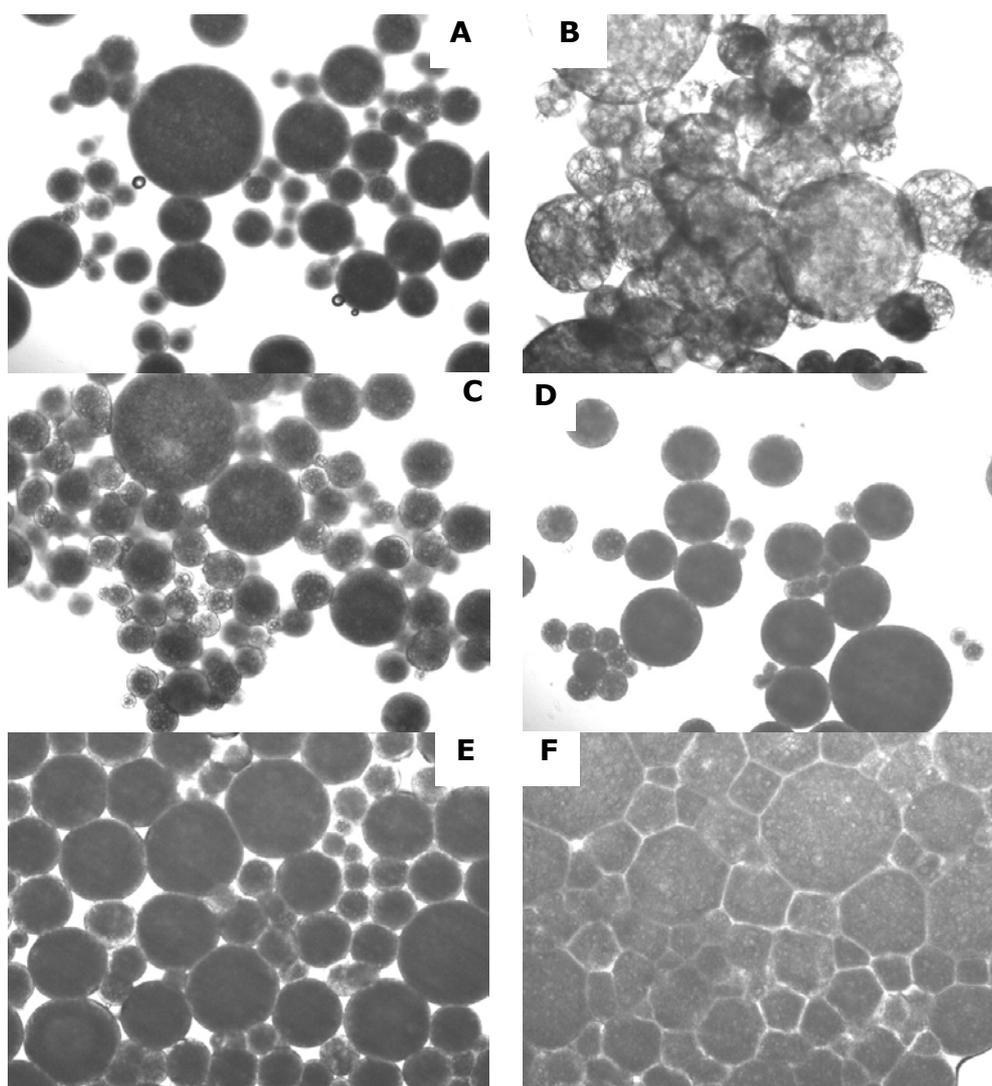


Figura 66. Microcápsulas coacervadas contendo 50% de óleo de vetiver e inserida em diferentes meios na proporção 0,8 g de microcápsulas em 6 mL de solução. a. água, b. álcool, c. álcool : água (1:1) , d. álcool: água (1:2), e. óleo mineral, f. óleo mineral. Optovar 0,8, aumento 12,5, filtro verde.

Em etanol anidro, solvente modelo, as partículas não apresentaram inchamento e apresentaram membrana externa bastante estável à desintegração. Ao contrário de polímeros erodíveis, os coacervados a partir de biopolímeros, não apresentaram tendência em desintegrar-se nem romper-se no decorrer do experimento (Figura 66).