

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

*Estudo do Processo de Encapsulação do Bioaroma
de Gorgonzola em β -Ciclodextrina e em Lipossomas*

Eng^a Fernanda Martins, MSc.

Autora

Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

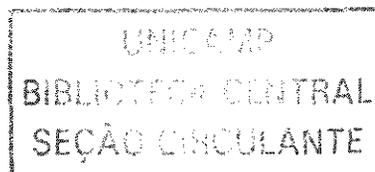
Orientadora

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Maio / 2003

UNICAMP



2003.06712

UNIDADE	CE
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	M366e
V	EX
TOMBO BC/	55073
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/08/03
Nº CPD	

BIBID. 2974021

CM00187264-6

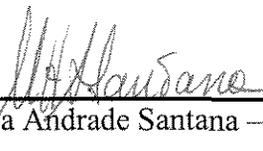
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

M366e Martins, Fernanda
Estudo do processo de encapsulação do bioaroma de gorgonzola em β -ciclodextrina e em lipossomas / Fernanda Martins. --Campinas, SP: [s.n.], 2003.

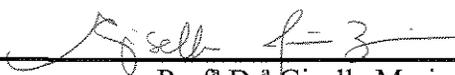
Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Estabilidade. 2. Metiletilcetona. 3. Secagem em spray. 4. Alimentos - Conservação. 5. Aroma. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

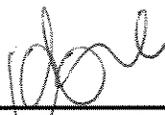
Tese de Doutorado defendida por Fernanda Martins e aprovada em 26 de maio de 2003
pela banca examinadora constituída pelos doutores:



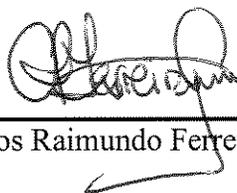
Profª Drª Maria Helena Andrade Santana – Orientadora



Profª Drª Gisella Maria Zanin (titular)



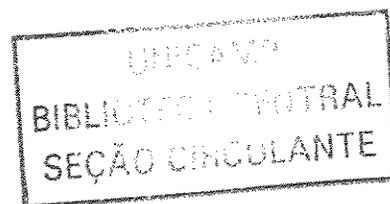
Profª Drª Gláucia Maria Pastore (titular)



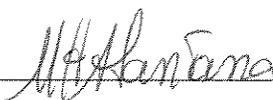
Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso (titular)



Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (titular)



Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Fernanda Martins e aprovada por Comissão Julgadora em 26 de maio de 2003.



Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana (Orientadora)

Dedico este trabalho

*Aos meus pais
pelo amor, compreensão,
dedicação e incentivos constantes.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana, por todo apoio, dedicação e imensa contribuição científica. Agradeço também aos meus colegas de laboratório, em especial a Elaine e a Giuliana, por compartilharem suas experiências técnicas e pela amizade. Ao técnico do laboratório Gilson, por toda ajuda, muitas vezes indispensável.

Sou grata também à Débora Nakai Biloti, pela contribuição com o Hyperchem, ao Joaquim de Oliveira e a Denise, do Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela contribuição de conhecimentos em aromas e a Prof^a Gláucia Maria Pastore e ao aluno Cleber P. Sene, pelo fornecimento do bioaroma de gorgonzola.

À Prof^a Helena Maria Cardello, pela ajuda prestada na análise sensorial.

À Nadia Regina Rodrigues e a Evani Glaza R. Rodrigues, do CPQBA, pelo empréstimo e ajuda na utilização do cromatógrafo a gás, sem o qual o projeto teria se prolongado.

Ao Prof^o Carlos Grosso, pelo empréstimo do "spray dryer" e à Izabela Dutra Alvim pela ajuda com o equipamento.

À FAPESP pelo apoio financeiro e a todos que, de alguma forma, colaboraram para o êxito deste trabalho.

*"As fragrâncias falam uma linguagem própria.
Elas conseguem expressar melhor
do que qualquer palavra os sentimentos mais sutis.
A escolha que uma pessoa faz
por um determinado perfume
e a maneira como ele reage em sua pele
revelam muitas coisas sobre ela".*

Marcel Lavabre

RESUMO

Neste trabalho, foi estudada a estabilização dos compostos de aroma do queijo gorgonzola produzidos por fermentação com linhagem de *Aspergillus sp*, por complexação em β -ciclodextrina e encapsulação em lipossomas. A complexação em β -ciclodextrina foi feita pelo método da co-precipitação, e primeiramente estudada com soluções concentradas dos principais constituintes sintéticos do aroma do queijo gorgonzola, as metilcetonas: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona, em separado e em mistura. Posteriormente, os compostos de aroma obtidos por fermentação, foram utilizados. Os compostos de aroma complexados ou encapsulados em solução foram submetidos à secagem em “spray dryer”, e adicionalmente os complexos de β -CD foram secos em estufa. Os resultados mostraram que a formação dos complexos ocorre de maneira praticamente instantânea. Separadamente, com exceção da 2-pentanona, a razão molar de saturação da inclusão molecular foi 1:2 (uma molécula de metilcetona para duas de β -CD). As razões molares de retenção total no complexo (superfícies interna e externa) foram 0,06:1, 0,57:1, 0,74:1 e 0,63:1, para a pentanona, heptanona, nonanona e undecanona: β -CD, respectivamente. Quando em mistura, as metilcetonas competem entre si, tendo as mais hidrofóbicas preferência na complexação. A formação dos complexos de inclusão em β -CD foi caracterizada pelas técnicas de difração de Raios-X, espectroscopia de infravermelho, calorimetria diferencial de varredura e ressonância magnética nuclear. Os estudos de estabilidade com relação à proteção contra decomposição térmica, oxidação, volatilidade e a retenção durante estocagem, confirmaram a formação dos complexos de inclusão através do aumento significativo da estabilidade das moléculas em relação à forma livre. Comparando-se os métodos de secagem empregados, tem-se que a secagem dos complexos em estufa resultou em 60% de recuperação das metilcetonas enquanto que por “spray drying” o rendimento foi de 25%. O bioaroma de gorgonzola, foi complexado na forma de solução diluída obtida diretamente do caldo de fermentação, e apresentou razão mássica de retenção total no produto seco por “spray drying” de 55 μ g de metilcetonas / g de β -CD. Os rendimentos obtidos foram 22% e 3%, para a secagem feita por “spray-drying” e estufa, respectivamente. A encapsulação das metilcetonas sintéticas em lipossomas multilamelares foi estudada utilizando concentrações nos níveis obtidos no caldo de fermentação, e caracterizada tanto em suspensão quanto na forma de pó obtido por “spray dryer”. O rendimento da encapsulação foi de 72% em suspensão e 24% no pó seco, tendo este último apresentado a razão mássica 0,66 μ g / g de lecitina. As estruturas obtidas dos lipossomas em suspensão e das partículas secas foram aproximadamente esféricas, com tamanhos e distribuição característicos de lipossomas multilamelares.

A análise sensorial dos compostos estabilizados do bioaroma de gorgonzola foi feita utilizando os complexos em β -CD (secos em estufa e em “spray dryer”) e os lipossomas secos em “spray dryer”, ambos adicionados à uma base de consistência pastosa. Os produtos testados foram sensorialmente aceitáveis, sendo o obtido por complexação em β -CD e seco por “spray drying” o que apresentou o aroma de gorgonzola significativamente mais intenso e a melhor aceitação por parte dos provadores.

Esses resultados mostram que tanto a β -CD quanto os lipossomas são eficientes na estabilização de compostos de aroma, e os produtos secos obtidos apresentam características sensoriais aceitáveis, sendo portanto potencialmente importantes para utilização no processamento de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: estabilidade, secagem por spray, alimentos – conservação, aromas.

ABSTRACT

In this work, it was studied the stabilization of the blue cheese flavour compounds obtained from fermentation of *Aspergillus sp.*, by complexation in β -cyclodextrin and encapsulation in liposomes. The complexation in β -cyclodextrin was carried out by coprecipitation method. Initially, the complexation was studied using concentrated solutions of the main synthetic compounds of the blue cheese flavour, the methylketones: 2-pentanone, 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone, in separate and in mixture. Secondary, the fermentation broth were used. The solutions of complexed or encapsulated flavour compounds were dried by spray dryer, and some of the β -CD complexes were also dried in conventional oven. The results showed that the formation of complexes occurs almost instantaneously. Separately, all but 2-pentanone, the molar ratio of saturation of the molecular inclusion was 1:2 (one molecule of methylketone to two of β -CD). The molar ratios of total retention in the complexes were (inner and outer surfaces) were 0,06:1, 0,57:1, 0,74:1 e 0,63:1, for pentanone, heptanone, nonanone and undecanone: β -CD, respectively. When in mixture, the most hydrofobic methylketones were preferred in the complexation. The formation of inclusion complexes in β -CD was characterized by the following techniques: X-ray diffraction, infra-red spectroscopy, differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance. The stability studies related with protection against thermal decomposition, oxidation, volatility and the retention during storage, confirmed the formation of inclusion complexes through the increasing in stability of the molecules compared with the free ones. The drying methods, comparatively, resulted in complexes with 60% of recovery of methylketones in conventional oven and 25% in spray dryer. The weight ratio of the total retention for the complexed blue cheese flavour, directly from the fermentation and spray dried, was 55 μ g methylketone / g β -CD. The obtained yields were 22% and 3%, for the products dried by spray-drying and conventional oven, respectively. The encapsulation of the synthetic methylketones in multilamellar liposomes was studied using the solution in the same concentration level of the fermentation solution, and characterized not only in suspension but also in powder produced by spray dryer. The encapsulation yield was 72% in the suspension and 24% in the powder, and the latter resulted in weight ration of 0,66 μ g / g lecithin. The obtained structures of the liposomes in suspension and of the powder particles were approximately spherical, with typical size and distribution of multilamellar liposomes.

The sensory evaluation of the stabilized blue cheese bioflavour compounds was carried out using β -CD complexes (dried in conventional oven and spray dryer) and liposomes dried in spray dryer, both mixed in a base of paste consistency. The flavour for all the tried products were acceptable. The β -CD complex dried by spray drying was the one which showed the highest intensity and the most preferred blue cheese flavour.

These results show that not only the β -CD but also the liposomes were efficient in the stabilization of the flavour compounds, and the obtained dried products obtained were acceptable, in relation with the flavour. Therefore, they are potentially important for being used in the food processing.

KEY-WORDS: stabilization, spray drying, preservation of food, flavour.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
NOMENCLATURA	xii
ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Aromas: Funções, Composição e a Contribuição da Biotecnologia	6
2.2. Aromas Produzidos por Biotecnologia	8
2.2.2. Produção de Aromas de Queijo por Microorganismos	11
2.2.2.1. Biossíntese do Aroma de Gorgonzola	13
2.2.2.2. Processo Biotecnológico para a Produção do Aroma Natural de Gorgonzola	15
2.2.3. Aspectos da Produção de Aromas por Processos Biotecnológicos	15
2.3. Desvantagens dos Processos de Produção e Estocagem de Bioaromas Livres e a Encapsulação como Alternativa para a Estabilização e Separação dos Aromas	17
2.4. Encapsulação Molecular em Ciclodextrinas	22
2.4.1. Propriedades Físicas e Químicas das Ciclodextrinas	24
2.4.2. Formação dos Complexos de Inclusão	25
2.4.2.1. Preparação dos Complexos de Inclusão de Compostos de Aromas	26
a) Complexação em Solução	26
b) Complexação em Estado Sólido	27
c) Complexação a Gás	28
2.4.2.2. Caracterização dos Complexos de Inclusão	28
2.4.3. Viabilidade de Utilização das Ciclodextrinas	29

2.4.4. Complexação de β -Ciclodextrina com Cetonas	29
2.5. Lipossomas: Propriedades e Potencialidade como Estabilizantes de Aromas na Indústria de Alimentos	31
3. MATERIAIS e EQUIPAMENTOS	33
4. MÉTODOS	35
4. 1. COMPLEXAÇÃO EM β -CD	35
4.1. 1. Predição Teórica da Inclusão das Metilcetonas na Cavidade da β -CD	35
4.1. 2. Estudo da Complexação das Metilcetonas Sintéticas em β -CD	35
4.1.2.1. Estudo da Influência do Etanol e da Diluição das Metilcetonas na Formação dos Complexos por Co-Precipitação	36
4.1.2.2. Método de Preparação dos Complexos	37
4.1.2.3. Quantificação dos Complexos Formados	38
4.1.2.3.1. Extração das Metilcetonas dos Complexos	38
4.1.2.3.2. Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia a Gás	38
4.1.2.4. Influência da Razão Molar Inicial (Metilcetona: β -CD)	39
4.1.2.4.1. Determinação da Estequiometria Total dos Complexos	39
4.1.2.4.2. Cinética de Extração das Metilcetonas Adsorvidas na Superfície dos Complexos	39
4.1.2.5. Estudo da Cinética de Formação dos Complexos	40
4.1.2.6. Cálculo das Constantes de Associação na Complexação	40
4.1.2.7. Efeito do Reaproveitamento da Solução de Complexação na Relação Molar entre as Metilcetonas Retidas	43
4.1.2.8. Estudo do Efeito das Variáveis na Secagem dos Complexos por “Spray Drying”	43
4.1.2.8.1. Comparação entre a Obtenção dos Complexos por Secagem em Estufa e em “Spray Dryer”	44
4.1.3. Caracterização dos Complexos Cristalinos	45

4.1.3.1. Difração de Raios-X	45
4.1.3.2. Espectroscopia de Infra-Vermelho	46
4.1.3.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	46
4.1.3.4. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C ¹³)	46
4.1.4. Estudos de Estabilidade das Metilcetonas Complexadas	46
4.1.4.1. Estabilidade à Volatilização das Metilcetonas nos Complexos	47
4.1.4.2. Estabilidade Térmica das Metilcetonas nos Complexos	47
4.1.4.3. Proteção à Oxidação das Metilcetonas nos Complexos	48
4.1.4.4. Estabilidade das Metilcetonas no Complexo durante Estocagem	48
4.1.5. Estudos da Complexação do Bioaroma de Gorgonzola em β -CD	48
4.1.5.1. Método de Preparação dos Complexos com o Bioaroma	49
4.1.5.2. Caracterização dos Complexos Formados	49
4.1.5.2.1. Extração e Concentração dos Voláteis em “Purge and Trap”	49
4.1.5.2.2. Caracterização da Geometria dos Complexos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
4.2.1. Estudo da Encapsulação em Lipossomas das Metilcetonas Sintéticas na Concentração do Bioaroma de Gorgonzola	51
4.2.1.1. Preparação dos Lipossomas em Suspensão	51
4.2.2. Secagem dos Lipossomas	51
4.2.3. Caracterização dos Lipossomas	52
4.2.3.1. Quantificação das Metilcetonas Encapsuladas	52
4.2.3.2. Quantificação da Lecitina	52
4.2.3.3. Medida de Distribuição do Tamanho das Partículas por Espalhamento Quasi-Elastico de Luz (QELS)	53
4.2.3.4. Caracterização da Geometria dos Lipossomas por Microscopia Óptica	53
4.3. Estudos Comparativos por Análise Sensorial dos Compostos Obtidos na	54

Encapsulação do Bioaroma de Gorgonzola em β -CD e em Lipossomas	
4.3.1. Análise Sensorial dos Compostos de Encapsulação do Bioaroma de Gorgonzola	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.1. Predição Teórica da Encapsulação das Metilcetonas em β -Ciclodextrina	57
5.1.1.1. Inclusão da 2-Pentanona em β -Ciclodextrina	58
5.1.1.2. Inclusão da 2-Heptanona em β -Ciclodextrina	60
5.1.1.3. Inclusão da 2-Nonanona em β -Ciclodextrina	62
5.1.1.4. Inclusão da 2-Undecanona em β -Ciclodextrina	64
5.1.2. Estudos da Complexação das Metilcetonas Sintéticas em β -CD	66
5.1.2.1. Influência das Variáveis da Co-Precipitação no Rendimento de Retenção das Metilcetonas	66
5.1.2.2. Influência da Razão Molar Inicial (Metilcetona: β -CD) na Complexação e Determinação da Estequiometria dos Complexos Formados	71
5.1.2.2.1. Complexos com as Metilcetonas em Separado	71
5.1.2.2.1 a) Cinética de Extração das Metilcetonas da Superfície dos Complexos com a β -CD	74
5.1.2.2.1 b) Estimativa da Estequiometria Verdadeira do Complexo	76
5.1.2.2.2. Complexos com as Metilcetonas em Mistura	78
5.1.2.3. Cinética da Complexação das Metilcetonas	80
5.1.2.3.1. Metilcetonas em Separado	80
5.1.2.3.2. Metilcetonas em Mistura	81
5.1.2.4. Cálculo das Constantes de Associação das Metilcetonas na Complexação	82
5.1.2.5. Efeito do Reaproveitamento na Razão de Retenção das Metilcetonas em Mistura	84
5.1.2.6. Influência das Variáveis de Secagem dos Complexos por “Spray Drying”	85
5.1.2.6.1. Comparação entre os Métodos de Secagem em Estufa e em “Spray Dryer”	89
5.1.3. Caracterização dos Complexos Cristalinos	90

	x
5.1.3.1. Caracterização dos Complexos por Difração de Raios-X	90
5.1.3.2. Caracterização dos Complexos por Espectroscopia de Infra-Vermelho	92
5.1.3.3. Caracterização dos Complexos por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	93
5.1.3.4. Caracterização dos Complexos por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C ¹³)	96
5.1.4. Estudos da Estabilidade dos Complexos Formados	98
5.1.4.1. Estabilidade à Volatilização das Metilcetonas	98
5.1.4.2. Estabilidade Térmica das Metilcetonas Complexadas	100
5.1.4.3. Estabilidade à Oxidação das Metilcetonas nos Complexos	102
5.1.4.4. Estabilidade à Estocagem das Metilcetonas Complexadas	103
5.1.4.4.1. Frascos Abertos	104
5.1.4.4.2. Frascos Fechados	106
5.1.5. Estudo da Complexação do Bioaroma de Gorgonzola	107
5.1.5.1. Definição das Correlações de Calibração da Análise dos Complexos por “Purge and Trap”	107
5.1.5.2. Comparação dos Complexos Formados por Secagem em Estufa e em “Spray Dryer”	109
5.1.5.3. Caracterização da Geometria das Partículas Formadas	111
5.2. Estudo da Encapsulação em Lipossomas das Metilcetonas Sintéticas na Concentração do Bioaroma	112
5.2.1. Influência da Secagem e da Presença de Manitol na Preparação dos Lipossomas	112
5.2.2. Caracterização da Geometria dos Lipossomas Formados	116
5.2.2.1. Lipossomas em Suspensão	116
5.2.2.2. Lipossomas Secos por “Spray Drying”	117
5.3. Estudos Comparativos da Encapsulação do Bioaroma de Gorgonzola em β -CD	118

e em Lipossomas por Análise Sensorial	
5.3.1. Comparação das Proporções de Metilcetonas Retidas na Encapsulação em β -CD e em Lipossomas	118
5.3.2. Análise Sensorial dos Compostos do Bioaroma Encapsulados	119
5.3.2.1. Teste de Ordenação	119
5.3.2.2. Teste de Aceitação pelo Consumidor	121
5.3.2.3. Teste de Atitude de Compra	124
6. CONCLUSÕES	127
7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	129
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXOS	139

NOMENCLATURA

C: fator de correção

K_d : constante de dissociação

K_1 : constante de equilíbrio de solubilidade

K_s : constante de associação da complexação

S_0 : solubilidade da metilcetona em meio sem β -CD

ABREVIATURAS

ACD e C6A: α - ciclodextrina

ANS: 1-anilinoftaleno -8-sulfonato

BCD e C7A: β - ciclodextrina

CD: ciclodextrina

Cpx.: complexo

DSC: calorimetria diferencial de varredura

GC: cromatografia a gás

GCD e C8A: γ -ciclodextrina

HP- β -CD: hidroxipropil β -ciclodextrina

ICD: dicroísmo circular induzido

IV: infra-vermelho

LUVs: vesículas unilamelares grandes

MC: metilcetona

MC-CD: complexo metilcetona-ciclodextrina

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MLVs: vesículas multilamelares

MNPA: acetato *m*-nitrofenil

PDA: ágar batata dextrosado

QELS: espalhamento quasi-elástico de luz

RCOR': cetona assimétrica

RMN: ressonância magnética nuclear

RMN- C^{13} : ressonância magnética nuclear de carbono 13

SQ: soma quadrática

SQM: soma quadrática média

SUVs: vesículas unilamelares pequenas

TGA: análise de gravimetria térmica

TLC: cromatografia de camada delgada

1. INTRODUÇÃO

Os aromas naturais ou bioaromas são substâncias obtidas por meio do metabolismo natural de animais e plantas, pela ação de enzimas e microorganismos ou pelo processamento de ingredientes naturais (TYRRELL, 1995).

Por muito tempo, as plantas foram as únicas fontes de compostos de aroma. Porém, muitas vezes, estes compostos se apresentam disponíveis apenas em pequenas quantidades ou em uma forma de difícil obtenção, que resulta em elevados custos para sua recuperação. Estas características fazem com que os aromas extraídos de fontes naturais tenham normalmente preços bastante elevados em relação aos obtidos sinteticamente (JANSSENS et al., 1992). Um exemplo disso é a vanilina, que na forma sintética é comercializada na faixa de US\$ 12,00/kg e na natural, na faixa de US\$ 4000,00 (FERON et al., 1996).

Contudo, em decorrência do aumento da preferência do consumidor por produtos com designação natural surgiu o interesse no desenvolvimento de aromas produzidos por biotecnologia. Este tipo de produção compreende o uso de células de plantas, culturas de tecidos, microorganismos e enzimas na síntese dos compostos de aroma (JANSSENS et al., 1992), podendo levar à classificação de naturais. Porém, para que recebam essa denominação, é necessário que utilizem matérias-primas ou substratos naturais e que somente processos físicos sejam empregados no isolamento e purificação dos materiais formados, como a fermentação e modificações enzimáticas (GATIFIELD, 1995).

De modo geral, os processos biotecnológicos não resultam em custos tão baixos quanto os processos químicos utilizados para a obtenção dos produtos sintéticos. Como exemplo, o butirato de etila tem um custo de aproximadamente US\$ 180,00/kg na forma biotecnológica e de US\$ 4,00/kg na sintética, sendo que o extraído de frutas custa em torno de US\$ 5000,00/kg (SCHARPF et al., 1986). Mesmo assim, estes custos podem ser compensados pelos benefícios resultantes da maior atratividade ao consumidor (GATIFIELD, 1995).

Algumas dificuldades técnicas fazem com que atualmente haja poucos aromas produzidos por processos biotecnológicos. Entre elas citam-se a dificuldade na recuperação de produtos voláteis, que normalmente se encontram em baixa concentração e apresentam problemas para a extração e estocagem, e a mistura com outros compostos do meio podendo

haver efeitos prejudiciais às propriedades sensoriais do produto final (SCHARPF et al., 1986). Além disso, a maioria dos compostos de aroma naturais quando expostos ao oxigênio do ar, à luz e ao calor sofrem oxidação, decomposição, tornam-se resinosos, ou evaporam (SZEJTLI et al., 1979). Portanto, para que seja possível a comercialização desses produtos, é necessário o emprego de algum processo de estabilização.

O método mais comumente utilizado é a estabilização dessas substâncias, principalmente em lactose (SZENTE et al., 1988a) e maltodextrina (ALLEGRE & DERATANI, 1994; FURUTA et al., 1994). Porém, estudos da inclusão molecular em ciclodextrinas têm mostrado, comparativamente, melhores resultados com relação à retenção dos compostos, à resistência contra oxidação e volatilização, termoestabilidade, tempo de estocagem e higroscopicidade muito baixa (SZENTE et al., 1988a). Além disso, os complexos de ciclodextrinas mostraram-se com melhor termoestabilidade em relação à estabilização com outras moléculas de amido (MAIER et al., 1987).

A encapsulação molecular ou inclusão ainda tem as vantagens de formar complexos bastante estáveis, de solubilidade em água muito reduzida, levando a uma rápida separação em forma cristalina, facilitando a sua recuperação (LINDNER et al., 1981) e evitando ou diminuindo a fotodegradação pela formação do complexo (THOSS et al., 1994). Além disso, a β -ciclodextrina (β -CD) também pode ser usada como adsorvente na recuperação de aromas do meio de fermentação, sendo uma alternativa à destilação (KRINGS et al., 1993) e após a extração com CO₂ supercrítico ou líquido (YASUMA et al., 1987; KAMIHIRA et al., 1990), podendo, assim, reduzir os custos de recuperação de determinados bioaromas.

As ciclodextrinas são oligômeros cíclicos constituídos de unidades de glucopiranoses. O diâmetro da cavidade interna das ciclodextrinas depende do número de unidades de moléculas formadoras, podendo ter de 6 a 8 unidades. Assim, as ciclodextrinas são denominadas de acordo com o número de unidades sendo a α -ciclodextrina constituída de 6 glucopiranoses, a β de 7 e a γ de 8, tendo, esta última o maior diâmetro. Os grupos hidroxil primário e secundário se encontram em lados opostos da molécula com forma de um tronco de cone invertido, a ligação da cavidade anel é formada por ligações de oxigênio. Enquanto sua superfície é hidrofílica, o interior da cavidade tem caráter hidrofóbico. Em consequência disto, as ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com substâncias que são menos polares que a água e que possuem dimensões geométricas correspondentes ao diâmetro da sua cavidade.

O interior da cavidade das moléculas de ciclodextrinas dissolvidas em água é menos hidrofílico que a superfície externa do anel, tornando a presença de moléculas de água na cavidade energeticamente desfavorável. As partes apolares de moléculas orgânicas, quando dissolvidas em água, são pouco hidratadas, sendo assim também energeticamente desfavoráveis. Desta forma, as moléculas orgânicas pouco hidratadas penetram na cavidade da ciclodextrina, expulsando do interior as moléculas de água, resultando num sistema com energia livre mais baixa. Esta parece ser a energia motriz principal da formação do complexo. Além disso, a tensão do anel também pode decrescer, pontes de hidrogênio serem formadas, contribuindo para a estabilização do complexo.

Do ponto de vista prático, a maioria dos óleos essenciais e das substâncias aromáticas possuem tamanhos aptos a ocupar a cavidade da molécula de β -ciclodextrina para formar complexos de inclusão (SZEJTLI et al., 1979), sendo esta a ciclodextrina utilizada na maior parte dos trabalhos de encapsulação de aromas, devido ao seu menor custo de produção, que é devido à menor solubilidade em água, facilitando o processo de purificação.

Os complexos de inclusão de ciclodextrinas em solução possuem composição estequiométrica definida em relação à molécula “hóspede” na cavidade da “hospedeira”. No caso de sólidos, complexos cristalinos, a composição estequiométrica estrita (razão “hóspede”: “hospedeiro” 1 : 1 ou 1 : 2) é rara, uma vez que as moléculas de ciclodextrina que contêm apenas água incorporada na cavidade representam manchas de deficiência dentro da estrutura do cristal. Na verdade, a estrutura é uma mistura de complexos de inclusão, ciclodextrina e moléculas “hóspede”, que podem estar dentro do cristal ou adsorvidas em sua superfície (SZEJTLI et al., 1979).

Recentemente, os lipossomas também têm sido estudados como alternativa para a estabilização de aromas. Os lipossomas ou vesículas lipídicas são estruturas de fosfolipídios, compostas de bicamadas concêntricas intercaladas por compartimentos líquidos aquosos. As cadeias de ácido graxos, lipofílicas, agrupam-se internamente enquanto os grupos hidrofílicos da cabeça são arranjados para fora e para o centro, sendo direcionadas para o cerne aquoso. Apesar da vasta gama de aplicações de compostos encapsulados em lipossomas, apenas recentemente houve um maior interesse em aplicações na indústria de alimentos, para o desenvolvimento de novos produtos com melhores características. Um exemplo disso é a liberação controlada de proteinases dos lipossomas para aumentar o desenvolvimento do aroma do queijo “Cheddar”

(KIM et al., 1991), além do aumento do volume de massas congeladas e assadas, e de pão, que também, após o reaquecimento, manteve as propriedades de aroma como no produto fresco (KROTZ, 1995).

O crescimento das aplicações dos lipossomas na indústria de alimentos possivelmente deu-se pela diminuição dos custos de produção, com a utilização de lecitinas como matéria-prima, que compreendem uma mistura complexa de fosfolipídios, triglicerídeos, glicolipídios, esteróis, carboidratos e traços de outros elementos, e o desenvolvimento de métodos mais simples de preparação, sem a necessidade de etapas que requerem alta energia, com maior facilidade de aumento de escala, como é o caso do método dos pró-lipossomas, que utiliza um agitador mecânico para a formação das vesículas (ARNAUD, 1995).

A encapsulação de aromas abre novas aplicações para os lipossomas, uma vez que os aromas encapsulados permanecem retidos mesmo após o contato com a água. Isso também permite que aromas solúveis em óleo possam ser suspensos em sistemas aquosos (ARNAUD, 1995).

As potencialidades da β -CD e dos lipossomas para a estabilização de compostos de aromas motivaram o desenvolvimento deste trabalho, no qual foi feito inicialmente um estudo do processo de complexação em β -CD dos principais constituintes do aroma do queijo gorgonzola, na forma de compostos sintéticos em separado e em mistura. Os compostos formados foram caracterizados e avaliados com relação à proteção contra decomposição térmica, oxidação, volatilidade e a retenção durante estocagem. Posteriormente, estudou-se a complexação em β -CD dos compostos de aroma do gorgonzola produzidos em meio de fermentação real, comparando-se os resultados obtidos na secagem em estufa e em “spray dryer”.

De modo análogo, foi estudada a encapsulação das principais metilcetonas sintéticas componentes do aroma do gorgonzola em lipossomas multilamelares, com o produto obtido tanto em suspensão quanto na forma de pó seco em “spray dryer”.

Para a finalização do trabalho foi feita análise sensorial dos produtos secos resultantes da estabilização do bioaroma de gorgonzola obtido por fermentação por meio da complexação em β -CD e encapsulação em lipossomas, para avaliar a aceitação do produto pelos consumidores.

1.1. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar os processos de estabilização do bioaroma de gorgonzola, por complexação em β -ciclodextrina e encapsulação em lipossomas, e avaliar os produtos obtidos pela análise sensorial.

O desenvolvimento do trabalho envolveu as seguintes etapas:

- Revisão bibliográfica sobre o assunto.
- Preparação e caracterização dos complexos de inclusão em β -ciclodextrina usando metilcetonas sintéticas, em separado e em mistura.
- Obtenção da cinética de complexação e influência da razão molar inicial, a partir de dados experimentais.
- Caracterização dos efeitos da complexação em β -ciclodextrina sobre a termoestabilidade, proteção contra oxidação, volatilização e estocagem.
- Preparação e caracterização dos lipossomas como estabilizantes dos principais compostos de aroma.
- Preparação e caracterização de complexos de inclusão em β -ciclodextrina e de lipossomas encapsulando compostos do aroma de gorgonzola obtidos por fermentação.
- Estudos de secagem em estufa e em “spray dryer” do bioaroma estabilizado.
- Análise sensorial dos compostos do bioaroma de gorgonzola encapsulados em β -ciclodextrina e em lipossomas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aromas: Funções, Composição e a Contribuição da Biotecnologia

Os mecanismos de percepção de gostos e odores ainda não estão claramente entendidos. Sabe-se que o sabor é percebido a partir de uma resposta integrada do gosto e do aroma, sendo o gosto o sabor básico e o aroma o típico.

O gosto é sentido por meio dos compostos não voláteis em temperatura ambiente que são percebidos por receptores na mucosa bucal e que geralmente estão presentes em alimentos em concentrações maiores. Já os aromas são provenientes de compostos voláteis que são percebidos pelos receptores olfativos e estão presentes em alimentos em concentrações baixíssimas.

O aroma típico de diversos alimentos é obtido por uma resposta integrada de um número muito grande de compostos voláteis, sendo que a faixa de concentração destes compostos nos alimentos é bastante variável. Além disso, a natureza química também é muito variada, podem ser: ésteres, ácidos, álcoois, éteres, lactonas, pirazinas, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, entre outros. Exemplos de alimentos em que o aroma característico é obtido a partir de diversos compostos são a maçã, com 356 compostos de aroma identificados, a carne, com 486 e o vinho branco, com 644. Sendo assim, há uma grande dificuldade de reprodução da composição de diversos aromas por via sintética.

A maioria dos alimentos não tem compostos predominantes na formação do aroma típico, porém, alguns têm substâncias que lembram o cheiro típico e são chamados de compostos de impacto. Tais compostos não são necessariamente os que estão presentes em maior concentração. Exemplos de compostos de impacto são a pirazina, que lembra o pimentão, o eugenol acetato, que lembra o cravo da Índia e o metil butanoato, que lembra banana.

Nos últimos anos, houve progresso na identificação de vários compostos voláteis de alimentos para tentar encontrar compostos de impacto, a partir dos quais é feita uma combinação de compostos necessários para que haja a aproximação do aroma característico (FENNEMA, 1976).

Atualmente, já é possível determinar mais e mais compostos que são necessários para gerar um aroma característico, saber sobre precursores e como os compostos característicos do aroma são formados e liberados (ACREE & TERANISHI, 1993).

De acordo com a definição clássica da indústria, aromas e fragrâncias basicamente consistem de quatro categorias principais: óleos essenciais ou outros produtos naturais, aroma químico (natural ou sintético), compostos de aroma e compostos de fragrância. Basicamente, as duas primeiras categorias fornecem materiais de aroma para as duas últimas, que são usadas em produtos para o consumidor. Porém, alguns óleos essenciais e aromas químicos podem ser aplicados diretamente nos produtos, tais como os conhecidos: vanilina e mentol.

A biotecnologia também tem contribuído com o desenvolvimento de meios de produção de aromas, pela utilização de microorganismos vivos, ou partes deles, para fazer ou modificar produtos, para melhorar plantas ou animais, ou para desenvolver microorganismos para usos específicos.

Os aromas obtidos por biotecnologia, com produtos derivados de ação enzimática e de fermentação, são considerados substâncias naturais, o que tem um efeito positivo na demanda pelo consumidor (WINTERHALTER & SCHREIER, 1993). Além disso, tais processos biotecnológicos são capazes de gerar sistemas complexos, com muitos dos compostos necessários para a caracterização dos aromas e em concentrações adequadas, podendo, assim, aproximar-se do aroma desejado, o que muitas vezes não é alcançado na produção de aromas artificiais.

Estudos da química de aromas geram informações necessárias para que a engenharia genética desenvolva plantas e animais que possibilitam a obtenção de aromas otimizados, bem como as condições de processamento dos alimentos. Desta forma, pode-se ter produtos com aroma de ótima qualidade.

Aromas sempre foram e serão uma grande preocupação da indústria de alimentos. Sua qualidade, que já pode ser controlada cientificamente, é de grande importância para a aceitação dos produtos pelos consumidores (FENNEMA, 1976).

2.2. Aromas Produzidos por Biotecnologia

A trajetória do processamento de aromas teve início há pelo menos três séculos. Há relatos da produção de aromas concentrados no século XVIII. No século XIX em função do progresso na química foi possível iniciar a síntese de alguns aromas artificiais. No século XX houve um grande avanço nesta área, como resposta ao desenvolvimento da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, que permitiu a separação e a identificação de compostos que desempenhavam papel importante nas qualidades organolépticas de aromas naturais (DUBOIS, 1988).

Atualmente, o mercado de aromas é dominado por aromas artificiais, porém, nos últimos anos, tem-se observado uma tendência à utilização de aromas naturais (JANSSENS et al., 1992; FERON et al., 1996; KRINGS & BERGER, 1998). Segundo ARMSTRONG & BROWN (1994) a demanda das indústrias de alimentos por aromas naturais tem aumentado de 5 a 10% para 75 a 80%. Tal tendência é atribuída principalmente à conscientização dos consumidores no âmbito de saúde e nutrição que têm evitado os alimentos com aromas artificiais e estimulado o desenvolvimento de produtos naturais.

De acordo com TYRRELL (1995), atualmente as fontes de aromas naturais podem ser classificadas em três categorias: a) materiais que são formados durante o metabolismo natural de animais e plantas, que podem ser usados na forma seca ou extrudados e refinados; b) compostos de aroma formados durante a ação de enzimas e microorganismos; c) compostos de aroma básicos formados durante o processamento térmico de ingredientes naturais.

Por muito tempo as plantas foram as únicas fontes de compostos de aroma, sendo estes normalmente isolados dos vários tipos de óleos essenciais. Embora sensorialmente ativos, tais compostos estão muitas vezes disponíveis em quantidades ínfimas ou numa forma ligada que dificulta sua obtenção, resultando em preços elevados, o que normalmente caracteriza os aromas naturais (JANSSENS et al., 1992).

Muitos óleos de plantas e compostos de aromas naturais são comercializados somente a preços superiores a US\$ 5000,00/kg. A diferença de preço entre aroma natural e artificial, na maioria das vezes, pode ser pronunciada. A vanilina sintética, por exemplo, é comercializada na faixa de US\$ 12,00/kg e a natural por US\$ 4000,00 (FERON et al., 1996).

De acordo com JANSSENS et al. (1992), além do aspecto econômico, outros fatores dificultam o uso de plantas como fonte de aromas. Entre eles podem ser citados: a) forte dependência de fatores de difícil controle, tais como variações climáticas e problemas de doenças, b) necessidade de importação de plantas de regiões tropicais ou subtropicais sujeitas, às vezes, a problemas sócio-políticos, c) dificuldade de interferência no metabolismo da planta para incrementar a quantidade de compostos de aroma, em decorrência, muitas vezes, do pequeno conhecimento da via metabólica, d) diminuição das reservas de diversas plantas de aroma pelo aumento da demanda de aromas naturais.

Na produção de compostos de aromas, já comercializados, a maior via de produção é a química, apresentando-se adequada para a síntese de inúmeros compostos por processos relativamente simples, como é o caso do acetato de etila e do acetaldeído. Porém, a síntese química de aromas apresenta alguns obstáculos como a produção de mistura racêmica, com propriedades inadequadas, além de algumas vezes envolver vários passos que implicam em custos de produção acentuados (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

A preferência dos consumidores por alimentos com aromas naturais e as desvantagens inerentes a cada uma das fontes de aroma já citadas levaram, nas últimas décadas, ao desenvolvimento de pesquisas sobre a produção alternativa de aromas por biotecnologia. A produção biotecnológica de aromas pode compreender o uso de células de plantas, culturas de tecidos, microorganismos e enzimas na síntese de tais produtos (JANSSENS et al., 1992).

DRAWERT (1998) apresenta algumas das vantagens da via biotecnológica para a produção de aromas quando em comparação com as demais vias já consideradas (naturais de plantas e artificiais): a) independência de influências externas tais como variações climáticas, doenças, fertilizantes, restrições comerciais, instabilidade sócio-política, b) possibilidade da produção em escala industrial, sob condições otimizadas que permitem a obtenção de produtos complexos, uniformes e com produtividade constante, c) possibilidade da obtenção de informações das vias bioquímicas de produção de aroma que podem ser aplicadas em plantas possibilitando o aumento da produção de óleos essenciais, d) produção de compostos de aroma denominados naturais, opticamente ativos, muitas vezes, estruturalmente idênticos aos compostos das plantas. Além disso, quando comparados aos produzidos por síntese química, os produzidos por biotecnologia são sistemas de aroma complexos, que possuem, muitas vezes, diversos dos compostos que caracterizam o sabor típico. Assim, dependendo do aroma desejado, conseguem

aproximar-se muito mais do aroma característico que os artificiais, que apresentam a dificuldade de conseguir uma mistura adequada das diversas substâncias envolvidas na percepção do sabor típico.

No entanto, segundo GATIFIELD (1995), para assegurar que os compostos de aroma produzidos por biotecnologia recebam a denominação de naturais, algumas condições devem ser garantidas. Tais condições estipulam que a matéria-prima ou substrato sejam naturais e somente processos físicos (destilação, extração e cristalização) sejam empregados para o isolamento e purificação dos materiais formados. Desde que tais condições sejam respeitadas, as leis de regulamento de aditivos, de vários países, consideram a biotecnologia como um processo de obtenção de aromas naturais. Como exemplo de processos biotecnológicos de obtenção de aromas naturais tem-se a fermentação e as modificações enzimáticas.

Segundo JANSSENS et al. (1992), os microorganismos são promissores na produção de compostos de aroma complexos ou simples, podendo ser capazes de sintetizar aromas a partir da fermentação de materiais simples (açúcares e aminoácidos) ou da conversão de substratos específicos por um processo denominado bioconversão. Na Tabela 1 são apresentados alguns aromas produzidos por microorganismos.

Tabela 1: Aromas produzidos por microorganismos e seus constituintes químicos

Microorganismo	Descrição Sensorial	Voláteis Produzidos
Bactérias		
<i>Streptococcus, Lactobacillus</i>	ácido, manteiga	acetaldeído, diacetil, ácido láctico
<i>Propionibacterium</i>	azedo, ácido	acetoína, aldeídos
Leveduras		
<i>Saccharomyces</i>	pão, fermentação alcoólica	lactonas, alcoóis, tiocompostos
<i>Geotrichum</i>	melão	etil ésteres, alcoóis
<i>Sporobolomyces</i>	pêssego	lactonas
<i>Hansenula</i>	floral, odor de solo	etil ésteres
<i>Kluyveromyces</i>	frutas, rosas	feniletanol, ésteres, terpenos, 1-octen-3-ol
Fungos		
<i>Aspergillus</i>	cogumelo	alcoóis insaturados
<i>Penicillium</i>	cogumelo	2-fenil-etanol, metilcetonas
<i>Ceratocystis</i>	banana, pêsego, ameixa, pêra	alcoóis, lactonas, ésteres

Fonte: WELSH (1994)

2.2.2. Produção de Aromas de Queijo por Microorganismos

Considerando o uso de microorganismos para a produção de aromas, GATIFIELD (1988) relata que existem duas tendências principais: na primeira a produção de misturas complexas ou sistemas de aroma com múltiplos componentes, em que se propõe aromatizar “in situ” pela adição de microorganismos que melhoram ou acentuam as qualidades aromáticas de um determinado alimento, e na segunda, a biossíntese de compostos de aromas específicos que podem ser adicionados aos alimentos como aromatizantes.

Na primeira estratégia de produção de aromas complexos, tem-se como exemplo a produção do queijo tipo gorgonzola, cujo processo de maturação dá-se pela adição de um fungo à massa do queijo fresco.

Diversos microorganismos podem ser adicionados ao processo de maturação, sendo que o mais comumente usado é o *Penicillium roqueforti*. Tal fungo, quando adicionado ao queijo produzido com leite de ovelhas e curado nas cavernas de Roquefort, na França, produz o queijo chamado de roqueforti, e quando adicionado ao queijo que utiliza o leite de vaca é conhecido como gorgonzola.

Outras espécies podem ser usadas na produção de outros tipos de queijos, como exemplo, o *Penicillium camemberti* e o *Penicilium candidum*, que são adicionados na produção do queijo camemberti.

Durante o processo de maturação desse tipo de queijo, algumas modificações importantes ocorrem com os substratos presentes, principalmente com os lipídios, as proteínas e os aminoácidos (OLIVEIRA, 1998). Na maturação, os ácidos graxos resultantes da hidrólise de lipídios são convertidos a metilcetonas como resultado de um mecanismo de proteção contra estes ácidos que são tóxicos ao microorganismo. As metilcetonas produzidas neste processo são os compostos de aroma característicos desse tipo de queijo (GATIFIELD, 1988).

As cetonas são caracterizadas pela presença do grupo carbonila podendo ser classificadas em alifáticas, aromáticas ou derivadas de fenol. Cetonas alifáticas, como acetona e diacetil, são importantes em aromas de queijo, especialmente em queijos maturados. Cetonas aromáticas são de particular interesse para fragrância industrial. As cetonas derivadas de fenóis incluem somente alguns compostos de interesse como aroma. Predominantemente, as cetonas produzidas por via biológica são as alifáticas, como as 2-alcanonas (metilcetonas) produzidas por fungos (ARMSTRONG & BROWN, 1994).

2.2.2.1. Biossíntese do Aroma de Gorgonzola

A produção de um aroma de qualidade depende do metabolismo dos lipídios do queijo. As metilcetonas, principais componentes do gorgonzola, são produtos da β -oxidação parcial dos ácidos graxos durante o metabolismo dos lipídios, como mostra a Figura 1.

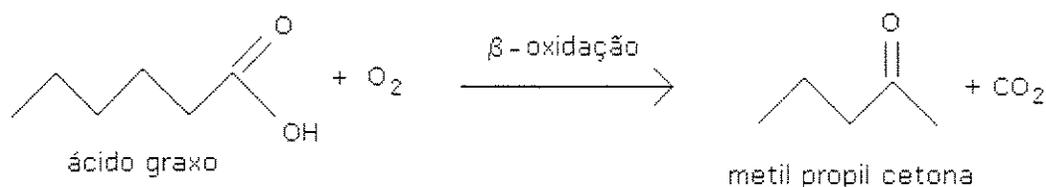


Figura 1: Representação da β -oxidação parcial do ácido graxo em metil propil cetona.

Outras classes de substâncias voláteis também são importantes no desenvolvimento do aroma, dentre as quais pode-se citar: ácidos graxos, álcoois, ésteres, lactonas, aldeídos, cetonas, aminas e compostos de enxofre (OLIVEIRA, 1998).

A Tabela 2 apresenta os principais compostos responsáveis pelo aroma de gorgonzola, mostrando seus precursores.

Tabela 2: Principais compostos de aroma do gorgonzola.

Precursores	Compostos Intermediários	Reações Envolvidas	Compostos de Aroma
Triglicerídeos	Ácidos graxos livres, glicerol, diglicerídeos, monoglicerídeos	hidrólise	Metilcetonas, álcoois, lactonas, ésteres
Ácidos graxos livres	β -cetoácidos	β -oxidação descarboxilação	Metilcetonas: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona, 2-undecanona, 2-butanona, octa 3-ona, octa-1-en-3-ona
Lactose ou aminoácidos	Cetoácidos, aldeídos	Via pentose fosfato ou desaminação oxidativa, redução	Álcoois: etanol, octa 1-en-3-ol, octa 2-en-1-ol, octa 1,5 -dien-3-ol, octa 1,5-dien-1-ol, butano-2,3-diol
Ácidos graxos insaturados	hidroxiácidos	β -oxidação, lipólise, ciclização	Lactonas: γ -decalactona, δ -decalactona, γ -dodecalactona, δ -dodecalactona
Lactose aminoácidos	Álcool (etanol) Ácidos (cadeia curta ou média)	metabolismo	Ésteres: acetato e propanoato de feniletila, cinamato de metila, hexanoato de metila, pentanoato de etila
Aminoácidos		Degradação de Strecker	Aldeídos (transitórios, convertem-se em álcoois e ácidos): hexanal, acetaldeído, 3-metil butanal, benzaldeído
Metionina		Metabolismo (metionina demetoliase)	Compostos de enxofre: 2,4-ditiopentano, dissulfeto de dietila, 2,4,5-tritiohexano e aminas voláteis: dimetilamina

Fonte: OLIVEIRA, 1998.

2.2.2.2. Processo Biotecnológico para a Produção do Aroma Natural de Gorgonzola

O aroma natural do gorgonzola pode ser produzido, em forma concentrada, por fermentação em um processo que utiliza uma nova linhagem de *Aspergillus sp* n° 1099 (OLIVEIRA, 1998).

Para que ocorra uma rápida e eficiente produção de metilcetonas a partir de triglicerídios, é necessário uma associação de esporos e lipase. A suspensão de esporos é produzida a partir de um meio ágar batata dextrose (PDA) no qual o microorganismo é inoculado e incubado por 4 dias a 30°C. Já a suspensão enzimática, de lipase, é obtida a partir de um meio composto de farelo de trigo : água (7:3, m:m), no qual é adicionada a suspensão de esporos. A mistura é, então, agitada e incubada por 72 horas a 30°C, sendo posteriormente filtrada, obtendo-se, assim, uma suspensão enzimática bruta.

O meio para a obtenção das metilcetonas características de gorgonzola é composto de creme de leite, que pode ser de cabra ou vaca, e de suspensão enzimática. A produção ocorre dentro de 96 horas a 30°C sob agitação, sendo de 4,5 o pH de melhor rendimento.

Além das metilcetonas, outros componentes importantes na caracterização do aroma de gorgonzola são produzidos durante o processo (OLIVEIRA, 1998).

2.2.3. Aspectos da Produção de Aromas por Processos Biotecnológicos

Embora sejam encontradas numerosas publicações sobre a produção de aromas por microorganismos, o cenário atual demonstra que essa área está ainda incipiente, fato que é demonstrado pelo número de processos instalados comercialmente (JANSSENS et al., 1992; FERON et al., 1996; KRINGS & BERGER, 1998).

Dificuldades técnicas explicam os poucos processos de produção. Os principais fatores envolvidos são a baixa produtividade devido a dificuldades relacionadas às vias metabólicas, toxicidade de produtos como metabólitos tóxicos que inibem a produção do microorganismo, longo tempo de fermentação resultando em altos custos de produção e aumento da possibilidade de contaminação, dificuldade na recuperação de produtos voláteis, que normalmente se encontram em baixa concentração e apresentam problemas para a extração, e mistura de produtos recuperados podendo haver alguns com efeito prejudicial às propriedades sensoriais do produto final, devendo, assim, ser removidos (SCHARPF et al., 1986).

Apesar das desvantagens econômicas da produção de aromas por fermentação, alguns aspectos podem justificar os custos. Entre eles pode-se citar: produtos derivados desse processo que podem não estar facilmente disponíveis pelas fontes biológica e química, e o alto potencial aromatizante de alguns compostos que são necessários apenas em pequenas quantidades. Exemplo disso é a produção do butirato de etila, que produzido biotecnologicamente tem um custo na faixa de US\$ 180,00/kg, sendo que o produto natural obtido pela concentração de sucos de frutas custa em torno de US\$ 5000,00/kg e o sintético em US\$ 4,00/kg (SCHARPF et al., 1986).

FERON et al. (1996) consideram que pesquisas básicas na produção de aromas por biotecnologia ainda são importantes, devendo-se enfatizar o melhor controle e manipulação dos passos metabólicos, a exploração e o desenvolvimento de tecnologias alternativas de produção e recuperação dos produtos obtidos, a busca de microorganismos produtores de aromas e de substratos de baixo custo.

Além dos aspectos já comentados, em decorrência do aumento da demanda dos consumidores por produtos e ingredientes com a designação “natural”, a literatura indica que a importância comercial da produção biotecnológica de aromas tende a crescer tornando-se representativa num futuro bem próximo (LUGAY, 1986; SCHARPF et al., 1986; FARBOOD, 1991; HADAR & DOSORETZ, 1991; JANSSENS et al., 1992; KRINGS & BERGER, 1998). Desta forma, os preços mais altos cobrados para os aromas naturais muitas vezes podem ser compensados pelos benefícios resultantes da preferência do consumidor (GATIFIELD, 1995).

2.3. Desvantagens dos Processos de Produção e Estocagem de Bioaromas Livres e a Encapsulação como Alternativa para a Estabilização e Separação dos Aromas

A maioria dos compostos de aroma naturais quando expostos ao oxigênio do ar, à luz e ao calor sofrem oxidação, decomposição, tornam-se resinosos ou evaporam (SZEJTLI et al., 1979).

Alguns processos de produção de alimentos, como a extrusão, que submetem os ingredientes a altas temperaturas, pressões e cisalhamento resultam em mudanças moleculares (WEN et al., 1990). Este tipo de processo, que pré mistura os aromas com a alimentação, tem-se demonstrado não ser econômico devido às perdas consideráveis dos aromas, ocorrendo oxidação e decomposição térmica. A destilação por vapor de aromas, com queda brusca de pressão na saída do produto, é outro mecanismo predominante da perda de aromas (BLANCHFIELD & OVEDEN, 1974; KINSELLA, 1978; PALKERT & FAGERSON, 1980; VILLOTA & HAWKES, 1994; KOLLENGODE et al., 1996).

Outra forma de perda de aroma é pela própria reatividade e volatilidade da maioria destes compostos nas condições normais, como é o caso do acetaldeído, constituinte essencial de aromas de frutas frescas (SZENTE & SZEJTLI, 1995) e dos constituintes do aroma característico do café (SZENTE & SZEJTLI, 1986). Desta forma, para que haja a disponibilidade destes compostos para a indústria de alimentos é necessária a fixação e estabilização deste tipo de substância.

Uma das tecnologias possíveis de ser empregada para se aplicar o acetaldeído em produtos alimentícios é a aplicação de sistemas que o geram, nos quais os pró-aromas como acetais, cetais e dioxolanos promoveriam a liberação de acetaldeído sob condições específicas, como por exemplo o pH. Este método, contudo, que utiliza moléculas de massa molar mais alta, apresenta algumas limitações devido à formação simultânea de outros compostos, como álcoois correspondentes de cadeia longa, que possuem seu próprio aroma e podem afetar o perfil sensorial, como ocorre no sistema de acetaldeído (SZENTE & SZEJTLI, 1995).

Outra possibilidade de se empregar aromas na indústria de alimentos é pela encapsulação destas substâncias, que atua como proteção à volatilidade e à reatividade.

Vários pesquisadores têm estudado comparativamente a encapsulação de aromas em compostos como lactose, gomas ou maltodextrinas, diversos tipos de amido e ciclodextrinas (SZENTE et al., 1988a; SZENTE & SZEJTLI, 1988; MAIER et al., 1987; ALLEGRE & DERATANI, 1994). Diversos trabalhos têm mostrado que uma das possibilidades mais promissoras de se estabilizar compostos de aroma é a formação de complexos de inclusão (encapsulação molecular) em ciclodextrinas (SZEJTLI et al., 1979).

MAIER et al. (1987) estudaram a termoestabilidade de compostos de aroma (mentol, pirazina, timol, vanilina ou óleo de hortelã) ligados em diferentes tipos de amido e em β -ciclodextrina e verificaram que após o aquecimento a 180°C, e muitas vezes também a extrusão, os compostos de aroma foram mantidos. No geral, as quantidades adsorvidas de suspensões ou emulsões aquosas decresceram na seguinte ordem: β -ciclodextrina, amilose, amido de batata, amido de tapioca, amido de trigo e amilopectina. Isto mostra que a β -ciclodextrina, quando comparada a vários tipos de amido foi melhor estabilizante.

SZENTE et al. (1988a) estudaram a complexação de aromatizantes de chá com β -ciclodextrina comparada à encapsulação em lactose. Foi verificada uma notável estabilidade dos complexos de óleos essenciais comparados aos adsorbatos de lactose. Após 3 dias de estocagem a 80°C, as perdas de aroma do complexo foram de apenas 10% (valor médio), contra 70% para os adsorbatos, mistura física. Os complexos de óleo essencial ou substâncias de aromas também apresentaram higroscopicidade muito baixa comparada com os adsorbatos. Além disso, as inclusões em β -ciclodextrina de óleos de alho, cominho areminio, de cebola, endro e toronja tiveram um aumento na estabilidade ao calor de 85 a 220°C com relação à adsorção em lactose e aumento na estabilidade à estocagem, a 40 e 60°C, com relação aos óleos de jasmim, anis, tomilho, manjerona e toronja (SZENTE & SZEJTLI, 1988).

ALLEGRE & DERATANI (1994) constataram que a encapsulação em β -ciclodextrina leva à maior eficiência de proteção dos aromas que outros suportes, como gomas ou maltodextrinas. Em carreadores convencionais, muitas moléculas são rapidamente degradadas. Compostos de aromas de frutas, por exemplo, são muito sensíveis à oxidação pelo ar e podem ser bem protegidos pela encapsulação em β -ciclodextrina.

FURUTA et al. (1994) estudaram a encapsulação de óleos essenciais, como o d-limoneno, usando uma mistura de β -ciclodextrina e maltodextrina. Verificaram que houve um

aumento na retenção do óleo durante “kneading” à medida que se aumentou a proporção molar β -ciclodextrina/ maltodextrina, até atingir um valor máximo. Além disso, o d-limoneno incluso na cavidade molecular da β -ciclodextrina mostrou-se difícil de evaporar, enquanto o adsorvido na maltodextrina podendo ser substituído pela água, com maior afinidade à maltodextrina, foi facilmente removido por secagem a vácuo.

A encapsulação molecular de diversos compostos, como já visto, pode ser realizada com β -ciclodextrina. Este processo geralmente tem a vantagem de modificar várias propriedades físicas e químicas da molécula encapsulada, sendo mais simples e de menor custo que a maioria dos restantes. Os complexos de inclusão formados são bastante estáveis e sua solubilidade em água é muito reduzida, o que leva à sua rápida separação em forma cristalina (LINDNER et al., 1981). Além disso, a encapsulação molecular é um processo de fácil fabricação, baixo custo e proteção da oxidação e degradação térmica em processos de extrusão, protegendo os aromas da degradação por temperatura (KOLLENGODE & HANNA, 1997), sendo que as ciclodextrinas são capazes de encapsular compostos de aroma com massa molecular na faixa de 80-250 (monoterpenóides, fenilpropanos).

A estabilidade dos complexos formados tem sido testada com relação ao estoque desses compostos, mostrando a sua viabilidade na retenção dos aromas. A complexação permite a redução da volatilidade e, assim, aumenta a duração na estocagem e diminui perdas.

SZENTE et al. (1988b) estocaram complexos de inclusão em β -ciclodextrina com aromas naturais e sintéticos e compostos de aroma sob condições normais durante 10 anos e seus conteúdos atuais foram monitorados. Estudos comparativos de cromatografia a líquido (TLC) e cromatografia a gás (GC) provaram que a encapsulação molecular de óleos essenciais resulta em estabilidade notável durante o longo período de estocagem à temperatura ambiente e à umidade normal. Além disso, constataram que aromas que consistem de compostos fenólicos são menos resistentes à longa estocagem e que tanto a perda de aroma total quanto o grau de deterioração do aroma retido foram maiores no caso dos complexos de inclusão de terpenóides fenilpropanóides.

Estudos utilizando óleo essencial de alho encapsulado em β -ciclodextrina, com estabilidade testada durante um ano e meio por TLC, indicaram que o complexo de inclusão do óleo de alho é mais estável que o óleo natural (LIANCI & RUIHAI, 1992).

YUNXIU et al. (1993) formaram complexos de inclusão do óleo volátil da flor de “ginseng” com β -ciclodextrina, com uma eficiência de inclusão de 90%, obtendo um complexo estável e fácil de estocar.

THOSS et al. (1994) estudaram a estabilidade dos óleos de limão, laranja e camomila, estocados durante 2 anos, como compostos de inclusão em β -ciclodextrina. Quando armazenados de forma fechada, os compostos de inclusão dos óleos de laranja e limão mantiveram-se estáveis. No armazenamento aberto, não houve total estabilidade devido à possível influência da umidade. Além disso, verificou-se que a fotodegradação pode ser evitada ou diminuída pela formação do complexo.

Os complexos de aromas em β -ciclodextrina também mostraram-se bastante eficientes como substituintes de condimentos naturais em análise sensorial de alimentos normais e dietéticos. LINDNER (1982) encapsulou condimentos naturais e aromas verificando que os complexos tinham composição constante, pureza macroscópica e microbiológica, decréscimo da sensibilidade ao calor, luz e oxidação durante o estoque, polimerização e sublimação.

Outros trabalhos realizados relatam que a β -ciclodextrina tem excelente desempenho na retenção de terpenos de óleos essenciais (REINECCIUS & RISCH, 1986), de compostos de aroma no suco de cebola podendo ser usado como aditivos em sopas (BAOKANG & YANTONG, 1992) e na supressão de alguns aromas indesejáveis nos alimentos (KOZO, 1989; SZENTE & SZEJTLI, 1990).

Estudo da estrutura formada no complexo com β -ciclodextrina utilizando a vanilina confirmou a formação de um complexo estável constatando que, em ambos, os finais fenólicos e aldeído foram afetados pela complexação, com proximidade de OCH_3 na vanilina aos prótons anoméricos da β -ciclodextrina (DIVAKAR, 1990).

A proteção contra a oxidação também foi confirmada em estudo da reação de benzaldeído, metoxibenzaldeído e vanilina com β -ciclodextrina por meio de espectroscopia fluorescente, ICD e absorção de luz ultra-violeta (XIAOFENG et al., 1996).

Outro fator importante na viabilidade dos complexos de aroma é a manutenção da composição original do aroma durante o processo. Isto, devido à característica final oferecida pelo produto depender de cada material aromático que é composto de substâncias individuais de aromas em várias proporções. BHANDARI et al. (1998) estudaram a encapsulação do óleo de

limão em β -ciclodextrina e verificaram que o produto encapsulado era similar ao óleo de limão nas proporções da maioria dos aromas voláteis.

O uso de β -ciclodextrina como adsorvente, em adsorção de fase sólida, também pode ser uma forma de recuperação dos aromas do meio de fermentação, sendo uma alternativa à destilação. Quando comparada a outros adsorventes a β -ciclodextrina imobilizada (Chiral Si 100, da Serva) mostrou que poderia ser mais conveniente se uma adsorção específica fosse necessária (KRINGS et al., 1993).

Ciclodextrinas também oferecem potencialidade para a separação seletiva de produtos voláteis de fermentação solúveis em água, pela cristalização dos complexos. Contendo o meio de crescimento da fermentação alguns aminoácidos e peptídeos, estes poderiam interagir com a ciclodextrina interferindo na seletividade dos complexos obtidos. Porém, em estudos realizados com estes compostos, verificou-se que mesmo após 24 horas de incubação não foram formados precipitados. Este fato pode ser explicado por essas moléculas, assim como outras moléculas biológicas como proteínas e ácidos nucleicos, que podem estar presentes em meios de fermentação, serem aparentemente grandes demais para formarem complexos insolúveis. Além disso, sabe-se que as ciclodextrinas não são tóxicas aos microorganismos, e assim, sua presença durante o processo de fermentação poderia combinar produtos de separação com a diminuição de produtos de inibição no meio (SHITY & BAR, 1992).

TANIGUCHI et al. (1988) verificaram ser possível a formação de compostos de aroma de raiz forte e “Wasabi” (*Wasabia japonica*) por reação enzimática em CO₂ líquido ou supercrítico. Relataram a possibilidade de separar-se estes compostos como complexos de inclusão, pela β -ciclodextrina e da utilização destes complexos como aditivos em alimentos. YASUMA et al. (1987) e KAMIHIRA et al. (1990) também estudaram a formação de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e compostos de aromas para a sua recuperação após a extração com CO₂ supercrítico ou líquido.

MENERT (1991) utilizou uma solução de β -ciclodextrina como um solvente para a extração de óleos essenciais. No caso de cominho aremínio (*Carum carvi*) como matéria-prima, mais de 75% do óleo essencial presente na semente foi isolado, porém apenas 36% estava na forma de complexo com a β -ciclodextrina. O rendimento total do complexo de cristal obtido nas condições ótimas foi de 50%, excedendo o do método de extração por bolhas de gás.

Deste modo, a extração com ciclodextrinas representa uma alternativa vantajosa que associa a recuperação do aroma do meio e a sua estabilização pela formação do complexo. Nesses processos dois aspectos são fundamentais: a extração do meio e a separação do complexo resultante, sendo que, em geral, a separação do complexo é feita por cristalização.

2.4. Encapsulação Molecular em Ciclodextrinas

As ciclodextrinas ou dextrinas de Schardinger têm despertado a curiosidade dos cientistas e pesquisadores desde sua descoberta por Schardinger em 1903. São produtos oriundos da degradação do amido, ou seja, oligossacarídeos cristalizáveis, que podem ser recristalizados e obtidos na forma pura (CRAMER, 1987).

Ciclodextrinas (ciclo-amilose, ciclomaltose, dextrinas de Schardinger) são polímeros homogêneos derivados da glicose, cristalinos, não - redutores, cíclicos e não higroscópicos. As unidades de glicose são unidas entre si por ligações de tipo α -1,4, (SZEJTLI, 1988; PREMA et al., 1990; FUJIWARA et al., 1992; LEE et al., 1992). São denominadas α , β e γ de acordo com o número de unidades de glicose. A Figura 2 mostra uma representação esquemática das estruturas das ciclodextrinas.

A α - ciclodextrina, também conhecida como α - dextrina de Schardinger, ciclomaltohexaose, ciclohexaglucona, ciclohexamilose, ACD e C6A, é constituída por 6 unidades de glicose. A β - ciclodextrina, ou β - dextrina de Schardinger, cicloheptaose, cicloheptaglucona, cicloheptamilose, BCD e C7A é formada por 7 unidades de glicose. A γ - ciclodextrina, também conhecida como γ - dextrina de Schardinger, ciclomalto-octaose, ciclo-octaglucona, ciclo-octamilose, GCD e C8A, é formada por 8 unidades de glicose (SZEJTLI, 1988).

As ciclodextrinas são moléculas que apresentam a forma de um tronco de cone invertido com uma cavidade interior cujo tamanho e forma são determinados pelo número de unidades de glicose. Esta forma cônica deve-se à conformação C1 dos resíduos de α -D-glicopiranosil e à ausência de livre rotação ao redor das ligações glicosídicas. Os grupos hidroxila secundários (nos átomos C2 e C3 das unidades de glicose) estão situados de um dos lados do anel e todas as hidroxilas primárias do outro lado. Isto confere às ciclodextrinas a propriedade de serem hidrofílicas externamente. O lado das hidroxilas secundárias é mais largo que o lado das

hidroxilas primárias (base do tronco de cone). O interior da molécula é composto por ligações CH e oxigênio glicosídico, o que o torna relativamente apolar em água (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991; LEE & KIM, 1991). Portanto, o interior da cavidade apresenta um microambiente hidrofóbico, enquanto o exterior mostra uma superfície hidrofílica. Esta característica favorece a inclusão de compostos orgânicos em seu interior, isto é, encapsulação molecular, que tem sido muito estudada devido à importância para a compreensão das interações enzima - substrato e princípio ativo - receptor (TAWARA & KHOURI, 1993).

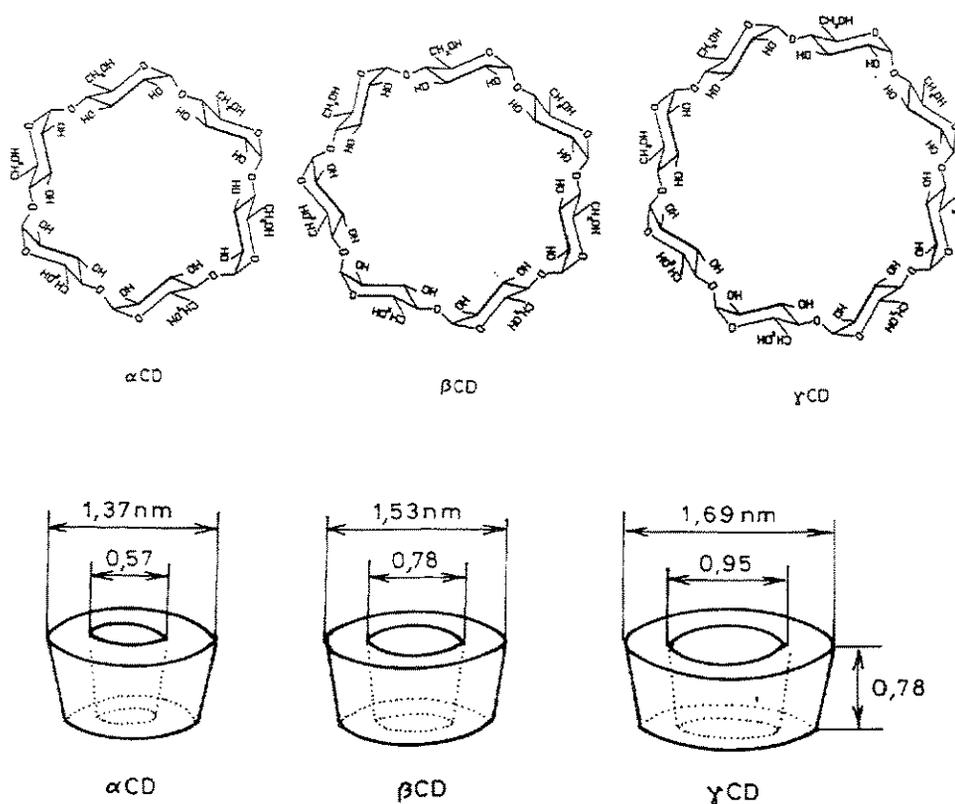


Figura 2: Estrutura das ciclodextrinas e suas dimensões geométricas aproximadas (SZEJTLI, 1988).

2.4.1. Propriedades Físicas e Químicas das Ciclodextrinas

As principais propriedades físicas e químicas das ciclodextrinas são mostradas na Tabela 3 (LE BAS & RYSANEK, 1987; SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991). O mais notável nessa Tabela é a baixa solubilidade da β -ciclodextrina na água. Muitas ligações de hidrogênio intramoleculares existem entre os grupos hidroxilas secundários. O grupo C₂-OH de uma unidade de glucopiranosídeo pode formar uma ponte de hidrogênio com o grupo C₃-OH da unidade glucopiranosose adjacente. Estas pontes de hidrogênio estabilizam a molécula de β -ciclodextrina, a tornam uma estrutura rígida e, provavelmente, atuam no sentido de prevenir a hidratação da molécula, o que pode explicar sua baixa solubilidade (BEKERS et al., 1991). A γ -ciclodextrina tem uma estrutura não-coplanar, mas flexível, e é a mais solúvel das três ciclodextrinas. Como regra geral, a solubilidade das ciclodextrinas em água aumenta com o aumento da temperatura (SZEJTLI, 1988).

As ciclodextrinas apresentam sabor adocicado. Uma solução contendo 2,5 % de β -ciclodextrina é tão doce quanto uma solução contendo 1,7 % de sacarose. Portanto, quando da utilização da β -ciclodextrina em processamento de alimentos, seu poder adoçante deve ser levado em consideração (SZEJTLI, 1988).

Tabela 3: Propriedades físico - químicas das ciclodextrinas.

Propriedades	α - CD	β - CD	γ - CD	1-DM- β
número de unidades de glicose	6	7	8	7
profundidade da cavidade (nm)	0,78 - 0,80	0,78 - 0,80	0,78 - 0,80	10
diâmetro interno (nm)	0,47 - 0,57	0,60 - 0,78	0,75 - 0,95	0,60
diâmetro externo (nm)	1,37 - 1,46	1,53	1,69 - 1,75	
massa molar (g/mol)	972	1135	1297	1331
solubilidade em água, 25°C	14,50	1,85	23,2	57
solubilidade em água, 40°C	28,5	4,40	58,5	
temperatura de fusão (°C)	275	280	275	295
pKa, 25 °C	12,3	12,2	12,1	

1- DM - β = Heptakis-2,6-di-o-metil-beta-ciclodextrina (DIMEB)

Fonte: LE BAS & RYSANEK, 1987; SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991

Como as ciclodextrinas são compostos cíclicos que apresentam uma cavidade relativamente hidrofóbica, esta característica as torna altamente suscetíveis à formação de complexos de inclusão com muitos compostos orgânicos, provocando uma alteração nas propriedades físicas e químicas dessas substâncias (BENDER, 1986; DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988; FUJIWARA et al., 1992; KIM et al., 1993).

2.4.2. Formação dos Complexos de Inclusão

Quando hidratadas, as α , β e γ - ciclodextrinas contêm 6, 11 e 17 moléculas de água, respectivamente. Estas moléculas podem ser substituídas por moléculas de compostos apolares ou menos polares que a água. Neste processo em que há ganho de energia, em reação rápida e reversível, formam-se os complexos de inclusão.

Na ausência de molécula “hóspede”, a cavidade hidrofóbica, que atua como “hospedeira”, é ocupada por moléculas de água (SZEJTLI, 1988). Contudo uma molécula “hóspede” específica, quando adicionada à solução de ciclodextrina, expulsa estas moléculas de água e ocupa ela própria esta cavidade. Além da interação hidrofóbica, outras forças, porém menos intensas, também participam deste processo, como as forças de van der Waals.

Na Figura 3 apresenta-se um exemplo típico de complexação em que as moléculas de água internas à cavidade da ciclodextrina, no início da reação, são substituídas pela molécula do *p*-Xileno.

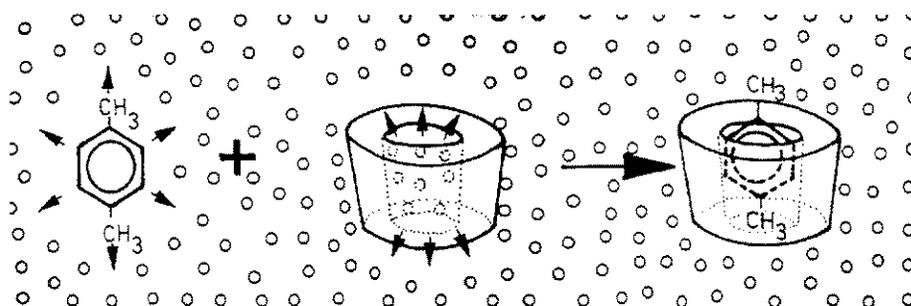


Figura 3: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina. A molécula hóspede é o *p*-Xileno e os pequenos círculos representam as moléculas de água (SZEJTLI, 1988).

2.4.2.1. Preparação dos Complexos de Inclusão de Compostos de Aromas

Não existe uma técnica padrão para a obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrina, portanto, para cada substância em questão deve ser desenvolvido um método particular, que se adapte ao tipo de estrutura molecular. Segundo a literatura os métodos mais comuns para obtenção destes complexos são: mistura sólida ou “kneading” e a co-precipitação (LOUKAS et al., 1995; MICARONI, 1994; SAENGER, 1980).

As estruturas dos complexos de inclusão diferem significativamente em solução e no estado sólido. Em solução a molécula “hóspede” está situada dentro da cavidade da ciclodextrina, ao mesmo tempo que o complexo está solvatado por moléculas do solvente, são os chamados complexos verdadeiros. No estado cristalino, a molécula “hóspede” pode estar não só dentro da cavidade, caracterizando o complexo verdadeiro, mas também no espaço inter-molecular formado pela rede cristalina. Além disso, algumas moléculas de ciclodextrina podem estar desocupadas ou ocupadas por moléculas de água (SZEJTLI et al., 1979).

Para que sejam viáveis tecnologicamente os métodos de inclusão necessitam de compatibilidade com as propriedades físico-químicas das moléculas “hóspedes”, devem ser de fácil aumento de escala e controle para reprodutibilidade.

Para cada molécula a ser encapsulada é necessário a escolha de um método específico e de parâmetros de otimização, especialmente o conteúdo de água, temperatura, tempo de agitação e pH, sendo que a falta de controle do pH pode favorecer a liberação de íons.

Além disso, a técnica de secagem usada, se um composto em pó é necessário, pode influenciar bastante no rendimento da inclusão e a taxa de dissociação do complexo (ALLEGRE & DERATANI, 1994).

Existem três meios de preparar os complexos de inclusão (SZEJTLI, 1988): o líquido-líquido, o líquido-sólido e o gás-líquido.

a) **Complexação em Solução**

A complexação em solução consiste na co-precipitação dos compostos formados.

Neste método, o componente a ser encapsulado, ou sua solução, é adicionado lentamente em uma solução aquosa saturada de ciclodextrina, que é aquecida para dissolução. Se um solvente orgânico é necessário para a dissolução do componente, esse tem que ser preferencialmente solúvel em água (etanol) ou volátil (dietil éter). A mistura deve ser

rigorosamente agitada até alcançar o equilíbrio. A cristalização do complexo pode ser completada por resfriamento ou evaporação do solvente orgânico (ALLEGRE & DERATANI, 1994), que pode ocorrer pelo repouso por 12 horas a 0°C, com posterior filtração e secagem por aquecimento em estufa convencional a 50°C por 24 horas, liofilização ou “spray drying”, formando um pó branco amorfo (SZEJTLI et al., 1979; BHANDARI et al., 1998).

O método da co-precipitação resulta em 100% de pureza do complexo, mas é de difícil adaptação à escala industrial devido à grande quantidade de água necessária. Além disso, alguns complexos não precipitam e não podem ser separados dessa forma.

b) Complexação em Estado Sólido

Outro método de inclusão é o líquido-sólido ou da suspensão, que consiste em se trabalhar com uma suspensão aquosa de ciclodextrina na qual a amostra com a molécula “hóspede” é lentamente adicionada. A “hóspede” pode estar pura ou em um solvente orgânico miscível em água (que será evaporado). Este método freqüentemente resulta em ótimos resultados com compostos de aroma. Além disso, é facilmente adaptável à escala industrial: o conteúdo de água não é tão alto (2-3 partes para 1 de ciclodextrina, m:m), o equipamento requerido é convencional e raramente necessita de qualquer investimento adicional, sendo que a pasta obtida pode ser facilmente seca em “spray dryer” ou liofilizador (ALLEGRE & DERATANI, 1994).

Há também a técnica de “kneading”, que é muito similar ao método da suspensão, mas geralmente usa apenas 0,5 parte de água por parte de ciclodextrina. Devido à alta viscosidade da pasta, este método requer um equipamento especial de “kneading”. A água necessita ser removida sob vácuo ou pelo uso de aquecimento no equipamento (ALLEGRE & DERATANI, 1994).

YOSHII et al. (1998) constataram a melhor eficiência na fração de inclusão do d-limoneno na β -ciclodextrina pelo método “kneading” que pelo aquoso, tendo verificado diferenças notáveis na fração de inclusão quando a razão molar de água/ ciclodextrina foi menor que 10.

Outra forma de inclusão é o “co-grinding”, em que a ciclodextrina e a amostra com a molécula “hóspede” são moídas em uma argamassa na presença de uma pequena quantidade de água até que a mistura se torne pó, material sólido. O composto é então seco até massa constante

(SZENTE et al., 1988a). Este método usa do mesmo princípio do “kneading”, porém sem o uso de equipamento especial.

c) Complexação a Gás

Este método consiste em se passar a substância em forma de gás através de uma solução de ciclodextrina para que a complexação ocorra (PSZCZOLA, 1988). Esta técnica é utilizada para a inclusão de substâncias aromáticas extraídas por CO₂ supercrítico ou líquido, em que o complexo é formado sob CO₂ pressurizado (KAMIHIRA et al., 1990).

2.4.2.2. Caracterização dos Complexos de Inclusão

A caracterização do complexo de inclusão é essencial principalmente para saber se a molécula “hóspede” realmente está incluída na ciclodextrina e em que extensão.

A maioria dos métodos descritos na literatura tem como base os efeitos específicos da inclusão. Por exemplo, no estado sólido, mudanças de cristalinidade e das propriedades térmicas devidas à inclusão podem ser evidenciadas por difração de raios-X e análise térmica, respectivamente. Métodos espectroscópicos como espectroscopia de infra-vermelho (IV) de estado sólido e RMN (ressonância magnética nuclear) também podem ser aplicados quando grupos funcionais apropriados estão presentes na molécula “hóspede”.

De acordo com YOSHII et al. (1992), difratogramas de raios-X de complexos entre ciclodextrinas e alguns óleos essenciais têm sido estudados. Nesses estudos foram caracterizados picos específicos do complexo de inclusão em dois ângulos de difração (2θ) de 5-7° e 11-12°. Além disso, foi verificado que a área sob cada pico aumenta proporcionalmente à quantidade de complexo. Desta forma, com a utilização de um método de referência para padronização, como a cromatografia gasosa, que quantifica os voláteis extraídos do complexo, a difração de raios-X pode ser usada como método de caracterização tanto qualitativo quanto quantitativo.

Uma grande variedade de métodos pode ser aplicada para detectar a inclusão em solução. Os métodos mais representativos são os espectroscópicos: mudança no espectro UV-visível e RMN, dicroísmo circular induzido, aumento de fluorescência. Recentemente a empresa RINGDEX desenvolveu uma ferramenta muito eficiente para a caracterização de complexos, que consiste de uma espectrometria de massa em modo “Electrospray” (SOROKINE et al., 1992). Esta ferramenta também é capaz de verificar a estequiometria efetiva do complexo, uma vez que em

muitos casos, a estequiometria fornecida na literatura corresponde apenas às proporções de ciclodextrina e de ingrediente ativo usado (ALLEGRE & DERATANI, 1994).

2.4.3. Viabilidade de Utilização das Ciclodextrinas

Das três formas de ciclodextrina obtidas pela enzima CGTase, a mais utilizada comercialmente é a β -ciclodextrina, pela facilidade de obtenção em forma pura devido à sua baixa solubilidade. A α e a γ -ciclodextrina por serem mais solúveis exigem processos de separação e purificação mais complexos, levando a um maior custo de produção.

Do ponto de vista prático, a maioria dos óleos essenciais e dos compostos de aroma possuem tamanhos aptos a ocupar a cavidade da molécula de β -ciclodextrina para formar os complexos (SZEJTLI et al., 1979).

Para aplicações na forma de complexos de inclusão com moléculas de maior tamanho a γ -ciclodextrina é a mais promissora, porém, para que se torne viável sua aplicação em larga escala, seu custo de produção deve ser reduzido (FRÖMMING, 1982; DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988).

Estudos sobre metabolismo, toxicidade e efeitos biológicos das ciclodextrinas, tanto na forma livre como na forma complexada, foram realizados e demonstraram que: (i) as ciclodextrinas são metabolizadas pela microflora presente no cólon humano, (ii) somente quantidades insignificantes de ciclodextrina administrada na forma oral são absorvidos pelo trato intestinal e (iii) a administração parenteral da α e da β -ciclodextrinas pode causar efeitos hemolíticos e nefrotóxicos, o que restringe seu uso a baixas dosagens (SZEJTLI, 1988).

2.4.4. Complexação de β -Ciclodextrina com Cetonas

TEE et al. (1996) estudaram a complexação de cetonas alifáticas com diferentes ciclodextrinas por meio de suas constantes de dissociação em solução. Os valores das constantes de dissociação foram obtidos por meio de dois métodos distintos: pelo deslocamento de um marcador fluorescente, o íon 1-anilinaftaleno -8-sulfonato (ANS), ligado à ciclodextrina, que

tem a intensidade de fluorescência atenuada à medida em que a cetona forma um complexo com a ciclodextrina, e o da clivagem do acetato *m*-nitrofenil (MNPA) pela ciclodextrina, que consiste em um método de inibição realizado em solução básica.

Os resultados de alcanonas assimétricas (RCOR') mostraram que estas são complexadas à ciclodextrina principalmente pela inclusão do maior dos dois grupos alquil, desde que este não seja grande demais para caber na cavidade da ciclodextrina. Porém, o grupo maior não é o único determinante na complexação. Comparações dos valores das constantes de dissociação da 2-pentanona (MeCOPr), 3-hexanona (EtCOPr) e 4-heptanona (PrCOPr) mostraram um decréscimo apreciável dos valores com o aumento do grupo menor, para complexações com a α , β e hidroxipropil β -ciclodextrinas (HP- β -CD), levando à conclusão de que o grupo menor também influencia na formação do complexo.

Os autores também notaram que a força de ligação das cetonas à ciclodextrina aumenta quase monotonicamente com o comprimento da cadeia, até mais de 8 carbonos (C_8). Este comportamento é revelado pela correlação linear de pK_d ($=-\log K_d$) com o comprimento da cadeia com 2 e 3-alcanonas para as três ciclodextrinas já citadas. Os dados também são consistentes com a visão de que os grupos finais hidrofílicos da molécula "hóspede" na ciclodextrina estão voltados para o meio. Assim, a ligação é determinada pela inclusão da porção alquil da molécula "hóspede" na cavidade da ciclodextrina.

Os coeficientes das correlações dos pK_d com os comprimentos de cadeia de cetonas de 3 a 8 carbonos estão na faixa de 0,36 a 0,51, correspondendo a incrementos de energia livre de 2,1–2,9kJ/mol para cada grupo metileno que é seqüestrado do meio aquoso pela inclusão na cavidade da ciclodextrina. Estes valores estão de acordo com as energias livre (3,0–3,6kJ/mol) de transferência de grupos metilenos da água para diversos meios orgânicos, incluindo micelas, podendo assim ser mencionado que os efeitos hidrofóbicos são os fatores primários que governam a ligação de alifáticos simples às ciclodextrinas. Porém, forças de van der Waals, que dependem do tamanho e área superficial e aumentam linearmente com o tamanho da cadeia, também contribuem significativamente.

2.5. Lipossomas: Propriedades e Potencialidade como Estabilizantes de Aromas na Indústria de Alimentos

Lipossomas, ou vesículas lipídicas, são definidos como compostos com estrutura em bicamadas lipídicas com compartimentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Preparados por uma variedade de técnicas, os lipossomas consistem de uma, algumas ou muitas membranas de bicamadas concêntricas e possuem um tamanho que pode variar de aproximadamente 25 nm de diâmetro a várias micra.

Essas vesículas são preparadas com fosfolipídios ou esfingolipídios, como, lecitinas de soja e da gema do ovo, compostos obtidos de fontes naturais. As estruturas formadas mimetizam células de organismos vivos e têm sido usadas como modelos de membranas por biólogos (ARNAUD, 1995). Fosfolipídios semi-sintéticos com cadeias de ácidos graxos de comprimento e saturação definidos, bem como o colesterol, também podem ser usados para propósitos específicos. A escolha do tipo de fosfolipídio e/ou a quantidade de colesterol têm um papel importante na estabilidade lipossomal durante estocagem e quando injetados em animais. Teoricamente, qualquer substância, levando em consideração a solubilidade, a carga elétrica, o tamanho molecular e outras características estruturais, pode ser incorporada aos lipossomas, contanto que a substância não interfira na formação da partícula. Materiais hidrossolúveis podem ser encapsulados na fase aquosa dos lipossomas, enquanto materiais lipossolúveis serão incorporados na fase lipídica.

A estrutura dos lipossomas é determinada pelo método de preparação, e esses podem ser divididos em três classes: vesículas multilamelares (MLVs), vesículas unilamelares pequenas (SUVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs).

Estas vesículas lipídicas têm sido estudadas extensivamente, nos últimos 30 anos, nas áreas médica, cosmética e farmacêutica devido ao seu potencial como carreador de drogas terapêuticas, incluindo macromoléculas bioativas (SHAHIDI & HAN, 1993).

Apesar dos lipossomas terem sido bastante estudados apenas nas áreas citadas acima, a indústria agro/alimentícia também possui um grande número de aplicações potenciais.

A dificuldade na produção de lipossomas em grande escala com os métodos usuais, além da baixa eficiência de encapsulação e uso de solventes orgânico e de equipamentos sofisticados, fizeram os lipossomas inadequados para aplicações na indústria de alimentos até os últimos anos.

Porém, com o desenvolvimento de novos métodos de produção, a encapsulação lipossomal de ingredientes alimentícios veio a ser uma área em crescimento. Tal encapsulação possibilita uma ampla faixa de aplicações, e muitos compostos já têm sido encapsulados com sucesso: enzimas, minerais, vitaminas e aromas (ARNAUD, 1995; SHAHIDI & HAN, 1993).

Os aromas encapsulados possuem uma ampla faixa de aplicações na indústria de alimentos uma vez que eles permanecem encapsulados mesmo após o contato com a água, ao contrário de outros métodos em que os agregados dissolvem-se na água. Além disso, a encapsulação em lipossomas permite que aromas solúveis em óleo possam ser suspensos em meio aquoso. Exemplo disso é a uso de aromas encapsulados em formulações de biscoitos, feitos por extrusão, que foram introduzidos para melhorar a retenção do aroma durante o processamento e a estocagem, sendo que a encapsulação também facilitou a dissolução do aroma na parte gordurosa ou aquosa da preparação de biscoitos (LENGERICH et al., 1991).

Escolhendo os fosfolipídios certos, com temperatura de transição apropriada, os aromas podem ser liberados apenas na boca. Alternativamente, os biscoitos podem ser re-aquecidos pelo consumidor levando à ruptura dos lipossomas e à liberação do aroma adquirindo qualidades similares aos biscoitos assados na hora.

Outro exemplo da aplicação dos lipossomas na retenção de aromas é o caso da preparação de queijos nos quais são adicionados aromas diretamente ao leite. Na adição livre há perda de aroma durante a formação do coalho, porém, quando encapsulados em lipossomas, os aromas ficaram fisicamente retidos na matriz durante a coagulação da proteína. Com isso, verificou-se que não só o gosto mas também o cheiro foram significativamente maiores que no queijo produzido com aromas livres. Além disso, após alguns dias de estocagem, foi verificada, por microscopia eletrônica, a presença de lipossomas no queijo sugerindo o prolongamento da liberação dos aromas encapsulados (ARNAUD, 1995).

Assim, pode-se verificar que há grande potencialidade de uso dos lipossomas como estabilizantes dos aromas na indústria de alimentos, com a vantagem de que sua composição fosfolipídica natural não acrescenta componentes sintéticos aos alimentos.

3. MATERIAIS e EQUIPAMENTOS

Os materiais utilizados compreendem:

- β -ciclodextrina ($C_{42}H_{70}O_{35}$, P.M. 1135,0), da Cyclolab, mínimo de 98%.
- Lecitina de soja (Epikuron 200 SH), da Degussa, mínimo de 92% de PC hidrogenada.

METILCETONAS

- 2-pentanona (M.M. 86,13), da Acros, 99%, $T_{eb} = 102^{\circ}C$
- 2-heptanona (M.M. 114,19), da Acros, 99%, $T_{eb} = 151,5^{\circ}C$
- 2-nonanona (M.M. 142,24), da Acros, 99%, $T_{eb} = 192^{\circ}C$
- 2-undecanona (M.M. 170,3), da Acros, 99%, $T_{eb} = 231,5 - 232,5^{\circ}C$
- 2-octanona (M.M. 128,21), da Acros, 99%, padrão interno, $T_{eb} = 172 - 173^{\circ}C$

SOLVENTE

- *n*-hexano para análise GR (M.M. 86,18), da Merck

Os equipamentos empregados são listados a seguir:

- Reator fechado com agitação mecânica e circulação de banho térmico
- Agitador mecânico com controle digital de rotação, da Tecnal
- Placa de aquecimento, da Fisatom
- Difractômetro de Raios-X: Philips Analytical X-Ray (XRD)
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (FID): uso de coluna capilar do tipo CP WAX 52 CB (30m x 0,32 mm x 0,25 μ m)]
- Purge and Trap, da Tekmar Dohrmann: uso com coluna de adsorção Vocarb 3000

- DSC 2920, da TA Instruments, usado na calorimetria diferencial de varredura
- SDT 2920 Simultaneous, DTA-TGA, da TA Instruments, usado na gravimetria térmica
- Espectrofotômetro Bruker 300 AC/P, usado em espectroscopia de infra-vermelho
- BOMEM MB SERIES HARTMANN & BRAUN – MICHELSON, usado em ressonância magnética nuclear de carbono 13.
- “Spray Dryer” de bancada, Büchi, bico de injeção spray de 1,5 mm e ciclone com pintura eletrostática.
- Microscópio Óptico, Leica modelo QW500IW
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Leica modelo LEO 440i
- QELS (Quase Elastic Light Scattering), Malvern Autosizer 4700
- Espectrofotômetro UV/Vis, Hitachi, modelo U2001

4. MÉTODOS

4.1. COMPLEXAÇÃO EM β -CD

O estudo da complexação em β -CD foi feito utilizando as metilcetonas: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona, por serem os principais compostos característicos do bioaroma de gorgonzola, tanto em separado quanto em mistura.

4.1.1. Predição Teórica da Inclusão das Metilcetonas na Cavidade da β -CD

A predição teórica da inclusão das metilcetonas na β -CD foi realizada com a utilização do Software Hyperchem. Para isso, a estrutura de cada molécula, metilcetonas e β -CD, separadamente, foi inserida no programa e a sua geometria foi otimizada com o uso do algoritmo Polak-Ribiere, de gradiente conjugado, considerando as moléculas no vácuo. Posteriormente, a molécula de β -CD otimizada foi fixada e a de metilcetona selecionada para a otimização em relação à estrutura da β -CD. Este procedimento foi realizado para cada metilcetona utilizando diversas posições relativas da metilcetona em relação à ciclodextrina. Posteriormente, selecionou-se ambas as moléculas para a avaliação da mudança estrutural da β -CD provocada pela molécula “hóspede”.

4.1.2. Estudo da Complexação das Metilcetonas Sintéticas em β -CD

Os estudos envolvendo as metilcetonas em mistura utilizaram uma razão molar entre elas de 3: 6: 8,5: 1 (2-pentanona: 2-heptanona: 2-nonanona: 2-undecanona), razão obtida na fermentação do bioaroma de gorgonzola segundo OLIVEIRA (1998).

4.1.2.1. Estudo da Influência do Etanol e da Diluição das Metilcetonas na Formação dos Complexos por Co-Precipitação

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do etanol e da diluição das metilcetonas na complexação para que fosse definido o método a ser empregado nos experimentos, uma vez que foram encontrados, na literatura, diferentes métodos de preparação dos complexos por co-precipitação.

Foi feito um planejamento experimental para a avaliação da influência das variáveis de complexação da mistura das metilcetonas sintéticas na co-precipitação. Foram estudadas a concentração de etanol na solução de β -CD (X_1), a concentração de etanol na diluição das metilcetonas adicionadas (X_2) e o volume de diluição das metilcetonas (X_3). A Tabela 4 mostra os níveis avaliados e a 5 as condições dos ensaios realizados. A razão molar utilizada entre o total de metilcetonas e a β -CD foi de 1:1.

Tabela 4: Níveis das variáveis estudados no planejamento experimental

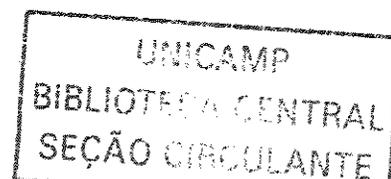
Variáveis	Níveis codificados				
	$-2^{3/4}$	-1	0	+1	$2^{3/4}$
X_1 (v:v, etanol:água)	0,16:0,84	30:70	50:50	70:30	0,84:0,16
X_2 (v:v, etanol:água)	0:1	20:80	50:50	80:20	1:0
X_3 (mL)	0	2,5	11,25	20	26

Tabela 5: Planejamento experimental 2^3 das variáveis da complexação em β -CD das metilcetonas em mistura realizado em 5 níveis, planejamento em estrela. X_1 , X_2 e X_3 representam os valores das variáveis codificados de acordo com as expressões da Tabela 4.

Ensaio	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	$-2^{3/4}$	0	0
14	$2^{3/4}$	0	0
15	0	$-2^{3/4}$	0
16	0	$2^{3/4}$	0
17	0	0	$-2^{3/4}$
18	0	0	$2^{3/4}$

4.1.2.2. Método de Preparação dos Complexos

A preparação dos complexos foi feita por co-precipitação seguida de cristalização, filtração e secagem em estufa. As condições experimentais empregadas na co-precipitação dos complexos foram definidas pelo estudo descrito no item 4.1.2.1, que correspondem ao método usado por KOLLENGODE & HANNA (1997).



A β -ciclodextrina (5 g) foi adicionada a 50 mL de água destilada a 55°C. Os compostos de aroma (~0,5 mL) foram adicionados gota a gota à solução de ciclodextrina com agitação constante. Interrompeu-se o aquecimento e a mistura alcançou a temperatura ambiente com agitação constante. O frasco com o complexo metilcetona- β -ciclodextrina precipitado foi, então, resfriado a 4°C por 16 horas. Após a refrigeração o complexo formado foi removido por filtração da solução em papel de filtro Whatman nº 4 e lavado 2 vezes com 10 mL de água. O complexo separado foi colocado em estufa a 55°C por aproximadamente 24 horas.

4.1.2.3. Quantificação dos Compostos Complexados

As metilcetonas foram quantificadas na forma livre por cromatografia a gás, cuja coluna foi acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID). Para a quantificação total dos voláteis nas amostras, anteriormente à cromatografia, foi realizada uma extração com o solvente *n*-hexano.

4.1.2.3.1. Extração das Metilcetonas dos Complexos

A amostra em pó (~0,15g) foi misturada à água (4mL) e ao solvente *n*-hexano (3mL) contendo o padrão interno 2-octanona (0,4g/L), em um tubo de vidro fechado. A solução foi aquecida a 85-90°C por 2,5 horas, com agitação intermitente. A fase orgânica contendo os compostos voláteis foi removida com uma pipeta. O extrato foi posteriormente resfriado a -10°C (BHANDARI et al., 1998) e mantido até análise em GC-FID.

4.1.2.3.2. Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia a Gás

A cromatografia é o método mais adequado para a determinação da composição original e dos complexos de substâncias de aromas (SZEJTLI et al., 1979).

Para a identificação das metilcetonas, amostras de padrões foram injetadas individualmente no cromatógrafo para a determinação dos picos específicos de cada uma delas.

A análise quantitativa foi realizada a partir de uma curva de calibração, ou seja, de amostras de concentrações conhecidas. As amostras dos padrões foram feitas com a utilização de um padrão interno (2-octanona), adicionado em todas as amostras com a mesma concentração. A

construção da curva é realizada plotando-se a área sob o pico da metilcetona sobre a área sob o pico do padrão interno versus a concentração.

As análises foram realizadas utilizando a temperatura inicial da coluna de 45°C por 3 minutos, aumentando gradativamente 15°C / minuto até 220°C, em que permanece por 10 minutos. A temperatura do detector foi fixada em 250°C, a temperatura do injetor a 230°C, empregando hélio como gás de arraste na vazão de 40 mL / minuto em sistema de injeção “split” à pressão constante de 100KPa.

4.1.2.4. Influência da Razão Molar Inicial (Metilcetona: β -CD)

Foi obtido um perfil da razão molar de retenção das metilcetonas nos complexos a partir da variação da razão molar inicial entre metilcetona e β -CD. Os experimentos foram realizados de acordo com o item 4.1.2.2. O tempo de agitação utilizado foi de 24 horas para as amostras com as metilcetonas em separado e de 4 horas para a mistura. Os ensaios feitos para a avaliação das metilcetonas em mistura utilizaram a mesma razão molar fixa mostrada no item 4.1.2.

4.1.2.4.1. Determinação da Estequiometria Total dos Complexos

Pelo perfil obtido, conforme descrito no item 4.1.2.4, foi possível a obtenção da estequiometria total dos complexos formados. Porém, para que fosse possível a definição da estequiometria verdadeira do complexo, ou seja, metilcetona no interior da β -CD, foi necessário um estudo da extração das metilcetonas adsorvidas na superfície, como mostra o item 4.1.2.4.2.

4.1.2.4.2. Cinética de Extração das Metilcetonas Adsorvidas na Superfície dos Complexos

Os compostos voláteis presentes na superfície da amostra foram determinados por extração da superfície do complexo em pó com o solvente *n*-hexano, usando o método de BHANDARI et al. (1998) adaptado.

O solvente contendo o padrão interno 2-octanona (0,4g/L - 10mL) com o complexo (0,5g) foram delicadamente agitados manualmente. As amostras foram incubadas sem agitação à temperatura ambiente. O tempo empregado de incubação da suspensão foi de 24 horas, sendo coletadas alíquotas do solvente em tempos definidos, que posteriormente foram analisadas por GC-FID. A mistura foi, então, filtrada e o resíduo lavado com o *n*-hexano (10mL). Secou-se a pasta resultante por 1 hora a 50-60°C.

4.1.2.5. Estudo da Cinética de Formação dos Complexos

Os dados cinéticos da encapsulação das metilcetonas foram obtidos pela variação do tempo de agitação da mistura no processo de co-precipitação (item 4.1.2.2). A razão molar utilizada para cada metilcetona em relação à ciclodextrina foi determinada pelos resultados da determinação da estequiometria dos complexos (itens 5.1.2.2.1 e 5.1.2.2.2), utilizando os valores de saturação da β -ciclodextrina.

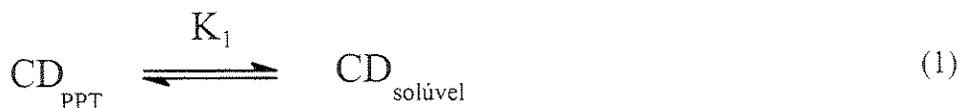
4.1.2.6. Cálculo das Constantes de Associação na Complexação

As constantes de equilíbrio dos complexos foram encontradas a partir da análise da complexação da ciclodextrina e dos valores de solubilidade encontrados para as metilcetonas livres em meio sem β -CD.

As solubilidades das metilcetonas livres foram determinadas pela adição de excesso de cada uma das metilcetonas estudadas em fase aquosa, ou seja, até que fosse formado um sobrenadante. As misturas foram levadas a 55°C por 30 minutos em sistema fechado e em seguida realizou-se a separação das fases em funil de separação. À fase aquosa foi feita extração com o solvente *n*-hexano contendo como padrão interno a 2-octanona (0,4g/L). Posteriormente, as amostras foram analisadas por cromatografia a gás.

ANÁLISE DA COMPLEXAÇÃO EM CICLODEXTRINA

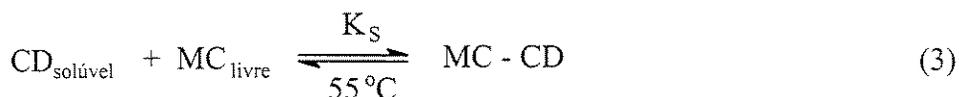
- Na solubilização a 55°C



$$K_1 = [\text{CD}]_{\text{solúvel}} \quad (2)$$

onde CD_{PPT} e $\text{CD}_{\text{solúvel}}$ são as concentrações de β -CD precipitada e solúvel, respectivamente. K_1 é a constante de equilíbrio de solubilidade.

- Na complexação a 55°C



onde $\text{CD}_{\text{solúvel}}$, MC_{livre} e $\text{MC} - \text{CD}$ são as concentrações da β -CD solúvel não complexada, da metilcetona não complexada e do complexo metilcetona-ciclodextrina, respectivamente. K_s é a constante de associação da complexação a 55°C.

- Na cristalização a 4°C



onde $\text{MC} - \text{CD} (25^\circ\text{C})$ e $\text{MC} - \text{CD} (4^\circ\text{C})$ são as concentrações do complexo metilcetona – ciclodextrina a 25°C e a 4°C, respectivamente. K_3 é a relação entre as concentrações do complexo a 4°C e a 25°C.

- Após o equilíbrio (no precipitado)

$$CD_{total} = CD_{solúvel} + MC - CD + CD_{PPT} \quad (5)$$

onde CD_{total} é a concentração de β -CD total.

Considerando $CD_{precipitada}$ desprezível: $CD_{livre} = CD_{solúvel}$

Considerando $MC-CD_{solúvel}$ desprezível: $MC-CD = MC-CD_{PPT}$

$$K_s = \frac{[MC - CD_{PPT}]}{[CD_{solúvel}][MC_{livre}]} \quad (6)$$

$$K_3 = \frac{[MC - CD]_{4^\circ C}}{[MC - CD]_{55^\circ C}} \quad (7)$$

$$K'_s = K_s \cdot K_3 \quad \rightarrow \quad K'_s = \frac{[MC - CD]_{4^\circ C}}{[CD_{livre}][MC_{livre}]} \quad (8)$$

Onde: $[MC-CD]_{4^\circ C}$ é a massa de precipitado obtida, $[CD_{livre}]$ é igual a $CD_{inicial} - CD_{complexada}$ e $[MC]_{livre}$ é igual a metilcetona solúvel (S_0) em meio sem β -CD.

4.1.2.7. Efeito do Reaproveitamento da Solução de Complexação na Relação Molar entre as Metilcetonas Retidas

A avaliação do efeito do reaproveitamento da solução de complexação na razão de retenção entre as metilcetonas foi realizada em triplicata. Inicialmente foi feita a complexação das metilcetonas em mistura de acordo com o método da co-precipitação descrito no item 4.1.2.2. Após o resfriamento a 4°C e a filtração da solução de complexação, a solução resultante da filtração foi adicionada ao sistema contendo 5g de β -CD a 55°C. A partir desta etapa os procedimentos foram os mesmos realizados na preparação usual do complexo. O reaproveitamento foi repetido com a solução filtrada da segunda e da terceira co-precipitações.

4.1.2.8. Estudo do Efeito das Variáveis na Secagem dos Complexos por “Spray Drying”

Foi feito um estudo da secagem dos complexos por “spray drying” para preparação e comparação dos complexos formados com os secos em estufa. Realizou-se um planejamento experimental fracionário 2^{4-1} para avaliação da influência das variáveis da secagem em “spray dryer” dos complexos da mistura de metilcetonas sintéticas em β -CD. A suspensão de co-precipitação foi levada à secagem após a mistura dos compostos a 55°C em agitador mecânico, sem prévia separação dos compostos solúveis. Foi utilizado para a secagem um “spray dryer” Büchi de bancada, descrito no item 3, com bico injetor de 1,5 mm. As variáveis estudadas foram: o teor de sólidos da suspensão alimentada ao “spray dryer” (X_1), a temperatura da suspensão de alimentação (X_2), a temperatura de entrada do “spray dryer” (X_3) e a vazão de alimentação (X_4). A Tabela 6 mostra os níveis avaliados e a 7 as condições dos ensaios realizados. A razão molar utilizada entre o total de metilcetonas e a β -CD foi de 1:1.

Tabela 6: Níveis estudados das variáveis no planejamento experimental.

Variáveis	Níveis codificados		
	-1	0	+1
X ₁ (m:m, sólidos:água)	04:100	10:100	16:100
X ₂ (°C)	30	55	80
X ₃ (°C)	120	145	170
X ₄ (mL/min)	2	3	4,5

Tabela 7: Planejamento experimental fracionário 2⁴⁻¹ das variáveis da secagem dos complexos por “spray drying” realizado em 3 níveis. X₁, X₂, X₃ e X₄ representam os valores das variáveis codificados de acordo com a Tabela 6.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

4.1.2.8.1. Comparação entre a Obtenção dos Complexos por Secagem em Estufa e em “Spray Dryer”

Foram comparados, em relação à razão molar de retenção das metilcetonas na ciclodextrina, os complexos obtidos pelo método de preparação já estudado, composto de 4 etapas: co-precipitação, cristalização, filtração e secagem em estufa, e o método de secagem em “spray dryer”, realizando a co-precipitação seguida de “spray drying” sem separação dos

compostos solúveis. As diferentes secagens foram comparadas nas melhores condições obtidas nos planejamentos experimentais realizados, sendo que o teor de sólidos para ambos os ensaios foi de 16% em massa.

4.1.3. Caracterização dos Complexos Cristalinos

Para a caracterização dos complexos formados foram feitas análises por difração de raios-X, espectroscopia de infra-vermelho, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN- C^{13}).

4.1.3.1. Difração de Raios-X

O difratograma de raios-X da β -ciclodextrina é bem definido, com picos agudos. No caso de substâncias que não têm estrutura cristalina, como as metilcetonas, não há difração dos raios-X. Assim, pode-se observar a formação de um complexo pela mudança dos picos no difratograma do complexo, evidenciando mudança na estrutura da molécula.

A amostra sólida foi densamente compactada num suporte e levada ao compartimento de difração de raios-X. As condições de operação do difratômetro são as seguintes: voltagem de 30KV, corrente de 35A, ângulo de difração 2θ na faixa de 3 a 30° , velocidade de varredura de 2° /minuto e “split” divergente de 1mm.

Foram feitas análises das amostras da β -CD e dos complexos de cada metilcetona nas condições de saturação. Estas amostras foram previamente colocadas em estufa a 105°C por 1 hora para que fossem retiradas as moléculas de água que poderiam estar presentes. Os complexos da análise foram preparados nas condições de saturação de retenção das metilcetonas. O complexo da mistura foi preparado na razão fixa de metilcetonas mostrada no item 4.1.2.

4.1.3.2. Espectroscopia de Infra-Vermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho foi realizada utilizando pastilhamento em KBr usando porcentual em massa de 1%.

4.1.3.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As análises de DSC foram realizadas para a obtenção de dados comparativos de transição térmica das moléculas de metilcetonas livres e complexadas em β -ciclodextrina. Para a obtenção dos resultados de DSC foi utilizado o equipamento descrito no item 3, utilizando uma panela vazia como referência.

Neste método, porções de aproximadamente 10mg das amostras foram pesadas em painéis de alumínio, que posteriormente foram fechadas. Para as amostras sólidas (complexos), usou-se painéis não herméticos e para as líquidas (metilcetonas livres), herméticos.

A varredura das amostras foi feita na faixa de temperatura de 25 a 300°C, sendo a taxa de aquecimento de 10°C/ minuto.

4.1.3.4. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C¹³)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13 com desacoplamento alternado foi realizada em uma rotação de 6,3 MHz em estado sólido.

4.1.4. Estudos de Estabilidade das Metilcetonas Complexadas

O estudo da estabilidade das metilcetonas inclusas na β -ciclodextrina foi realizado com o intuito de se avaliar a influência da encapsulação das metilcetonas em β -CD e, também, como uma forma de comprovação da formação do complexo.

A estabilidade foi avaliada com relação à proteção a volatilização, degradação térmica, oxidação e perdas durante estocagem.

4.1.4.1. Estabilidade à Volatilização das Metilcetonas nos Complexos

Foi feito um estudo comparativo da volatilidade das metilcetonas complexadas e em estado livre. A análise dos complexos sólidos foi realizada a 105°C, condições extremas, e a das moléculas livres líquidas à temperatura ambiente.

Para a avaliação da volatilização das substâncias encapsuladas, amostras dos complexos com cada uma das quatro metilcetonas em separado e em mistura foram pesadas em placas de Petri previamente secas. Foi realizada a secagem das placas a 85°C por 30 minutos, e posteriormente, as placas fechadas foram colocadas em dessecador por 30 minutos para que ocorresse o resfriamento. Após este tempo elas foram pesadas ainda vazias e em seguida com as amostras.

A secagem do material ocorreu a 105°C, sendo o tempo de permanência na estufa diferente para cada uma das amostras, de 0 a 24 horas. Após o aquecimento foi repetido o mesmo procedimento de resfriamento e pesagem utilizado para as placas vazias.

Como comparação à volatilização das metilcetonas em ciclodextrina, a volatilização das moléculas livres foi monitorada em balança analítica, em condições ambientes de temperatura e pressão. Amostras de metilcetonas livres (0,1000g) foram colocadas em placas Petri abertas sobre a balança. Foi definido o tempo para que ocorresse total vaporização da amostra.

4.1.4.2. Estabilidade Térmica das Metilcetonas nos Complexos

O estudo da estabilidade térmica dos complexos foi realizado por análise de gravimetria térmica (TGA), em equipamento descrito no item 3, com a utilização de uma panela de referência com óxido de alumínio.

Porções de aproximadamente 20 mg de complexo foram pesadas em panela de platina que permaneceu aberta durante a análise. O termograma foi feito na faixa de temperatura entre 25

e 450°C, com taxa de aquecimento de 10°C/ minuto. Durante o aquecimento, foi monitorada a variação de massa da amostra.

4.1.4.3. Proteção à Oxidação das Metilcetonas nos Complexos

A proteção à oxidação, das metilcetonas complexadas, foi avaliada colocando amostras dos complexos (~0,5g) em tubos fechados com atmosfera de oxigênio puro, à temperatura ambiente. Como referência, parte das mesmas amostras foram colocadas em tubos com nitrogênio puro, atmosfera inerte, para avaliação paralela. Assim, a quantidade de metilcetona oxidada foi verificada pela diferença entre a quantidade de metilcetona nas amostras com nitrogênio e nas amostras com oxigênio.

Em tempos determinados, porções das amostras foram coletadas e analisadas com relação à quantidade da metilcetona remanescente.

4.1.4.4. Estabilidade das Metilcetonas no Complexo durante Estocagem

A análise da estabilidade dos complexos durante a estocagem foi feita monitorando em tempos determinados amostras de cada um dos complexos estudados. As amostras (~2g) foram colocadas em placas de Petri abertas, em condições ambientes, e a avaliação da estabilidade foi feita pela extração total das metilcetonas e posterior análise por cromatografia a gás, utilizando os mesmos procedimentos de quantificação das metilcetonas (item 4.1.2.3).

O estudo da estabilidade em frascos fechados foi feito de maneira similar, porém, armazenando as amostras em tubos fechados e mantidos em dessecador.

4.1.5. Estudos da Complexação do Bioaroma de Gorgonzola em β -CD

O bioaroma de gorgonzola usado nos estudos foi obtido em fermentação a partir de um meio composto de creme de leite de vaca e de suspensão enzimática, de acordo com a metodologia descrita por OLIVEIRA (1998) (item 2.2.2.2). Após a produção do aroma, o caldo

resultante da fermentação foi submetido à extração e à filtração para a separação dos esporos e recuperação dos compostos de aroma, o que resultou em um líquido amarelo e translúcido.

4.1.5.1. Método de Preparação dos Complexos com o Bioaroma

A preparação do complexo do bioaroma de gorgonzola foi baseada no método estudado com as metilcetonas sintéticas (item 4.1.2). Porém, a água foi substituída pelo líquido do caldo de fermentação, obtido por extração por etanol, não tendo, portanto, adição gota à gota dos compostos de aroma. Desta forma, o caldo de fermentação foi adicionado à β -CD, sendo o teor de sólidos da suspensão de 12%. A comparação dos métodos de secagem dos complexos foi feita de acordo com o procedimento descrito no item 4.1.2.8.1.

4.1.5.2. Caracterização dos Complexos Formados

Os complexos formados foram caracterizados pela quantidade de metilcetonas presentes a partir da extração e concentração dos voláteis em “Purge and Trap” seguida de GC-FID e pela geometria formada nos métodos de secagem por estufa e por “spray dryer” a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.1.5.2.1. Extração e Concentração dos Voláteis em “Purge and Trap”

Como a concentração dos compostos do bioaroma de gorgonzola era muito baixa, a extração com o *n*-hexano e posterior cromatografia a gás não tinham sensibilidade suficiente para analisar quantitativamente as amostras. Desta forma, foi necessária a concentração dos voláteis, por extração e adsorção em coluna acoplada ao cromatógrafo, em um equipamento de “Purge and Trap” (mencionado no item 3).

As amostras a serem analisadas foram colocadas, em solução aquosa (5mL), em um suporte de vidro de capacidade para 25mL acoplado ao “Purge and Trap”, ao qual era adicionado 2mL de padrão interno 2-octanona (0,05mg/L). A coluna de adsorção utilizada foi a Vocarb 3000 e o gás para a purga o Hélio. As amostras foram purgadas por 15 minutos à temperatura

ambiente. A dessorção foi feita a 225°C durante 4 minutos, e posteriormente, a coluna de adsorção era aquecida por mais 6 minutos a 225°C para limpeza. A pressão na coluna de adsorção durante a purga do gás foi ajustada para 60KPa. A injeção no cromatógrafo, das amostras dessorvidas, era feita automaticamente e as condições seguiam as mostradas no item 4.1.2.3.2.

Como a β -CD influencia a quantificação das metilcetonas por “Purge and Trap”, devido à complexação, a curva de calibração foi obtida na presença de β -CD, variando a massa empregada em cada purga dos padrões das metilcetonas. Assim, para cada massa usada de β -CD foi obtido um coeficiente angular correspondente para a calibração das metilcetonas. Desta forma, construiu-se uma curva dos coeficientes angulares versus a massa de β -CD.

Como as amostras dos complexos com o bioaroma de gorgonzola a serem analisadas não se dissolviam completamente e com isso não se tinha a quantificação da massa dissolvida por pesagem, foi construída uma curva que relacionava a área do padrão interno obtida no cromatograma com a massa de β -CD dissolvida. A partir desta correlação foram obtidas as massas de β -CD nas amostras e, assim, as relações em massas entre as metilcetonas e a β -CD nos complexos.

A concentração total de metilcetonas no bioaroma utilizado foi determinada pela soma das concentrações de metilcetonas presentes nos complexos em pó e nas soluções filtradas obtidas na preparação dos complexos com secagem em estufa. A determinação do total das metilcetonas no bioaroma livre não pode ser obtida de forma direta possivelmente devido à interferência de compostos que se complexam com as metilcetonas prejudicando a análise e não resultando, portanto, na quantificação total da amostra.

4.1.5.2.2. Caracterização da Geometria dos Complexos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras em pó foram metalizadas com uma liga de ouro e platina à espessura de 92Å com taxa de recobrimento de 0,5Å/s para análise em microscópio eletrônico de varredura (item 3). A amplificação da imagem das amostras foi de 500 a 3500 vezes.

4.2.1. Estudo da Encapsulação em Lipossomas das Metilcetonas Sintéticas na Concentração do Bioaroma de Gorgonzola

A estabilização das metilcetonas em lipossomas foi estudada usando uma solução aquosa contendo as metilcetonas sintéticas em diluição próxima à do bioaroma de gorgonzola.

O procedimento utilizado baseou-se no método de SILVA et al. (1992).

4.2.1.1. Preparação dos Lipossomas em Suspensão

A solução aquosa de metilcetonas (90% em massa) foi adicionada gradualmente à lecitina de soja (10% em massa) à temperatura de 65°C e rotação de 200rpm. Após 3 minutos, com a homogeneização da suspensão, a rotação era aumentada para 2000rpm e mantida por 25 minutos. Após os primeiros 10 minutos de agitação a 2000rpm o aquecimento era retirado do sistema.

Para que se pudesse avaliar o efeito de um agente estabilizador das membranas lipídicas no lipossoma, como um açúcar, durante o processo de secagem, foi utilizado o manitol na preparação das vesículas adicionando-se o composto na relação molar de 30:70 manitol: lecitina. O manitol foi adicionado a 200rpm após a preparação do lipossoma, com posterior agitação a 2000rpm por 25 minutos.

4.2.2. Secagem dos Lipossomas

Os lipossomas foram secos em “spray dryer”, equipamento descrito no item 3, após 1 dia de repouso para estabilização da suspensão. A vazão de alimentação foi de 4,5mL/min., a temperatura de entrada de 120°C estando a amostra à temperatura ambiente e sendo o teor de sólidos das amostras de 10%.

4.2.3. Caracterização dos Lipossomas

Os lipossomas foram caracterizados pela quantificação da encapsulação das metilcetonas e pelas estruturas formadas, distribuição de tamanho (QELS, item 4.1.3.3) e morfologia. Lipossomas em suspensão: microscopia óptica (item 4.2.3.4) e lipossomas secos: microscopia eletrônica de varredura (MEV, item 4.1.5.2.2).

4.2.3.1. Quantificação das Metilcetonas Encapsuladas

Para a quantificação das metilcetonas encapsuladas na suspensão de lipossomas foi necessária uma separação prévia das metilcetonas livres. A separação foi realizada a partir da diluição das amostras, decantação, retirada do sobrenadante e posterior resuspensão em solução aquosa. Para que fosse analisado o efeito da diluição na liberação das metilcetonas nos lipossomas, foram feitas diluições de 2, 5 10 e 20 vezes nas amostras da suspensão. Após um dia em repouso para a decantação dos lipossomas, foram analisadas porções do sobrenadante e do decantado. O teor de lecitina no decantado foi obtido pelo ensaio fosfato, de acordo com o item 4.2.3.2.

A análise foi realizada por cromatografia a gás precedida da concentração dos voláteis no “Purge and Trap”. O processo seguiu o método descrito no item 4.1.5.2.1.

As amostras dos lipossomas em pó foram analisadas de maneira similar, não sendo necessária a separação das metilcetonas não encapsuladas, devido à secagem. Porções de aproximadamente 0,003g de amostra em pó eram dissolvidas em 5mL de água e injetadas no “Purge and Trap”. A calibração das metilcetonas foi feita sem a presença de lecitina devido à não interferência na análise.

4.2.3.2. Quantificação da Lecitina

A lecitina foi quantificada pela medida do teor de fosfato (PO_4^{-3}) nas amostras, grupo presente nos fosfolipídios constituintes da lecitina. O ensaio baseia-se no método desenvolvido

por CHEN (1956), que consiste da oxidação das cadeias de ácido graxo com ácido sulfúrico, resultando em carbono elementar, em seguida é feita a oxidação total dos carbonos em dióxido de carbono (CO₂) pela adição de peróxido de hidrogênio. O fósforo é, então, transformado em ortofosfato pelo molibdato de amônio, que é reduzido pelo ácido ascórbico resultando num complexo de coloração azul.

Toda a vidraria utilizada no procedimento foi lavada com detergente livre de fosfato para que não houvesse interferências na análise. Foram colocadas 2 pérolas de vidro em cada tubo de ensaio para melhorar a distribuição de calor e, em seguida, foi adicionado 100µL da amostra. Adicionou-se 500µL de ácido sulfúrico (10N) e a mistura foi aquecida a 200°C por 30 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 165µL de água oxigenada e aqueceu-se a 200°C por mais 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4mL de água destilada à temperatura ambiente. Em seguida, colocou-se 500 µL de molibdato de amônio (0,02g/mL) e 500µL de ácido ascórbico (0,1g/mL). Aqueceu-se por 7 minutos à temperatura de 70°C para formação do complexo azul. As absorvâncias foram, então, medidas em espectrofotômetro (item 3) a 830 nm.

4.2.3.3. Medida de Distribuição do Tamanho das Partículas por Espalhamento Quasi-Elástico de Luz (QELS)

A distribuição do tamanho das partículas é medida a partir do espalhamento quasi-elástico de luz laser (item 3), que correlaciona o espalhamento da luz ao diâmetro das partículas. As amostras foram colocadas em cubeta e esta era imersa em um banho de água Milli-Q a 25°C. O fotomultiplicador foi alinhado em 90° em relação ao feixe de luz incidente.

4.2.3.4. Caracterização da Geometria dos Lipossomas por Microscopia Óptica

As amostras de lipossomas foram adequadamente diluídas e colocadas em lâminas de vidro com sobreposição de uma lamínula para análise em microscópio óptico (item 3). A amplificação das imagens das amostras foi de 500 vezes.

4.3. Estudos Comparativos por Análise Sensorial dos Compostos Obtidos na Encapsulação do Bioaroma de Gorgonzola em β -CD e em Lipossomas

A análise sensorial foi realizada utilizando amostras do bioaroma de gorgonzola encapsulado em β -CD, com secagem em estufa e em “spray dryer”, e em lipossomas secos por “spray drying”. A proporção de sólidos foi de aproximadamente 12% em massa para todas as preparações, contendo o bioaroma aproximadamente 3% de sólidos. Os métodos usados na preparação dos compostos são os descritos nos itens 4.1.5.1, para os complexos com a β -CD, e 4.2.1.1 e 4.2.2, para os lipossomas.

O bioaroma de gorgonzola usado nas preparações foi obtido em batelada diferente do usado nos experimentos do estudo descrito no item 4.1.5, sendo o creme de leite do meio de fermentação o de cabra em substituição ao de vaca anteriormente usado. A mudança no meio deu-se devido ao melhor rendimento das metilcetonas com o creme de leite de cabra, o que levaria a um caldo mais concentrado podendo, assim, resultar em encapsulações com o aroma mais intenso. Além disso, a filtração do caldo de fermentação foi feita até que a parte mais gordurosa do meio também fosse filtrada e incorporada a suspensão do bioaroma. Desta forma, o caldo resultante era composto de duas fases, sendo a fase topo cremosa e a do fundo líquida. Assim, antes da encapsulação foi feita uma homogeneização do bioaroma por agitação magnética e posterior sonicação em banho por 30 minutos.

4.3.1. Análise Sensorial dos Compostos de Encapsulação do Bioaroma de Gorgonzola

A análise sensorial foi constituída de 3 testes: de ordenação da intensidade do sabor de gorgonzola, de aceitação das amostras pelo consumidor e de atitude de compra.

Foram preparadas 3 amostras de patê contendo 3% em massa do pó dos compostos do bioaroma de gorgonzola encapsulados: em β -CD com secagem em estufa (amostra 245), em β -CD com secagem em “spray dryer” (amostra 862) e em lipossomas com secagem em “spray dryer” (amostra 458), sendo usado o requeijão do tipo “light” como base de consistência pastosa. As amostras foram servidas com torradas e apresentadas simultaneamente aos provadores em ordem aleatória.

A análise foi realizada com provadores não treinados, num total de 30 pessoas, sendo a ficha apresentada de acordo com o modelo a seguir:

MODELO DA FICHA DA ANÁLISE SENSORIAL

Nome: _____

Data: __/__/__

Você está recebendo 3 amostras de patê . Ordene-as da esquerda para a direita em ordem crescente de **intensidade de sabor de queijo gorgonzola.**

- intenso

+intenso

Utilizando a escala abaixo, avalie o que você achou de cada amostra, em relação ao sabor de queijo gorgonzola:

AMOSTRA	Desgostei muitíssimo	Gostei muitíssimo
---------	-------------------------	----------------------

_____	_____
_____	_____
_____	_____

Comentários: _____

Se estes produtos estivessem à venda, utilizando a escala abaixo, indique qual seria sua atitude:

- 1- eu certamente não compraria
- 2- eu provavelmente não compraria
- 3- eu tenho dúvida se compraria ou não
- 4- eu provavelmente compraria
- 5- eu certamente compraria

AMOSTRA

ATITUDE DE COMPRA

_____	_____
_____	_____
_____	_____

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.1. Predição Teórica da Encapsulação das Metilcetonas em β -Ciclodextrina

O procedimento utilizado para a obtenção dos resultados da predição teórica da inclusão das metilcetonas na β -CD está descrito no item 4.1.1. A Figura 4 apresenta a molécula de β -CD com a cavidade vazia e as estruturas das metilcetonas livres otimizadas em relação às distâncias atômicas e os ângulos de ligação.

A otimização das moléculas resultou em estruturas com energia iguais a:

- 2-pentanona: 1,53 kcal/mol
- 2-heptanona: 2,81 kcal/mol
- 2-nonanona: 4,08 kcal/mol
- 2-undecanona: 5,36 kcal/mol
- β -ciclodextrina: 95,56 kcal/mol

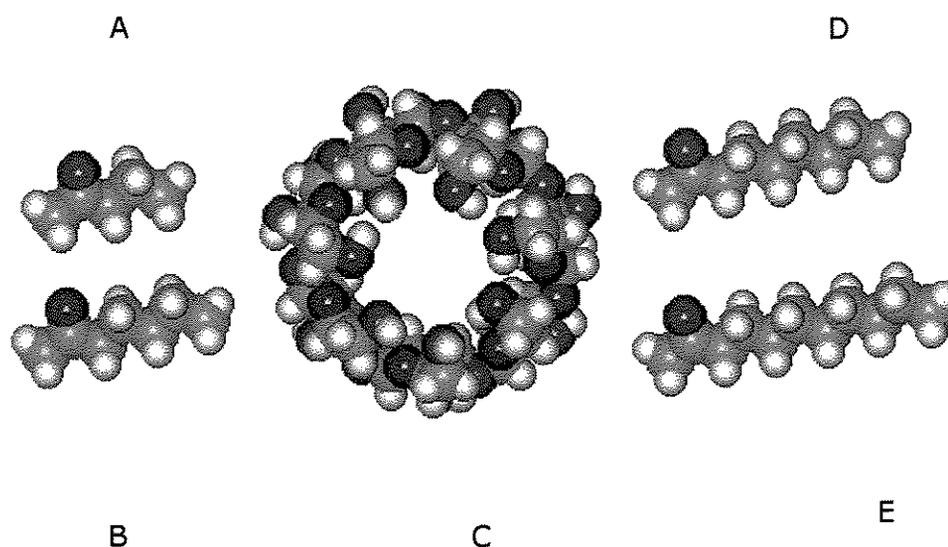


Figura 4: Modelos de estruturas moleculares, A: 2-pentanona, B: 2-heptanona, C: β -CD, D: 2-nonanona e E: 2-undecanona. As esferas representam os átomos, sendo o carbono, a verde, o hidrogênio, a prateada e o oxigênio, a vermelha.

De acordo com TEE et al. (1996) as 2-alcanonas apresentam correlação linear entre o pK_d ($= -\log K_d$, constante de dissociação) e o comprimento da cadeia, para valores de comprimento de cadeia de 3 a 8 carbonos em solução aquosa a 25°C. Esta correlação para complexos com a β -ciclodextrina é de 0,459. Extrapolando o comprimento de cadeia até n igual a 11, tem-se as constantes de dissociação dos complexos em solução:

- 2-pentanona: $5,07 \cdot 10^{-3}$
- 2-heptanona: $6,12 \cdot 10^{-4}$
- 2-nonanona: $7,4 \cdot 10^{-5}$
- 2-undecanona: $9,0 \cdot 10^{-6}$

Como os valores das constantes de dissociação sofrem um aumento da ordem de aproximadamente 10 vezes com a diminuição de 2 carbonos na cadeia da metilcetona, pode-se prever que a encapsulação molecular da 2-undecanona é a mais estável e que à medida que diminui o comprimento da cadeia, diminui a força de ligação entre a metilcetona e a β -CD.

A seguir são apresentados os resultados da predição da encapsulação das metilcetonas no interior da β -CD.

5.1.1.1. Inclusão da 2-Pentanona em β -Ciclodextrina

De acordo com o Software Hyperchem, é possível ocorrer a inclusão da 2-pentanona no interior da β -CD, como aparece na Figura 5. A inclusão da 2-pentanona foi possível com a entrada da molécula pelo lado da carbonila e pelo do grupo metila.

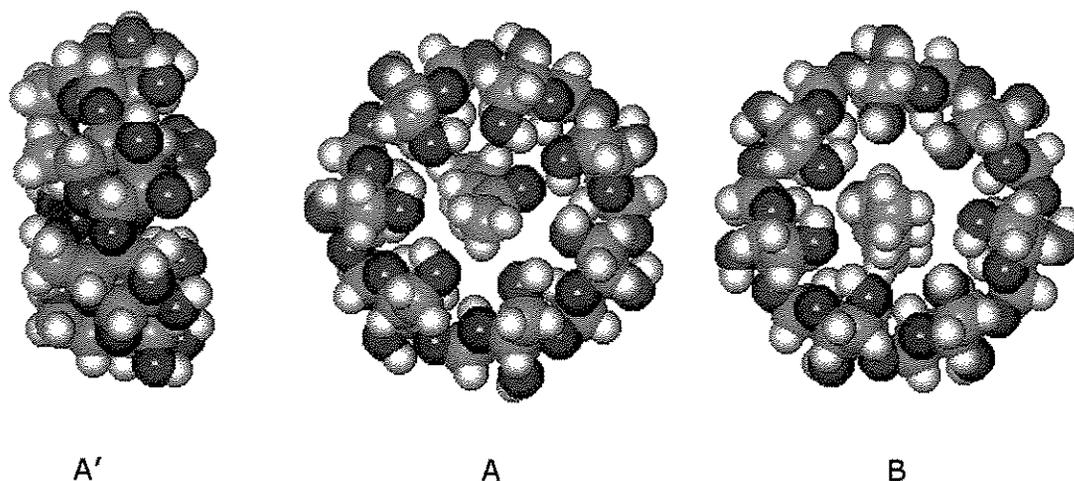


Figura 5: Representação da inclusão molecular da 2-pentanona no interior da cavidade da β -CD. As cores representativas dos átomos são as mesmas usadas na Figura 4. As esferas azuis correspondem à molécula de 2-pentanona. A: inclusão da pentanona com a carbonila voltada para o lado da β -CD com extremidade mais estreita, A': A vista lateralmente e B: inclusão com a carbonila para a lado de maior abertura.

De acordo com a representação das moléculas, observa-se que a altura da cavidade da β -CD tem aproximadamente a mesma medida do comprimento da 2-pentanona (Figura 5 A'). Desta forma, a estrutura da pentanona fica praticamente inteira no interior de uma molécula de β -CD.

As energias obtidas na predição das estruturas são:

- A : 9,56 kcal/mol
- B: 10,62 kcal/mol

Foi constatado que apenas uma molécula de pentanona entra na cavidade da ciclodextrina. Com isto, pode-se prever a estequiometria de inclusão como sendo de 1:1 (mol 2-pentanona: mol β -CD). Além disso, considerando as energias obtidas na simulação, a estrutura A, com menor energia, é termodinamicamente mais favorável que a B.

5.1.1.2. Inclusão da 2-Heptanona em β -Ciclodextrina

A 2-heptanona também pode ser encapsulada na β -CD. Porém, diferentemente do que ocorre com a pentanona, parte da molécula não está no interior da “hospedeira”, pois possui comprimento maior que a altura da cavidade. De acordo com o Software Hyperchem, que considera as moléculas no vácuo, ou seja, sem as interferências do meio aquoso, dependendo de como entre na cavidade da β -CD os grupos CH_2CH_3 (Figura 6A) ou COCH_3 (Figura 6B) ficam na parte externa ou pode ocorrer, também, com a aproximação de outra molécula de β -CD, a inclusão da parte restante por outra ciclodextrina, como pode ser observado na Figura 6.

As energias previstas da 2-heptanona nos complexos são:

- A: 8,89 kcal/mol
- B: 7,20 kcal/mol
- C: 8,53 kcal/mol
- D: 2,17 kcal/mol
- E: 1,72 kcal/mol

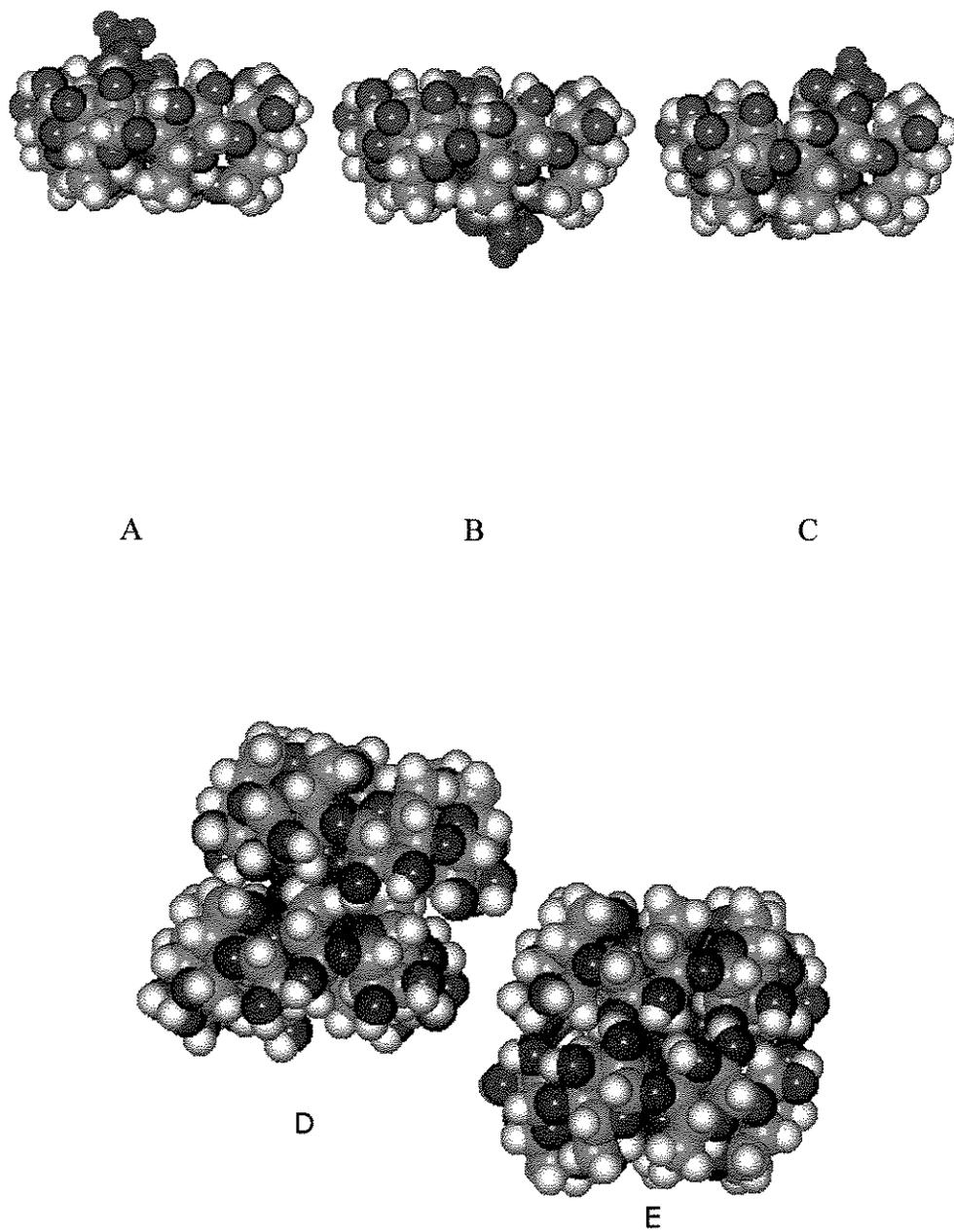


Figura 6: Representação da predição das estruturas moleculares dos complexos de β -CD com 2-heptanona (A, B,C: complexo com uma β -CD, D, E: complexo com duas β -CD's. As cores correspondem às mesmas moléculas que da Figura 4.

A estrutura A tem a carbonila voltada para o meio, fora da cavidade da β -CD pelo lado do maior anel; a B tem a carbonila para fora pelo lado do menor anel e a C possui apenas grupos alquila voltados para o meio pela extremidade maior. Esta última configuração não ocorre fisicamente devido às interações de repulsão do meio aquoso com os grupos alquila. Já as estruturas D e E, com 2 β -CD's, diferem pela posição de uma ciclodextrina em relação à outra, na D, os lados maior de uma e menor de outra é que se encontram, na E, ambas as maiores extremidades estão voltadas para o meio da estrutura.

De acordo com a simulação realizada no Software Hyperchem, que considera as moléculas no vácuo, o complexo B apresenta energia menor que o A e o C e, portanto, é termodinamicamente mais favorável. Assim, a estrutura que melhor representa a 2-heptanona no interior de uma ciclodextrina é a do complexo com o grupo carbonila da 2-heptanona voltado para o lado da extremidade menor da ciclodextrina.

Entre as estruturas com duas β -CD's, considerando fatores estéricos em que a molécula de 2-heptanona tem maior facilidade de entrar na cavidade da ciclodextrina pelo lado de maior extremidade, a mais favorável é a E, que proporciona menor energia à 2-heptanona. Considerando esta estrutura, possivelmente, a estequiometria do complexo seja de 1:2, molécula de 2-heptanona para de β -CD.

5.1.1.3. Inclusão da 2-Nonanona em β -Ciclodextrina

A 2-nonanona também pode ser encapsulada na β -CD, da mesma forma que ocorre com a heptanona, parte da molécula não se posiciona no interior da “hospedeira”. Pode ocorrer, também, com a aproximação de outra molécula de β -CD, a inclusão da parte restante por outra ciclodextrina, como pode ser observado na Figura 7.

As energias previstas para a 2-nonanona nos complexos são:

- A: 9,75 kcal/mol
- B: 7,66 kcal/mol
- C: 7,07 kcal/mol
- D: 1,04 kcal/mol
- E: 1,75 kcal/mol

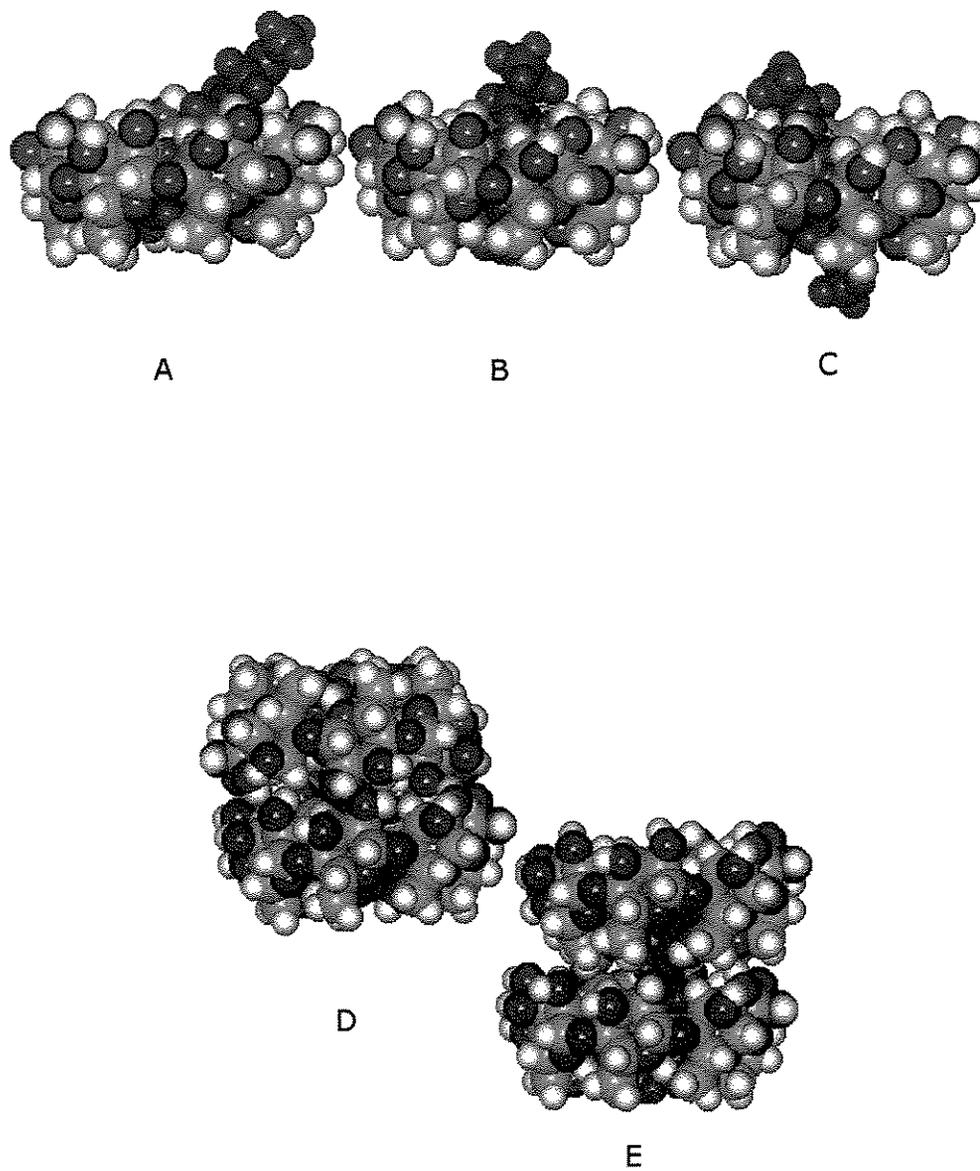


Figura 7: Representação da predição das estruturas moleculares dos complexos de β -CD com 2-nonanona. A, B, C: complexo com uma β -CD e D, E: complexo com duas β -CD's. As cores correspondem às mesmas moléculas que da Figura 4.

A estrutura A tem a carbonila voltada para o meio de solução, fora da cavidade da β -CD pelo lado do maior anel; a B tem a carbonila no interior da ciclodextrina voltada para o lado do menor anel, e a C possui as duas extremidades da 2-nonanona para fora da cavidade com o grupo da carbonila voltada para o lado do menor anel. Esta última configuração não ocorreria fisicamente pelas razões já apresentadas no item 5.1.1.2. Já as estruturas D e E, que possuem 2 β -CD's diferem pela posição de uma ciclodextrina em relação à outra, na D, ambas as maiores extremidades estão voltadas para o meio da estrutura, já na E, os lados maior de uma e menor de outra é que se encontram.

Por análise das energias dos complexos formados a estrutura C é mais favorável termodinamicamente que as A e B, para a complexação em uma molécula de ciclodextrina, e dentre as com duas β -CD's a D, que possui a menor energia para a nonanona, é mais que a E. Desta forma, considerando a estrutura D como de melhor predição, espera-se que a estequiometria do complexo verdadeiro seja de 1:2 (mol nonanona:mol β -CD).

5.1.1.4. Inclusão da 2-Undecanona em β -Ciclodextrina

A predição teórica da encapsulação molecular da 2-undecanona em β -ciclodextrina é semelhante à da inclusão da 2-nonanona, item 5.1.3. A Figura 8 mostra as estruturas obtidas pelo Hyperchem.

As energias preditas da 2-undecanona nos complexos são:

- A: 6,36 kcal/mol
- B: 8,55 kcal/mol
- C: 10,97 kcal/mol
- D: 5,04 kcal/mol
- E: 6,42 kcal/mol

A estrutura A (Figura 8) possui as extremidades da 2-undecanona para fora da cavidade com o grupo da carbonila voltada para o lado do menor anel,; a B tem a carbonila no interior da ciclodextrina voltada para o lado do menor anel, configurações não possíveis fisicamente devido interações análogas as citadas no item 5.1.1.2, e a C tem a carbonila voltada para o meio de solução, fora da cavidade da β -CD pelo lado do maior anel. Já as

estruturas D e E, que possuem 2 β -CD's diferem pela posição de uma ciclodextrina em relação à outra, na D, ambas as maiores extremidades estão voltadas para o meio da estrutura, já na E, os lados maior de uma e menor de outra é que se encontram.

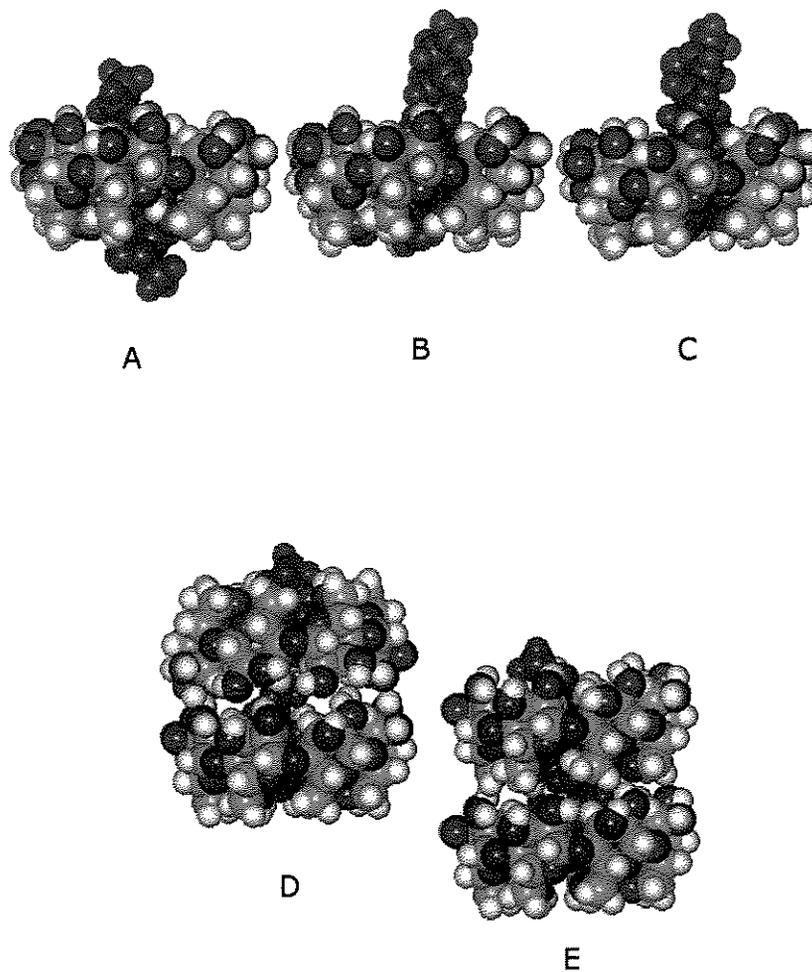


Figura 8: Representação da predição das estruturas moleculares dos complexos de β -CD com 2-undecanona. A, B, C: complexo com uma β -CD e D, E: complexo com duas β -CD's. As cores correspondem às mesmas moléculas que da Figura 4.

Por análise análoga à realizada no item anterior as estruturas B e C são menos estáveis que a A, e dentre as com duas β -CD's a D, que possui a menor energia para a

undecanona, é mais que a E. Desta forma, considerando a estrutura D como de melhor predição, espera-se que a estequiometria do complexo verdadeiro seja de 1:2 (mol undecanona: mol β -CD).

5.1.2. Estudos da Complexação das Metilcetonas Sintéticas em β -CD

5.1.2.1. Influência das Variáveis da Co-Precipitação no Rendimento de Retenção das Metilcetonas

As variáveis da co-precipitação foram estudadas por planejamento experimental de acordo com o item 4.1.2 para definição das condições experimentais da preparação dos complexos. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 8 e 9 e nas Figuras 9 a 12.

Tabela 8: Rendimentos obtidos pelo planejamento experimental em estrela 2^3 com ponto central (X_1 : concentração de etanol na solução de β -CD, X_2 : concentração de etanol na diluição das metilcetonas adicionadas e X_3 : volume de diluição das metilcetonas).

Ensaio	X_1	X_2	X_3	Rendimento total (%)
1	-1	-1	-1	50,8
2	1	-1	-1	12,7
3	-1	1	-1	41,5
4	1	1	-1	6,9
5	-1	-1	1	45,6
6	1	-1	1	18,3
7	-1	1	1	36,5
8	1	1	1	1,2
9	0	0	0	37,4
10	0	0	0	35,3
11	0	0	0	36,0
12	0	0	0	35,9
13	$-2^{3/4}$	0	0	65,7
14	$2^{3/4}$	0	0	4,2
15	0	$-2^{3/4}$	0	61,1
16	0	$2^{3/4}$	0	14,0
17	0	0	$-2^{3/4}$	35,5
18	0	0	$2^{3/4}$	31,8

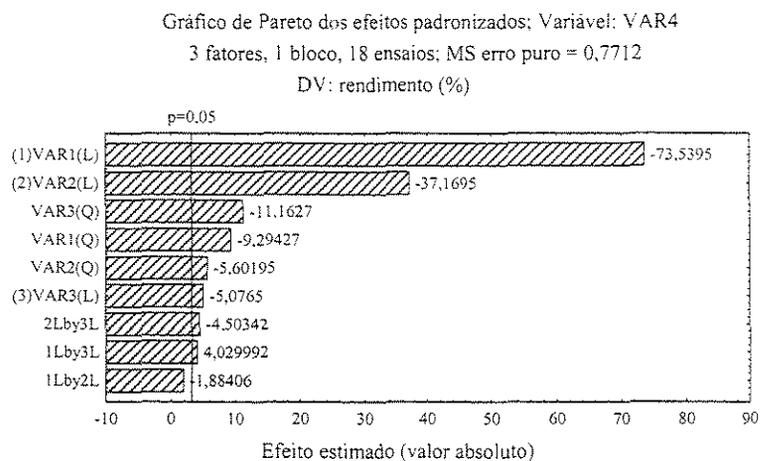


Figura 9: Gráfico de Pareto dos experimentos do planejamento fatorial completo das variáveis da co-precipitação, obtido a partir de valores do erro puro, calculado pela variação dos dados dos ensaios 9 a 12.

De acordo com a Figura 9, pode-se notar que apenas a interação entre as variáveis concentração de etanol: água na solução de co-precipitação e na solução de adição das metilcetonas não foi significativa a um nível de confiança de 95%. Desta forma, a análise da variância dos dados (ANOVA) foi obtida ignorando-se o efeito desta interação.

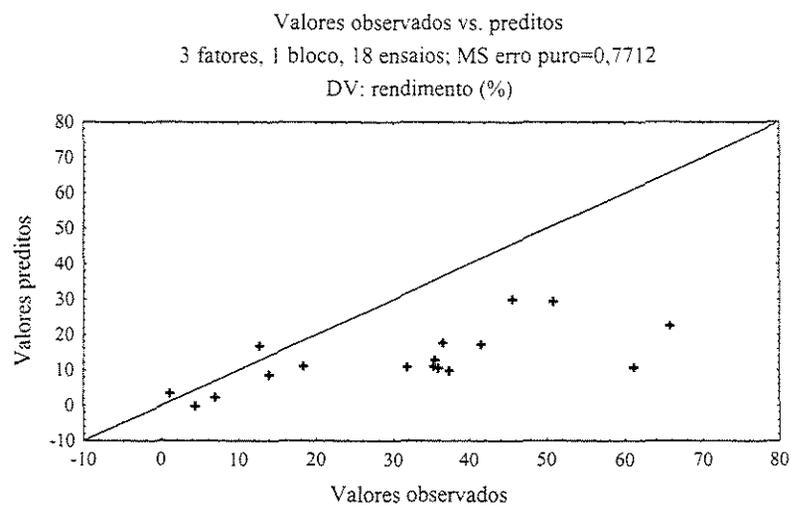


Figura 10: Gráfico comparativo dos valores preditos pelo modelo linear e dos observados.

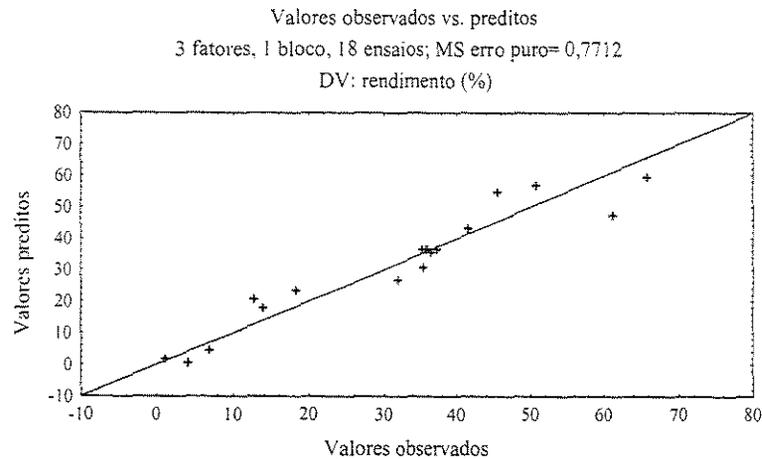


Figura 11: Gráfico comparativo dos valores preditos pelo modelo quadrático e dos observados.

Além disso (Figura 10), observa-se que há um desvio dos valores observados em relação aos preditos no modelo linear, tendência que não ocorre na predição do modelo quadrático (Figura 11). Assim, conclui-se que o modelo quadrático é mais adequado ao ajuste dos dados experimentais. Desta forma, a ANOVA foi obtida incluindo-se os efeitos quadráticos no modelo.

Tabela 9: Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados do planejamento fatorial em estrela das variáveis da co-precipitação (ANOVA).

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	5471,099	8	683,89	11,64	3,23
Resíduos	528,930	9	58,77		
Falta de ajuste	526,613	6	87,77	113,99	8,94
Erro puro	2,314	3	0,77		
Total	5951,926	17	-		

% variação explicada = 0,91113, $r = 0,95$

% máxima de variação explicável = 0,999

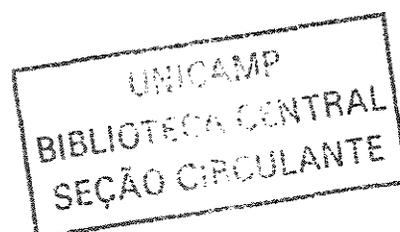
$$F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} (\text{regressão}) = 3,60$$

$$F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} (\text{resíduos}) = 12,75$$

Nota-se que mesmo os resultados de F calculado e tabelado não sendo maiores do que 5, o modelo quadrático é mais adequado ao ajuste dos dados experimentais que o linear. Assim, as superfícies de resposta e as áreas de contorno das variáveis estudadas, Figura 12, foram geradas a partir do modelo quadrático codificado, com intervalo de 95% de confiança, apresentado na Equação 9.

$$\begin{aligned}
 Y = & 36,5741 - 17,4832X_1 - 2,2983X_1^2 - 8,8366X_2 - 1,3853X_2^2 - 1,2069X_3 - 2,7603X_3^2 \\
 & (\pm 0,4384) \quad (\pm 0,2377) \quad (\pm 0,2473) \quad (\pm 0,2377) \quad (\pm 0,2473) \quad (\pm 0,2377) \quad (\pm 0,2473) \\
 + & 1,2512X_1X_3 - 1,3982X_2X_3 \quad (9) \\
 & (\pm 0,3105) \quad (\pm 0,3105)
 \end{aligned}$$

A Figura 12 apresenta as superfícies de resposta e as áreas de contorno obtidas com o Software STATISTICA.



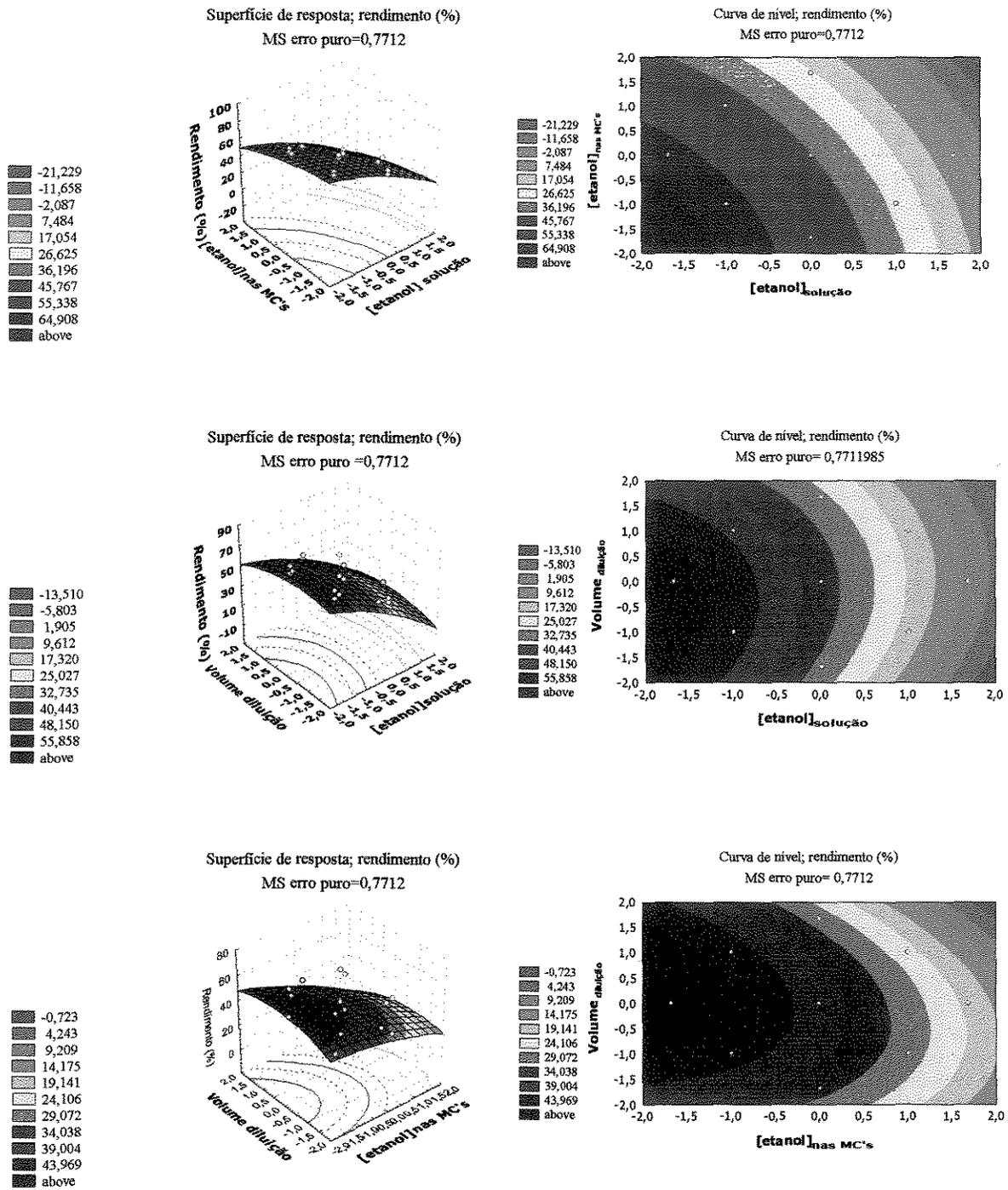


Figura 12: Superfícies de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo da equação 9 codificada.

Observou-se que a presença de etanol na solução de co-precipitação e na diluição das metilcetonas resulta em menores retenções das metilcetonas, bem como a maior diluição das metilcetonas. Isto é devido à maior solubilidade das metilcetonas em meio etanol: água, favorecendo a sua partição na solução.

Portanto, as melhores condições experimentais para a realização da co-precipitação encontradas nos experimentos foram a adição concentrada das metilcetonas e a ausência de etanol. Sendo, assim, definidas as condições da co-precipitação para os estudos de complexação em β -CD.

5.1.2.2. Influência da Razão Molar Inicial (Metilcetona: β -CD) na Complexação e Determinação da Estequiometria dos Complexos Formados

5.1.2.2.1. Complexos com as Metilcetonas em Separado

O método utilizado para a obtenção dos dados da influência da razão molar inicial entre as metilcetonas e a β -CD está descrito no item 4.1.2.4. As Figuras 13 a 16 representam os resultados (em base seca) obtidos nos experimentos, realizados a 55°C.

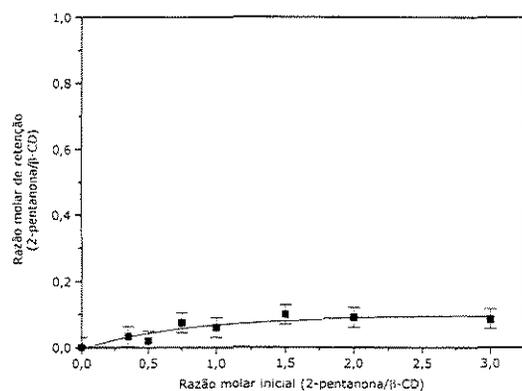


Figura 13: Perfil da influência da razão molar inicial na retenção total da 2-pentanona na β -CD.

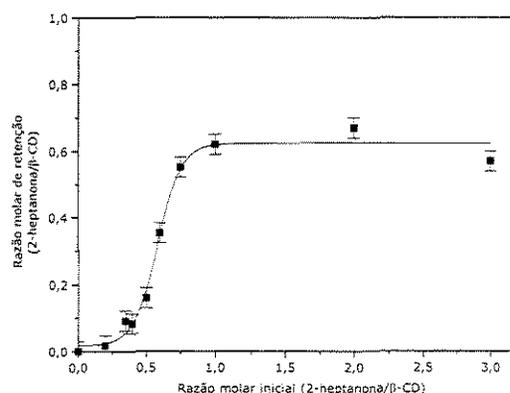


Figura 14: Perfil da influência da razão molar inicial na retenção total da 2-heptanona na β -CD.

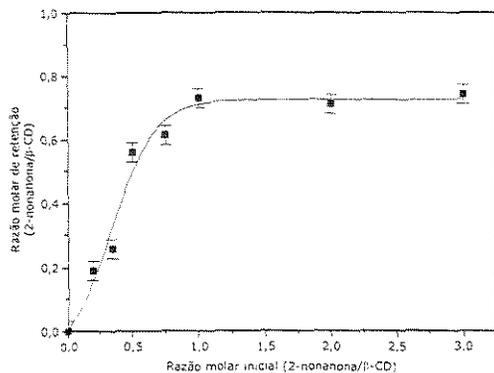


Figura 15: Perfil da influência da razão molar inicial na retenção total da 2-nonanona em β -CD.

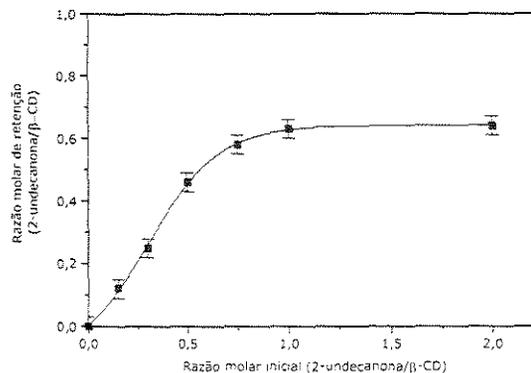


Figura 16: Perfil da influência da razão molar inicial na retenção total da 2-undecanona em β -CD.

Pelas Figuras 13 a 16, verifica-se que os valores da razão molar inicial para a saturação da retenção total no complexo é de 1:1 para todas as metilcetonas estudadas, não havendo maior retenção com o aumento da razão molar inicial, considerando o erro experimental dos ensaios. Assim, a preparação dos complexos será realizada usando a proporção molar inicial de saturação de cada complexo obtendo, assim, um melhor aproveitamento da β -CD.

Além disso, o máximo da saturação ocorre em uma retenção, em mol:mol, de $0,07:1 \pm 0,03$ para a 2-pentanona, $0,61:1 \pm 0,03$ para a 2-heptanona, $0,73:1 \pm 0,03$ para a 2-nonanona e $0,64:1 \pm 0,03$ para a 2-undecanona, sendo estes os valores da estequiometria total dos complexos, ou seja, quantidades de metilcetonas retidas tanto na cavidade da ciclodextrina quanto fora dela.

Verifica-se, também, que a quantidade retida de 2-pentanona no complexo ($\sim 0,07$) é bastante inferior à das outras metilcetonas estudadas. Este resultado pode ser explicado pela menor massa molar ($86,13\text{g/mol}$) que resulta numa maior capacidade de difusão pelo interior da ciclodextrina. De acordo com REINECCIUS & RISCH (1986), moléculas “hóspedes” muito pequenas dificilmente são retidas na β -CD. Além disso, segundo trabalho realizado por TEE et al. (1996), quanto maior a massa molar da metilcetona menores as perdas de massa durante a secagem dos complexos.

A baixa estabilidade de complexos com compostos pequenos pode ser explicada também pelo fato de eles não terem contato suficiente com a parede da cavidade da ciclodextrina. Portanto, as forças de ligação entre as moléculas tornam-se reduzidas. A 2-pentanona, além da pequena massa molar, é uma molécula alifática, o que a faz ter também um volume reduzido. Desta forma, possivelmente seu tamanho impede que as interações com a parede da cavidade sejam suficientes para a retenção.

A maior dificuldade de formação do complexo com a 2-pentanona também pode ser vista a partir das energias obtidas na predição das estruturas no item 5.1.1, em que a energia predita para o complexo com a pentanona (~10kcal/mol) é maior que a dos outros complexos (entre 1 e 5kcal/mol), ou seja, é requerida maior energia para a formação da estrutura.

Outro fator que pode ser atribuído à baixa retenção da 2-pentanona é sua maior polaridade, já que a cadeia de hidrocarboneto da molécula é a menor entre as quatro.

Estudos mostram que compostos voláteis mais polares são menos retidos (GOUBET et al., 1998). Provavelmente, isto ocorra pela maior solubilidade dos compostos em água, que tem como consequência a maior facilidade de difusão pela matriz durante a secagem, e pela diminuição da constante de associação do complexo, já que a cavidade da ciclodextrina tem caráter hidrofóbico. Esta característica da matriz faz com que a complexação requeira um grupo não polar, hidrofóbico, como constituinte da molécula “hóspede”. Desta forma, a ligação torna-se mais forte quanto maior o contato dos grupos hidrofóbicos com a cavidade.

Outra característica físico-química importante no processo de difusão da 2-pentanona na β -ciclodextrina é a volatilidade relativa. Nesse caso, a pentanona também é a molécula com menor capacidade de retenção, já que sua pressão de vapor é a maior entre as metilcetonas estudadas, como visto no item 3, pela sua menor temperatura de ebulição.

Sendo assim, dentre os fatores que influenciam na retenção dos voláteis, como: massa molar, polaridade e volatilidade relativa, a pentanona é a metilcetona menos favorável à retenção no complexo explicando, portanto, sua reduzida quantidade complexada.

5.1.2.2.1 a) Cinética de Extração das Metilcetonas da Superfície dos Complexos com a β -CD

Para que fosse possível avaliar as forças de interação das moléculas nos complexos foi feito um estudo da cinética de recuperação das metilcetonas complexadas em solvente orgânico. Os experimentos foram realizados de acordo com o item 4.1.2.4.1. Os resultados são apresentados nas Figuras 17 a 20.

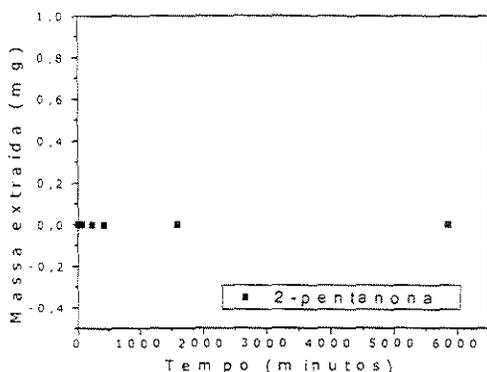


Figura 17: Cinética de extração da superfície do complexo de 2-pentanona com *n*-hexano.

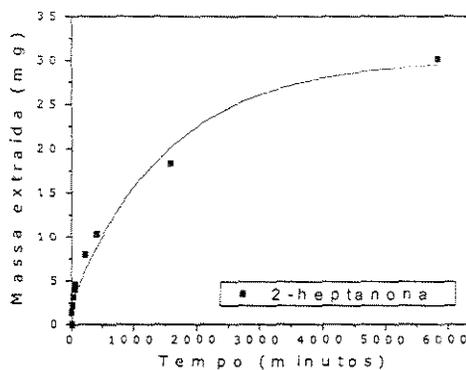


Figura 18: Cinética de extração da superfície do complexo de 2-heptanona com *n*-hexano.

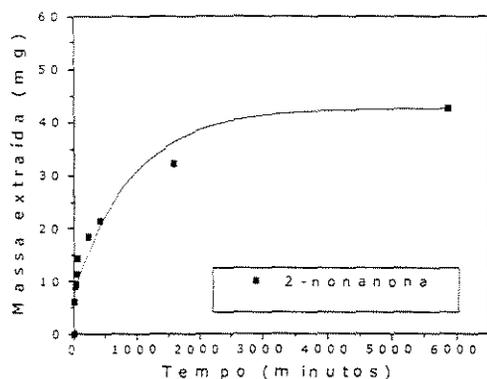


Figura 19: Cinética de extração da superfície do complexo de 2-nonanona com *n*-hexano.

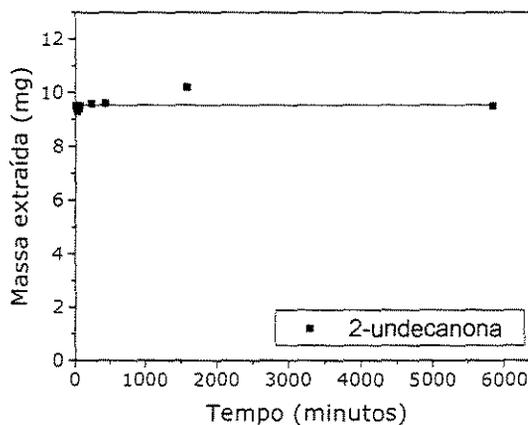


Figura 20: Cinética de extração da superfície do complexo de 2-undecanona com *n*-hexano.

A Tabela 10 apresenta valores referentes à retenção total de metilcetona no complexo e a extraída.

Tabela 10: Remoção de metilcetonas dos complexos de β -CD, após 100 horas de extração com *n*-hexano.

Metilcetona no complexo	Massa total retida no complexo (mg)	Massa obtida na solução de extração (mg)	Massa estimada na superfície do complexo (mg)
2-pentanona	2,8	0,0	0,0 (0% *)
2-heptanona	31,2	30,2	7,0 (22% *)
2-nonanona	48,0	42,6	14,0 (29% *)
2-undecanona	43,0	9,5	9,5 (22% *)

(*): valores expressos em porcentagem obtidos pela razão entre a massa estimada na superfície e a massa total no complexo.

Pelas Figuras 16 a 20 e pela Tabela 10, pode-se verificar que há diferentes comportamentos para a extração superficial das metilcetonas do complexo em β -ciclodextrina.

Na Tabela 10, verifica-se que há uma quantidade de pentanona retida no complexo bastante inferior à das outras metilcetonas, e pela Figura 17, verifica-se que o complexo de pentanona não libera esta metilcetona durante a extração, nem após 4 dias de imersão no solvente, ou seja, provavelmente a pentanona retida no complexo está toda no interior da ciclodextrina.

Os resultados referentes à 2-heptanona e à 2-nonanona mostram que estas possuem comportamentos semelhantes, sendo que a massa de metilcetona presente no solvente só atinge a saturação em valores próximos aos da metilcetona total no complexo, ou seja, com o tempo, a lavagem extrai a maior parte da metilcetona retida no complexo, deslocando também a retida no interior. Com isso, não é possível fazer uma avaliação precisa da quantidade de 2-heptanona ou 2-nonanona adsorvida na superfície da β -CD. Porém, pode-se notar, pelas Figuras 18 e 19, que há inicialmente um rápido deslocamento da massa de 2-heptanona e de 2-nonanona do complexo com perfil praticamente linear. Posteriormente, o comportamento da

remoção de ambas as metilcetonas muda, tornando-se mais gradual que o inicial. Estima-se que, inicialmente, seja deslocada a metilcetona da superfície do complexo e que em tempos maiores o *n*-hexano também seja capaz de remover a maior parte da metilcetona no interior da ciclodextrina. Assim, pelo comportamento inicial das curvas, estima-se que 22 e 29% da metilcetona total do complexo esteja na superfície dos complexos de 2-heptanona e 2-nonanona, respectivamente.

Já o complexo de undecanona (Figura 20) mantém a massa extraída na lavagem constante por vários dias sendo que, a massa presente no solvente é bastante inferior à total no complexo. Com isso, espera-se que a massa facilmente deslocada seja referente à adsorvida na superfície do complexo, enquanto a 2-undecanona não extraída com o solvente esteja presa por fortes interações no interior da ciclodextrina. Verifica-se também, que a proporção de undecanona na superfície do complexo é de aproximadamente 22% da total retida, massa extraída .

Desta forma, apenas foi possível realizar a quantificação precisa da metilcetona na superfície do complexo para a 2-undecanona, sendo que para os complexos de 2-heptanona e 2-nonanona, a quantificação foi estimada. Com isso, pode-se verificar que a porcentagem de metilcetona na superfície do complexo foi próxima para estas três moléculas estudadas (22-29%). Já, a pentanona, mostrou-se ausente da superfície da ciclodextrina.

5.1.2.2.1 b) Estimativa da Estequiometria Verdadeira do Complexo

A estequiometria verdadeira dos complexos formados com a β -CD é referente à relação molar de inclusão molecular na β -CD, ou seja, relação molar das moléculas no interior do complexo. Assim, de acordo com o item 5.1.2.2.1.a, em que se encontrou valores de massa estimados na superfície dos complexos formados com as outras metilcetonas, pode-se calcular as razões molares de retenção na superfície, e por diferença, os valores no interior da ciclodextrina. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Estimativa das estequiometrias dos complexos com as metilcetonas sintéticas em separado.

Complexação	Razão molar de retenção (mol metilcetona : mol β -CD)			
	2-Pentanona	2-Heptanona	2-Nonanona	2-Undecanona
Superfície (*)	0,0	0,14	0,21	0,16
Interior	0,07	0,47	0,52	0,48
Total (**)	0,07	0,61	0,73	0,64

(*): erro experimental da ordem de $\pm 0,05$

(**): erro experimental da ordem de $\pm 0,03$

Pode-se concluir que a inclusão no interior da ciclodextrina para as três maiores metilcetonas possui a relação de 1 molécula de metilcetona para 2 de ciclodextrina, que está de acordo com a predição teórica da estequiometria verdadeira feita pelo Software Hyperchem, cujos resultados foram apresentados no item 5.1.1.

Para a massa total retida das metilcetonas por 100g de β -ciclodextrina, que foram de: 9,6g para a undecanona, 9,1g para a nonanona os resultados para os compostos de aroma isolados são bastante próximos daqueles obtidos na literatura para o aroma completo, como os obtidos por BHANDARI et al. (1998) 9,451g de óleo volátil de limão : 100g de β -ciclodextrina, por SZENTE et al. (1988a), entre 9 e 10% (em massa) para o óleo de limão, de jasmim, de menta, de canela, para o geraniol, o citral e o cinamaldeído, e por KOLLENGODE & HANNA (1997) 8-9 g de aroma:100g de β -ciclodextrina, entre eles a 3-octanona. Já para a heptanona (6,1:100) e pentanona (0,5:100), os valores de retenção máxima foram menores.

Com relação à quantidade na superfície do complexo, os valores diferem dos encontrados na literatura, para a 2-undecanona e 2-nonanona foi obtida uma retenção de aproximadamente 3,0% em massa, para a 2-heptanona de $\sim 1,5\%$ e para a 2-pentanona de zero, enquanto BHANDARI et al. (1998) obtiveram 0,12% para o óleo de limão e WESTING et al. (1988) 0,43% para o complexo de óleo de laranja.

Além disso, os valores de saturação foram bastante próximos aos da razão inicial obtida por BHANDARI et al. (1998) de 12:88 em peso, que corresponde aproximadamente à relação molar de 1:1 das metilcetonas estudadas.

5.1.2.2.2. Complexos com as Metilcetonas em Mistura

Os resultados (em base seca) obtidos nos experimentos, realizados a 55 °C são apresentados na Figura 21 e na Tabela 12.

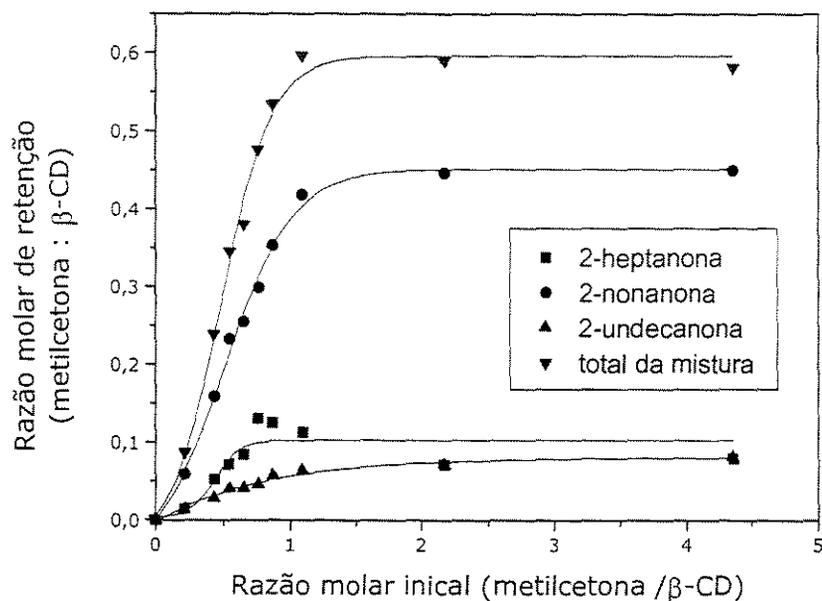


Figura 21: Perfis da influência da razão molar inicial na retenção individual e total da mistura de metilcetonas. Razão molar da mistura: 3: 6: 8,5: 1 (2-pentanona: 2-heptanona: 2-nonanona: 2-undecanona).

Tabela 12: Rendimento na saturação do complexo de β-CD com as metilcetonas em mistura.

Metilcetona	Massa retida /massa β-CD (g/100g)	Rendimento médio (%) ^(*)
2-pentanona	0	0
2-heptanona	1,2	27
2-nonanona	5,2	70
2-undecanona	1,0	80
mistura	7,4	51

(*): valores obtidos a partir da razão entre as massas de metilcetonas retidas nos complexos e adicionadas à co-precipitação.

Pela Figura 21, verifica-se que a razão de saturação do complexo para a mistura de metilcetonas é encontrada em valores de razão molar inicial próximos de 1:1 (metilcetona total: β -CD), como os encontrados para as metilcetonas em separado (item 5.1.2.2.1).

Pela Tabela 12, constata-se que ocorre uma variação nos rendimentos das metilcetonas complexadas. Sendo assim, verifica-se que há uma mudança na relação molar inicial entre as metilcetonas na mistura, como mostra a Tabela 13.

Verifica-se, também, que a relação mássica de retenção da mistura é de 7,4g de metilcetona por 100g de β -ciclodextrina, valor próximo aos obtidos em experimentos anteriores realizados com diferentes compostos de aroma, como os já citados no item 5.1.2.2.1 b).

A Tabela 13 apresenta os dados de proporções iniciais e após a complexação das metilcetonas em mistura, nas condições de saturação, incluindo os valores da estequiometria total do complexo.

Tabela 13: Comparação entre as proporções iniciais e finais das metilcetonas sintéticas em mistura na preparação do complexo.

Metilcetonas	Razão molar			
	Inicial		No complexo	
	MC: β -CD	Entre MC's	MC: β -CD (*)(**)	Entre MC's
2-pentanona	0,15:1	3,0	0,00	0,0
2-heptanona	0,33:1	6,0	0,07:1	1,0
2-nonanona	0,45:1	8,5	0,45:1	6,4
2-undecanona	0,06:1	1,0	0,08:1	1,1
total	1:1	-	0,60:1	-

(*): valores de estequiometria total do complexo.

(**): erro experimental de $\pm 0,03$.

A Tabela 13 mostra que a razão molar total de retenção das metilcetonas na ciclodextrina é de $0,60 \pm 0,03$, valor próximo aos encontrados para as metilcetonas estudadas individualmente, com exceção da 2-pentanona. Nota-se, também, que houve competição entre

as metilcetonas. Assim, a 2-pentanona, com capacidade de retenção bastante inferior às demais, não foi retida no complexo. Já a 2-heptanona, que para um valor da nonanona de retenção na β -CD de 0,45: 1, deveria estar presente numa razão molar de 0,33: 1, apresenta-se em quantidade mais de quatro vezes menor (0,07: 1). Com relação à concorrência entre a nonanona e a undecanona, verificou-se que a undecanona ficou encapsulada com um pequeno aumento da razão molar de retenção, de 0,06:1 para 0,08:1, dentro do erro experimental. As diferenças de retenção ficam ainda mais evidentes quando se observa os dados de razão molar inicial e final entre as metilcetonas.

Essa competição pode ser explicada pela diferença entre as constantes de dissociação das metilcetonas alifáticas em solução de ciclodextrina, como visto no item 5.1.1, sendo de: $5 \cdot 10^{-3}$, $6,12 \cdot 10^{-4}$, $7,4 \cdot 10^{-5}$ e $9 \cdot 10^{-6}$ para 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona, respectivamente. Outro fator que pode estar relacionado é a capacidade de retenção dos compostos voláteis na matriz, como já discutido no item 5.1.2.2.1 b).

Essa mudança da razão molar entre as metilcetonas após a complexação pode ocasionar mudanças nas características sensoriais do aroma, uma vez que a concentração dos compostos é um fator determinante no aroma. Na tentativa de se contornar esse problema, nas etapas de complexação dos compostos obtidos por fermentação, foram realizados ciclos repetidos de co-precipitação.

5.1.2.3. Cinética da Complexação das Metilcetonas

5.1.2.3.1. Metilcetonas em Separado

A influência do tempo de agitação na formação do complexo foi estudada de acordo com o item 4.1.2.5. A Tabela 14 apresenta os resultados de retenção com o tempo obtidos para os complexos das metilcetonas separadamente.

Tabela 14: Cinética de co-precipitação dos complexos de β -CD com as metilcetonas estudadas separadamente.

Tempo (horas)	Razão molar de retenção total (MC : β -CD), expressa em base seca (*)			
	2-Pentanona	2-Heptanona	2-Nonanona	2-Undecanona
0	0,10	0,63	0,73	0,60
0,5	0,05	0,63	0,74	0,69
1	0,07	0,58	0,73	0,69
7	-	-	0,73	-
16	-	-	0,71	-
24	0,07	0,60	0,74	0,66

(*) erro experimental da ordem de $\pm 0,03$

Pode-se observar (Tabela 14), que não houve variação significativa na retenção total das metilcetonas: pentanona, heptanona e nonanona, com o tempo de agitação. Desta forma, verifica-se que a complexação destas moléculas ocorre muito rapidamente. No caso da retenção da 2-undecanona com o tempo, verifica-se que a razão molar total obtida no tempo zero, resultou em uma retenção um pouco menor que a de saturação, que é alcançada em até 30 minutos.

Os rendimentos médios da encapsulação das metilcetonas, calculados em relação à massa inicial de metilcetona, foram de 3% para a 2-pentanona, 43% para 2-heptanona e de 60% para a 2-nonanona e para a 2-undecanona.

5.1.2.3.2. Metilcetonas em Mistura

Os experimentos foram realizados seguindo o procedimento do item 4.1.2.5. A Tabela 15 apresenta os resultados da cinética de retenção obtidos para os complexos formados.

Tabela 15: Cinética de co-precipitação do complexo de β -CD com as metilcetonas em mistura.

Tempo (minutos)	Razão molar de retenção total (metilcetonas : β -CD, em base seca (*))				
	2-Pentanona	2-Heptanona	2-Nonanona	2-Undecanona	Total
0	0	0,06	0,46	0,08	0,59
30	0	0,07	0,46	0,08	0,60
60	0	0,07	0,46	0,08	0,61
240	0	0,07	0,45	0,07	0,59

(*) erro experimental da ordem de $\pm 0,03$

A Tabela 15 mostra que o tempo inicial já é suficiente para a saturação da retenção das metilcetonas na β -ciclodextrina, não havendo diferença na complexação dentro do tempo estudado. Assim, pode-se considerar que a formação do complexo é bastante rápida, resultado já esperado devido aos dados obtidos com as metilcetonas em separado. Observa-se também que não há mudança entre a razão molar das metilcetonas retidas com o maior tempo de agitação, ou seja, o aumento do tempo de agitação da mistura não interfere na competição entre as metilcetonas estudadas.

5.1.2.4. Cálculo das Constantes de Associação das Metilcetonas na Complexação

Tendo encontrado os valores de saturação dos complexos, pode-se calcular as constantes de associação. Estas foram encontradas a partir das relações da complexação entre a β -CD e as metilcetonas, descritas no item 4.1.2.6, sendo K_1 (Equação 5) igual a 1,88 e $[CD_{solúvel} \text{ a } 55^\circ C]$ igual a 65,28g/L. Os resultados são apresentados na Tabela 16 e Figura 22, considerando o volume de 50mL empregado na preparação dos complexos.

Tabela 16: Valores para o cálculo das constantes de associação dos complexos com cada uma das metilcetonas estudadas com a β -CD ($K's$: Equação 8).

Metilcetonas	Massa a 4°C (MC-CD) (g)	[MC] a 55°C (g/L)	$K's, (g/L)^{-1}$
2-pentanona	4,05	32,094	0,039
2-heptanona	4,33	2,508	0,529
2-nonanona	4,49	0,214	6,431
2-undecanona	4,70	0,045	32,014

As constantes de associação encontradas indicam que o grupo metil das 2-alcanonas contribui positivamente para a complexação, o que implica em uma menor solubilidade em meio aquoso, ou seja, quanto mais solúvel a metilcetona, menor a constante de associação com a β -CD.

Além disso, pode-se notar (Figura 22), que há uma correlação linear entre $\log(K's)$, que é igual a $-pK's$, e o comprimento da cadeia de carbono das metilcetonas. Verificou-se, também, que o valor encontrado para o coeficiente angular da reta ($0,49 \pm 0,03$) é bastante próximo ao valor relatado por TEE et al. (1996) para as 2-alcanonas a 25°C ($0,459 \pm 0,010$). TEE et al. (1996) reportaram que valores de coeficiente angular na faixa de 0,36 a 0,51 correspondem a incrementos de energia livre de 2,1 a 2,9kJ/mol para cada grupo metileno que é seqüestrado do meio aquoso pela inclusão na cavidade da ciclodextrina. Estes valores são próximos aos (3,0 a 3,6kJ/mol) de energia livre de transferência de grupos metilenos que estão na água para diversos meios orgânicos, incluindo micelas, o que indica que os efeitos hidrofóbicos são os fatores primários que governam a ligação de alifáticos simples às ciclodextrinas. Contudo, as forças de van der Waals, que dependem do tamanho e da área superficial e aumentam linearmente com o tamanho da cadeia também contribuem significativamente na formação dos complexos.

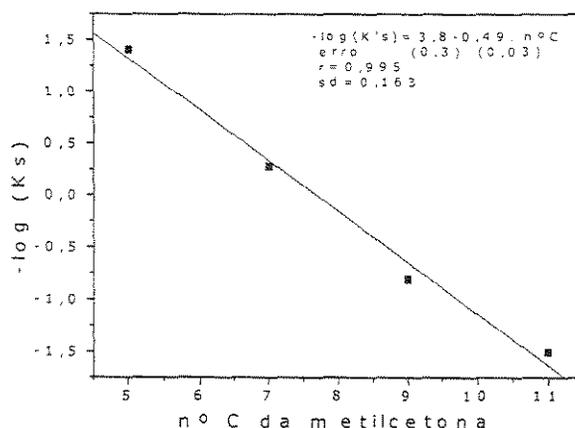


Figura 22: Perfil da influência do tamanho da cadeia de carbonos da metilcetona no $-\log$ da constante de associação dos complexos com a β -CD.

5.1.2.5. Efeito do Reaproveitamento na Razão de Retenção das Metilcetonas em Mistura

Esta avaliação foi feita na tentativa de que fosse atingida uma proporção entre as metilcetonas em mistura no complexo mais próxima da inicial. Os resultados foram obtidos conforme o item 4.1.2.7 e são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17: Variação da razão de retenção das metilcetonas em mistura com o reaproveitamento (reaprov.) da solução de co-precipitação.

Metilcetonas	Razão molar de retenção				
	Inicial	1º Reaprov.	2º Reaprov.	3º Reaprov.	Erro
2-Pentanona	0,000	0,003	0,002	0,000	$\pm 0,001$
2-Heptanona	0,146	0,001	0,000	0,000	$\pm 0,006$
2-Nonanona	0,45	0,00	0,00	0,00	$\pm 0,010$
2-Undecanona	0,071	0,000	0,000	0,000	$\pm 0,003$
Total	0,667	0,005	0,002	0,001	$\pm 0,014$
Rendimento (%)(*)	54,7	0,4	0,2	0,1	-

(*): valores calculados pela relação entre as massas de metilcetonas recuperadas nos complexos e as adicionadas à co-precipitação.

O reaproveitamento da solução resultante da filtração após o resfriamento da mistura a 4°C resultou em uma pequena retenção da 2-pentanona no 1º e 2º reaproveitamentos, o que não ocorre na co-precipitação inicial (Tabela 17). Porém, verifica-se que a alteração na razão molar entre as metilcetonas retidas é muito reduzida, o que provavelmente não alteraria de forma significativa o resultado sensorial da mistura de metilcetonas.

5.1.2.6. Influência das Variáveis de Secagem dos Complexos por “Spray Drying”

As condições de secagem da suspensão de co-precipitação dos complexos com β -CD foram avaliadas por meio de um planejamento experimental fracionário 2^{4-1} (item 4.1.2.8). Os dados obtidos no planejamento aparecem nas Tabelas 18 e 19 e nas Figuras 23 e 24.

Tabela 18: Resultados do planejamento experimental fracionário 2^{4-1} com ponto central, com relação ao rendimento obtido, à umidade das amostras e à porcentagem de metilcetonas na superfície do complexo. Ensaios correspondentes aos apresentados na Tabela 7.

Ensaios	Rendimentos de retenção (%)		Porcentagens	
	Total	Interior da β -CD	Molar de MC's na superfície	Umidade nas amostras
1	2,8	2,6	8,2	10,5
2	25,1	17,7	29,4	10,7
3	2,0	2,0	0	9,7
4 (*)	-	-	-	-
5	2,9	2,5	16,0	10,9
6 (*)	-	-	-	-
7	1,2	1,2	0	9,0
8	7,4	6,6	11,0	7,3
9	11,5	10,4	10,0	9,4
10	11,9	10,0	15,6	11,0
11	10,6	9,8	7,6	8,3

(*): não foram obtidos resultados devido ao entupimento do bico injetor na alimentação das amostras.

O rendimento de retenção das metilcetonas no interior da β -CD segue a mesma tendência do rendimento total de retenção (Tabela 18), ou seja, a variação da retenção não ocorre apenas por diferenças na adsorção das moléculas na superfície do complexo e sim por inclusão na cavidade da β -CD.

Para que fossem avaliadas as variáveis que influenciam significativamente na secagem em “spray dryer”, foi obtido o gráfico de Pareto, ignorando os efeitos de interação entre as variáveis X_{23} , X_{24} e X_{34} por confundirem-se com os efeitos X_{14} , X_{13} e X_{12} , respectivamente, devido à resolução IV do planejamento fracionário, sendo, X_1 : teor de sólidos da suspensão alimentada ao “spray dryer”, X_2 : temperatura da suspensão de alimentação, X_3 : temperatura de entrada do “spray dryer” e X_4 : vazão de alimentação.

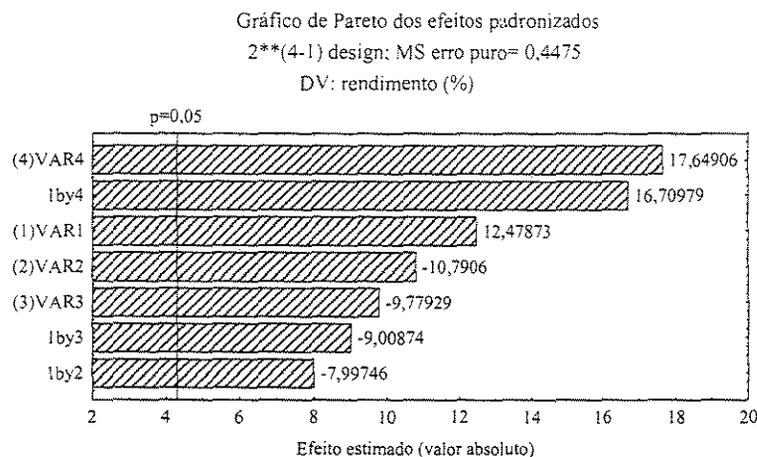


Figura 23: Gráfico de Pareto obtido a partir de valores do erro puro dos experimentos do planejamento fatorial fracionário das variáveis de secagem por “spray drying”.

Verifica-se que todas as variáveis estudadas influenciam no rendimento de retenção das metilcetonas no complexo durante secagem em “spray dryer” (Tabela 18), com um intervalo de confiança de 95%. Assim, a ANOVA foi gerada considerando todas as variáveis estudadas.

Tabela 19: Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados do planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) das variáveis da secagem em “spray dryer” (ANOVA).

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	493,87	7	70,55	2,54	8,89
Resíduos	83,36	3	27,79		
Falta de ajuste	82,47	1	82,47	183,27	18,51
Erro puro	0,90	2	0,45		
Total	577,24	10	57,72		

% variação explicada = 0,85558, $r = 0,92$

% máxima de variação explicável = 0,998

Fcalculado / Ftabelado (regressão) = 0,29

Fcalculado / Ftabelado (resíduos) = 9,90

Pela análise da variância, Tabela 19 (ANOVA), verificou-se que o modelo linear não é adequado aos dados experimentais obtidos, sendo a razão de F calculado e tabelado muito menor que 5. Assim, não foi possível gerar um modelo. Contudo, pode-se avaliar os efeitos das variáveis na secagem por “spray drying” (Figura 24).

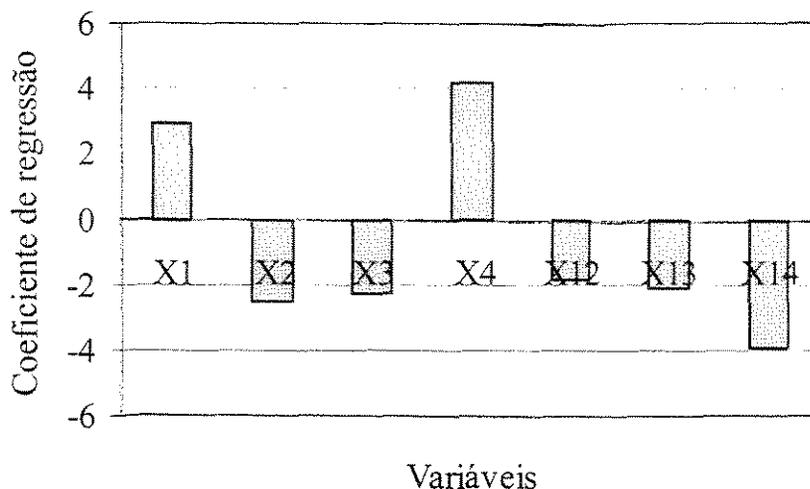


Figura 24: Efeito das variáveis da secagem dos complexos de β -CD em “spray dryer”. X₁: teor de sólidos da suspensão alimentada ao “spray dryer”, X₂: temperatura da suspensão de alimentação, X₃: temperatura de entrada do “spray dryer”, X₄: vazão de alimentação e X₁₂, X₁₃ e X₁₄: os efeitos de interação entre as variáveis.

Pela Figura 24 pode-se notar que o teor de sólidos da suspensão, assim como a vazão de alimentação contribuem positivamente para a retenção total das metilcetonas, sendo a vazão a variável de maior impacto no rendimento, uma vez que maiores vazões resultam em menores tempos de residência no “spray dryer”. Por outro lado, as temperaturas da suspensão e de entrada do fluxo de ar no “spray dryer” têm uma influência negativa na retenção, ou seja, quanto maiores as temperaturas menor a eficiência na retenção dos voláteis. Já era esperado que o aumento do teor de sólidos formasse maior quantidade de complexo, assim como a maior temperatura da suspensão de alimentação diminuísse o rendimento pelo aumento da solubilidade das metilcetonas, o que resulta em menores valores de constante de associação, como visto no item 5.1.2.4.

Pela influência das variáveis estudadas, mesmo não se tendo obtido um ajuste dos dados experimentais a um modelo, pode-se avaliar as condições mais adequadas de secagem por “spray dryer”. Como não se pode estender os níveis das variáveis por limitações operacionais, conclui-se que as condições mais adequadas para secagem em escala de bancada são: 16% de teor de sólidos, pois maiores valores causam o entupimento do bico de injeção,

vazão de 4,5mL/ minuto, limite da capacidade de secagem do equipamento utilizado, 30°C para a temperatura de alimentação da suspensão, valor próximo ao da temperatura ambiente abaixo do qual haveria necessidade de resfriamento, e temperatura de entrada do fluxo de ar de 120°C, sendo que abaixo desta não ocorre secagem adequada da amostra.

5.1.2.6.1. Comparação entre os Métodos de Secagem em Estufa e em “Spray Dryer”

O método empregado na avaliação comparativa entre a secagem em estufa e em “spray dryer” está apresentado no item 4.1.2.8.1. A Tabela 20 mostra os resultados obtidos.

Tabela 20: Comparação entre a eficiência de retenção das metilcetonas em mistura por secagem em estufa e em “spray dryer”.

Metilcetonas	Mol metilcetona / mol β -CD		
	“Spray Dryer”	Estufa	
		Úmida	Seca a 105°C
2-pentanona	0	0	0
2-heptanona	0,01	0,17	0,11
2-nonanona	0,30	0,43	0,40
2-undecanona	0,06	0,07	0,07
total	0,37	0,67	0,58
Total na superfície	0,11	0,15	0,02
Rendimento	25%	60%	53%

Pelos resultados apresentados, nota-se que quanto menor a metilcetona maior foi a diferença na quantidade retida no complexo seco em “spray dryer” com relação ao seco em estufa. Este resultado pode ser explicado pela maior volatilidade e menor força de interação com a β -CD das metilcetonas menores, como foi observado no estudo da extração da superfície do complexo resultando, assim, em maior perda quando expostas a 120°C. Além disso, a menor razão molar metilcetona/ β -CD obtida por “spray drying” está relacionada à ausência de separação por filtração da ciclodextrina solúvel. Observou-se, também, que o método de secagem em estufa mostrou-se com rendimento mássico bastante superior,

principalmente devido à grande perda de massa ocorrida no “spray dryer” de bancada, pela adesão na câmara de secagem e sucção pela exaustão do equipamento. Desta forma, houve uma diminuição de mais de 50% no rendimento mássico das metilcetonas em secagem por “spray drying”, contudo, as perdas de massa ocorridas no “spray dryer” de bancada podem ser reduzidas quando utilizado um equipamento piloto ou industrial. Assim, este método pode ser considerado mais adequado ao aumento de escala do processo que a secagem em estufa.

5.1.3. Caracterização dos Complexos Cristalinos

Neste item são apresentados os resultados das caracterizações dos complexos das metilcetonas em separado e em mistura.

5.1.3.1. Caracterização dos Complexos por Difração de Raios-X

O procedimento utilizado para a caracterização dos complexos por difração de raios-X seguiu o método descrito no item 4.1.3.1.

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos para os complexos com as metilcetonas: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona, em separado e em mistura, além do difratograma da β -CD pura.

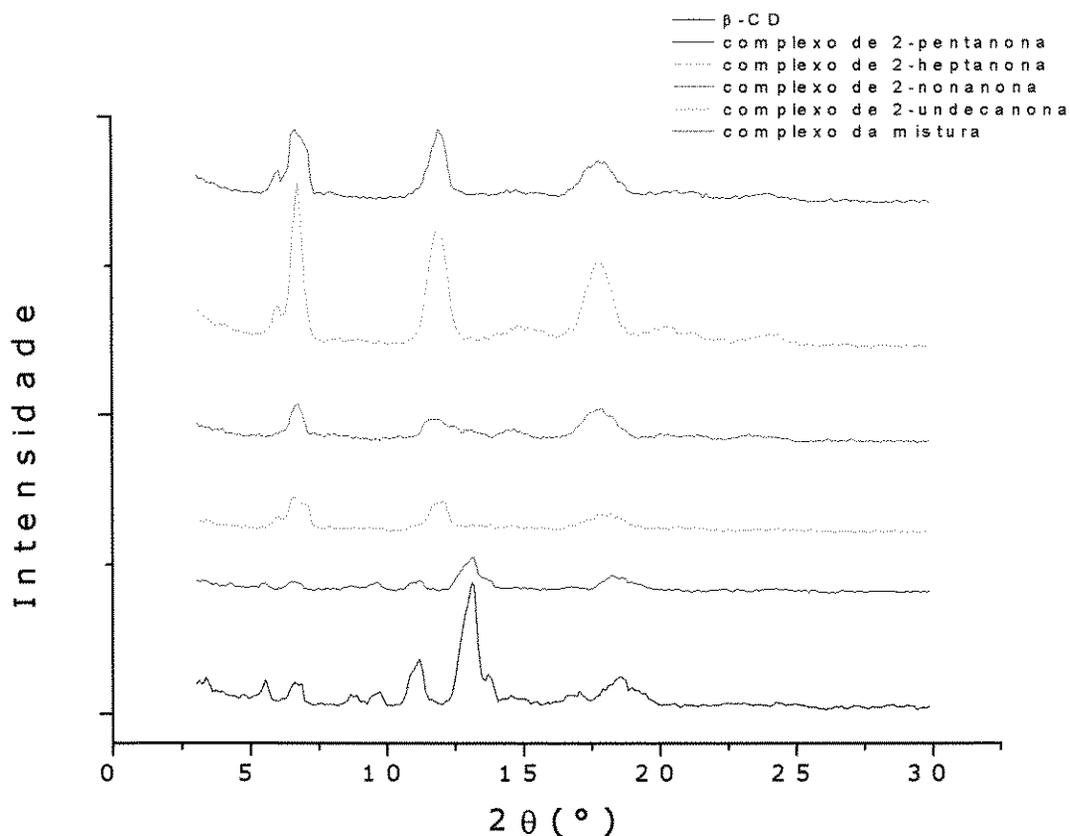


Figura 25: Difratoogramas de raios-X da β -CD e dos complexos com as metilcetonas (2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona) em separado e em mistura.

Pode-se notar que o difratograma da β -CD tem picos bem definidos. Quando se compara o difratograma do complexo de 2-pentanona com o da β -CD, nota-se que os picos situam-se nos mesmos ângulos que os da β -CD pura. Porém, há uma atenuação na intensidade. Este resultado pode ser explicado pela quantidade de 2-pentanona retida no complexo, que é bastante reduzida. Assim, não ocorrem mudanças pronunciadas na estrutura da β -CD.

Já os difratogramas dos complexos com as outras metilcetonas, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona, diferem daquele da β -CD não só pela diferença de intensidade dos picos mas também pelo ângulo em que aparecem. Verifica-se que as mudanças mais notáveis ocorrem nos picos na faixa de ângulos de difração entre 5-7° e 11-14°, em que ocorre o

desaparecimento dos picos entre 10-11° e 13-14° e surgimento de um outro entre os dois. Estas mudanças estão de acordo com estudos de YOSHII et al. (1992) relacionados a complexos sólidos entre ciclodextrinas e alguns óleos essenciais, que caracterizaram os picos específicos do complexo de inclusão em dois ângulos de difração, entre 5-7° e 11-12°. Estas diferenças entre os difratogramas da β -CD pura e dos complexos provavelmente estão relacionadas à ocupação da cavidade da ciclodextrina que pode estar alterando sua estrutura cristalina.

Com relação ao espectro do complexo da mistura de metilcetonas os picos entre 5-7° e 11-13° apresentam-se semelhantes aos do complexo com a 2-undecanona, com intensidade um pouco reduzida, já o pico entre 16-19° aproxima-se bastante ao do complexo com 2-nonanona.

5.1.3.2. Caracterização dos Complexos por Espectroscopia de Infra-Vermelho

As análises por espectroscopia de infra-vermelho foram feitas de acordo com o método descrito no item 4.1.3.2. Os espectros obtidos para a β -CD e os complexos formados com cada uma das metilcetonas estudadas (2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona) em separado e em mistura são apresentados no Anexo I.

Observando-se os espectros da β -CD livre e dos complexos, pode-se notar que os perfis obtidos são bastante semelhantes, porém, com algumas alterações.

Verifica-se que a banda larga que aparece no espectro da β -CD no comprimento de onda de 3407cm^{-1} , na faixa de absorção característica de grupos álcoois (C-OH), que estão presentes na estrutura da glicose na ciclodextrina, é deslocada para a faixa de $3366\text{-}3386\text{cm}^{-1}$ nos complexos. Tal deslocamento pode ocorrer pela presença de pontes de hidrogênio entre os grupos carboxila (OH) da β -CD e carbonila (C=O) das metilcetonas. Isto ocorre devido às pontes de hidrogênio diminuírem a energia necessária para a vibração de estiramento do grupo OH, que tem como efeito a diminuição da frequência. Nesta banda, também pode-se observar uma mudança acentuada na intensidade dos picos nos espectros dos complexos quando comparados ao da β -CD.

Além deste deslocamento, nos espectros dos complexos com a 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona aparece uma banda na faixa de $1707\text{-}1712\text{cm}^{-1}$, correspondente à cetona saturada. A posição dentro da faixa de frequência do grupo funcional depende de fatores como pontes de hidrogênio. No caso dos complexos analisados, há uma diferença de até 10cm^{-1} na frequência, valor que pode ter sido alterado de acordo com as pontes de hidrogênio formadas entre as moléculas de metilcetona e β -CD.

Além disso, verifica-se que o complexo com a 2-pentanona não apresenta a banda característica da cetona, como ocorre com os outros complexos. Tal fato pode ser explicado pela pequena quantidade de pentanona retida no complexo, que é da ordem de um décimo em mol quando comparada à retenção das outras metilcetonas, como visto no item 5.1.2.2.1. Outro fator importante para a não presença da absorção próxima de 1710cm^{-1} é a ausência de pentanona na superfície do complexo, como visto no item 5.1.2.2.1 a), e a molécula estar inteiramente na cavidade da β -CD, tendo-se assim o possível encobrimento da energia de vibração da pentanona.

Nota-se também a presença de moléculas de água nas amostras, que é identificada pela banda a 1637cm^{-1} em todos os espectros.

Verificou-se que o espectro do complexo da mistura das metilcetonas estudadas (2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona) em β -CD é bastante próximo ao obtido para o complexo com a 2-nonanona. Esta semelhança já era esperada devido à composição do complexo da mistura de metilcetonas ser predominantemente composto pela 2-nonanona. As mudanças observadas restringem-se às intensidades dos picos presentes.

5.1.3.3. Caracterização dos Complexos por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os termogramas dos complexos e da β -CD obtidos por calorimetria diferencial de varredura apresentam-se nas Figuras 26 a 31. O método utilizado para a análise está descrito no item 4.1.3.3.

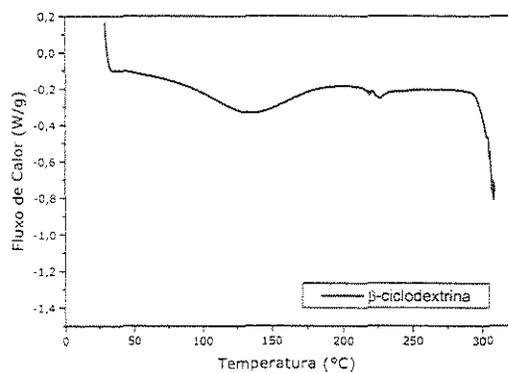


Figura 26: Termograma de DSC da β -CD.

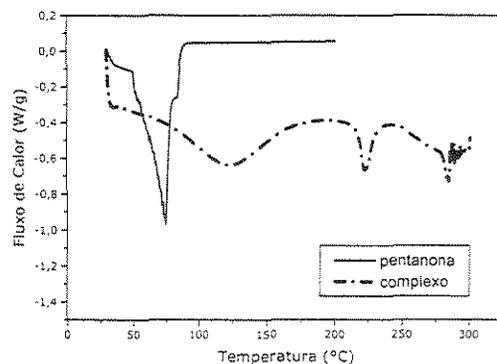


Figura 27: Termogramas de DSC comparativos da 2-pentanona livre e de seu complexo.

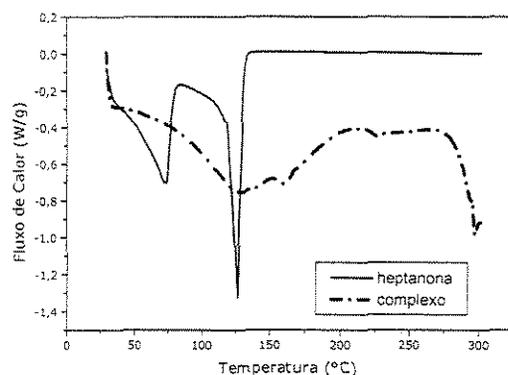


Figura 28: Termogramas de DSC comparativos da 2-heptanona livre e de seu complexo.

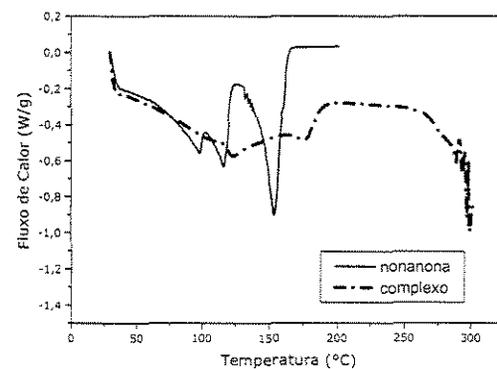


Figura 29: Termogramas de DSC comparativos da 2-nonanona livre e de seu complexo.

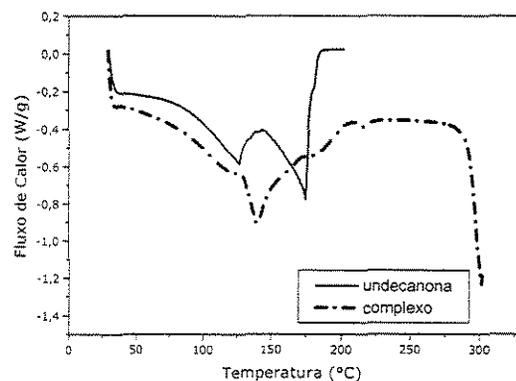


Figura 30: Termogramas de DSC comparativos da 2-undecanona livre e de seu complexo.

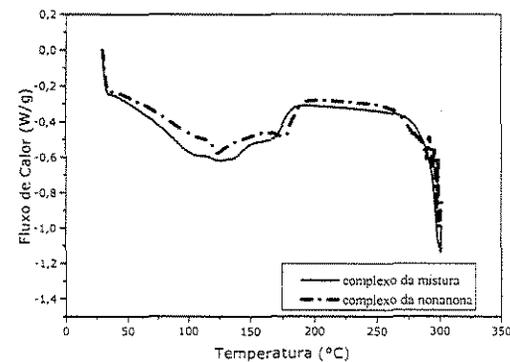


Figura 31: Termogramas de DSC comparativos dos complexos da 2-nonanona e da mistura de metilcetonas.

Tendo-se a β -CD pura como referência (Figura 26), pode-se notar que há duas regiões de transição. A primeira na faixa de 73-140°C, com pico a 134°C e outra em torno de 220-230°C. Na região do pico a 134°C, provavelmente esteja ocorrendo a vaporização da umidade presente na amostra. Na faixa de aproximadamente 230°C, ocorre a transição de fase da β -CD de sólida para líquida.

Comparando os termogramas entre as metilcetonas livres e complexadas, nota-se diferenças acentuadas entre eles, como mostra as Figuras 27 a 30.

Na Figura 27, a 2-pentanona livre apresenta um pico próximo a 75°C, que indica a transição de fase de líquido para gás, valor menor que de seu ponto de ebulição (100-110°C), que pode ser explicado pela alta volatilidade da amostra. Já no termograma do complexo há o desaparecimento do pico típico de transição térmica da 2-pentanona livre, que pode ser devido à ausência de 2-pentanona na superfície da β -CD. O não aparecimento de outro pico correspondente à pentanona inclusa pode estar indicando que há fortes interações desta metilcetona na ciclodextrina que ocasionam sua transição juntamente com a da ciclodextrina.

Na Figura 28, verifica-se que a temperatura de transição da 2-heptanona pura é de aproximadamente 127°C (faixa entre 118 e 142°C) e que este pico endotérmico pode estar encoberto no termograma do complexo. Este desaparecimento provavelmente ocorre pela proteção da 2-heptanona na cavidade da ciclodextrina, que deve ter deslocado o pico para a temperatura de decomposição da CD, próximo a 300°C. No termograma do complexo com 2-heptanona aparece apenas um pico reduzido próximo a 152°C, que pode estar relacionado à transição da pequena quantidade de heptanona retida na superfície do complexo. Desta forma, a molécula na superfície possui menor proteção que a de inclusão, porém, as interações com a superfície da ciclodextrina provocam um pequeno aumento na temperatura de transição.

Análise análoga pode ser feita para os efeitos da encapsulação da 2-nonanona (Figura 29), sendo que o pico da nonanona livre está em torno de 154°C (141-170°C), também menor que a temperatura de ebulição da molécula livre (192°C). Nota-se, também, uma pequena absorção de calor a 176°C, que pode ser devido à 2-nonanona adsorvida na superfície, e a ausência do pico bem definido de transição.

Com relação às mudanças ocorridas na complexação da 2-undecanona (Figura 30), pode-se dizer que são as mesmas já observadas para a 2-heptanona e a 2-nonanona. A

transição da 2-undecanona livre está na faixa de 159 a 185°C (pico a 175°C), sendo que a absorção de calor nesta temperatura não aparece no diagrama do complexo.

Pode-se notar, na Figura 31, que inclui o termograma do complexo das metilcetonas em mistura, que quando comparado ao do complexo da 2-nonanona, resulta em termogramas bastante semelhantes. Como o complexo da mistura de metilcetonas possui apenas pequenas quantidades de 2-heptanona e de 2-undecanona quando comparadas com a retenção de 2-nonanona na ciclodextrina já era esperado que as curvas não fossem muito diferentes.

Além disso, observa-se, também, que no termograma da mistura, na faixa de 100 a 150°C, não há uma separação bem definida dos picos presentes, assim, conclui-se que as mudanças decorrentes da perda de umidade da amostra confundem-se com a perda da heptanona retida e são seguidas pelas variações que representam a perda de 2-nonanona (~125°C) e de 2-undecanona (~135°C) superficiais. Já, em temperaturas maiores, na faixa de 150 a 190°C, há um pequeno deslocamento do pico, da curva da mistura, para valores menores de temperatura. Além disso, o pico aparece em uma faixa mais ampla que a do complexo de 2-nonanona. O decréscimo da temperatura inicial do pico pode ser devido à presença de heptanona na amostra, que também pode ter aumentado a faixa de temperatura do pico, juntamente com a presença de undecanona.

Portanto, assim como os complexos das metilcetonas separadamente, o termograma do complexo da mistura também difere dos perfis das metilcetonas livres.

Portanto, pode-se considerar que a caracterização calorimétrica dos complexos evidencia a encapsulação na ciclodextrina, o que ocasiona um aumento da estabilidade termodinâmica dessas moléculas com relação ao seu estado não encapsulado.

5.1.3.4. Caracterização dos Complexos por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C¹³)

Para que se pudesse estudar a estrutura dos complexos de inclusão formados com a β -CD foram obtidos espectros de RMN-C¹³ sólido, em que os fenômenos de troca molecular entre moléculas complexadas e não complexadas são bastante limitados. O método usado está descrito no item 4.1.3.4.

Para a interpretação dos espectros foi usada a numeração dos carbonos apresentada na Figura 32, que representa uma molécula de glicose. Desta forma, as intensidades obtidas nos espectros equivalem a 7 vezes os valores individuais do carbono, uma vez que a molécula de β -ciclodextrina possui 7 unidades de glicose.

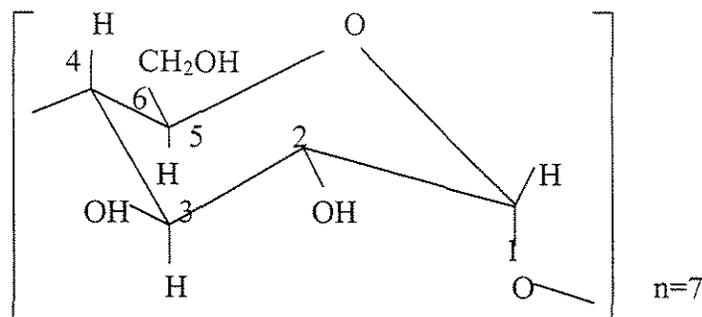


Figura 32: Representação da estrutura de uma molécula de glicose com a correspondente numeração dos carbonos usada na análise do RMN- C^{13} .

Os espectros obtidos da β -CD livre e dos complexos formados com as 4 metilcetonas estudadas (2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona) em separado e em mistura, são apresentados no Anexo II.

Foi observado que o espectro da β -CD livre apresenta 2 picos em 94 e 96ppm, além de picos acima de 110ppm, que não correspondem aos de espectros relatados previamente na literatura (SFIHI et al., 1996), o que leva à consideração de que tais picos provavelmente representem impurezas na amostra.

Com relação aos outros picos presentes, na faixa de 97-104ppm, correspondem ao C-1, de 79-86ppm ao C-4, de 70-77ppm aos C-2, 3, 5 e de 55-67ppm ao C-6. A existência de várias ressonâncias para cada carbono de β -CD é principalmente relacionada a ângulos de torção diferentes em ligações do tipo (1 \rightarrow 4) para C-1 e C-4 e a ângulos de torção que descrevem a orientação dos grupos hidroxil (SFIHI et al., 1996).

Observando os espectros dos complexos, verifica-se a presença de picos na região entre 10-50ppm e em \sim 210ppm, que correspondem aos carbonos das metilcetonas e ao grupo carbonila, respectivamente. Além disso, observa-se que os picos do espectro da β -CD, de 54-

110ppm, possuem melhor resolução que dos complexos, resolução esta que diminui à medida que cresce o comprimento da cadeia de hidrocarboneto das metilcetonas. Ou seja, há evidências da presença das metilcetonas nas amostras sólidas dos complexos devido a alterações no espectro de ressonância característico da β -ciclodextrina.

O espectro obtido por C^{13} -RMN para o complexo da mistura das metilcetonas estudadas em β -CD também é bastante semelhante ao do complexo da 2-nonanona, como visto no item 5.1.3.2. A maior retenção da 2-nonanona em relação às outras metilcetonas, relação molar de 0: 1: 6,4: 1,1, 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona, respectivamente, faz com que suas características predominem no perfil dos espectros.

Contudo, a constatação da formação do complexo de inclusão, e identificação das formas complexadas das moléculas “hóspedes” não são conclusivas, pois as moléculas podem estar dentro, fora ou parcialmente inclusas na cavidade da β -CD.

5.1.4. Estudos da Estabilidade dos Complexos Formados

5.1.4.1. Estabilidade à Volatilização das Metilcetonas

O estudo da estabilidade à volatilização das metilcetonas complexadas foi feito de acordo com o método descrito no item 4.1.4.1.

A Tabela 21 mostra os resultados obtidos de perda de massa dos complexos no estudo da estabilidade à volatilização das metilcetonas, em separado e em mistura, complexadas em β -CD.

Tabela 21: Variação da razão em massa de retenção das metilcetonas em mistura realizada a 105°C com os complexos em estado sólido.

Tempo (h)	Razão em massa de retenção (metilcetona : β -CD)				
	2-Pentanona	2-Heptanona	2-Nonanona	2-Undecanona	Total
Metilcetonas em separado					
inicial	0,0057	0,062	0,092	0,110	
0,5	0,0058	0,059	0,092	0,093	
1	0,0060	0,057	0,090	0,091	
2	0,0052	0,056	0,087	0,091	
3	0,0060	0,061	0,091	0,090	
4	0,0058	0,056	0,090	0,086	
24	0,0055	0,052	0,084	0,087	
Metilcetonas em mistura					
inicial	0	0,016	0,069	0,014	0,099
0,5	0	0,013	0,061	0,013	0,087
1	0	0,014	0,062	0,013	0,089
2	0	0,012	0,059	0,013	0,084
3	0	0,013	0,060	0,012	0,085
4	0	0,014	0,063	0,013	0,090
24	0	0,013	0,061	0,013	0,088

Pode-se observar (Tabela 21), comportamentos semelhantes da variação da razão em massa de retenção das metilcetonas em separado e em mistura. Nota-se que não há perdas significativas na retenção das metilcetonas nos diferentes complexos durante o aquecimento a 105°C, até as 24 horas monitoradas, após os primeiros 30 minutos de aquecimento.

O decréscimo ocorrido, no início do aquecimento, deve-se, provavelmente, à volatilização das metilcetonas maiores e, portanto, menos voláteis, livres nas amostras. Esta volatilização está relacionada ao fato da secagem a 50-60°C não ter sido suficiente para liberar toda a metilcetona que não foi complexada.

A Tabela 22 apresenta os resultados da volatilização das metilcetonas livres à temperatura ambiente (25°C).

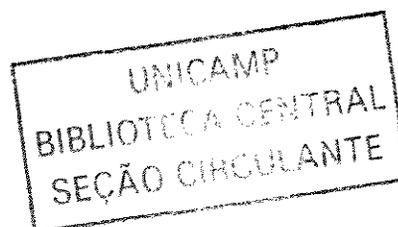


Tabela 22: Tempo para volatilização total das metilcetonas livres.

Metilcetona	Tempo para massa zero (horas)(*)
2-pentanona	0,18
2-heptanona	0,92
2-nonanona	2,87
2-undecanona	13,67

(*): massa inicial 0,1000g.

Comparando o tempo de volatilização das metilcetonas livres à temperatura ambiente (Tabela 22) com os resultados da Tabela 21, verifica-se que houve uma mudança significativa na volatilização das metilcetonas complexadas, uma vez que em menos de 14 horas, a 2-undecanona, com menor taxa de volatilização entre elas, era totalmente evaporada.

Assim, conclui-se que os complexos possuem boa estabilidade à volatilização a altas temperaturas por, no mínimo, 24 horas, o que evidencia fortes interações entre as moléculas no complexo.

5.1.4.2. Estabilidade Térmica das Metilcetonas Complexadas

O estudo da estabilidade térmica dos complexos formados e da β -ciclodextrina pura foi realizado por TGA (item 4.1.4.2) e os resultados são apresentados nas Figuras 33 a 38 e na Tabela 23, com dados das perdas de massa ocorridas e representadas nos termogramas.

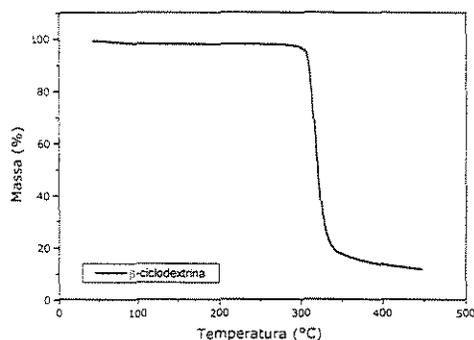


Figura 33: Termograma da β -CD pura obtido por TGA.

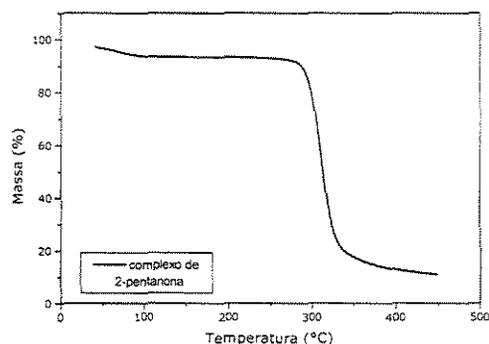


Figura 34: Termograma do complexo de 2-pentanona obtido por TGA.

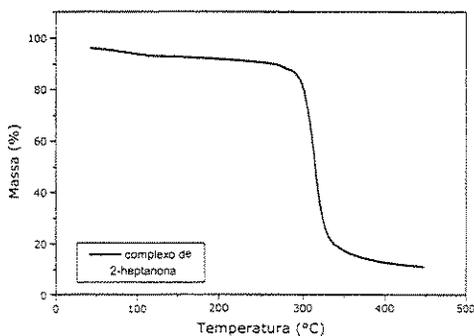


Figura 35: Termograma do complexo de 2-heptanona obtido por TGA.

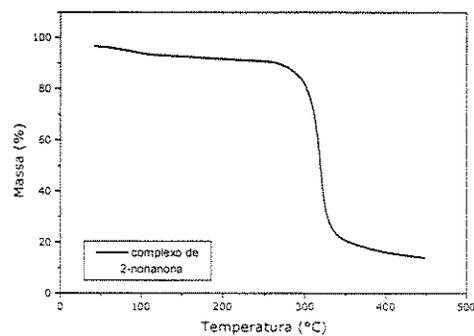


Figura 36: Termograma do complexo de 2-nonanona obtido por TGA.

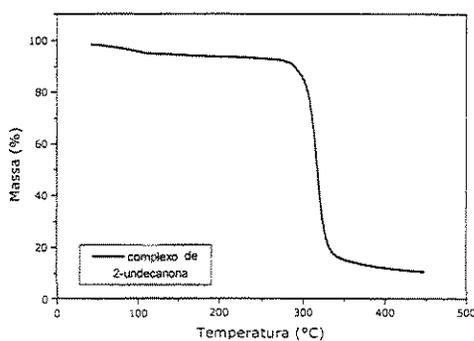


Figura 37: Termograma do complexo de 2-undecanona obtido por TGA.

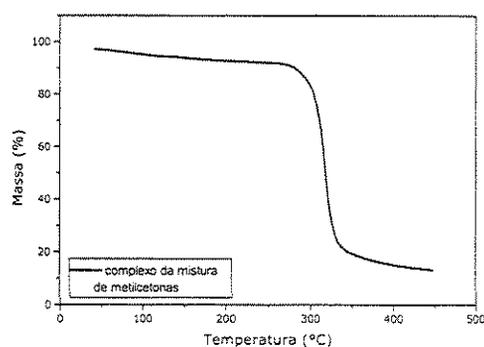


Figura 38: Termograma do complexo da mistura de metilcetona obtido por TGA.

Tabela 23: Comparação entre as porcentagens de perda de massa ocorrida durante o TGA e da massa de metilcetona no complexo (cpx.).

Amostras	Porcentagem de massa perdida				Porcentagem de MC na massa total (*)	
	Faixa de temperatura (°C)				Superfície	Interior
	40-105	105-130	130-240	240-450		
Ciclodextrina	1,0	0,1	0,2	86,2	-	-
Cpx.pentanona	3,6	0,2	0,4	82,0	0	0,7
Cpx.heptanona	2,6	0,7	2,0	79,8	1,3	4,4
Cpx.nonanona	3,0	0,7	2,1	77,0	2,5	6,0
Cpx.undecanona	3,0	0,7	1,4	82,7	1,8	6,4
Cpx.mistura	2,2	0,6	2,1	79,1	1,6	4,9

(**): valores obtidos a partir dos resultados do item 5.1.2.2.1 a).

Pode-se verificar (Tabela 23) que a maior parte da massa perdida na amostra de ciclodextrina, antes do início da transição de fase a 240°C, ocorre até 105°C e representa a evaporação da umidade na amostra, não havendo mais mudanças significativas até 240°C. Nota-se, também, que a decomposição da ciclodextrina ocorre em torno de 290°C (de 250 a 350°C), temperatura em que há uma diminuição brusca na massa da amostra.

Além disso, o complexo com a 2-pentanona tem comportamento semelhante ao da β -ciclodextrina, perda da maior parte da umidade até 105°C e pequenas perdas até 240°C.

Já para os complexos com as outras metilcetonas e da mistura, verifica-se que a soma da massa total perdida até a temperatura de transição da ciclodextrina é inferior à massa de metilcetona na amostra, mostrando que parte das moléculas complexadas somente são liberadas após a mudança de fase da ciclodextrina, o que evidencia fortes interações e, assim, a retenção das metilcetonas pela formação de um complexo de inclusão e não apenas por um processo de adsorção, que não ocasionaria tal estabilidade às moléculas voláteis.

Além disso, pelo estudo da volatilização (item 5.1.4.1) foi constatado que a 105°C ocorre apenas uma pequena variação na razão em massa de retenção, o que mostra que as perdas até 105°C estão relacionadas à saída das moléculas não complexadas, incluindo a umidade das amostras. Desta forma, verifica-se que parte das moléculas na superfície do complexo em até 130°C ainda não foram liberadas, mostrando que a retenção na superfície do complexo também confere boa estabilidade térmica às moléculas de metilcetonas.

Além disso, a diferença de perda de massa para o total de 100% é devida ao resíduo final da amostra que não é decomposto.

5.1.4.3. Estabilidade à Oxidação das Metilcetonas nos Complexos

O estudo da estabilidade à oxidação das metilcetonas complexadas em β -CD foi realizado de acordo com o método descrito no item 4.1.4.3, sendo os resultados apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Comparação da estabilidade entre os complexos sob atmosfera de oxigênio e atmosfera inerte.

Complexos	Razão molar (MC / β -CD) (*)			
	1 dia		3 dias	
	Inerte	O ₂	Inerte	O ₂
Em separado				
2-Pentanona	0,07	0,07	0,07	0,08
2-Heptanona	0,58	0,63	0,58	0,64
2-Nonanona	0,73	0,72	0,76	0,74
2-Undecanona	0,63	0,62	0,64	0,63
Em mistura				
2-Heptanona	0,14	0,15	0,15	0,16
2-Nonanona	0,50	0,46	0,51	0,49
2-Undecanona	0,11	0,09	0,11	0,11
Total	0,76	0,70	0,76	0,76

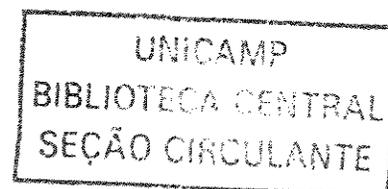
(*): erro experimental da ordem de 0,03

Observa-se, na Tabela 24, que não houve variações significativas das quantidades das metilcetonas nos complexos, comparando-se as amostras sob atmosfera de oxigênio com as de referência, as diferenças observadas são da ordem do erro das análises. Desta forma, as possíveis oxidações ocorridas são menores que o desvio das análises e, portanto, não detectáveis pelo método empregado.

Contudo, pode-se concluir, mesmo sem precisão na análise, que o nível de oxidação das amostras é pequeno e que, assim, as quantidades de metilcetonas não oxidadas nos complexos são bastante próximas das iniciais nas amostras, mostrando uma boa estabilidade à oxidação das metilcetonas complexadas.

5.1.4.4. Estabilidade à Estocagem das Metilcetonas Complexadas

A estabilidade à estocagem das metilcetonas complexadas em β -CD foi estudada de acordo com os métodos descritos no item 4.1.4.4, em que foram avaliadas as perdas totais de metilcetonas ocorridas em função do tempo de estocagem.



5.1.4.4.1. Frascos Abertos

Os resultados do estudo da estabilidade dos complexos durante estocagem em frascos abertos são apresentados nas Figuras 39 a 42, para os complexos das metilcetonas em separado, e na Figura 43, metilcetonas em mistura.

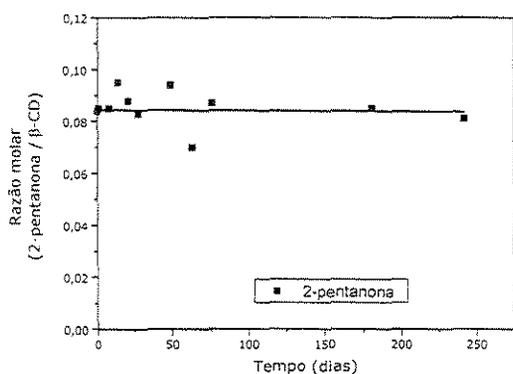


Figura 39: Perfil da retenção da 2-pentanona complexada em β -CD durante estocagem em frascos abertos.

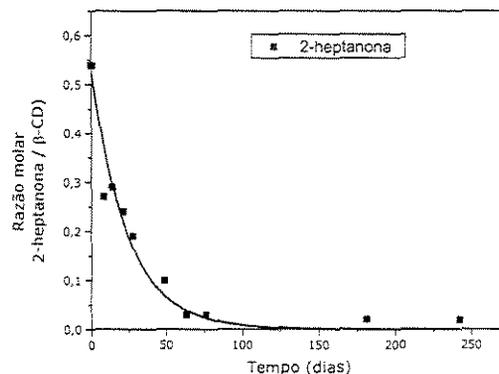


Figura 40: Perfil da retenção da 2-heptanona complexada em β -CD durante estocagem em frascos abertos.

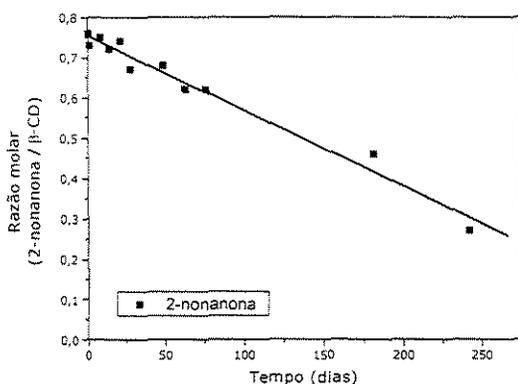


Figura 41: Perfil da retenção da 2-nonanona complexada em β -CD durante estocagem em frascos abertos.

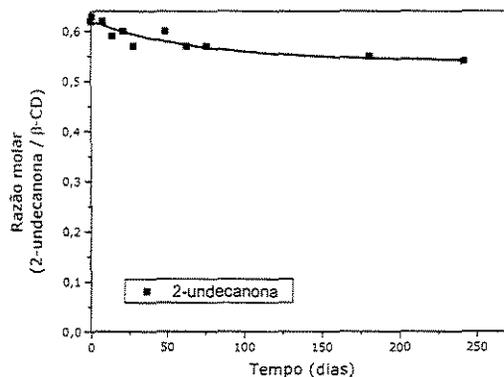


Figura 42: Perfil da retenção da 2-undecanona complexada em β -CD, durante estocagem em frascos abertos.

Pode-se observar, nas Figuras 39 a 42, que os perfis de retenção das metilcetonas com o tempo foram distintos para as diferentes metilcetonas. Estas diferenças já eram esperadas uma vez que no estudo da extração das metilcetonas da superfície da β -CD com *n*-hexano, item 5.1.2.2 a), os perfis da remoção também não foram semelhantes, indicando diferentes forças de interação com a β -CD dependendo da metilcetona complexada.

Assim como na extração superficial, não houve perda significativa na quantidade de 2-pentanona do complexo. Os resultados da 2-heptanona e da 2-nonanona também corroboram os obtidos nos experimentos de remoção com o solvente, sendo que com o tempo houve uma tendência de perda total da massa de metilcetona do complexo. Observa-se na Figura 40 que a 2-heptanona praticamente foi toda liberada em pouco mais de 100 dias, restando apenas quantidades residuais na β -CD. No caso da 2-nonanona, Figura 41, pode-se observar que ocorreu uma queda acentuada na retenção da metilcetona, porém mais lenta que da 2-heptanona, após 250 dias ainda restava pouco menos da metade da 2-nonanona retida inicialmente. Observando a Figura 42, verifica-se que houve uma pequena redução da razão molar de retenção da 2-undecanona com tendência à estabilização da quantidade retida na β -CD em aproximadamente 150 dias, o que também está de acordo com o dados obtidos no estudo da extração.

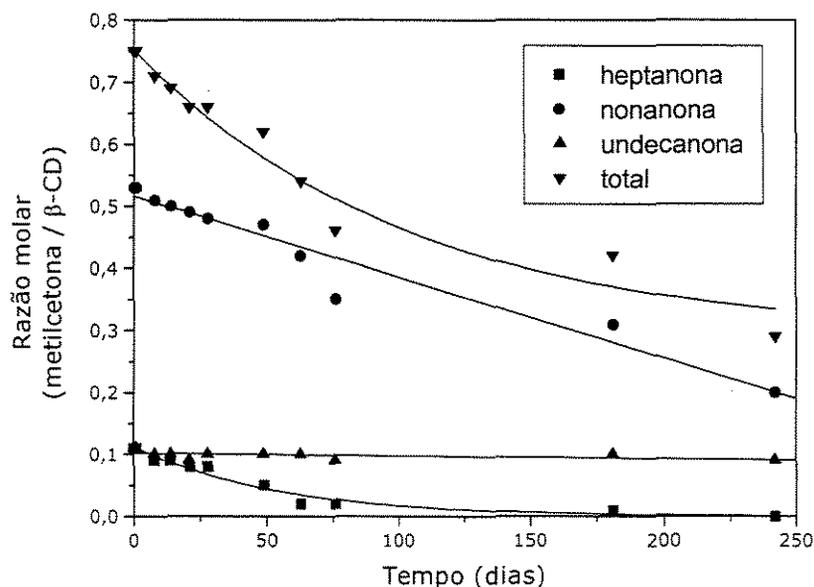


Figura 43: Perfil da retenção das metilcetonas complexadas em mistura durante a estocagem em frascos abertos.

Na Figura 43 observa-se que o comportamento da estabilidade das metilcetonas em mistura no complexo é semelhante ao encontrado nos complexos destas em separado.

Assim, verifica-se que cada metilcetona complexada possui estabilidade diferente durante estocagem em frascos abertos.

5.1.4.4.2. Frascos Fechados

Os resultados do estudo da estabilidade dos complexos durante estocagem em frascos fechados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Estabilidade dos complexos durante estocagem em frascos fechados.

Tempo (dias)	Razão molar de retenção (metilcetona : β -CD)				
	2-Pentanona	2-Heptanona	2-Nonanona	2-Undecanona	Total
Em separado					
0	0,08	0,54	0,76	0,63	
135	0,08	0,59	0,73	0,62	
196	0,07	0,62	0,74	0,61	
Em mistura					
0	0	0,11	0,53	0,11	0,75
135	0	0,14	0,48	0,11	0,74
196	0	0,13	0,45	0,10	0,68

Quando estocados em frascos fechados os complexos com todas as metilcetonas estudadas mantêm-se estáveis por pelo menos 196 dias, tanto nos complexos das metilcetonas em separado quanto em mistura (Tabela 25). Tais resultados são bastante distintos dos obtidos no item 5.1.4.4.1, em que os complexos são estocados em frascos abertos e perdem massa com o tempo. Assim, pode-se concluir que a β -CD é um estabilizante apropriado para compostos como as metilcetonas com relação à retenção com o tempo em embalagens fechadas.

5.1.5. Estudo da Complexação do Bioaroma de Gorgonzola

5.1.5.1. Definição das Correlações de Calibração da Análise dos Complexos por “Purge and Trap”

As curvas de calibração para a quantificação dos complexos de inclusão com o bioaroma são apresentadas nas Figuras 44 a 47 e foram obtidas de acordo com os procedimentos descritos no item 4.1.5.2.1.

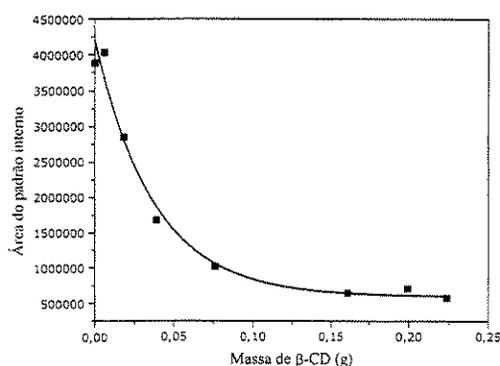


Figura 44: Curva de calibração da massa de β -CD em relação à área do padrão interno.

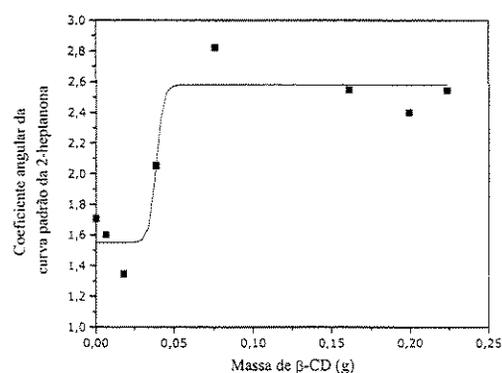


Figura 45: Curva dos coeficientes angulares da calibração da 2-heptanona em relação à massa de β -CD.

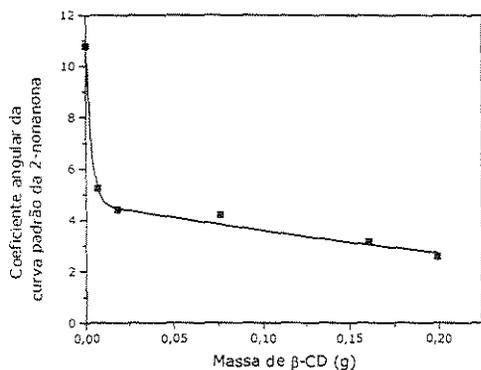


Figura 46: Curva dos coeficientes angulares da calibração da 2-nonanona em relação à massa de β -CD.

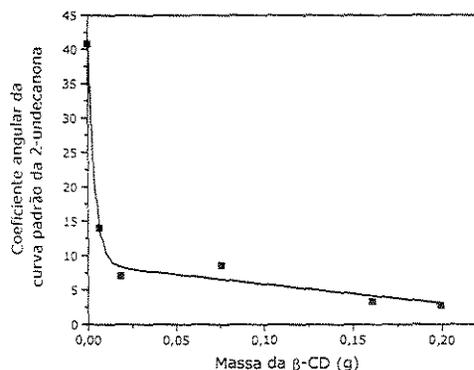


Figura 47: Curva dos coeficientes angulares da calibração da 2-undecanona em relação à massa de β -CD.

CORRELAÇÕES DAS CURVAS:

1) Figura 44

$$A_{PI} = 595093 + 3,6 \cdot 10^6 \exp(-m / 0,037) \quad (10)$$

onde A_{PI} é a área do pico referente ao padrão interno no cromatograma e m a massa de β -CD.

2) Figura 45

$$\alpha = (1,55 - 2,58) / \{1 + \exp[(m - 0,039) / 0,002]\} + 2,58 \quad (11)$$

onde α é o coeficiente angular da curva padrão da metilcetona versus a concentração.

3) Figura 46

$$\alpha = -1,48 + 5,90 \exp(-m / 0,002) + 6,37 \exp(-m / 0,547) \quad (12)$$

4) Figura 47

$$\alpha = -13,94 + 32,26 \exp(-m / 0,004) + 22,49 \exp(-m / 0,822) \quad (13)$$

Nas curvas das Figuras 44 a 47, nota-se que acima da massa máxima solúvel da β -CD a 25°C, que é de 0,1295g para 7 mL, todas as curvas praticamente atingem um valor constante, comportamento que já era esperado uma vez que sem o aumento da massa solúvel não há complexação com a metilcetona padrão interno 2-octanona.

Verifica-se, também, Figuras 45 a 47, que há um perfil ascendente do coeficiente angular da 2-heptanona e descendente para a 2-nonanona e 2-undecanona. Este comportamento é devido à constante de associação das metilcetonas com a β -CD. Estando o coeficiente angular da calibração das metilcetonas associado à relação entre a área do padrão externo (padrões das metilcetonas a serem quantificadas) e a do padrão interno (2-octanona), com o aumento da massa de β -CD há um maior aumento da complexação das metilcetonas com maior constante de associação resultando em menos massa extraída no “Purge and Trap” e, assim, menor área do pico no cromatograma obtido na cromatografia a gás. Sendo a ordem de associação crescente das metilcetonas com a β -CD a seguinte: heptanona, octanona (padrão interno), nonanona e undecanona, a menor associação da heptanona que a da octanona resulta em uma relação entre as áreas dos picos maior à medida que se aumenta a massa, e assim, a complexação. O oposto ocorre com as metilcetonas com constantes de associação maior que do padrão interno.

A definição das condições operacionais da análise do bioaroma por cromatografia precedida da extração e concentração dos voláteis utilizando o “Purge and Trap”, foi a etapa mais difícil e que demandou mais tempo no estudo da complexação do bioaroma. As dificuldades encontradas resultaram das inúmeras variáveis presentes tanto do equipamento quanto das amostras a serem analisadas. Devido a isto, as amostras dos complexos formados com o bioaroma recém-produzido somente foram quantificadas com precisão após 5 meses de preparação do complexo.

5.1.5.2. Comparação dos Complexos Formados por Secagem em Estufa e em “Spray Dryer”

As amostras foram preparadas pelo método da co-precipitação seguida de secagem em estufa e de secagem em “spray dryer (item 4.1.5.1). O método de quantificação dos

compostos é descrito no item 4.1.5.2. As Tabelas 26 e 27 apresentam os dados obtidos de complexação em β -CD para as metilcetonas estudadas, com exceção da 2-pentanona, que não foi possível quantificar devido a não separação de seu pico com o de outros compostos presentes no bioaroma. Na Tabela 26, a designação das amostras: “inicial, refere-se à complexação do aroma fresco (recém - produzido) e analisado após 5 meses (que se refere à complexação do aroma livre estocado em refrigerador durante 5 meses). Portanto, a diferença entre os resultados deve-se à grande perda de voláteis no estoque do bioaroma livre em refrigerador, o que pode ter ocorrido tanto pela volatilização dos compostos quanto por transformações químicas.

Tabela 26: Relação em massa entre as metilcetonas do bioaroma complexadas e a β -CD.

Razão em massa (metilcetona : β -CD, $\mu\text{g} / \text{g}$)						
Amostras	2-Heptanona		2-Nonanona		2-Undecanona	
	Estufa	“Spray Dryer”	Estufa	“Spray Dryer”	Estufa	“Spray Dryer”
Inicial	19,9	4,2	2,6	23,1	4,8	27,7
5 meses*	0,3	0,8	0,4	2,7	0,2	2,7

(*): tempo de estocagem do bioaroma em refrigerador sem complexação.

Para o bioaroma estocado durante 5 meses, os rendimentos da complexação pelos dois processos são apresentados na Tabela 27. Observa-se pelos resultados de razões mássicas entre as metilcetonas e a β -CD que o método de secagem por “spray drying” resulta em maior eficiência de complexação do bioaroma que o método de secagem em estufa. Este resultado pode ser explicado pela alta razão de metilcetonas solúveis no meio de co-precipitação em relação ao total, devido à baixa concentração dos compostos no bioaroma. Desta forma, quando é realizada a filtração, anterior à secagem em estufa, as metilcetonas não complexadas são separadas. No procedimento de secagem por “spray dryer” não há separação das metilcetonas em equilíbrio na solução. Além disso, a complexação do bioaroma é realizada em relações molares entre os compostos de aroma e a β -CD muito menores que as de saturação. Assim, à medida que ocorre a secagem, o equilíbrio de solubilidade é deslocado e

possivelmente há complexação dos compostos de aroma também durante o processo de secagem, resultando, então, em maior quantidade de metilcetonas retidas na β -CD.

Tabela 27: Rendimentos das metilcetonas obtidos na complexação do bioaroma com a β -CD, utilizando valores de concentração inicial do bioaroma para os cálculos de 1,017, 0,940 e 0,273 mg/L para a 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona, respectivamente.

Amostras (*)	Rendimento de retenção das metilcetonas (%)			
	2-Heptanona	2-Nonanona	2-Undecanona	Total (**)
Estufa	2,3	3,1	12,0	2,9
“Spray dryer”	6,3	22,9	78,9	22,2

(*): amostras preparadas após 5 meses de estocagem do bioaroma livre em refrigerador.

(**): rendimento total de retenção das metilcetonas obtido pela relação da soma das metilcetonas retidas nos complexos e iniciais na co-precipitação.

Comparando o rendimento total de retenção das metilcetonas na amostra seca em “spray dryer” com o obtido no estudo das variáveis da secagem por “spray drying” para determinação do melhor rendimento, de 25% (item 5.1.2., Tabela 20), para as metilcetonas sintéticas concentradas, observa-se que os resultados são muito semelhantes. Já o rendimento da amostra seca em estufa é ~57% inferior ao encontrado para as metilcetonas sintéticas concentradas, diferença que pode ser explicada pela baixa concentração das metilcetonas no bioaroma o que resulta numa razão elevada de metilcetonas livres em equilíbrio com o complexo.

5.1.5.3. Caracterização da Geometria das Partículas Formadas

As amostras dos complexos de β -CD com o bioaroma de gorgonzola foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com o item 4.1.5.2.2. As micrografias obtidas são vistas nas Figuras 48 e 49.

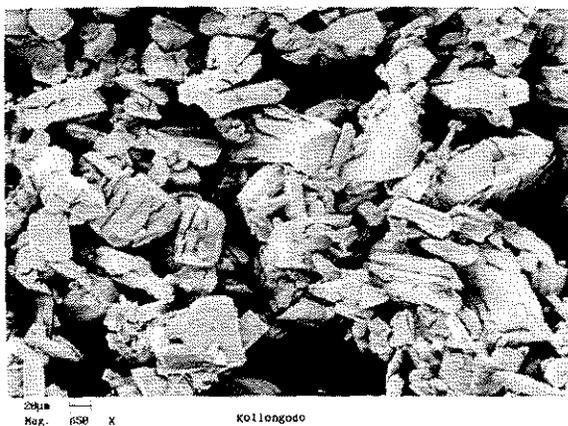


Figura 48: Micrografia do complexo de β -CD com o bioaroma de gorgonzola seco em estufa (amplificação de 650x).

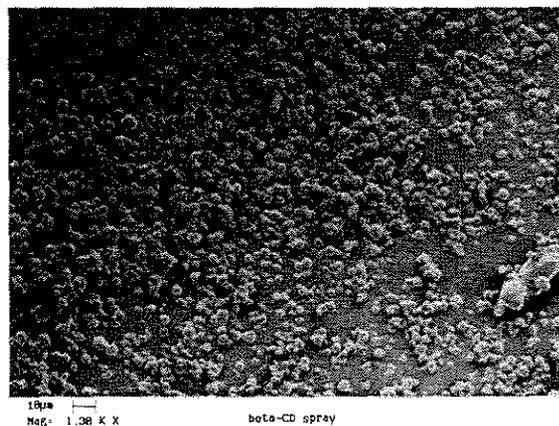


Figura 49: Micrografia do complexo de β -CD com o bioaroma de gorgonzola seco em “spray dryer” (amplificação de 1300x).

Observa-se que houve diferenças bastante acentuadas entre as geometrias dos complexos secos em estufa (Figura 48) e em “spray dryer” (Figura 49). As estruturas do complexo seco em estufa têm forma de blocos irregulares de tamanho na faixa de 5 a 100 μ m, enquanto que as do complexo obtido em “spray drying” apresentam formato esférico de diâmetro entre 1,5 a 10 μ m. A forma de esferas pode ser explicada pelo próprio processo de secagem em “spray dryer”, já que a suspensão é atomizada em gotículas e seca rapidamente. Por outro lado, os complexos secos em estufa, primeiramente foram submetidos à cristalização, aumentando o tamanho das partículas, para posteriormente serem secos em pasta. Desta forma, com a lenta retirada da água das amostras, formaram-se agregados dos complexos.

5.2. Estudo da Encapsulação em Lipossomas das Metilcetonas Sintéticas na Concentração do Bioaroma

5.2.1. Influência da Secagem e da Presença de Manitol na Preparação dos Lipossomas

A preparação dos lipossomas em suspensão com a solução de metilcetonas em concentração similar à do bioaroma de gorgonzola seguiu o método descrito no item 4.2.1.1 e

dos lipossomas secos o descrito no item 4.2.2. As Tabelas 28, 29 e 30 mostram os resultados de encapsulação obtidos para cada metilcetona estudada tanto nos lipossomas em suspensão quanto nos secos.

Tabela 28: Razão molar de encapsulação das metilcetonas nos lipossomas.

Amostras	Razão molar (metilcetona : lecitina, mmol/mol)							
	2-Heptanona		2-Nonanona		2-Undecanona		Total	
Diluições (*)	-	Manitol	-	Manitol	-	Manitol	-	Manitol
20	0,01	-	0,03	-	0,024	-	0,06	-
10	0,03	0,01	0,06	0,03	0,024	0,023	0,12	0,06
5	0,07	0,03	0,09	0,10	0,022	0,035	0,19	0,16
2	0,12	0,05	0,18	0,15	0,026	0,031	0,32	0,23
Secos (**)	0,07	0,03	0,035	0,022	0,012	0,011	0,12	0,06

(*): erro experimental, heptanona: $\pm 0,03$, nonanona: $\pm 0,05$ e undecanona: $\pm 0,006$.

(**): erro experimental, heptanona: $\pm 0,05$, nonanona: $\pm 0,006$ e undecanona: $\pm 0,006$.

Nessa tabela pode-se verificar que a presença do manitol não melhorou a encapsulação das metilcetonas nos lipossomas em suspensão, não resultando em razões molares com diferenças significativas entre as amostras. Contudo, pode-se verificar diferentes comportamentos entre as metilcetonas à medida que se alterava a diluição das amostras. Enquanto a 2-heptanona e a 2-nonanona tiveram suas razões molares diminuídas com a diluição, significando a liberação de parte das moléculas, a 2-undecanona manteve-se praticamente estável, ou seja, as moléculas mantiveram-se encapsuladas mesmo em maiores diluições. Estes resultados podem estar relacionados à diferença de tamanho e de solubilidade das metilcetonas. Assim, a 2-undecanona teria maior dificuldade de atravessar as bicamadas lipídicas dos lipossomas, por seu maior tamanho, e teria maior afinidade pela parte lipofílica da lecitina que pelo meio aquoso, por ser a menos solúvel. Desta forma, conclui-se que a utilização de suspensões mais concentradas de lipossomas resultam em uma liberação menor dos compostos encapsulados.

Outro fator observado foi a diminuição da razão molar de retenção da 2-nonanona e da 2-undecanona nos lipossomas secos por “spray drying”, o que pode ser explicado pela

desestruturação das vesículas durante o processo de secagem e, assim, a liberação e perda de parte dos voláteis encapsulados. Não houve redução significativa da 2-heptanona, provavelmente por esta metilcetona ser a mais solúvel, e desta forma, possivelmente estar em maior quantidade no cerne aquoso do lipossoma. Assim, sua localização numa região de maior dificuldade de liberação durante a secagem aumentaria sua estabilização.

Nota-se também, que a presença do agente estabilizante de membrana lipídica, o açúcar manitol, não resultou em melhor retenção das metilcetonas no “spray dryer”, ou seja, sua adição à preparação dos lipossomas não tornou as bicamadas lipídicas mais estáveis durante a secagem.

Tabela 29: Rendimentos obtidos na retenção das metilcetonas sintéticas em lipossomas.

Amostras	Rendimentos de retenção das metilcetonas nos lipossomas (%)							
	2-Heptanona		2-Nonanona		2-Undecanona		Total	
Em Suspensão	-	Manitol	-	Manitol	-	Manitol	-	Manitol
Diluições	-	Manitol	-	Manitol	-	Manitol	-	Manitol
20	12	-	22	-	78	-	28	-
10	25	9,2	39	21	73	83	40	18
5	59	24	62	65	90	92	70	47
2	89	35	92	92	99	99	72	60
Secos	28	3	18	3	26	7	24	4

Observa-se nessa tabela que há um aumento no rendimento de retenção com a menor diluição das amostras. Este resultado pode ser explicado pela menor difusão das metilcetonas na solução em equilíbrio com os lipossomas e, também, pela menor eficiência de separação nas diluições menores, devido ao maior volume de decantado obtido. Nota-se, também, menores rendimentos nas amostras com o manitol, o que pode ser devido ao maior tempo de agitação e, desta forma, à maior volatilização das metilcetonas.

Os resultados também mostram uma diferença significativa no rendimento das amostras secas, o que é devido não apenas à perda das metilcetonas, como visto na Tabela 28 pela diminuição dos valores de razão molar, como também à grande perda de massa ocorrida no processo de secagem por “spray drying”. As perdas de massa ocorrem tanto na adesão das partículas ao equipamento quanto ao arraste do material seco pela exaustão do sistema. Nos experimentos realizados com a suspensão de lipossomas com manitol, observou-se uma adesão ao equipamento consideravelmente maior do pó obtido do que a ocorrida nas amostras

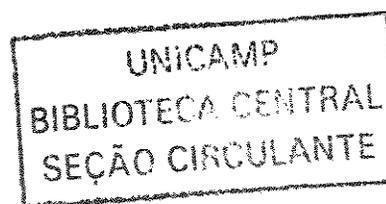
sem manitol, o que justifica a grande diferença nos rendimentos. Além disso, o aspecto geral da amostra seca também foi bastante mudado com a presença do manitol, tendo-se obtido partículas mais viscosas e aderidas umas as outras.

A Tabela 30 mostra as proporções em massa entre as metilcetonas antes e depois da encapsulação. As concentrações muito baixas das metilcetonas nas amostras foi um fator de grande imprecisão durante as análises quantitativas, o que resultou em valores do erro global médio (\pm) bastante elevados, sendo que nas amostras com menores quantidades de metilcetonas (lipossomas secos) os valores do erro ultrapassaram os dos resultados obtidos, não se podendo fazer uma análise conclusiva. Os valores dos erros globais foram obtidos pelo cálculo do maior e menor valor da proporção das metilcetonas considerando os erros experimentais obtidos.

Tabela 30: Proporções em massa entre as metilcetonas nos lipossomas.

Lipossomas	2-Heptanona		2-Nonanona		2-Undecanona	
	Média	\pm	Média	\pm	Média	\pm
Inicial	6		4,3		1	
Em Suspensão						
-	4,6	2,9	6,9	4,6	1	0,6
Manitol	1,6	1,7	4,8	3,5	1	0,5
Seco						
-	5,8	14,2	2,9	3,9	1	2,0
Manitol	2,7	13,3	2,0	3,6	1	2,4

Verifica-se que as proporções entre as metilcetonas encapsuladas, para as amostras em suspensão, considerando o erro global, estão na faixa que inclui a relação inicial. Este resultado é importante porque a proporção entre os compostos de aroma pode definir as características sensoriais do produto.



5.2.2. Caracterização da Geometria dos Lipossomas Formados

A caracterização das geometrias dos lipossomas em suspensão foi feita por microscopia óptica (item 4.2.2.4) e os secos por microscopia eletrônica de varredura (MEV, item 4.1.3.4).

5.2.2.1. Lipossomas em Suspensão

A distribuição de tamanho das amostras foi obtida por espalhamento quasi-elástico de luz laser (QELS). As micrografias obtidas dos lipossomas em suspensão, preparados com e sem manitol, estão nas Figuras 50 e 51.

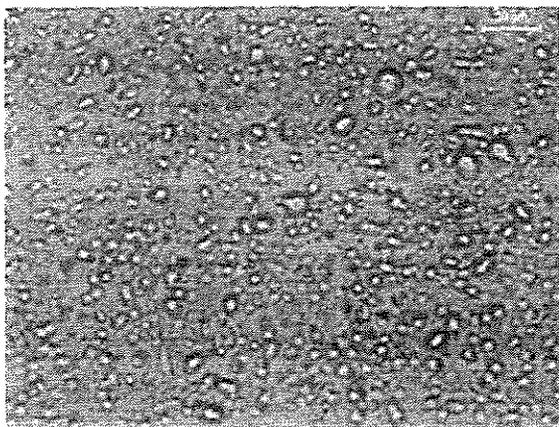


Figura 50: Micrografia dos lipossomas, preparados com as metilcetonas na concentração do bioaroma de gorgonzola (amplificação de 500x).

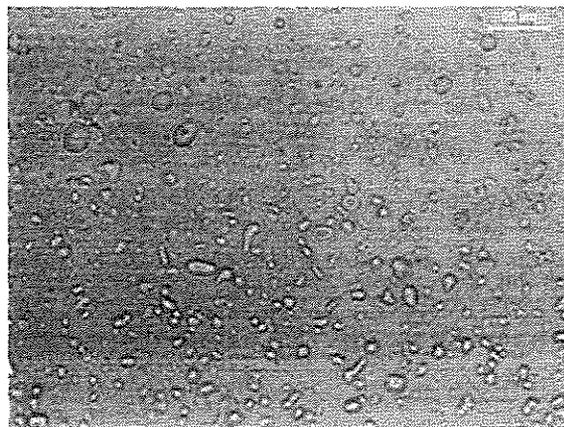


Figura 51: Micrografia dos lipossomas com manitol, preparados com as metilcetonas na concentração do bioaroma de gorgonzola, (amplificação de 500x).

Observa-se nas micrografias que a geometria dos lipossomas em suspensão com e sem manitol é bastante semelhante, podendo-se observar formas esféricas como a dos lipossomas. A distribuição de tamanho das amostras mostrou que há apenas uma população de lipossomas, sendo que a amostra sem manitol é constituída de partículas com diâmetro médio

de 1940,1nm (faixa de 1856,4 a 2092,0nm) e com manitol de 1409,6nm (faixa de 1324,9 a 1493,1nm), distribuição de tamanho no Anexo III.

5.2.2.2. Lipossomas Secos por “Spray Drying”

As Figuras 52 e 53 mostram as micrografias obtidas por MEV das amostras de lipossomas secos em “spray dryer”.

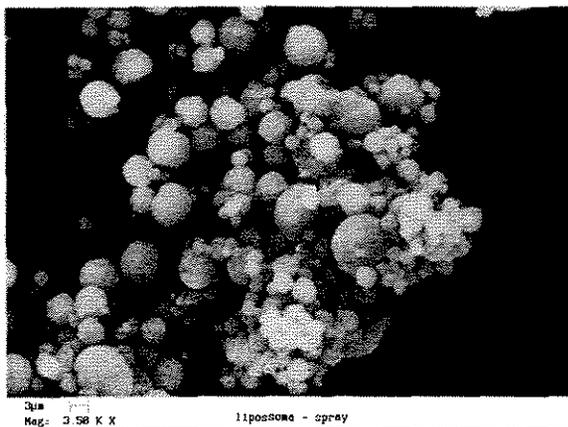


Figura 52: Micrografia dos lipossomas, preparados com as metilcetonas na concentração do bioaroma de gorgonzola, secos em “spray dryer” (amplificação de 3500x).

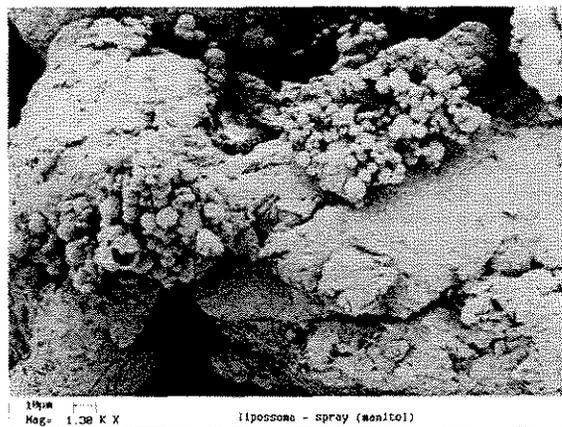


Figura 53: Micrografia dos lipossomas com manitol, preparados com as metilcetonas na concentração do bioaroma de gorgonzola, secos em “spray dryer” (amplificação de 1300x).

A Figura 52 mostra uma morfologia uniforme dos lipossomas secos por “spray drying”, tendo-se apenas geometria aproximadamente esférica presente, na faixa de 1 a 10 μ m.

No caso dos lipossomas com manitol, quando secos, resultaram em dois tipos de geometrias, esféricas, com diâmetro também na faixa de 1 a 10 μ m e aglomerados disformes, provavelmente devido à alta viscosidade das amostras e a aderência do pó.

Desta forma, pode-se concluir que a presença de manitol não trouxe vantagens quanto à estabilidade das membranas e à retenção dos voláteis em seu interior.

De maneira geral, pode-se concluir que foi possível a estabilização do bioaroma de gorgonzola em β -CD, tendo-se resultados melhores na secagem por “spray dryer” sem separação dos compostos não encapsulados. Além disso, apesar das altas diluições das amostras terem sido um fator de grande imprecisão e de dificuldade nas análises, verificou-se que é possível a encapsulação das metilcetonas em lipossomas, e obtenção do produto tanto em suspensão quanto em pó.

5.3. Estudos Comparativos da Encapsulação do Bioaroma de Gorgonzola em β -CD e em Lipossomas por Análise Sensorial

5.3.1. Comparação das Proporções de Metilcetonas Retidas na Encapsulação em β -CD e em Lipossomas

Não foram obtidos valores absolutos das quantidades de metilcetonas nas amostras. Isto ocorreu devido à interferência de compostos do bioaroma, possivelmente da parte gordurosa, que provavelmente retinham parte dos voláteis na suspensão durante a purga, impedindo assim a quantificação total das metilcetonas. Desta forma, apenas foram obtidos valores relativos entre as metilcetonas na encapsulação.

Os resultados das proporções em massas entre as metilcetonas antes e depois da encapsulação nas amostras da encapsulação do bioaroma de gorgonzola em β -CD e em lipossomas são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31: Proporções em massas entre as metilcetonas nas amostras do bioaroma de gorgonzola livre e encapsulado.

Material de encapsulação / Secagem	Proporção em massa entre as metilcetonas		
	2-Heptanona	2-Nonanona	2-Undecanona
Inicial	4,3	6,6	1,0
β -CD / estufa	12,8	14,9	1,0
β -CD / “spray dryer”	17,8	9,8	1,0
Lipossomas / “spray dryer”	8,2	1,8	1,0

Verifica-se na Tabela 31 que em nenhuma das preparações as proporções entre as metilcetonas mantiveram-se próximas às iniciais, sendo que durante a secagem por “spray drying” houve uma inversão da metilcetona de maior quantidade da nonanona para a heptanona. A influência destas mudanças no aroma característico foi estudada pela análise sensorial no item 5.3.2.

5.3.2. Análise Sensorial dos Compostos do Bioaroma Encapsulados

A análise sensorial, realizada como descrito no item 4.3, apresentou os seguintes resultados para os vários itens avaliados:

5.3.2.1. Teste de Ordenação

Os resultados obtidos no teste de ordenação da intensidade de sabor de queijo gorgonzola nas amostras de patê foram analisados pelo método Friedman, no qual se dá a cada amostra, em cada julgamento, um valor correspondente à posição em que a amostra foi ordenada, se a amostra foi ordenada na primeira posição ela recebe o valor 1, se foi ordenada

na terceira, o valor 3. Em seguida, para cada amostra, são somados todos os valores recebidos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 32.

Tabela 32: Valores correspondentes aos julgamentos das amostras de patê testadas, de acordo com o método Friedman, sendo a amostra 862 com o bioaroma encapsulado em β -CD com secagem em "spray dryer, a 245 em β -CD com secagem em estufa e a 458 em lipossomas.

Provador	Amostras		
	862	458	245
	Posição		
1	3	2	1
2	3	1	2
3	2	3	1
4	2	1	3
5	2	3	1
6	3	1	2
7	3	2	1
8	3	1	2
9	3	1	2
10	3	1	2
11	3	2	1
12	2	3	1
13	3	1	2
14	2	3	1
15	2	3	1
16	2	3	1
17	2	3	1
18	3	2	1
19	3	1	2
20	3	2	1
21	2	1	3
22	1	2	3
23	2	3	1
24	3	2	1
25	3	2	1
26	3	1	2
27	2	3	1
28	2	1	3
29	3	1	2
30	3	1	2
soma	76	56	48

Com o número de amostras testadas e o número de testes aplicado (número de provadores), obtém-se, na Tabela Newell e Mac Farlane, a diferença crítica entre os totais de ordenação, a 5% de significância: 19 e a 1%: 23. A Tabela 33 mostra as diferenças obtidas entre as amostras no teste de ordenação.

Tabela 33: Diferenças obtidas entre totais de ordenação das amostras de patê com aroma de gorgonzola.

Amostras		862	458	245
	Total	76	56	48
862	76	-	20	28
458	56	-	-	8

Com os valores de diferenças calculados na Tabela 33 e as diferenças críticas obtidas na Tabela Newell e Mac Farlane, conclui-se que as amostras encapsuladas em β -CD pelos dois métodos de secagem diferem entre si a 1% de significância, sendo que a seca em “spray dryer” apresenta maior intensidade do sabor de gorgonzola. Quando compara-se esta última à amostra de encapsulação em lipossomas, também há diferença significativa na intensidade do sabor a 5% de significância, sendo a amostra com o complexo de β -CD seco em “spray dryer” a de maior intensidade de sabor de queijo gorgonzola dentre as três amostras testadas.

Comparando-se os compostos de bioaroma estabilizados em lipossomas e em complexos de inclusão secos em estufa, verificou-se que não existe diferença significativa na intensidade do aroma de gorgonzola entre as amostras a $p \leq 0,05$, 5% de significância.

Quando comparadas às proporções entre as metilcetonas nas amostras, item 5.3.1 – Tabela 31, constatou-se que, apesar de nenhuma das amostras ter mantido as proporções originais do bioaroma, sensorialmente elas apresentam aroma característico de gorgonzola. Assim, conclui-se que, apesar das mudanças na relação entre as metilcetonas, foram mantidas as propriedades sensoriais principais do aroma do queijo gorgonzola.

5.3.2.2. Teste de Aceitação pelo Consumidor

O teste de aceitação avalia o grau com que consumidores gostam do produto testado. O teste empregou escala não estruturada, ou gráfica, de 9 cm, em que a marca na escala foi

medida e associada a um valor de 0 a 9 correspondente a um grau de satisfação. Os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey e são mostrados nas Tabelas 34 e 35.

Tabela 34: Avaliação da aceitação das amostras de patê com sabor de gorgonzola, sendo a amostra 862 com o bioaroma encapsulado em β -CD com secagem em “spray dryer”, a 245 em β -CD com secagem em estufa e a 458 em lipossomas.

Provedor	Avaliação			Total
	862	458	245	
1	7	8,1	5,8	20,9
2	9	0	4,5	13,5
3	8,7	0,3	0,2	9,2
4	4,5	1,3	7,2	13
5	3,6	6,2	1,6	11,4
6	7,7	6,9	7,7	22,3
7	9	3,5	5,8	18,3
8	6,8	2,6	4,6	14
9	7,5	4,5	9	21
10	9	0,3	6,3	15,6
11	7,6	4,4	4,4	16,4
12	7	4	6,1	17,1
13	4,5	0	9	13,5
14	7,6	4,4	6,1	18,1
15	8,2	1,9	4,2	14,3
16	3,8	5,9	1,7	11,4
17	5,9	1,4	3,7	11
18	9	4,7	4,1	17,8
19	6,7	4,5	5,5	16,7
20	6,2	5	0	11,2
21	7,7	3,9	8,8	20,4
22	0,6	5,2	8,2	14
23	4,1	1,4	4,3	9,8
24	7,8	3,6	0,5	11,9
25	8	7,2	1,6	16,8
26	7,5	3,5	6,5	17,5
27	1,3	1,9	0,6	3,8
28	6,7	1,9	7,8	16,4
29	3	1,6	2,1	6,7
30	4,4	1,5	7	12,9
Total	190,4	101,6	144,9	436,9
Média	6,35	3,39	4,83	

ANÁLISE DOS RESULTADOS

1) Cálculo do fator de correção

$$C = 436,9^2 / (n^\circ \text{ amostras} * n^\circ \text{ provadores}) = 436,9^2 / 3*30 = 2120,91 \quad (14)$$

$$2) SQ_{\text{amostra}} = 190,4^2 + 101,3^2 + 144,9^2 / 30 - C = 131,45 \quad (15)$$

$$3) SQ_{\text{provador}} = (20,9^2 + 13,5^2 + \dots) / 3 - C = 177,78 \quad (16)$$

$$4) SQ_{\text{total}} = \text{soma dos quadrados da avaliação das amostras} = 7^2 + 9^2 + \dots + 2,1^2 + 7^2 - C = 650,38 \quad (17)$$

$$5) SQ_{\text{resíduo}} = SQ_{\text{total}} - (SQ_{\text{amostra}} + SQ_{\text{provador}}) = 341,16 \quad (18)$$

Tabela 35: Análise da variância dos resultados de avaliação da aceitação do patê com sabor de gorgonzola (ANOVA).

	SQ	Grau de liberdade	SQM	Fcalculado	Ftabelado
Amostra	131,45	2	65,73	11,17	5,00 (1%)
Provador	177,78	29	6,13	1,04	1,65 (5%)
Resíduo	341,16	58	5,88		
Total	650,38	89			

Como $F_{\text{calculado}}$ é maior que F_{tabelado} a 1%, conclui-se que há diferença significativa com 99% de confiança no grau de aceitação das amostras testadas e que não há diferença significativa entre os provadores.

6) Verificação da amostra mais aceita

$$MDS = q * \text{sqr}(SQ_{\text{Mresíduo}} / n^\circ \text{ julgamentos}) \quad (19)$$

sendo q obtido na Tabela Tukey a 5%, n° amostras; gl resíduo), $q(3;58) = 3,41$

$$\text{MDS} = 1,51$$

$$862 \times 458 = 6,35 - 3,39 = 2,96 > 1,51 \text{ diferem entre si a } p < 0,05$$

$$458 \times 245 = 4,83 - 3,39 = 1,44 < 1,51, \text{ não diferem entre si}$$

$$862 \times 245 = 6,35 - 4,83 = 1,52 > 1,51, \text{ diferem entre si a } p < 0,05$$

Pela análise dos resultados verifica-se que a amostra 862, com o complexo de β -CD seco por “spray drying”, foi a melhor aceita pelos consumidores em relação às outras duas testadas ao nível de 5% de significância, sendo sua avaliação média resultante: gostei moderadamente. Este resultado corresponde à melhor aceitação da amostra que apresentou a maior intensidade do aroma de gorgonzola no teste de ordenação, item 5.3.2.1. As amostras com bioaroma encapsulado em lipossomas (amostra 458) e em β -CD seca em estufa (amostra 245) não diferiram entre si com relação à aceitação, tendo avaliação entre nem gostei/nem desgostei e desgostei ligeiramente.

Estes resultados indicam uma boa aceitação pelo consumidor do bioaroma encapsulado, uma vez que se pode ainda fazer ajustes das condições das amostras testadas sensorialmente para comercialização, bem como utilizar o aroma encapsulado em outros produtos.

5.3.2.3. Teste de Atitude de Compra

O teste de atitude de compra consiste da avaliação das porcentagens das notas dadas pelos provadores a cada uma das amostras. Os resultados obtidos estão representados na Figura 54.

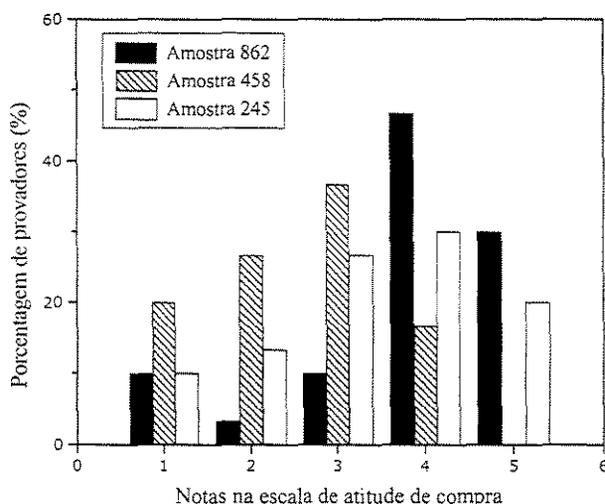


Figura 54: Representação gráfica das porcentagens das notas dadas pelos provadores para cada uma das amostras testadas na análise sensorial em relação a sua atitude de compra, sendo: 1 - eu certamente não compraria, 2 - eu provavelmente não compraria, 3 - eu tenho dúvida se compraria ou não, 4 - eu provavelmente compraria e 5 - eu certamente compraria.

Pela Figura 54 verifica-se que a amostra 862, complexo do bioaroma seco em “spray dryer”, é a amostra com atitude de compra mais positiva, sendo que sua maior porcentagem de avaliação, aproximadamente 50% dos provadores, provavelmente compraria o produto e em torno de 30% certamente compraria. Este resultado está em concordância ao obtido no teste de aceitação, item 5.3.2.2, em que a amostra aparece como a mais bem aceita.

Por outro lado, a amostra 458, bioaroma encapsulado em lipossomas, teve a maior rejeição dentre as três amostras, com a maioria das notas dadas entre 1 e 3, sendo que quase 40% tinha dúvida se compraria ou não e aproximadamente 20% dos provadores certamente não compraria o produto testado, o que confirma o resultado de aceitação como desgostei ligeiramente.

A amostra 245, do complexo seco em estufa, obteve atitude positiva de compra, sendo a maior porcentagem de notas entre 3 e 5, sendo que aproximadamente 30% provavelmente compraria e 20% certamente compraria.

Com estes resultados, conclui-se que a amostra com o complexo do bioaroma encapsulado em β -CD com secagem por “spray drying”, além de possuir o aroma de

gorgonzola mais intenso, é a que resultou em melhores resultados sensoriais, tendo aceitação pelo consumidor e atitude positiva de compra.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir, de maneira geral, que a inclusão das metilcetonas sintéticas em β -CD resulta em complexos estáveis com relação à temperatura, à volatilização, à oxidação e à estocagem, mostrando a potencialidade da complexação de aromas em β -CD para a preservação na estocagem e no processamento de alimentos.

Conclui-se também, que é possível a encapsulação de compostos de aroma em lipossomas em suspensão e secos por “spray dryer”, tanto na forma concentrada quanto na diluída, o que resulta em um aumento da estabilidade dos compostos de aroma.

Além disso, os estudos com o aroma do gorgonzola, produzido por fermentação, mostraram que ocorre a estabilização dos compostos de aroma sendo mantido sensorialmente o aroma característico. Assim, é viável a aplicação da β -CD e da lecitina de soja, na forma lipossomal, como agentes estabilizantes na indústria de alimentos, com possibilidade de aceitação dos produtos pelos consumidores.

7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

As seguintes sugestões são recomendadas para os trabalhos futuros:

- Para que seja possível a quantificação do bioaroma de forma direta e dos complexos formados é necessário um estudo mais detalhado do método de análise dos compostos voláteis.
- Pode-se, ainda, melhorar o rendimento de complexação do bioaroma de gorgonzola com a β -CD pela avaliação da complexação em estado sólido, com pouca adição de água ao sistema, por “kneading” ou “co-grinding”. Para isso, porém, haveria necessidade de obtenção do bioaroma em fermentação de estado sólido e não líquido.
- O processo de complexação em β -CD também pode ser melhorado pelo estudo mais detalhado das condições de secagem tanto em estufa quanto em “ spray dryer”, para que ocorra menor oxidação da parte gordurosa da amostra do bioaroma.
- Um estudo mais detalhado do processo de encapsulação em lipossomas poderia levar a melhores rendimentos de retenção tanto em suspensão quanto em estado sólido, podendo-se avaliar também a secagem por liofilização. Além disso, há necessidade de analisar a estabilidade dos compostos de aroma encapsulados em lipossomas.
- Sugere-se também a análise sensorial do aroma encapsulado em outros produtos, tais como arroz, biscoitos, etc.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACREE, T.E. & TERANISHI, R. **Flavor Science: Sensible Principles and Techniques**. Washington: American Chemical Society, p. xi-xvi, 1993.
- ALLEGRE, M. & DERATANI, A. Cyclodextrin Uses: from Concept to Industrial Reality. **Agro Food Industry Hi-Tech**, Jan/Feb, p. 9-17, 1994.
- ARMSTRONG, D. W. & BROWN, L. A. Aliphatic, Aromatic and Lactone Compounds. In: GABELMAN, A. **Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1994, p. 41-94.
- ARNAUD, J. P. Liposomes in the Agro/Food Industry. **Agro Food Industry Hi- Tech**, Sept/Oct, p.30-36, 1995.
- BAOKANG, Y. & YANTONG, W. β -Cyclodextrin Encapsulation of Onion Juice. **Shipin Kexue (Beijing)**, v. 155, p. 25-27, 1992.
- BHANDARI, B. R., D'ARCY, B. R. & BICH, L. L. T. Lemon Oil to β -Cyclodextrin Ratio Effect on the Inclusion Efficiency of β -Cyclodextrin and the Retention of Oil Volatiles in the Complex. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 1494-1499, 1998.
- BEKERS, O., UIJTENDAAL, E., BEIJNEN, J. H. et al. Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.17, p.1503 - 1549, 1991.
- BENDER, H. Production, Characterization and Application of Cyclodextrins. In: LISS, A.R. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 6, p. 31 - 71, 1986.
- BLANCHFIELD, J. R. & OVEDEN, C. Problems of Flavouring Extruded Snack Food. **Food Manufacture**, v.49, n. 1, p.27-29, 1974.
- CHEN, P. S. Microdetermination of Phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1756-1758, 1956.
- CRAMER, F. Introduction. In: DUCHÊNE, D. (eds.) **Cyclodextrins and their Industrial Uses**. Paris: Editions de Santé, 1987, p.11-18.

- DIVAKAR, S. Structure of a β -Cyclodextrin - Vanillin Inclusion Complex. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 940-944, 1990.
- DRAWERT, F. Bioflavour: What does it Mean? In: Bioflavour'87, 1987, Wirzburg. **Analysis - Biochemistry - Biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 1988, p. 1-32.
- DUBOIS, M. Natural Flavor Ingredients. **The American Association of Cereal Chemists**, v.33, n. 7, p. 560-563, 1988.
- DUCHÊNE, D. **Cyclodextrins and their Industrial Uses**. Paris: Editions de Santé, 1987.
- FARBOOD, M. I. Microorganisms as a Novel of Flavour Compounds. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, n. 3, p. 690-694, 1991.
- FENNEMA, O. R. Introduction of Food Chemistry. In: **Principles of Food Science**. New York: Marcel Dekker, 1976, p. 1-11.
- FERON, G., BONNARME, P. & DURAND, A. Prospects for the Microbial Production of Food Flavours. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.285-293, 1996.
- FRÖMMING, K. Cyclodextrin in Pharmaceutical Industry. In: SZEJTLI, J. (ed.) **The First International Symposium on Cyclodextrin**. Dordrecht: D. Riedel Publishing Company, p. 367 - 376, 1982.
- FUJIWARA, S., KAKIHARA, H., WOO, K. et al. Cyclization Characteristics of Cyclodextrin Glucotransferase are Confered by the NH₂ - Terminal Region of the Enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 4016-4025, 1992.
- FURUTA, T., YOSHII, H., KOBAYASHI, T. et al. Powdery Encapsulation of d-Limonene by Kneading with Mixed Powders of β -Cyclodextrin and Maltodextrin at Low Water Content. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 847-850, 1994.
- GATIFIELD, I. L. Production of Flavor and Aroma Compounds by Biotechnology. **Food Technology**, n.10, p. 110-122, 1988.
- GATIFIELD, I. L. Enzymatic and Microbial Generation of Flavors. **Perfumer & Flavorist**, v.20, n. 9/10, p. 5-14, 1995.
- GOUBET, I., LE QUERE, J. L. & VOILLEY, A. J. Retention of Aroma Compounds by Carbohydrates: Influence of their Physicochemical Characteristics and of their Physical

- State. A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1981-1990, 1998.
- HADAR, Y. & DOSORETZ, C. G. *Mushroom mycelium* as a Potential Source of Food Flavour. **Trends in Food Science & Technology**, n. 9, p. 214-218, 1991.
- JANSSENS, L., DE POOTER, H. L., SCHAMP, N. M. et al. Production of Flavours by Microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 195-215, 1992.
- KAMIHIRA, M., ASAI, T., YAMAGATA, Y. et al. Formation of Inclusion Complexes Between Cyclodextrins and Aromatic Compounds under Pressurized Carbon Dioxide. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69, n. 6, p. 350-353, 1990.
- KIM, H-H. Y. & BAIANU, I. C. Novel Liposomes Microencapsulation Techniques for Food Applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.2, n. 3, p. 55-61, 1991.
- KIM, T., LEE, Y. & KIM, H. Enzymatic Production of Cyclodextrins from Milled Corn Starch in an Ultrafiltration Membrane Bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 89 - 94, 1993.
- KINSELLA, J. E. Texturized Proteins: Fabrication, Flavoring and Nutrition. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.10, p.147-207, 1978.
- KOLLENGODE, A. N. R. & HANNA, M. A. Cyclodextrin Complexed Flavors Retention in Extruded Starches. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 5, p. 1057-1060, 1997.
- KOLLENGODE, A. N. R., HANNA, M. A. & CUPPETT, S. Volatiles Retention as Influenced by Method of Addition During Extrusion Cooking. **Journal of Food Science**, v.61, p. 985-989, 1996.
- KOZO, H. Stabilization of Labille Flavors and Masking of Unusual Odors by Cyclodextrins. **Kagaku to Kogyo**, v. 63, n. 4, p. 170-178, 1989.
- KRINGS, U., KELCH, M. & BERGER, R. G. Adsorbents for the Recovery of Aroma Compounds in Fermentation Processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 58, p. 293-299, 1993.
- KRINGS, U. & BERGER, R. G. Biotechnological Production of Flavours and Fragrances. **Applied Microbiology**, v. 49, p. 1-8, 1998.

- KROTZ, R. Lecithin Fractions: Phospholipids and Liposomes in Bakery Products. **Food Ingredients and Analysis International**, v. 17, Oct/ Dec., p. 14-16, 1995.
- LE BAS, G. & RYSANEK, N. Structural Aspects of Cyclodextrins. In: DUCHÊNE, D. (ed.) **Cyclodextrins and their Industrial Uses**. Paris: Editions de Santé, 1987, p. 107 - 130.
- LEE, J., CHOI, K., CHOI, J. et al. Enzymatic Production of α -Cyclodextrin with the Cyclomalto-dextrin Glucotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 14, p. 1017-1020, 1992.
- LEE, Y. & KIM, H. Enhancement of Enzymatic Production of Cyclodextrins by Organic Solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 499 - 503, 1991.
- LENGERICH, B. V., HAYNES, L. C., LEVINE, H. et al. Extrusion Baking of Cookies Having Liposome Encapsulated Ingredients. **US Patent 4,999,208**, 1991.
- LIANCI, S. & RUIHAI, W. Quality and Stability of β -Cyclodextrin Inclusion Complex of the Essential Oil of Garlic. **Zhongcaoyao**, v. 23, n. 10, p. 518-520, 1992.
- LINDNER, K. Using Cyclodextrin Aroma Complexes in the Catering. **Die Nahrung**, v.26, n. 7/8, p. 675-680, 1982.
- LINDNER, K., SZENTE, L. & SZEJTLI, J. Food Flavouring with β -Cyclodextrin - Complexed Flavour Substances. **Acta Alimentaria**, v. 10, n. 3, p. 175-186, 1981.
- LOUKAS, Y., GREGORIADIS, G. & JAYASEKERA, P. Characterization and Photoprotection Studies of a Model γ -Cyclodextrin - Included Photolabile Drug Entrapped in Liposomes Incorporating Light Absorbers. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, p. 11035-11040, 1995.
- LUGAY, J. C. Biogenesis of Aromas. An Industrial Perspective. In: PARLIAMENT, T. H., CROTEAU, R. (eds.) **Biogenesis of Aromas**. Washington: American Chemistry Society Symposium Series. 317, 1986, p. 11-17.
- MAIER, H. G., MORITZ, K. & RUEMMLER, U. Thermostable Binding of Aroma Compounds to Starch. Part 1: Binding by Freeze-Drying. **Starch/Staerke**, v. 39, n. 4, p. 126-131, 1987.

- MENERT, A. Extraction of Caraway Oil by β -Cyclodextrin Complexation. **Tallinna Tehnikaülikool Toim.**, v. 727, p. 69-80, 1991.
- MICARONI, A. **Estudo da Inclusão Molecular de Produtos de Interesse Farmacológico Utilizando Ciclodextrinas.** Campinas: Instituto de Química. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, 1994, p. 6-13.
- OLIVEIRA, J.G. **Produção Biotecnológica de Metilcetonas por Linhagem de *Aspergillus sp.*** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- PALKERT, P. E. & FAGERSON, I. S. Determination of Flavor Retention in Pre-Extrusion Flavored Textured Soy Protein. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 526-528, 1980.
- PREMA, P., SREEDHARAN, P., RAJA, K. et al. Studies on Cyclodextrin Glycosyltransferase Production and Characterization. In: DUCHÊNE, D. ed., **Minutes of 5th International Symposium on Cyclodextrins**, Paris: Editions de Santé, 1990, p. 46-49.
- PSZCZOLA, D. E. Production and Potential Food Applications of Cyclodextrins. **Food Technology**, Jan., p. 96-100, 1988.
- REINECCIUS, G. A. & RISCH, S. J. Encapsulation of Artificial Flavors by β -Cyclodextrin. **Perfumer & Flavorist**, v. 11, n. 4, 1, p. 3-6, 1986.
- SAENGER, W. Cyclodextrin Inclusion - Compounds in Research and Industry. **Angewandte Chemie - International Edition in English**, v. 19, n.5, p. 344-362, 1980.
- SCHARPF, L. G., SEITZ, E. W., MORRIS, J. A., FARBOOD, M.I. Generation of Flavor and Odor Compounds Through Fermentation Processes. In: PARLIMENT, T. H., CROTEAU, R. (eds.) **Biogenesis of Aromas**. Washington: American Chemistry Society Symposium Series. 317, 1986, p. 323-346.
- SFIHI, H., LEGRAND, A. P., DOUSSOT, J. et al. Solid-State ^{13}C NMR Study of β -Cyclodextrin/ Substituted Aromatic Ketone Complexes: Evidence for Two Kinds of Complexation of the Guest Molecules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 115, p. 115-126, 1996.

- SHAHIDI, F. & HAN, X. Q. Encapsulation of Food Ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.
- SHITY, H. & BAR, R. New Approach for Selective Separation of Dilute Products from Simulated *Clostridial* Fermentation Broths Using Cyclodextrins. **Biotechnology & Bioengineering**, v.39, p. 462-466, 1992.
- SILVA, R. F., FIERRO, J., BUCCINO, J. et al. Food Composition and Methodology. **US Patent 5,120,561**, 1992.
- SOROKINE, O., LETAVERNIER, J.F., LEIZE, E. et al. In: HEDGES, A. R. (ed.) **Minutes of the 6th International Symposium on Cyclodextrins**. Paris: Editions de Santé, 1992, p. 26-232.
- SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988.
- SZEJTLI, J., SZENTE, L. & BÁNKY-ELŐD, E. Molecular Encapsulation of Volatile, Easily Oxidizable Labile Flavour Substances by Cyclodextrins. **Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.101, n. 1-2, p. 27-46, 1979.
- SZENTE, L., GÁL-FÜZY, M. & SZEJTLI, J. Tea Aromatization with Beta-Cyclodextrin Complexed Flavours. **Acta Alimentaria**, v. 17, n. 2, p. 193-199, 1988a.
- SZENTE, L., HARANGI, J. & SZEJTLI, J. Long-Term Storage Stability Studies on Flavor- β -Cyclodextrin Complexes. **Proceedings of 4th International Symposium of Cyclodextrins**, p. 545-549, 1988b.
- SZENTE, L. & SZEJTLI, J. Molecular Encapsulation of Natural and Synthetic Coffee Flavor with β -Cyclodextrin. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 4, p. 1024-1027, 1986.
- SZENTE, L. & SZEJTLI, J. New Results on the Molecular Encapsulation of Flavors by Cyclodextrins. **Abh. Akad. Wiss. DDR, Abt. Math., Naturwiss., Tech.**, (2, Characterization, Production and Application of Food Flavours), p.101-106, 1988.
- SZENTE, L. & SZEJTLI, J. Use of Cyclodextrins in the Food Industry. **Magyar Kemikusok Lapja**, v.45, n. 3-4, p. 118-122, 1990.
- SZENTE, L. & SZEJTLI, J. Cyclodextrin-Complexed Acetal as an Acetaldehyde Generator. **Perfumers & Flavorist**, v. 20, Mar/Apr, p. 11-13, 1995.

- TANIGUCHI, M., NOMURA, R., KAMIHIRA, M. et al. Effective Utilization of Horseradish and Wasabi by Treatment with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Fermentation and Technology**, v.66, p. 347-353, 1988.
- TAWARA, H. K. & KHOURI, S. An Equilibrium Study of *p*-Methyl Red Inclusion Complexes with α and β -Cyclodextrins. **Carbohydrate Research**, v. 245, p. 165-173, 1993.
- TEE, O.S., FEDORTCHENKO, A. A., LONKE, P.G. et al. Binding of Aliphatic Ketones to Cyclodextrins in Aqueous Solution. **Journal of Chemical Society- Perkin Transactions 2**, v. 6, Jun, p. 1243-1249,1996.
- THOSS, M., SCHWABE, L. & FROEMMING, K. H. Storage and Photostability of Cyclodextrin Inclusion Compounds of Lemon, Orange, Hop, and Chamomile Oil. **Pharmazie**, v. 49, n. 4, p. 252-257, 1994.
- TYRRELL, M. Advances in Natural Flavors and Materials. **Perfumers & Flavorist**, v. 20, n.1/2, p. 13-21, 1995.
- VILLOTA, R. & HAWKES, J. G. Flavoring in Extrusion. An Overview. In: PARLIMENT, T. H., MORELLO, M. J. & MCGORRIN, R. J. **Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave, and Extrusion Process**. Washington: American Chemical Society, 1994, p.280-296.
- XIAOFENG, L., ZHENG, X., FANGPING,X., MINGGUI, X. Spectroscopic Study on the Inclusion of Aroma Compounds with β -Cyclodextrin in Aqueous Solution. **Fenxi Huaxue**, v.24, n. 6, p. 621-625, 1996.
- WINTERHALTER, P. & SCHREIER, P. Biotechnology: Challenge for the Flavor Industry. In: **Flavor Science: Sensible Principles and Techniques**. Washington: American Chemical Society, Chap.7, p. 225-227, 1993.
- WELSH, F. W. Overview of Bioprocess Flavor and Fragrance Production. In: GABELMAN, A. **Bioprocess Production of Flavour, Fragrance and Color Ingredients**. New York: John Wiley & Sons Inc. , 1994, p. 1-17.

- WEN, L. F., RODIS, P. & WASSERMAN, B. P. Starch Fragmentation and Protein Insolubilization During Twin-Screw Extrusion of Corn Meal. **Cereal Chemistry**, v. 67, p.268-275, 1990.
- WESTING, L. L., REINICCIUS, G. A. & CAPORASO, F. Shelf Life of Orange Oil-Effects of Encapsulation by Spray Drying, Extrusion and Molecular Inclusion. In: RISCH, S. J., REINICUIS, G. A. (eds) **Flavor Encapsulation**. Washington: American Chemical Society, 1988, p. 111-121.
- YASUMA, T., YAGINUMA, I. & KATAOKA, M. Extraction of Volatile Natural Fragrant Substances Using Cyclodextrin as Adsorbent. **Japan Kokai Tokkyo Koho JP 62,148,598** A2 2 Jul, Showa, 1987.
- YOSHII, H., FURUTA, T., OKITA, E. et al. The Increased Effect of Kneading on the Formation of Inclusion Complexes Between *d*-Limonene and β -Cyclodextrin at Low Water Content. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 464-468, 1998.
- YOSHII, H., TAKESHI, F., ASADA, M. et al. Quantitative Analysis by X-Ray Diffraction of the Inclusion Complex Formed by *d*-Limonene in a β -Cyclodextrin/Maltodextrin Mixed Powder. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 3, p. 384-387, 1992.
- YUNXIU, S., HUIXIANG, Z., YONGXIN, L. et al. Identification of Composition from Volatile Oil in Genseng Flower Bud and Studies on Inclusion Complex of β -Cyclodextrin. **Chinese Science Bulletin**, v. 38, n. 13, p. 1092-1096, 1993.

ANEXO I

Espectros de infra-vermelho.

Tabela de identificação dos espectros.

Amostra	Número da Amostra
β -ciclodextrina	23
Complexo com 2-pentanona	27
Complexo com 2-heptanona	24
Complexo com 2-nonanona	26
Complexo com 2-undecanona	25
Complexo com mistura das metilcetonas	321

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Peak Report
12/6/00 1:40 AM

A:\0023.SPC
bcd seca

X Units.: Wavenumber (cm-1)
Y Units.: Transmittance
Resolutn: 4 cm-1
Begin X.: 4000.07
Ending X: 399.2356
Points: 1868

Center X	Peak Y	Name
576.02018	72.071139	576
755.69595	75.612334	756
861.02154	79.233758	861
938.65945	77.455714	939
1028.9094	51.111260	1029
1081.2082	61.179562	1081
1157.7873	63.531658	1158
1368.4646	74.150499	1368
1457.9948	74.897228	1458
1637.1607	72.599428	1637
2360.5365	74.076636	2360
2923.3133	66.728306	2923
3407.2592	47.204165	3407

File # 1 : 0023

Mode = 2 (Mid-IR)

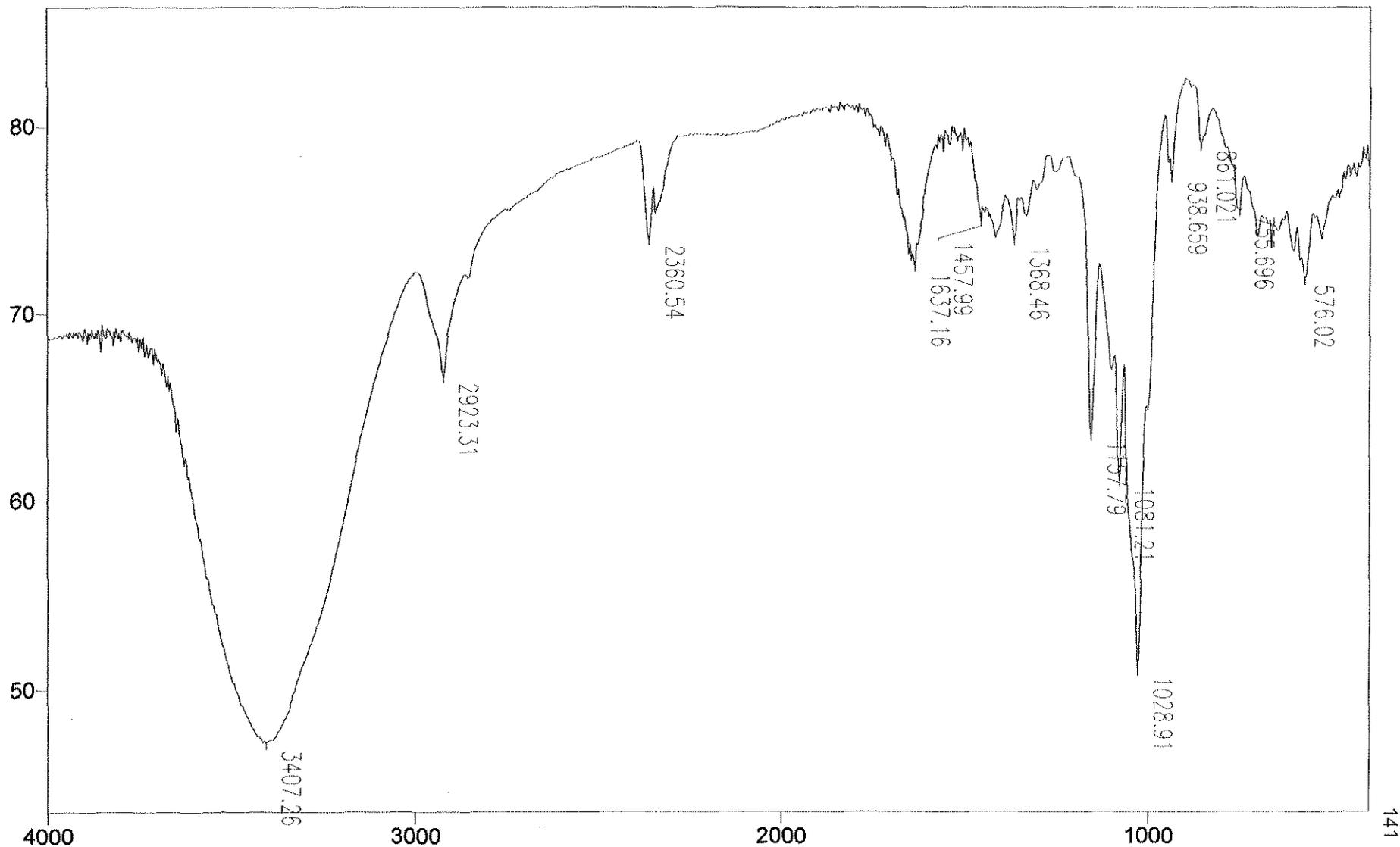
12/6/00 1:40 AM

Sample Description: bcd seca

Scans = 16

Res = 4 cm⁻¹ 20 scans/min

Apod = Cosine



Peak Report
12/6/00 3:00 AM

A:\0027.SPC
complexo pentanona

X Units.: Wavenumber (cm-1)
Y Units.: Transmittance
Resolutn: 4 cm-1
Begin X.: 4000.07
Ending X: 399.2356
Points: 1868

Center X	Peak Y	Name
530.54501	31.944471	530
609.94392	28.389541	610
707.09726	32.291377	707
755.85760	36.566518	756
859.87770	49.726778	860
947.76373	45.785528	948
1029.1939	1.1360308	1029
1080.6040	6.1763912	1081
1156.6742	8.7966540	1157
1254.5762	50.335990	1254
1335.0732	39.690895	1335
1413.7624	39.212008	1414
1637.7859	43.245276	1638
2361.1178	65.125215	2361
2924.3276	34.580663	2924
3386.4778	3.0313336	3386

File # 4 : 0027

Mode = 2 (Mid-IR)

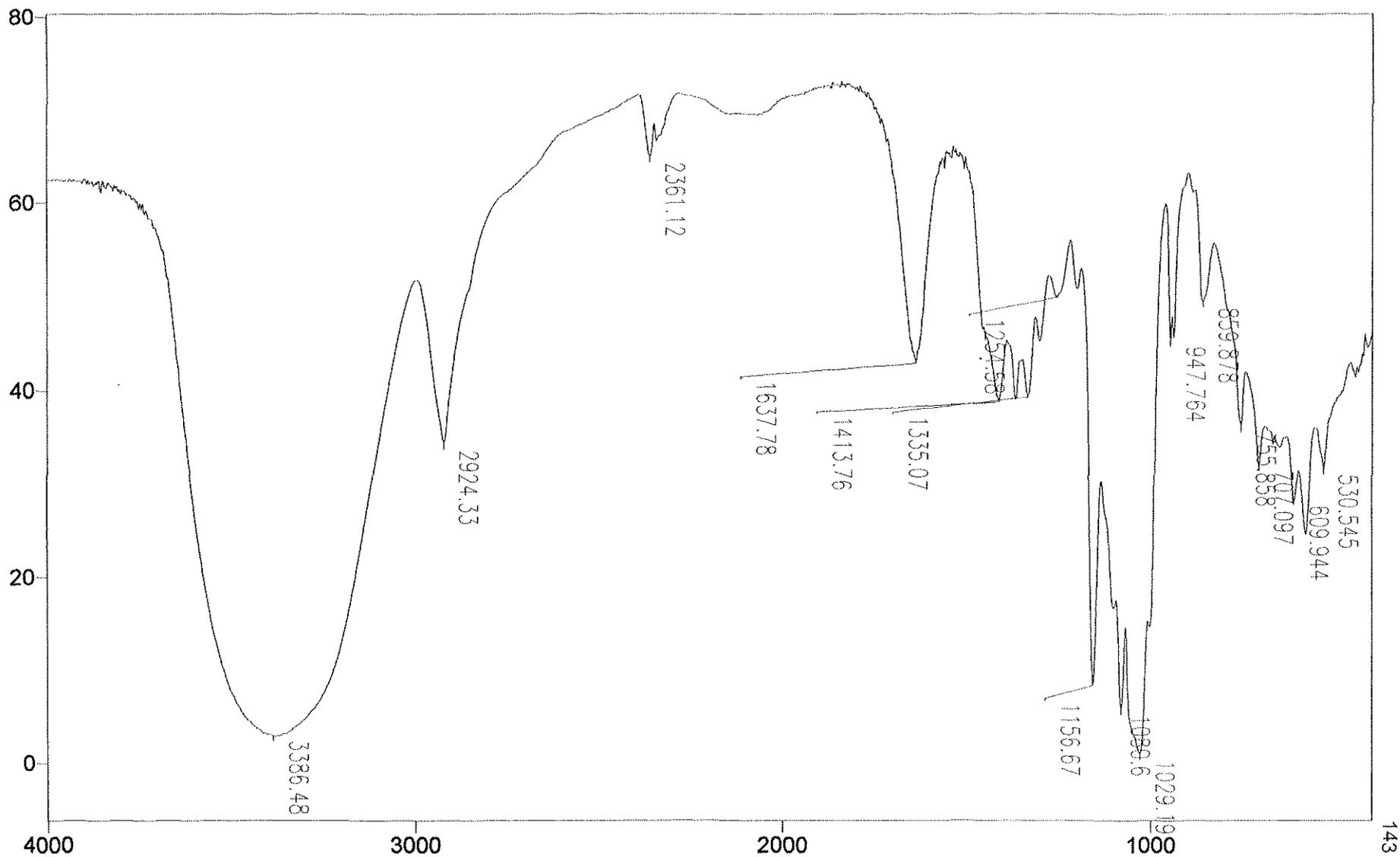
12/6/00 3:00 AM

Sample Description: complexo pentanona

Scans = 16

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine



Peak Report
12/6/00 1:53 AM

A:\0024.SPC
complexo heptanona

X Units.: Wavenumber (cm-1)
Y Units.: Transmittance
Resolutn: 4 cm-1
Begin X.: 4000.07
Ending X: 399.2356
Points: 1868

Center X	Peak Y	Name
446.67037	33.226280	447
529.91102	22.907328	530
575.89269	17.780535	576
608.54530	21.684746	608
705.01591	21.403345	705
756.67994	27.520991	757
861.17469	40.020870	861
938.39421	30.794720	938
1003.6012	6.5419825	1004
1102.4000	9.7010691	1102
1158.2081	5.0254809	1158
1202.5417	37.568763	1202
1249.0146	39.242912	1249
1305.5835	32.430418	1305
1334.1821	27.488979	1334
1416.6116	28.260588	1417
1638.1294	36.612014	1638
1707.8968	47.481266	1708
2066.3280	63.911871	2066
2360.1306	58.608915	2360
2924.2055	22.911915	2924
3366.3748	2.2494249	3366

Mode = 2 (Mid-IR)

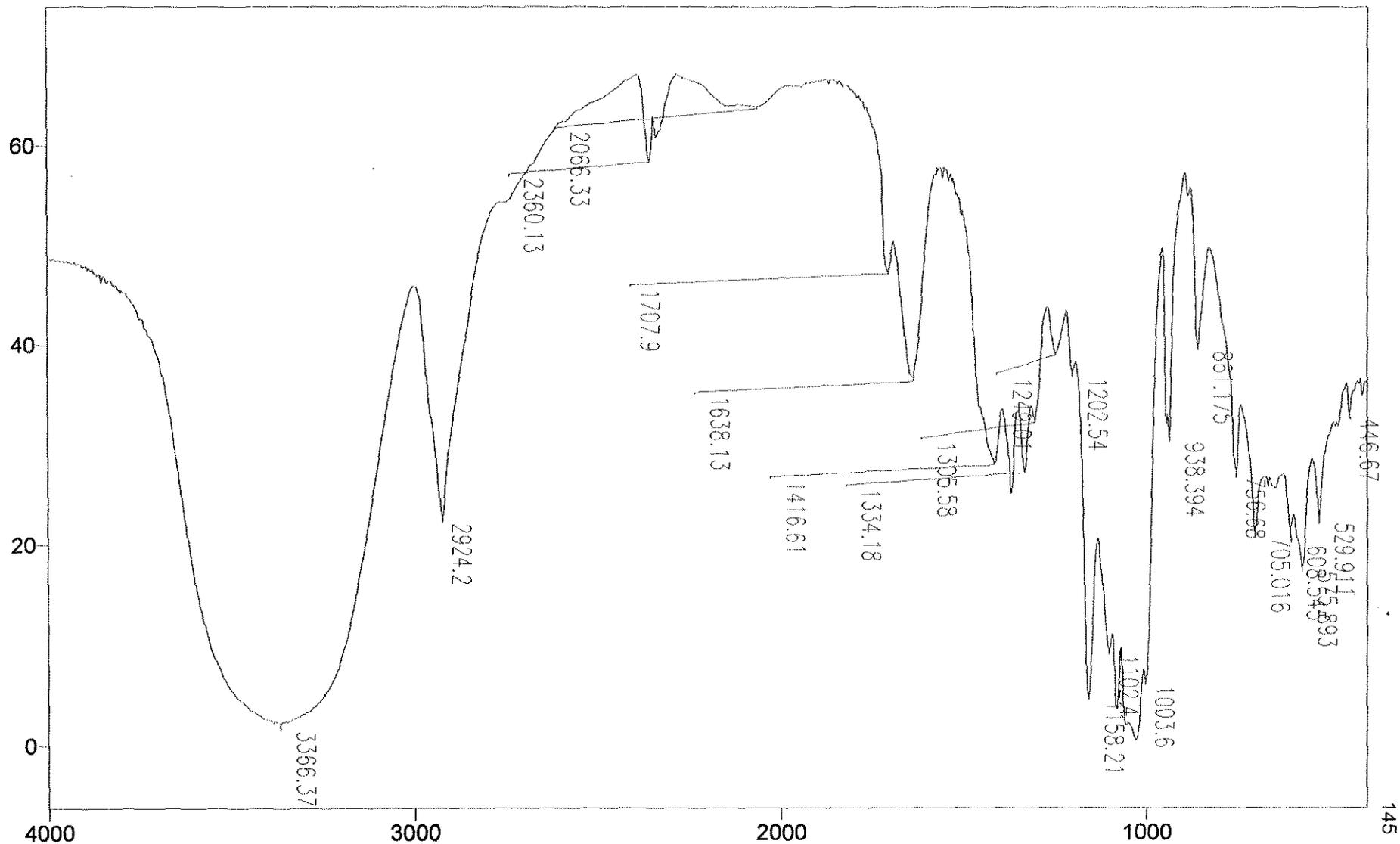
12/6/00 1:53 AM

Sample Description: complexo heptanona

Scans = 16

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine



Peak Report
12/6/00 2:16 AM

A:\0026.SPC
complexo nonanona

X Units.: Wavenumber (cm-1)
Y Units.: Transmittance
Resolutn: 4 cm-1
Begin X.: 4000.07
Ending X: 399.2356
Points: 1868

Center X	Peak Y	Name
529.99359	44.656110	530
576.32582	38.115393	576
704.48869	40.733262	704
757.49559	48.586529	757
861.42882	58.630300	861
945.76610	50.199856	946
1003.8804	25.282015	1004
1057.8667	10.975220	1058
1081.1818	16.368263	1081
1102.4429	28.590434	1102
1158.6893	18.733014	1159
1333.5384	46.295767	1333
1419.4109	47.935118	1419
1637.1636	51.729543	1637
1711.6166	59.131576	1712
2360.8356	56.352784	2361
2923.9620	36.735371	2924
3378.9150	9.6994544	3379

File # 1.0020

Mode = 2 (Mid-IR)

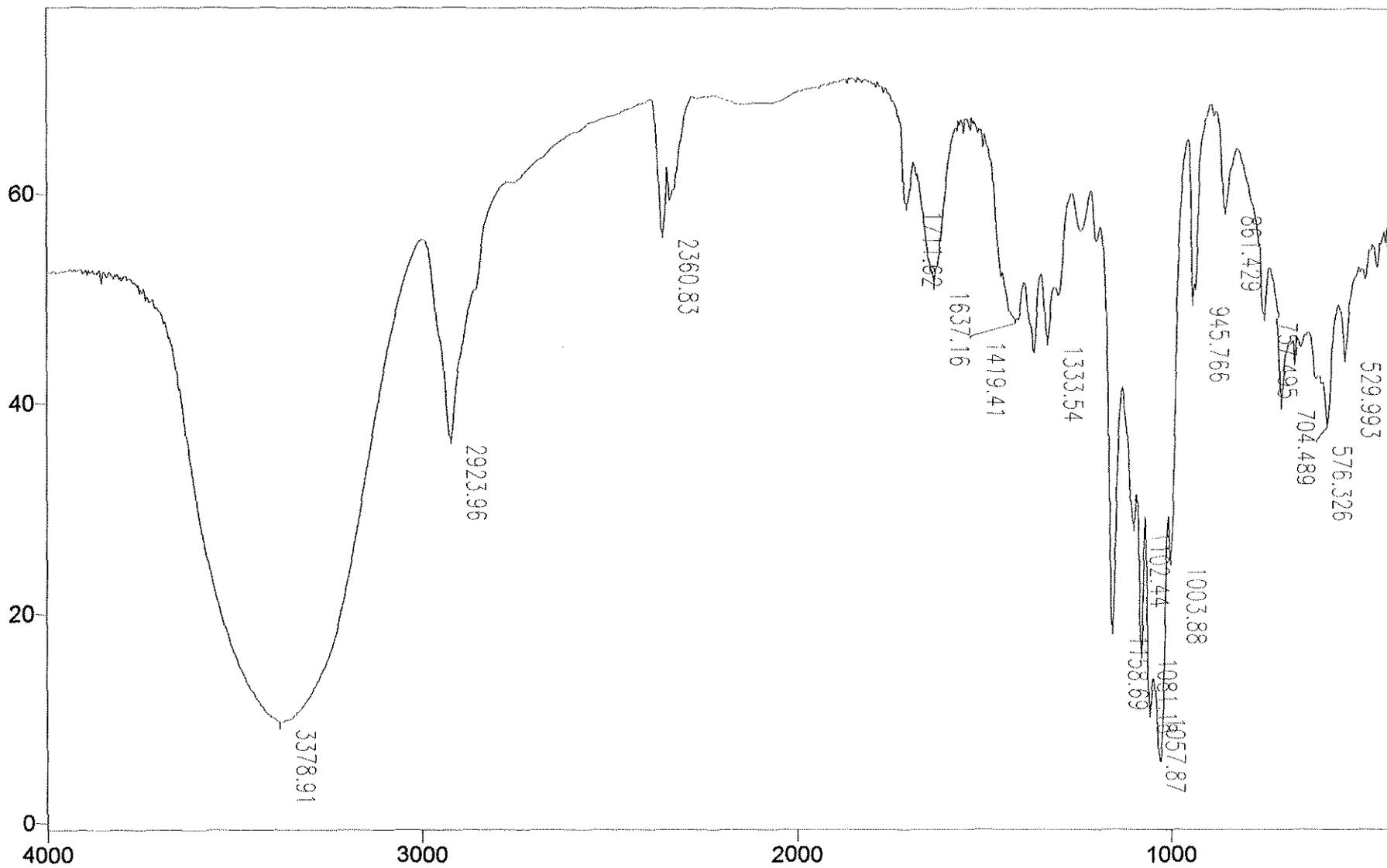
12/6/00 2:16 AM

Sample Description: complexo nonanona

Scans = 16

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine



Peak Report
12/6/00 2:05 AM

A:\0025.SPC
complexo undecanona

{ Units.: Wavenumber (cm-1)
/ Units.: Transmittance
Resolution: 4 cm-1
Begin X.: 4000.07
Ending X.: 399.2356
Points: 1868

Center X	Peak Y	Name
529.63091	51.910330	530
576.34126	45.307594	576
704.46889	47.796583	704
757.36368	55.126920	757
860.99967	64.194597	861
945.78291	56.754124	946
1004.1236	33.038371	1004
1030.7438	8.6948510	1031
1081.4115	22.189266	1081
1158.4452	25.037748	1158
1203.9740	62.686564	1204
1245.5468	62.879595	1245
1333.2307	53.389546	1333
1369.9107	51.919594	1370
1637.3323	58.381752	1637
1717.0457	66.306581	1717
2361.5617	68.155685	2361
2922.7141	41.573542	2923
3366.4496	14.315503	3366

File # 1 : 0025

Mode = 2 (Mid-IR)

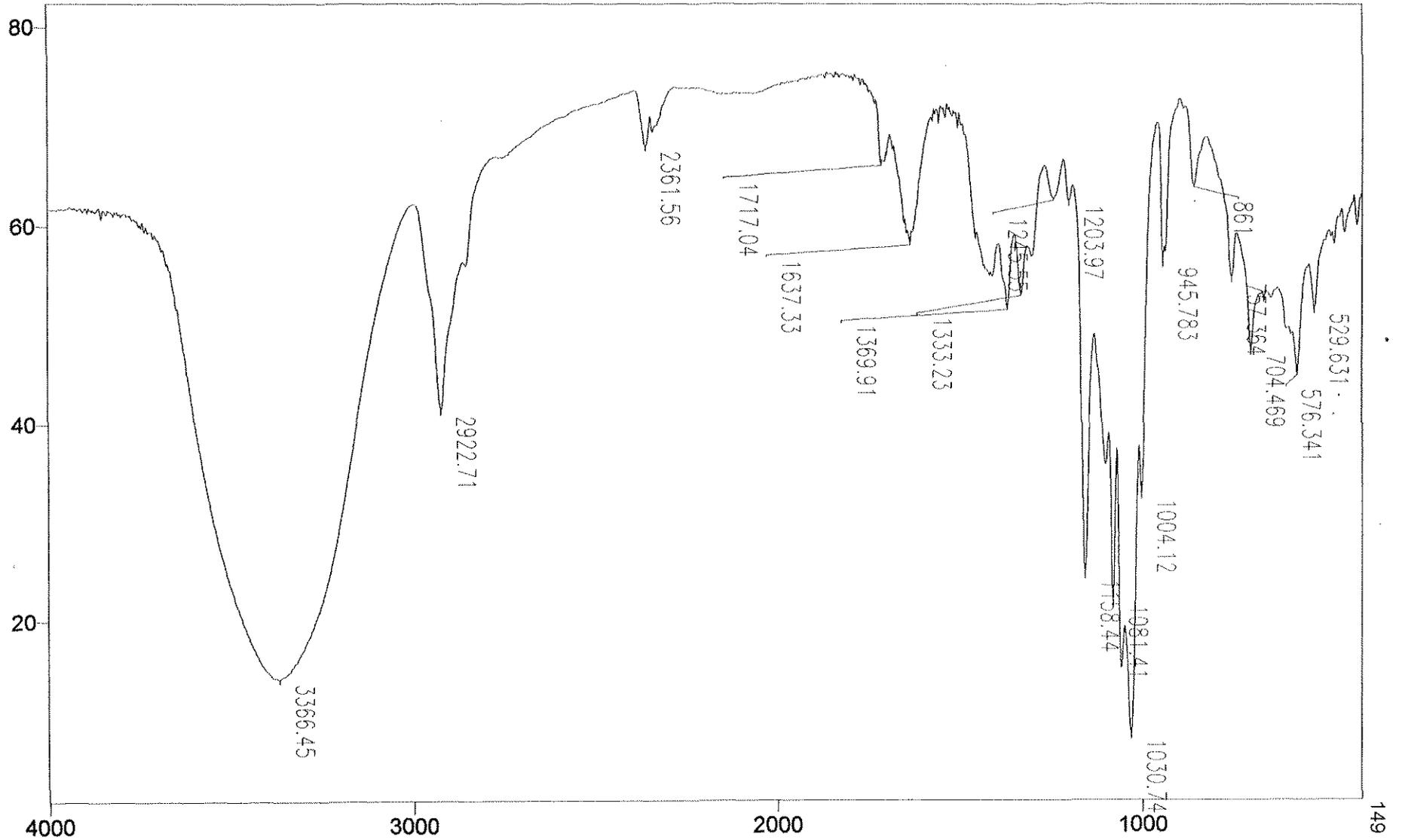
12/6/00 2:05 AM

Sample Description: complexo undecanona

Scans = 16

Res = 4 cm⁻¹ 20 scans/min

Apod = Cosine



Peak Report
5/30/01 1:27 PM

A:\AMO321.SPC
BCD misturada ccm metil cetnas

X Units.: Wavenumber (cm-1)
Y Units.: Transmittance
Resolutn: 4 cm-1
Begin X.: 4000.07
Ending X: 399.2358
Points: 1868

Center X	Peak Y	Name
576.82682	57.116879	577
704.80394	58.681990	705
945.63193	63.915190	946
1004.5420	50.330681	1004
1030.9009	23.862529	1031
1080.5762	41.274885	1080
1101.4455	51.577366	1101
1157.6984	43.668920	1158
1369.7358	60.994755	1370
1638.6194	61.180671	1639
2922.7699	56.177819	2923
3376.4327	34.387790	3376

File # 1 : AM0321

Mode = 2 (Mid-IR)

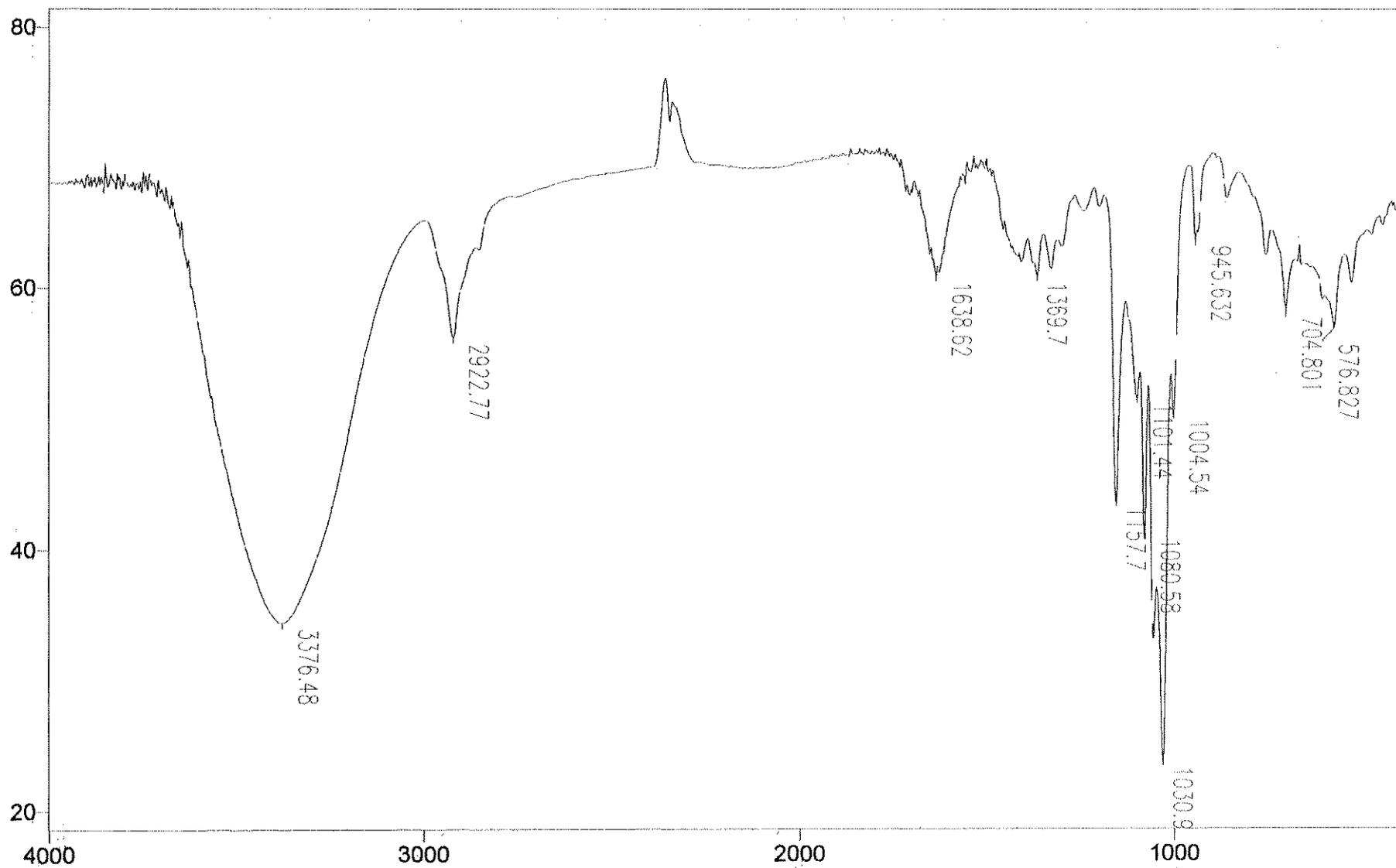
5/30/01 1:27 PM

Sample Description: BCD misturada com metil cetona

Scans = 16

Res = 4 cm⁻¹ 20 scans/min

Apod = Cosine



ANEXO II

Espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 da amostra sólida.

Tabela de identificação dos espectros.

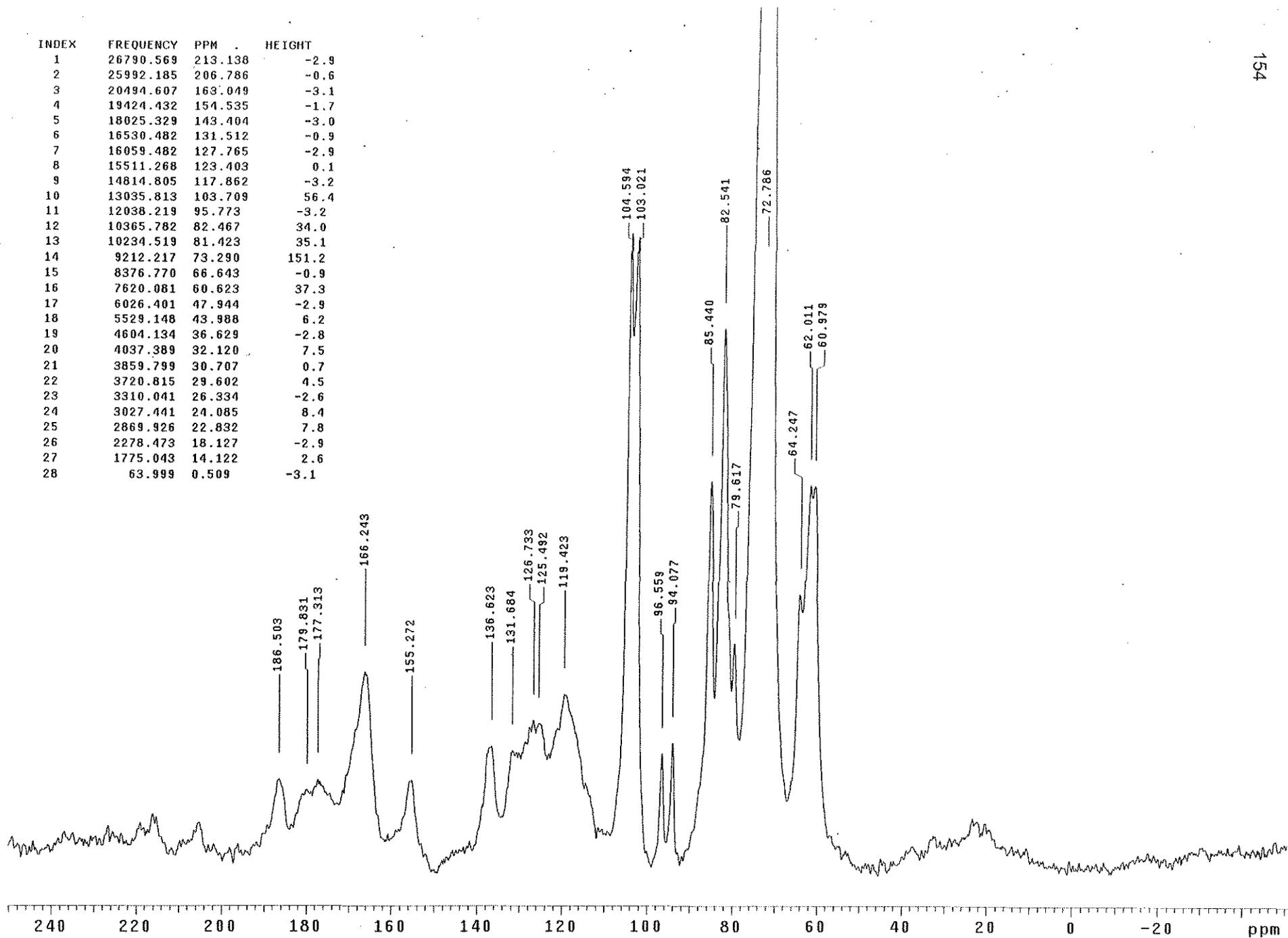
Amostra	Número da Amostra
β -ciclodextrina	23
Complexo com 2-pentanona	27
Complexo com 2-heptanona	24
Complexo com 2-nonanona	26
Complexo com 2-undecanona	25
Complexo com mistura das metilcetonas	321

C.ANAL. #0023 13c/cpmashp Rotax 6300hz fev0
7canC1

exp4 xpolar1

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Feb 7 2001	dn	H1
solvent	none	dof	-1464.0
file	exp	dm	nny
ACQUISITION		dmm	c
sfrq	125.710	dpwr	58
tn	C13	crossp	3300
at	0.080	dipolr	4095
np	8096	PROCESSING	
sw	50600.9	lb	40.00
fb	28000	wtfile	
bs	64	proc	ft
ss	4	fn	65536
tpwr	60	math	f
tpwrm	4095		
pw	4.5	werr	
cntct	3000.0	wexp	
d1	3.000	wbs	testsn
tof	2169.9	wnt	
nt	10000	DISPLAY	
ct	2682	sp	-11247.7
srate		wp	50600.9
gain	50	vs	66807
rof1	10.0	sc	0
rof2	10.0	wc	250
FLAGS		hzmm	11.20
il	n	is	500.00
in	n	rfl	11247.7
dp	y	rfp	0
xpol	y	th	4
toss	n	ins	1.000
pdp	n	ai	ph

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	26790.569	213.138	-2.9
2	25992.185	206.786	-0.6
3	20494.607	163.049	-3.1
4	19424.432	154.535	-1.7
5	18025.329	143.404	-3.0
6	16530.482	131.512	-0.9
7	16059.482	127.765	-2.9
8	15511.268	123.403	0.1
9	14814.805	117.862	-3.2
10	13035.813	103.709	56.4
11	12038.219	95.773	-3.2
12	10365.782	82.467	34.0
13	10234.519	81.423	35.1
14	9212.217	73.290	151.2
15	8376.770	66.643	-0.9
16	7620.081	60.623	37.3
17	6026.401	47.944	-2.9
18	5529.148	43.988	6.2
19	4604.134	36.629	-2.8
20	4037.389	32.120	7.5
21	3859.799	30.707	0.7
22	3720.815	29.602	4.5
23	3310.041	26.334	-2.6
24	3027.441	24.085	8.4
25	2869.926	22.832	7.8
26	2278.473	18.127	-2.9
27	1775.043	14.122	2.6
28	63.999	0.509	-3.1



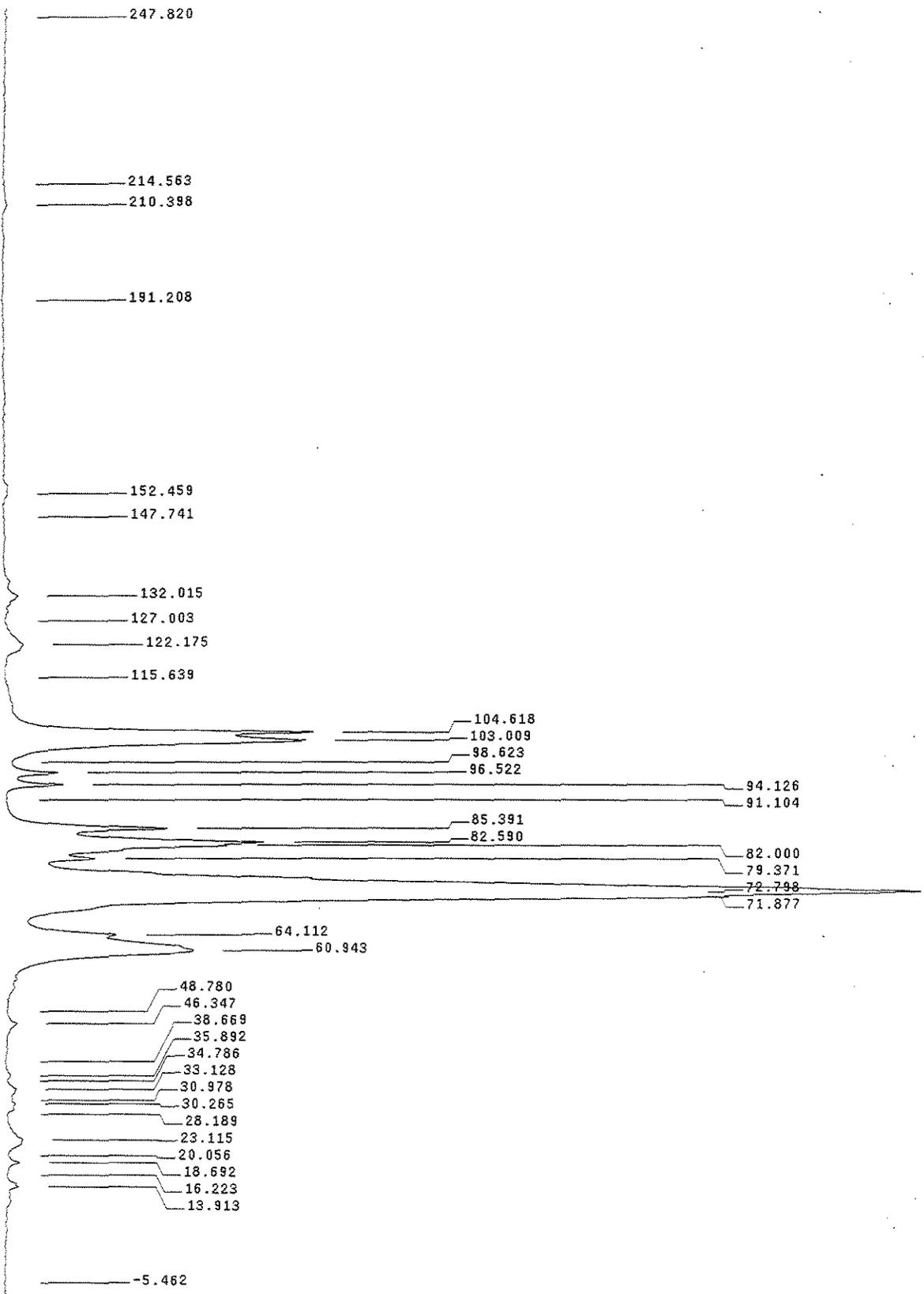
C.ANAL. #0027 13Ccpmashp 6200 hz .fev1
5canC1

exp10 xpolar1

↓

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Feb 15 2001	dn	H1
solvent	none	dof	-1464.0
file	exp	dm	nny
ACQUISITION		dmm	c
sfrq	125.710	dpwr	58
tn	C13	crossp	3300
at	0.080	dipolr	4095
np	8096	PROCESSING	
sw	50600.9	lb	40.00
fb	28000	wfile	
bs	16	proc	ft
ss	4	fn	65536
tpwr	60	math	f
tpwrm	4095		
pw	4.5	werr	
cntct	3000.0	wexp	
d1	3.000	wbs	testsn
tof	2169.9	wnt	
nt	20000	DISPLAY	
ct	19514	sp	-6298.4
srata		wp	37658.4
gain	50	vs	99334
rof1	10.0	sc	0
rof2	10.0	wc	250
FLAGS		hzmm	150.63
il	n	is	500.00
in	n	rfl	11247.7
dp	y	rfp	0
xpol	y	th	-1
toss	n	ins	1.000
pdp	n	ai	ph

240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
ppm



INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
				38	2349.509	18.692	-0.3
1	31150.025	247.820	-4.2	39	2039.112	16.223	-6.0
2	26969.704	214.563	-6.2	40	1748.791	13.913	-0.7
3	26446.199	210.398	-4.5	41	-686.513	-5.462	-6.9
4	24034.059	191.208	-7.0				
5	19163.451	152.459	-4.6				
6	18570.454	147.741	-6.9				
7	16593.797	132.015	-0.4				
8	15963.737	127.003	-6.1				
9	15356.842	122.175	1.8				
10	14535.293	115.639	-6.2				
11	13150.089	104.618	130.4				
12	12947.790	103.009	126.9				
13	12396.488	98.623	-2.9				
14	12132.419	96.522	17.2				
15	11984.170	95.343	-0.9				
16	11831.288	94.126	19.7				
17	11451.399	91.104	-5.8				
18	10733.316	85.391	65.5				
19	10381.224	82.590	108.3				
20	10307.100	82.000	92.1				
21	9976.627	79.371	33.8				
22	9150.446	72.798	400.2				
23	9034.626	71.877	315.1				
24	8399.934	66.827	3.6				
25	8058.652	64.112	43.2				
26	7660.232	60.943	77.0				
27	6131.411	48.780	-5.6				
28	5825.647	46.347	-1.3				
29	4860.482	38.669	-6.7				
30	4511.478	35.892	-4.2				
31	4372.495	34.786	-5.7				
32	4164.019	33.128	-1.6				
33	3893.773	30.978	-4.0				
34	3804.206	30.265	-2.1				
35	3543.225	28.189	-5.7				
36	2905.444	23.115	1.1				
37	2520.923	20.056	-5.2				

C.ANAL. #0027 13Ccpmashp 6200 hz fev15canC1

Pulse Sequence: xpolari

Ambient temperature
INOVA-500 "inova500"

PULSE SEQUENCE: xpolari

Relax. delay 3.000 sec

Pulse 95.4 degrees

Acq. time 0.080 sec

Width 50600.9 Hz

19514 repetitions

OBSERVE C13, 125.6959304 MHz

Cross polarization

Contact time 3000.000 usec

Decoupler power levels @ dpwr=58

Crosspolarization 3300

Dipolar 4095

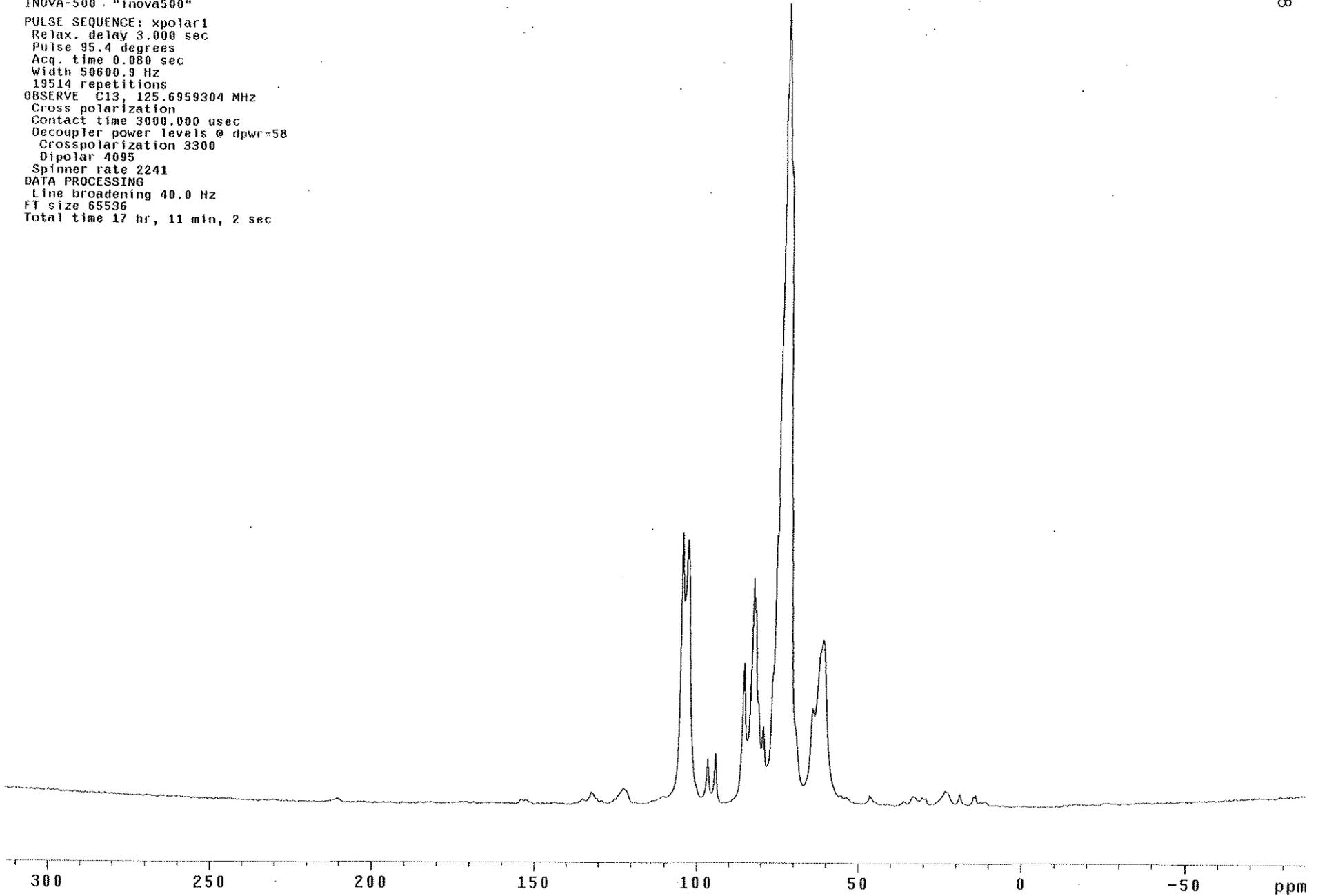
Spinner rate 2241

DATA PROCESSING

Line broadening 40.0 Hz

FT size 65536

Total time 17 hr, 11 min, 2 sec



C.ANAL. #0024 13c/cpmashp 6300hz fev0
7canC2

exp5 xpolar1

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Feb 7 2001	dn	H1
solvent	none	dof	-1464.0
file	exp	dm	hny
ACQUISITION			
sfrq	125.710	dppr	58
tn	C13	crossp	3300
at	0.080	dipolr	4095
np	8096	PROCESSING	
sw	50600.9	lb	40.00
fb	28000	wtfile	
bs	4	proc	ft
ss	4	fn	65536
tpwr	60	math	f
tpwrn	4095		
pw	4.5	werr	
cntct	3000.0	wexp	
d1	3.000	wbs	testsn
tof	2169.9	wnt	
nt	20000	DISPLAY	
ct	20000	sp	-11247.7
srate		wp	50600.9
gain	50	vs	30358
rof1	10.0	sc	0
rof2	10.0	wc	250
FLAGS		hzmm	114.56
il	n	is	500.00
ln	n	rfl	11247.7
dp	y	rfp	0
xpol	y	th	-2
toss	n	ins	1.000
pdp	n	ai	ph

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

C.ANAL. #0024 13c/cpmashp 6300hz fev07canC2

Pulse Sequence: xpolar1

Ambient temperature
INOVA-500 "inova500"

PULSE SEQUENCE: xpolar1
Relax. delay 3.000 sec
Pulse 95.4 degrees
Acq. time 0.080 sec
Width 50600.9 Hz
20000 repetitions

OBSERVE C13, 125.6959304 MHz

Cross polarization
Contact time 3000.000 usec
Decoupler power levels @ dpwr=58
Crosspolarization 3300
Dipolar 4095

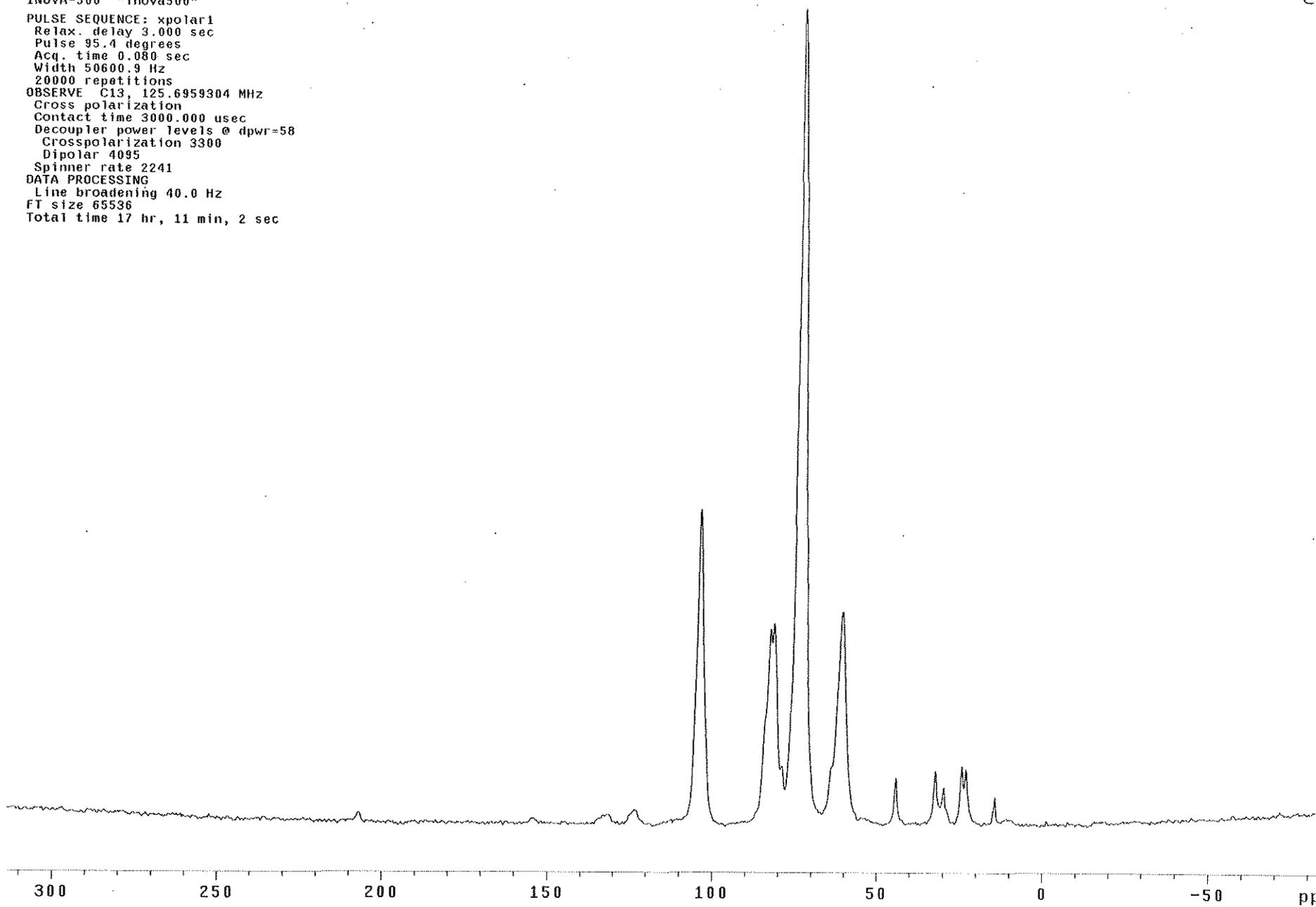
Spinner rate 2241

DATA PROCESSING

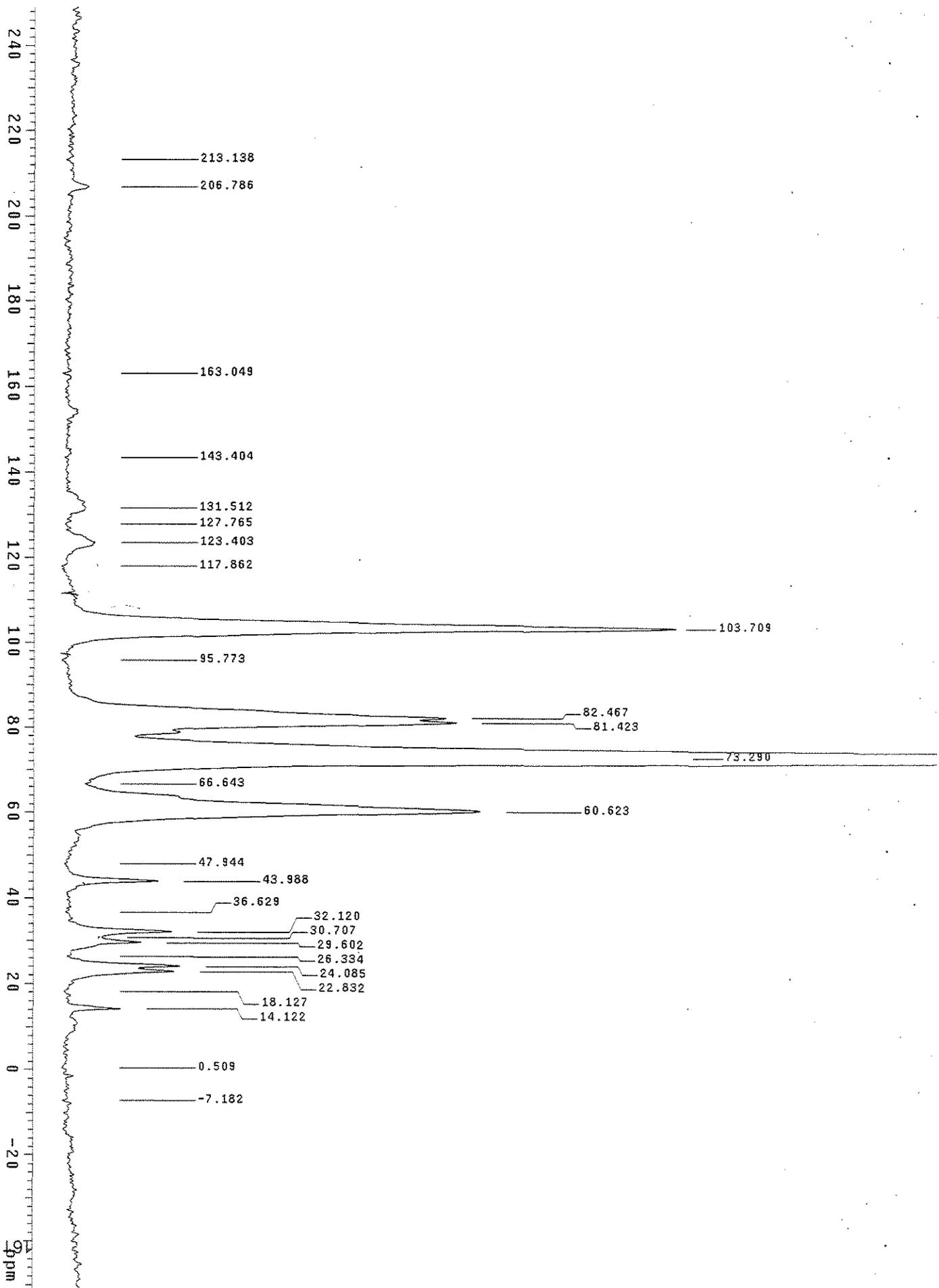
Line broadening 40.0 Hz

FT size 65536

Total time 17 hr, 11 min, 2 sec



101



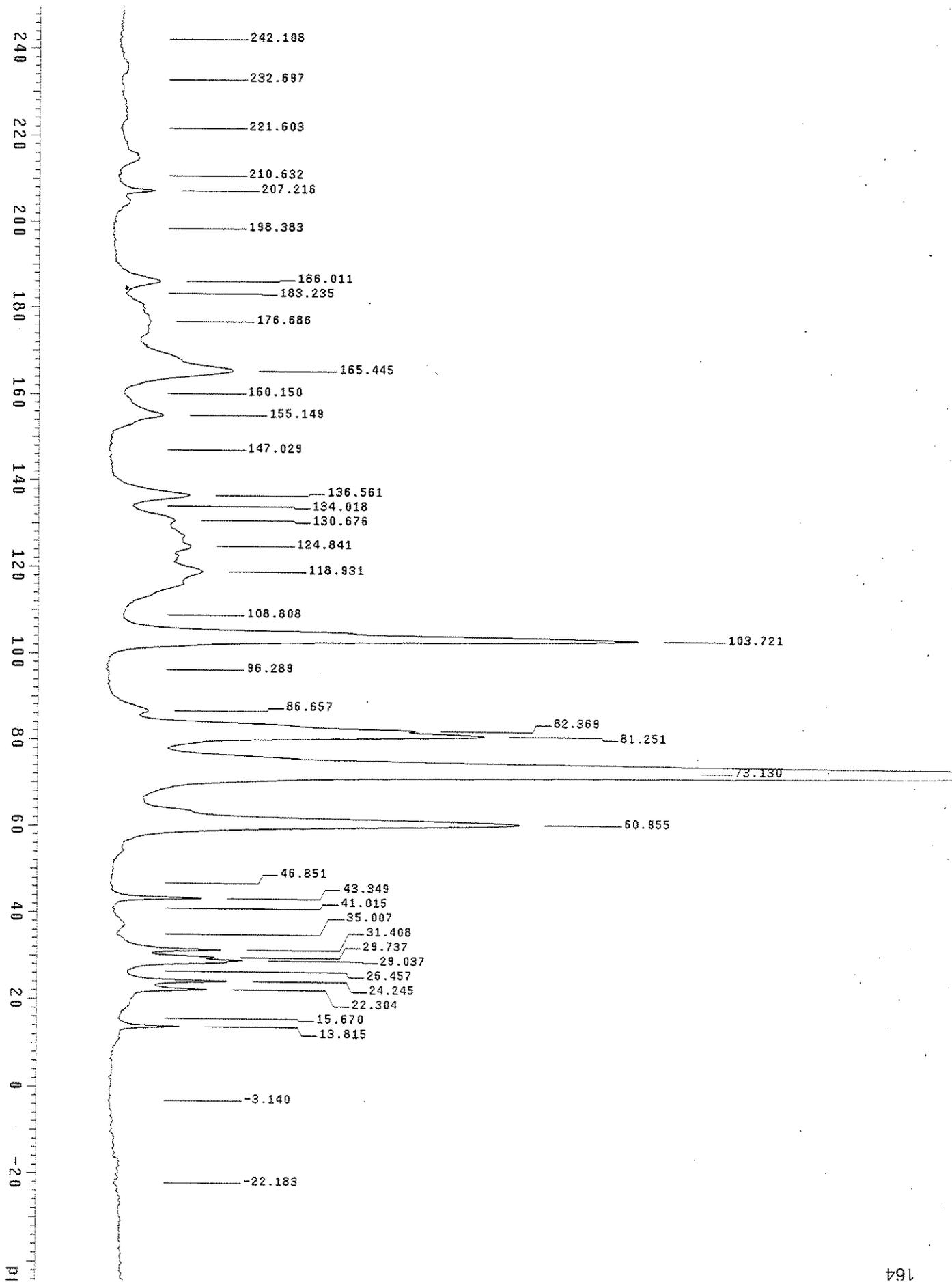
C.ANAL. #0026 13Ccpmashp, 6200 hz, fev1
4canC1

expl0 xpolar1

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Feb 14 2001	dn	H1
solvent	none	dof	-1464.0
file	exp	dm	nny
ACQUISITION		dmm	c
sfrq	125.710	dpwr	58
tn	C13	crossp	3300
at	0.080	dipolr	4095
np	8096	PROCESSING	
sw	50600.9	lb	40.00
fb	28000	wtfile	
bs	64	proc	ft
ss	4	fn	65536
tpwr	60	math	f
tpwrn	4095		
pw	4.5	werr	
cntct	3000.0	wexp	
d1	3.000	wbs	testsn
tof	2169.9	wnt	
nt	20000	DISPLAY	
ct	18800	sp	-11247.7
srate		wp	50600.9
gain	50	vs	35378
rof1	10.0	sc	0
rof2	10.0	wc	250
FLAGS		hzmm	202.40
il	n	is	500.00
in	n	rfl	11247.7
dp	y	rfp	0
xpol	y	th	85
loss	n	ins	1.000
pdp	n	ai	ph

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
			INDEX
			38
			39
			40
			FREQUENCY
			1969.620
			1736.437
			-394.647
			PPM
			15.670
			13.815
			-3.140
			HEIGHT
			-4.1
			7.8
			-5.8
1	33650.188	267.711	-2.7
2	30431.943	242.108	-4.6
3	29249.037	232.697	-4.2
4	27854.567	221.603	-4.3
5	26475.540	210.632	-4.7
6	26046.234	207.216	2.4
7	24935.909	198.383	-5.7
8	23380.835	186.011	3.5
9	23031.832	183.235	-3.1
10	22208.739	176.686	1.6
11	20795.738	165.445	17.5
12	20130.160	160.150	-3.4
13	19501.645	155.149	4.1
14	18480.887	147.029	-6.4
15	17165.174	136.561	9.3
16	16845.512	134.018	-1.6
17	16425.472	130.676	6.5
18	15691.947	124.841	9.5
19	14949.156	118.931	11.9
20	13676.683	108.808	-3.5
21	13037.358	103.721	96.6
22	12103.078	96.289	-6.7
23	10892.376	86.657	1.5
24	10353.428	82.369	53.2
25	10212.900	81.251	66.6
26	9192.141	73.130	236.0
27	7661.776	60.955	73.6
28	5888.961	46.851	-5.7
29	5448.846	43.349	12.0
30	5155.436	41.015	-5.1
31	4400.291	35.007	-4.4
32	3947.822	31.408	15.8
33	3737.802	29.737	14.5
34	3649.779	29.037	20.0
35	3325.484	26.457	-2.3
36	3047.516	24.245	17.0
37	2803.523	22.304	13.2

UNICAMP
 BIBLIOTECA CENTRAL
 SEÇÃO CIRCULANTE

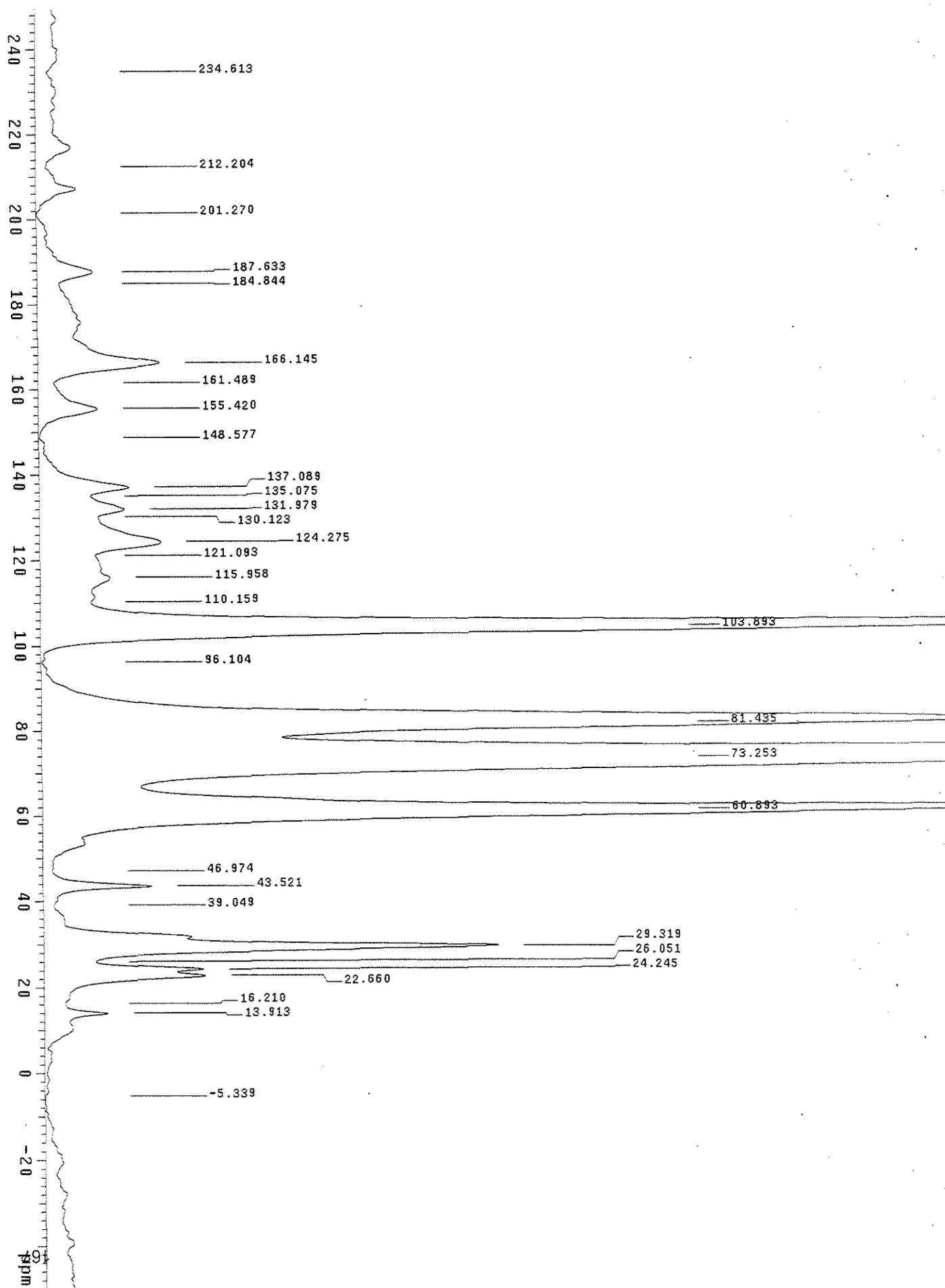


C.ANAL.#0025 13c/cpmashp. 6300hz fev0
8canC1

exp5 xpolar1

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Feb 8 2001	dn	H1
solvent	none	dof	-1464.0
file	exp	dm	nyy
ACQUISITION		dmm	c
sfrq	125.710	dpwr	58
tn	C13	crossp	3300
at	0.080	dipolr	4095
np	8096	PROCESSING	
sw	50600.9	lb	100.00
fb	28000	wfile	
bs	4	proc	ft
ss	4	fn	65536
tpwr	60	math	f
tpwrm	4095		
pw	4.5	werr	
cntct	3000.0	wexp	
d1	3.000	wbs	testsn
tof	2169.9	wnt	
nt	20000	DISPLAY	
ct	17801	sp	-6346.2
srate		wp	37704.7
gain	50	vs	172740
rof1	10.0	sc	0
rof2	10.0	wc	250
FLAGS		hzmm	150.82
il	n	is	500.00
in	n	rfl	11247.7
dp	y	rfp	0
xpol	y	th	-2
toss	n	ins	1.000
pdp	n	ai	ph

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	30152.431	239.884	-1.8
2	29489.942	234.613	-2.3
3	27260.025	216.873	-1.2
4	26673.205	212.204	-2.4
5	26036.969	207.142	-0.9
6	25298.811	201.270	-2.8
7	23584.678	187.633	-0.2
8	23234.130	184.844	-1.8
9	20883.761	166.145	2.9
10	20298.485	161.489	-2.1
11	19535.619	155.420	-0.0
12	18675.464	148.577	-2.8
13	17231.578	137.089	1.4
14	16978.318	135.075	-0.4
15	16589.164	131.979	1.2
16	16355.980	130.123	-0.1
17	15620.911	124.275	2.9
18	15220.946	121.093	-0.2
19	14575.444	115.958	0.5
20	13846.552	110.159	-0.4
21	13058.977	103.893	60.9
22	12079.914	96.104	-2.8
23	10236.064	81.435	42.8
24	9207.584	73.253	151.2
25	8395.301	66.791	1.8
26	7654.055	60.893	45.8
27	5904.404	46.974	-2.4
28	5470.466	43.521	2.3
29	4908.354	39.049	-2.3
30	3685.297	29.319	18.3
31	3274.523	26.051	-0.4
32	3047.516	24.245	4.6
33	2848.306	22.660	4.7
34	2037.568	16.210	-1.8
35	1748.791	13.913	0.2

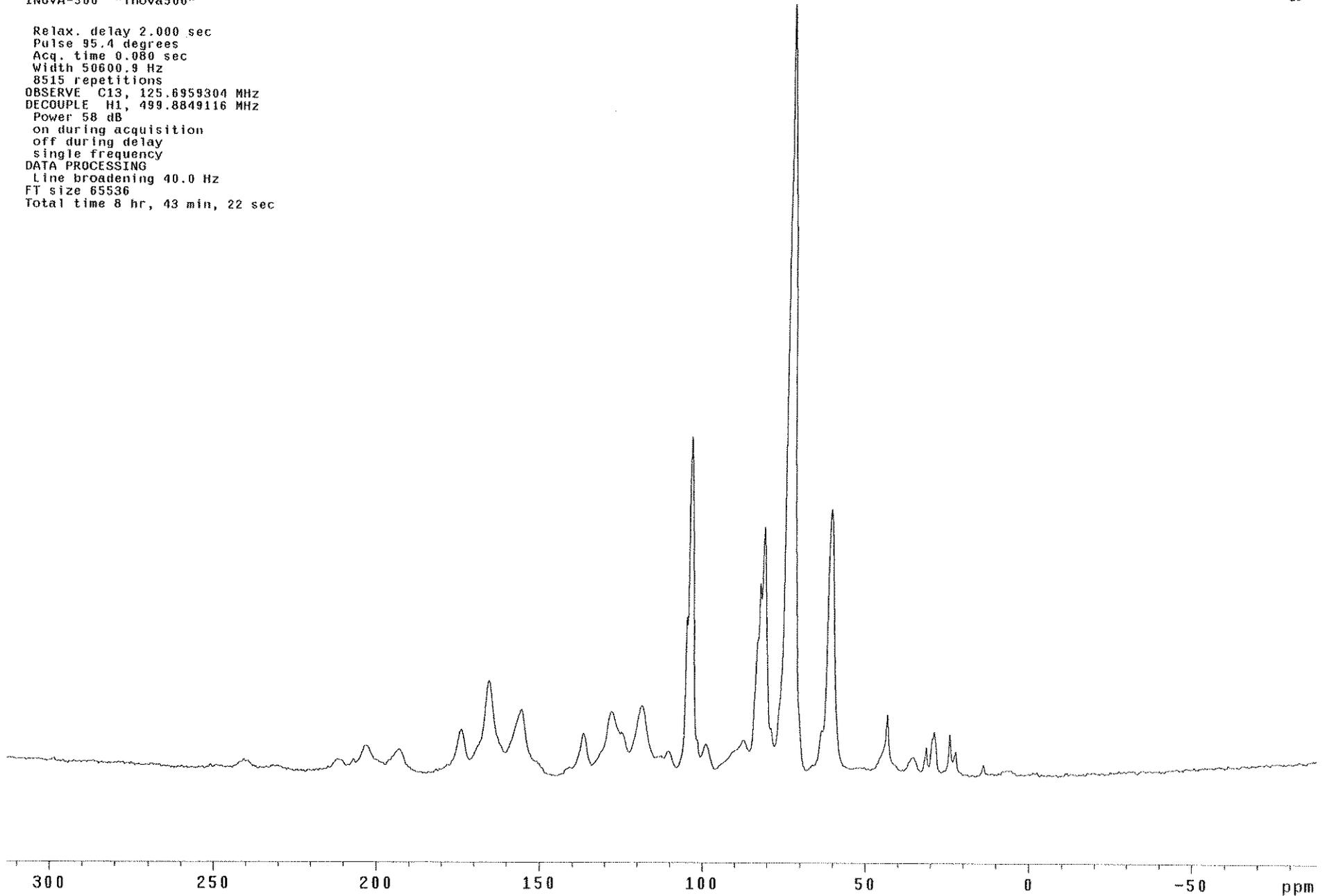


C.ANAL. #AM0321 13C/cpmashp 4300hz jul05canC

Pulse Sequence: xpolar1

Ambient temperature
INOVA-500 "inova500"

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 95.4 degrees
Acq. time 0.080 sec
Width 50600.9 Hz
8515 repetitions
OBSERVE C13, 125.6959304 MHz
DECOUPLE H1, 499.8849116 MHz
Power 58 dB
on during acquisition
off during delay
single frequency
DATA PROCESSING
Line broadening 40.0 Hz
FT size 65536
Total time 8 hr, 43 min, 22 sec



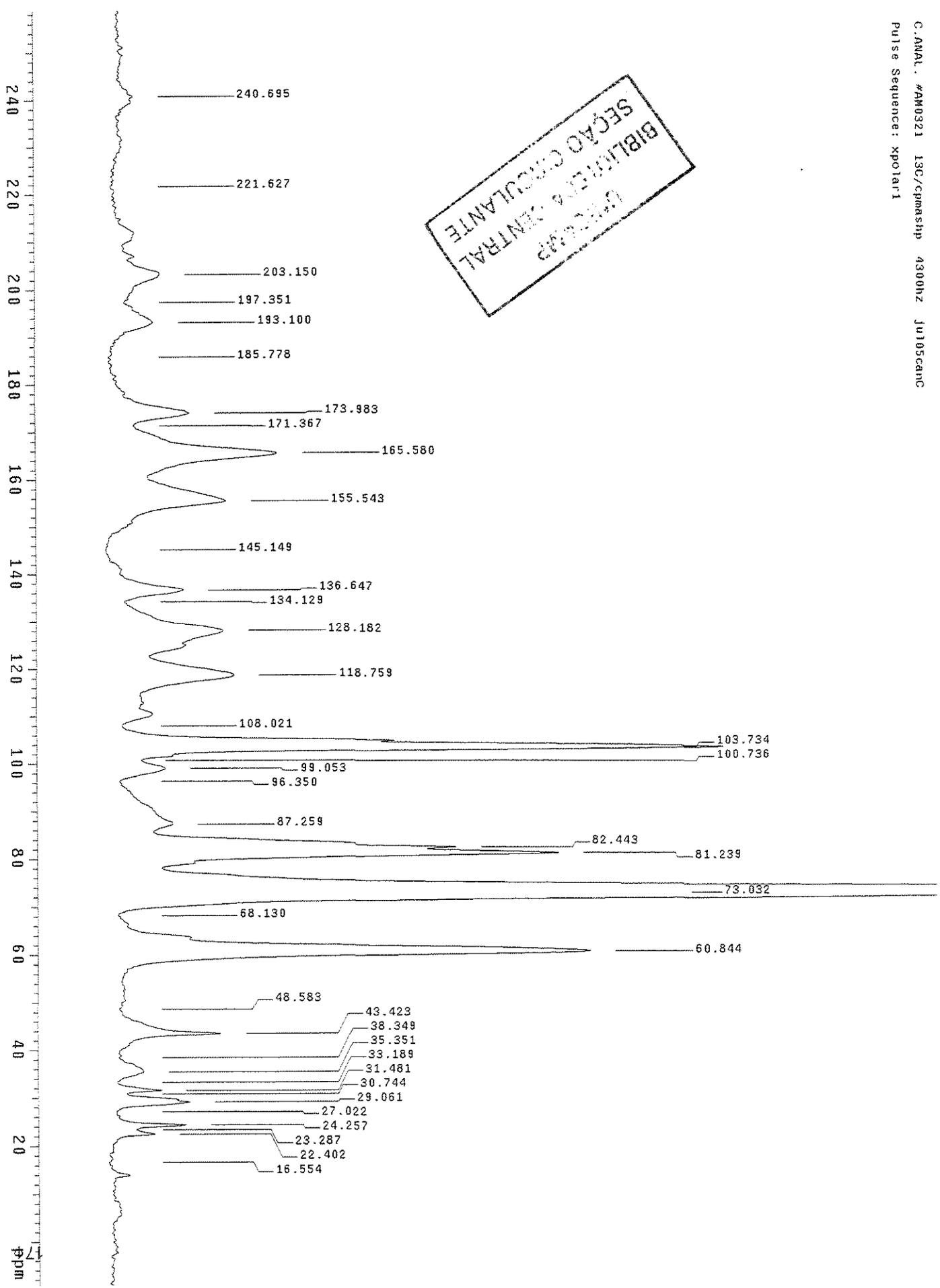
C.ANAL. #AM0321 13C/cpmashp 4300hz ju
105canC

exp4 xpolar1

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Jul 5 2001	dn	H1
solvent	none	dof	-1464.0
file	exp	dm	nny
ACQUISITION			
sfrq	125.710	dpmr	58
tn	C13	crossp	3000
at	0.080	dipolr	4095
np	8096	PROCESSING	
sw	50600.9	lb	40.00
fb	28000	wtfile	
bs	16	proc	ft
ss	4	fn	65536
tpwr	60	math	f
tpwrn	4095		
pw	4.5	werr	
cntct	3000.0	wexp	
d1	2.000	wbs	testsu
tof	2169.9	wnt	
nt	15000	DISPLAY	
ct	8515	sp	-11247.7
srata	2241	wp	50600.9
gain	50	vs	33761
rof1	10.0	sc	0
rof2	10.0	wc	250
FLAGS		hzmm	202.40
ij	n	is	500.00
in	n	rfl	11247.7
dp	y	rflp	0
xpol	y	th	0
toss	n	ins	1.000
pdp	n	ai	ph

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	31460.422	250.290	-3.1	40	4443.531	35.351	1.3
2	30720.720	244.405	-3.3	41	4171.740	33.189	-4.0
3	30254.353	240.695	-0.2	42	3957.088	31.481	4.9
4	29729.303	236.518	-3.6	43	3864.432	30.744	-2.1
5	27857.655	221.627	-4.7	44	3652.868	29.061	10.6
6	26623.789	211.811	0.0	45	3396.520	27.022	-4.3
7	26291.772	209.170	-2.4	46	3049.061	24.257	9.7
8	26015.349	206.970	-0.0	47	2927.064	23.287	-0.3
9	25925.782	206.258	-1.4	48	2815.877	22.402	3.5
10	25535.083	203.150	5.1	49	2080.807	16.554	-5.7
11	24806.191	197.351	-2.1	50	1338.017	10.645	-5.2
12	24271.875	193.100	3.8	51	216.881	1.725	-5.3
13	23351.494	185.778	-5.3				
14	21869.001	173.983	10.9				
15	21540.073	171.367	-0.3				
16	20812.725	165.580	28.1				
17	19551.062	155.543	18.0				
18	18244.615	145.149	-6.0				
19	17175.984	136.647	9.6				
20	16859.410	134.129	-2.3				
21	16111.987	128.182	17.4				
22	14927.536	118.759	19.5				
23	14045.762	111.744	0.5				
24	13891.335	110.515	3.3				
25	13577.850	108.021	-2.9				
26	13194.873	104.975	50.9				
27	13038.902	103.734	115.2				
28	12662.102	100.736	1.0				
29	12450.538	99.053	5.8				
30	12110.800	96.350	-3.4				
31	10968.044	87.259	7.4				
32	10362.693	82.443	63.0				
33	10211.355	81.239	83.1				
34	9179.787	73.032	270.0				
35	8563.626	68.130	-3.8				
36	7647.878	60.844	89.3				
37	6106.703	48.583	-3.6				
38	5458.112	43.423	16.7				
39	4820.331	38.349	-3.7				

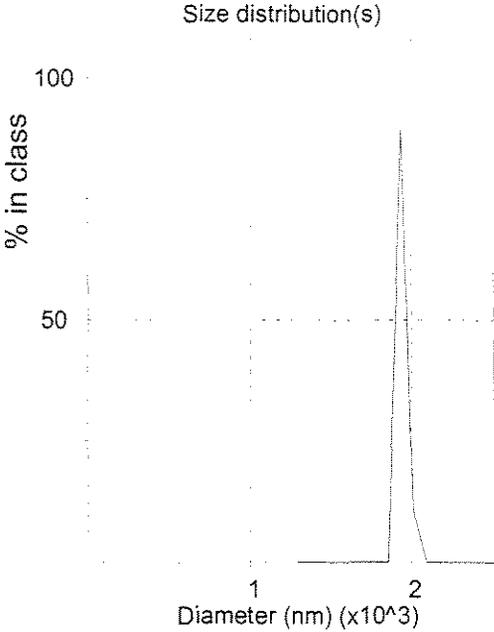
BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



ANEXO III

Distribuição do tamanho das partículas obtida por espalhamento quasi – elástico de luz.

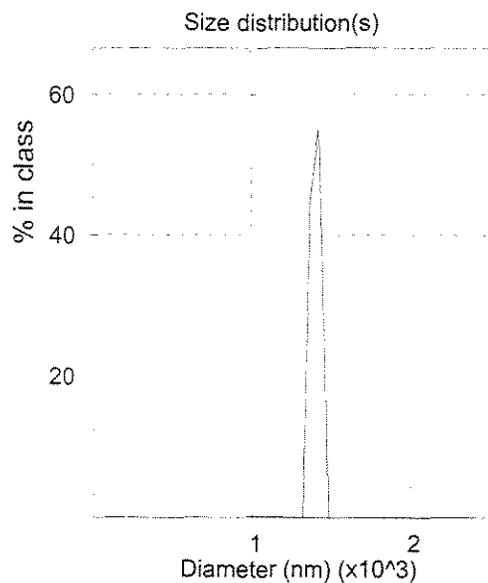
DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE AMOSTRA DE LIPOSSOMAS



Size(nm)	Intensity	Volume	Number
1297.2	0.0	0.0	0.0
1349.9	0.0	0.0	0.0
1404.8	0.0	0.0	0.0
1461.8	0.0	0.0	0.0
1521.2	0.0	0.0	0.0
1583.0	0.0	0.0	0.0
1647.3	0.0	0.0	0.0
1714.3	0.0	0.0	0.0
1783.9	0.0	0.0	0.0
1856.4	0.0	22.4	22.4
1931.8	89.4	47.4	47.4
2010.3	10.6	27.6	27.6
2092.0	0.0	2.6	2.6
2177.0	0.0	0.0	0.0
2265.4	0.0	0.0	0.0
2357.5	0.0	0.0	0.0
2453.3	0.0	0.0	0.0
2552.9	0.0	0.0	0.0
2656.7	0.0	0.0	0.0
2764.6	0.0	0.0	0.0
2876.9	0.0	0.0	0.0
2993.8	0.0	0.0	0.0
3115.4	0.0	0.0	0.0
3242.0	0.0	0.0	0.0

Peak Analysis by intensity			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	1940.1	82.2
Peak Analysis by volume			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	1940.9	162.9
Peak Analysis by number			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	1940.9	162.9

DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE AMOSTRA DE LIPOSSOMAS COM MANITOL



Size(nm)	Intensity	Volume	Number
963.4	0.0	0.0	0.0
1002.5	0.0	0.0	0.0
1043.3	0.0	0.0	0.0
1085.7	0.0	0.0	0.0
1129.8	0.0	0.0	0.0
1175.7	0.0	0.0	0.0
1223.5	0.0	0.0	0.0
1273.2	0.0	0.0	0.0
1324.9	0.0	11.2	11.2
1378.7	44.9	36.2	36.2
1434.8	55.1	38.8	38.8
1493.1	0.0	13.8	13.8
1553.7	0.0	0.0	0.0
1616.9	0.0	0.0	0.0
1682.6	0.0	0.0	0.0
1750.9	0.0	0.0	0.0
1822.1	0.0	0.0	0.0
1896.1	0.0	0.0	0.0
1973.2	0.0	0.0	0.0
2053.3	0.0	0.0	0.0
2136.8	0.0	0.0	0.0
2223.6	0.0	0.0	0.0
2314.0	0.0	0.0	0.0
2408.0	0.0	0.0	0.0

Peak Analysis by intensity			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	1409.6	106.0

Peak Analysis by volume			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	1410.2	137.5

Peak Analysis by number			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	1410.2	137.5