



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Paulo Henrique Mariano Marfil

**Microencapsulação de óleo de palma por coacervação
complexa em matrizes de gelatina/goma arábica e
gelatina/alginato**

São José do Rio Preto
2014

Paulo Henrique Mariano Marfil

**Microencapsulação de óleo de palma por coacervação
complexa em matrizes de gelatina/goma arábica e
gelatina/alginato**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti
Telis

São José do Rio Preto
2014

Marfil, Paulo Henrique Mariano.

Microencapsulação de óleo de palma por coacervação complexa em matrizes de gelatina/goma arábica e gelatina/alginato / Paulo Henrique Mariano Marfil. – São José do Rio Preto, 2014
135 f. : il., tabs.

Orientador: Vânia Regina Nicoletti Telis
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Microencapsulação. 3. Dendê.
4. Coacervação complexa. 5. Biopolímeros. 6. Gelatina. 7. Alginato de sódio. I. Telis, Vânia Regina Nicoletti. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664.09

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Paulo Henrique Mariano Marfil

**Microencapsulação de óleo de palma por coacervação
complexa em matrizes de gelatina/goma arábica e
gelatina/alginato**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti Telis
UNESP – São José do Rio Preto / SP
Orientadora

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
UNICAMP – Campinas / SP

Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira
USP – Ribeirão Preto / SP

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina de Souza
UFTM – Uberaba / MG

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
UNESP – São José do Rio Preto / SP

São José do Rio Preto
06 de outubro de 2014

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia.

Pois o triunfo pertence a quem se atreve”

Charles Chaplin

Aos meus pais, Mauricio e Leide e minha
esposa Ana Carolina, dedico.

RESUMO

A microencapsulação do óleo de palma pode ser capaz de protegê-lo e promover a sua liberação controlada. Para otimização do processo de microencapsulação é preciso quantificar de forma adequada o óleo de palma presente externamente e internamente às microcápsulas. Assim, realizou-se o desenvolvimento e validação de um método espectrofotométrico para ser utilizado na determinação da eficiência do processo de microencapsulação. Primeiramente padronizou-se o processo de extração do óleo de palma presente externamente através de cinco lavagens sucessivas com solvente orgânico. Posteriormente investigou-se a melhor forma de realizar o rompimento das microcápsulas. Através de extrações sucessivas com hexano foi possível determinar o óleo de palma contido internamente. As medidas foram feitas em espectrofotômetro e o método proposto mostrou-se de baixo custo, rápido e de fácil execução. Além disso, a etapa de validação permitiu observar que o método é seguro e confiável, uma vez que mostrou-se seletivo, exato, preciso e robusto. Foi investigada a formação de complexos eletrostáticos entre gelatina e alginato de sódio como um possível sistema para microencapsular óleo de palma por coacervação complexa. Preparou-se soluções de gelatina e alginato de sódio (0,25% m/v) em diferentes valores de pH (2,0; 3,0; 3,5; 4,0 e 5,0) para medidas de potencial zeta. Misturas desses dois biopolímeros em diferentes proporções de gelatina:alginato de sódio (0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, e 1:0) foram preparadas para ensaios de turbidimetria (medidas de absorvância em 590 nm) e análise morfológica (microscopia ótica). Na concentração de biopolímeros totais de 2,5% (m/v) foram preparadas misturas de gelatina:alginato de sódio (1:1, 2:1, 3:1 e 4:1) para análise reológica dos complexos formados. Óleo de palma (2,5% p/v) foi homogeneizado em solução de gelatina a 15000 rpm por 5 minutos, misturado à solução de alginato de sódio e o pH de coacervação ajustado em $3,5 \pm 0,1$. Os coacervados obtidos foram decantados por 24 horas, congelados a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e

liofilizados. A morfologia das partículas foi analisada em microscópio ótico e eletrônico de varredura (MEV) e a concentração de óleo de palma presente externamente foi determinada através da extração com hexano e quantificada em espectrofotômetro. Na faixa de pH estudada, gelatina e alginato de sódio mostraram-se carregados com cargas opostas o que permite a interação eletrostática entre esses biopolímeros. O maior valor de absorbância foi observado em pH 3,5 e os maiores valores de viscosidade nas proporções 3:1 e 4:1 de gelatina:alginato de sódio e pH 3,5. Análises de MEV mostraram o formato irregular e a estrutura esponjosa dos coacervados, os quais apresentaram baixa retenção de óleo de palma (<40%). Para a matriz gelatina:goma arábica, investigou-se a concentração desses materiais (2,5; 5,0 e 7,5% (p/v)), a proporção entre proteína:polissacarídeo (1:2; 1:1; 2:1) e a proporção do recheio em relação à concentração de materiais (75; 100 e 125%) seguindo um planejamento fatorial central composto com uma repetição do ponto central. A homogeneização do óleo de palma na solução de gelatina foi realizada sempre a 15000 rpm por 5 minutos. O pH de coacervação foi $4,0 \pm 0,1$ e os coacervados obtidos foram decantados por 24 horas, congelados (-40°C) e liofilizados por 72 horas. A eficiência de encapsulação [E(%)] foi determinada pelo método analítico desenvolvido. A morfologia foi analisada por microscopia ótica e MEV e a distribuição de tamanho de partículas por difração a laser. Os maiores valores de E(%) foram obtidos na proporção entre gelatina:goma arábica de 1:1 e 2:1, utilizando óleo de palma em até 100% em relação à concentração do material de parede, numa concentração de biopolímeros de 2,5 até 7,5%. Em relação à morfologia, altas concentrações de materiais de parede (>7,5%) e proporções de gelatina maiores que de goma arábica (2:1 ou mais) dificultaram ou impediram a formação de microcápsulas esféricas ou ovais. As microcápsulas apresentaram valores de diâmetro médio $[D_{(4,3)}]$ entre $97,1 \pm 5,5$ e $689,1 \pm 69,8$ μm .

Palavras-chave: óleo de palma, microencapsulação, coacervação complexa, gelatina, alginato de sódio, goma arábica.

ABSTRACT

Microencapsulation of palm oil may be able to protect it and promote its controlled release. For optimization of the microencapsulation process, it is necessary to quantify accurately the palm oil present externally and internally to the microcapsules. A spectrophotometric method was developed and validated to be used in the determination of the efficiency of microencapsulation process of palm oil. First, the extraction of extern palm oil through five successive washes with organic solvent was standardized. Next, the best method to accomplish the rupture of the microcapsules was investigated. Through successive extractions with hexane, it was possible to determine the amount of palm oil contained internally. Measurements were made in a spectrophotometer and the proposed method was shown to be low cost, fast and of easy implementation. In addition, the validation step allowed us to observe that the method is safe and reliable, since it proved to be specific, accurate, precise and robust. Formation of electrostatic complexes between gelatin and sodium alginate was investigated as a possible system to microencapsulate palm oil by complex coacervation. Gelatin and sodium alginate solutions were prepared (0.25% w/v) in different pH values (2.0, 3.0, 3.5, 4.0, and 5.0) to zeta potential measurements. Turbidity (absorbance measurement at 590 nm) and morphology (light microscopy imaging) analyzes were carried out in blends of different gelatin:sodium alginate mixing ratios (0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, and 1:0) keeping a fixed amount of total polymers (0.25% w/v). Gelatin:sodium alginate blends at biopolymer ratios 1:1, 2:1, 3:1, and 4:1 were also prepared with 2.5% (w/v) total polymers to rheological analysis. Homogenization of palm oil (2.5% w/v) in gelatin solution was performed at 15,000 rpm for 5 minutes and the coacervation pH was 3.5 ± 0.1 . The obtained coacervates were decanted for 24 hours, frozen (-40°C) and freeze-dried. The particle morphology was analyzed by scanning electron microscopy, whereas the amount of palm oil retained by the complexes was determined by extraction with hexane and quantified by spectrophotometry. In

the pH range studied, sodium alginate was negatively charged and gelatin was positively charged, resulting in electrostatic interaction and complex coacervation. The highest turbidity values were observed at pH 3.5 and optical micrographs showed complexes with irregular format. The pH 3.5 and the gelatin:sodium alginate ratio of 3:1 and 4:1 showed the highest viscosity. Freeze-dried particles presented irregular format and sponge-like structure, with low retention of palm oil (<40%). For the gelatin:gum arabic matrix, was investigated the concentration of these materials [2.5, 5.0 and 7.5% (w/v)], the ratio between gelatin and gum arabic (1:2; 1:1; 2:1) and ratio between encapsulated and wall materials (75, 100, and 125%) were investigated following a factorial central design with a central point repetition. The homogenization of palm oil in gelatin solution was performed at 15,000 rpm for 5 minutes. Coacervation pH was 4.0 ± 0.1 and the obtained coacervates were decanted for 24 hours, frozen (-40°C) and lyophilized for 72 hours. The encapsulation efficiency [E(%)] and the amount of palm oil retained by the microcapsules were determined by quantifying palm oil by spectrophotometric method using hexane as solvent. The morphology was analyzed by light and scanning electron microscopy and the particle size distribution by laser diffraction. The highest values of E(%) were obtained in the proportion of gelatin and gum arabic 1:1 or 2:1, using 100% palm oil in relation to the concentration of the wall material, which could vary in concentration from 2.5 to 7.5% of biopolymers. Regarding morphology, high concentrations of wall materials (> 7.5%) and gelatin ratio greater than gum arabic (2:1 or more) hampered or prevented the formation of spherical or oval microcapsules. Microcapsules showed values of average diameter [$D_{(4,3)}$] between 97.1 ± 5.5 and 689.1 ± 69.8 μm .

Keywords: palm oil, microencapsulation, complex coacervation, gelatin, sodium alginate, gum arabic.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xix
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
OBJETIVO GERAL.....	6
Objetivos específicos	6
ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO EM CAPÍTULOS	7
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.1 MICROENCAPSULAÇÃO	13
1.2 COACERVAÇÃO COMPLEXA.....	14
1.3 ÓLEO DE PALMA	17
1.4 AGENTES ENCAPSULANTES	19
1.4.1 Gelatina.....	21
1.4.2 Goma Arábica	23
1.4.3 Alginato de sódio.....	24
1.5 QUANTIFICAÇÃO DO ATIVO EM MICROCÁPSULAS.....	26
1.6 POTENCIAL ZETA E ESTEQUIOMETRIA	32
1.7 MICROSCOPIA.....	34
1.8 REOLOGIA.....	34
1.9 TAMANHO DAS PARTÍCULAS	36
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÓLEO DE PALMA EM MICROCÁPSULAS PRODUZIDAS PORCOACERVAÇÃO COMPLEXA.....	46
ABSTRACT	48
2.1 INTRODUCTION	49
2.2 MATERIAL AND METHODS.....	50
2.2.1 Material.....	50

2.2.2 Methods	50
2.2.2.1 <i>Production of palm oil microcapsules</i>	50
2.2.2.2 <i>Morphology of palm oil microcapsules</i>	52
2.2.2.3 <i>Choice of solvent and selection of optimum wavelength</i>	53
2.2.2.4 <i>Solubility of microcapsules</i>	53
2.2.2.5 <i>Choice of the best pH for palm oil releasing</i>	53
2.2.2.6 <i>Standardizing time and number of external washes of the microcapsules</i>	54
2.2.2.7 <i>Disruption standardization procedure and number of extractions of microcapsules</i>	54
2.2.2.8 <i>Validation of proposed analytical methodology</i>	54
2.2.2.8.1 Specificity	55
2.2.2.8.2 Linearity and range	55
2.2.2.8.3 Precision	56
2.2.2.8.4 Accuracy	56
2.2.2.8.5 Robustness and Stability.....	56
2.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	57
2.3.1 Development of the analytical method for determination of palm oil in microcapsules produced by complex coacervation.....	57
2.3.1.1 <i>Choice of solvent and selection of the optimum wavelength</i>	57
2.3.1.2 <i>Solubility of microcapsules</i>	58
2.3.1.3 <i>Choice of the best pH for palm oil releasing</i>	58
2.3.1.4 <i>Standardizing time and number of external washes of the microcapsules</i>	59
2.3.1.5 <i>Disruption standardization and number of extractions of microcapsules</i>	60
2.3.1.6 <i>Validation of the analytical method</i>	63
2.3.1.6.1 Specificity	63
2.3.1.6.2 Linearity and interval	63
2.3.1.6.3 Precision	64
2.3.1.6.4 Accuracy	64
2.3.1.6.5 Robustness and Stability.....	65
2.4 CONCLUSIONS	66
Acknowledgment.....	66
REFERENCES	67
CAPÍTULO 3 - FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ELETROSTÁTICOS DE GELATINA E ALGINATO PARA ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE PALMA.....	68

ABSTRACT	70
3.1 INTRODUCTION	71
3.2 MATERIAL AND METHODS.....	73
3.2.1 Material	73
3.2.2 Zeta Potential	73
3.2.3 Sample preparation	73
3.2.4 Rheological tests	74
3.2.6 Microscopy	75
3.2.6.1 <i>Light Microscopy</i>	75
3.2.6.2 <i>Scanning Electron Microscopy</i>	75
3.2.7 Particle size	75
3.2.8 Quantification of palm oil microencapsulated.....	76
3.2.9 Water content analysis	76
3.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	77
3.3.1 Zeta Potential	77
3.3.2 Rheological study	78
3.3.3 Stoichiometric assay	82
3.3.4 Morphology of gelatin:sodium alginate blends	83
3.3.4.1 <i>Light microscopy</i>	83
3.3.4.2 <i>Scanning Electron Microscopy (SEM)</i>	84
3.3.5 Particle size and quantification of palm oil microencapsulated.....	86
3.4 CONCLUSIONS	89
Acknowledgements	89
REFERENCES	90
CAPÍTULO 4 - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE	
ÓLEO DE PALMA OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA EM MATRIZ	
DE GELATINA E GOMA ARÁBICA	93
RESUMO	94
ABSTRACT	96
4.1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	97
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	99
4.2.1 Materiais	99
4.2.2 Preparo das microcápsulas de óleo de palma.....	99
4.2.3 Quantificação do óleo de palma microencapsulado	101

4.2.4	Determinação de umidade.....	102
4.2.5	Morfologia dos coacervados	102
4.2.5.1	<i>Microscopia ótica</i>	102
4.2.5.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	102
4.2.6	Distribuição de tamanho das partículas	103
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.3.1	Otimização das condições de produção das microcápsulas de óleo de palma.....	104
4.3.1.1	<i>Eficiência de encapsulamento</i>	104
4.3.2	Morfologia e distribuição de tamanho das microcápsulas de óleo de palma.....	108
4.3.2.1	<i>Morfologia das microcápsulas de óleo de palma</i>	108
4.3.2.2	<i>Distribuição de tamanho das microcápsulas de óleo de palma</i>	117
4.4	CONCLUSÕES	121
	Agradecimentos	121
	REFERÊNCIAS	122
	CONCLUSÕES GERAIS	124
	APÊNDICES	127
	APÊNDICE A - Preparo de tampões para estudo do rompimento das microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa	128
	APÊNDICE B - Protocolo do método analítico para a determinação de óleo de palma em microcápsulas obtidas por coacervação complexa	132
	APÊNDICE C - Soluções utilizadas nos ensaios de estequiometria para estudo dos coacervados de gelatina e alginato de sódio.....	135

AGRADECIMENTOS

Em especial, à Prof. Dra. Vânia Regina Nicoletti Telis, por todo o aprendizado, seriedade e dinamismo no decorrer deste trabalho e de todos os anos que trabalhamos juntos. Pelo exemplo de competência e dedicação, pela orientação segura e fiel, pelas sugestões e pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso e Prof. Dr. Roger Darros-Barbosa por todas as sugestões e contribuições durante o exame de qualificação.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade e atenção em discutirmos junto esse trabalho.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP / IBILCE) por ter proporcionado a realização de grandes sonhos.

Aos professores de graduação e pós-graduação, por todos os ensinamentos e por contribuírem com a minha formação e crescimento profissional.

À Profa. Dra. Márcia Helena Pontieri da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pelas orientações e ajuda no desenvolvimento e validação do método analítico e pelo apoio e amizade constante.

À Dra. Izabela Dutra Alvim do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pela grande ajuda com as determinações de tamanho de partículas.

Ao Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa da Universidade Estadual Paulista (UNESP/IBILCE) pelo uso de seu laboratório para realização das determinações de potencial zeta.

Aos alunos de iniciação científica Bruna Barbon Paulo e Felipe Henrique Teixeira de Vasconcelos que tornaram esse trabalho ainda mais agradável e prazeroso. Obrigado pela ajuda constante, pela disponibilidade em trabalhar aos sábados, domingos e feriados, pela injeção de ânimo e energia positiva sempre.

Aos técnicos de laboratório, em especial ao Newton, pela paciência e ajuda constante e disponibilidade em ajudar.

Aos colegas de laboratório, pelo convívio, discussões acadêmicas, momentos de descontração e pela ajuda e apoio.

Aos amigos de graduação, que mesmo distantes, mantemos vivo nosso contato, nossa amizade e carinho.

Aos colegas de trabalho que acompanharam toda a trajetória do desenvolvimento desse trabalho, sempre dispostos a contribuir.

Às pessoas que mais amo e admiro, meus pais Maurício e Leide, que sempre me incentivaram nos estudos e nunca mediram esforços para proporcionar o melhor a mim e meu irmão. Muito obrigado pelo amparo e carinho, pela dedicação na educação dos filhos, pelo exemplo de bondade, responsabilidade e respeito.

À minha família, avós, tios, primos e meu irmão Pedro Augusto, obrigado pela confiança e incentivo prestados em todos os momentos, pela torcida permanente.

Em especial ao meu avô materno Benedito (*in memoriam*) que recentemente foi impedido de participar da conclusão desse trabalho, mas deixou seu exemplo de vida, generosidade e sabedoria.

A Ana Carolina, que sempre esteve disposta a me ajudar em tudo. Muito obrigado pelo amor infinito, pelo carinho, compreensão, companheirismo verdadeiro e incentivo. Por ser esta pessoa tão especial e amiga, que me faz muito feliz. Amo você!

À família Borella Anhê, por terem me acolhido como filho, por estarem presentes sempre e acompanharem cada momento desse trabalho.

À minha fisioterapeuta Marcela, pela amizade e trabalho exemplar.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

E, finalmente a Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades oferecidas e pela iluminação em mais uma etapa vencida.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Topologia das três possíveis redes de sistemas formados por dois biopolímeros gelificantes: a) rede interpenetrante, b) rede acoplada e c) separação de fases (RICHARDSON, KASAPIS, 1998). 20
- Figura 1.2** - Estrutura repetida da gelatina, responsável pela estrutura em tripla hélice (BUREY et al., 2008). 22
- Figura 1.3** - Estrutura química do alginato de sódio. a) ácido β -D-manurônico; b) α -L-gulurônico e c) alginato (GAVA, 2008). 25
- Figura 1.4** - Representação esquemática da evolução da turbidez ao longo da acidificação para um sistema hipotético, contendo uma proteína que interage com um polieletrólito forte (curva sólida) ou com um polieletrólito com pKa fixo em pH = 2,0 (curva pontilhada). pH1, indica a formação de complexos solúveis, pH2 indica a formação de complexos interpoliméricos ou coacervados e pH3 indica o pKa do polissacarídeo e a consequente dissociação dos complexos. (Adaptado de MATTISON et al., 1999; WEINBRECK et al., 2003). 33
- Figure 2.1** - Flowchart of the production of palm oil microcapsules by complex coacervation. 52
- Figure 2.2** - Micrographs of the microcapsules of palm oil produced by complex coacervation. A) Light microscopy. B) Scanning Electron Microscopy (2.0 kV). 57
- Figure 2.3** - A) Absorption spectrum (400 to 690 nm) to determine the best wavelength for palm oil detection in solution ($1200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). B) Absorption spectrum of the microcapsules without the addition of palm oil. (\blacktriangle = without disruption; \star = after disruption). 58
- Figure 2.4** - Influence of pH on solubility of the palm oil microcapsules. 59
- Figure 2.5** - Absorbance values as affected by the number of extractions of palm oil present inside the microcapsules produced by complex coacervation. 61

Figure 2.6 - Palm oil microcapsules after first extraction with the addition of buffer (pH = 9.5) and hexane followed by stirring for one minute.	62
Figure 2.7 - Microcapsules of palm oil after modification of the methodology proposed for disruption and quantification of the number of extractions. A) After the second addition of buffer, followed by stirring for one minute, addition of hexane, and further stirring for one minute. Featured detail of ruptured microcapsules. B) Samples of microcapsules after last extraction.	62
Figure 2.8 - Absorption spectra (400 to 690 nm) of solutions of palm oil of two different brands. (○ = Marabá [®] ; ▲ = Hemmer [®]).	63
Figure 2.9 - Calibration curve for palm oil solutions.	64
Figure 3.1 - Zeta potential measurements of gelatin and sodium alginate solutions (0.25% w/v) as a function of pH at the coacervation temperature (50 °C).	78
Figure 3.2 - Viscosity of gelatin:sodium alginate coacervates as function of shear rate with a total polymer concentration fixed at 2.5% (w/v). A) 1:1; B) 2:1.	79
Figure 3.3 - Viscosity of gelatin:sodium alginate coacervates as function of shear rate with a total polymer concentration fixed at 2.5% (w/v). C) 3:1; D) 4:1.	80
Figure 3.4 - Viscosity of coacervates obtained at different gelatin:sodium alginate mixing ratios at shear rate of 10 s ⁻¹ (□ = 1:1; ▲ = 2:1; ○ = 3:1; ☆ = 4:1).	81
Figure 3.5 - Absorbance of gelatin:sodium alginate systems (0.25% w/v) at 590 nm as function of pH.	82
Figure 3.6 - Light microscopy of systems composed of gelatin:sodium alginate at mixing ratios of 5:1; 4:1; 3:1; 2:1, and 1:1.	84
Figure 3.7 - Scanning electron micrographs of palm oil complexes in gelatin:sodium alginate matrices at biopolymer mixing ratios of 2:1, 3:1, and 4:1 using voltage of 2.0 kV.	85
Figure 3.8 - Particle size distribution of palm oil complexes in gelatin:sodium alginate matrix at mixing ratios of 2:1, 3:1, and 4:1 and pH 3.5.	88

Figura 4.1 - Fluxograma do processamento de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa.	101
Figura 4.2 - Projeção horizontal e vertical de partículas para determinação do maior (D_s) e menor (d_i) diâmetro projetado.	103
Figura 4.3 - Gráfico de contorno variando-se a concentração de biopolímeros (%) e a quantidade de recheio (%) em relação à E(%).	106
Figura 4.4 - Gráfico de contorno variando-se a concentração de biopolímeros (%) e a proporção entre gelatina e biopolímeros totais em relação à E(%).	107
Figura 4.5 - Gráfico de contorno variando-se a quantidade de recheio (%) e a proporção entre gelatina e biopolímeros totais em relação à E(%).	107
Figura 4.6 - Microscopia ótica das microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa (grupos 1, 2, 3 e 4), sob as seguintes condições: a) após coacervação, b) após liofilização e c) após rehidratação.....	110
Figura 4.7 - Morfologia de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa. Amostras pertencentes ao grupo 1.	112
Figura 4.8 - Morfologia de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa. Amostras pertencentes ao grupo 2, 3 e 4. No grupo 4, em destaque a grande quantidade de óleo de palma que não foi microencapsulado.	113
Figura 4.9 - MEV de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa em matrizes de gelatina e goma arábica representantes do grupo 1 analisadas em voltagem de 2,0 kV. Amostra 4 contém 2,5 % de material de parede, 125% de recheio em relação a parede e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,667. Amostra 12 contém 5,0 % de material de parede, 142,1 % de recheio em relação à parede e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,500. Amostra 16 refere-se ao ponto central e contém 5,0 % de material de parede, 100,0 % de recheio em relação à parede e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,5. .	115
Figura 4.10 - MEV de microcápsulas de óleo de palma representantes dos grupos 2, 3 e 4 analisadas em voltagem de 2,0 kV. Amostras 7 e 10 contém 7,5 % e 9,205 % de	

material de parede, 125% e 100 % de recheio e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,333 e 0,5, respectivamente. Amostras 8 e 3 contém 7,5 % e 2,5 % de material de parede, ambas 125 % de recheio em relação à parede e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,667 e 0,333, respectivamente. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Métodos utilizados para determinação da eficiência de encapsulação em microcápsulas obtidas por coacervação complexa	28
Table 2.1 - Absorbance values as affected by the time of external washing of the microcapsules	61
Table 2.2 - Results of validation of the spectrophotometric method for quantification of palm oil microencapsulated by complex coacervation	66
Table 3.1 - Particle sizes of gelatin and sodium alginate containing palm oil	86
Tabela 4.1 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental	99
Tabela 4.2 - Planejamento experimental para preparo das microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa	100
Tabela 4.3 - Efeito estimado, erro, coeficiente t e grau de significância estatística, para cada fator no modelo codificado para E(%)	104
Tabela 4.4 - Morfologia das microcápsulas de óleo de palma em matriz de gelatina e goma arábica	109
Tabela 4.5 - Valores de $D_{(4,3)}$ das amostras do Grupo 1 e 2	117
Tabela 4.6 - Distribuição do tamanho de partículas de amostras (Am.) do Grupo 1	119
Tabela 4.7 - Distribuição do tamanho de partículas de amostras (Am.) do Grupo 2	120

Introdução e Objetivos

INTRODUÇÃO GERAL

Há um grande interesse em desenvolver sistemas capazes de proteger compostos bioativos de condições externas que possam provocar danos aos alimentos, tais como reações de oxidação, polimerização, hidrólise. Ao mesmo tempo, buscam-se sistemas que permitam a liberação controlada para aplicações em alimentos, fármacos e na agricultura (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2013; EZHILARASI et al., 2013; KANG; DAI; KIM, 2012).

A microencapsulação pode ser definida como um processo no qual uma matriz envolve pequenas partículas de sólido, líquido ou gás com o objetivo de proteger o material das condições adversas do meio, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada do encapsulado em condições pré-estabelecidas (JACKSON; LEE, 1991).

O processo de microencapsulação tem sido usado com muitos objetivos, contudo suas aplicações de maior potencial estão relacionadas à liberação modulada, ou seja, a liberação do recheio de uma forma controlada em um período de tempo pré-determinado, o que tem se tornado cada vez mais importante e interessante para a indústria de alimentos e farmacêutica (GOUIN, 2004). A liberação modulada pode garantir efetividade do recheio, ampliação da gama de aplicabilidade e garantia da dose desejada, além da liberação em locais determinados, importante no caso da indústria farmacêutica (VOLOSOV; BIALER; YAGEN, 2000). Os parâmetros experimentais que possuem efeito no perfil de liberação são temperatura, pH, umidade, presença ou não de solvente, ações mecânicas e força iônica (SHAHIDI; HAN, 1993).

A liberação do recheio pode acontecer de várias formas. A parede da partícula pode ser quebrada por ruptura mecânica, por difusão controlada, por aumento da temperatura, por dissolução em solventes (de longe a forma mais comumente usada na indústria de alimentos), por mudanças no pH do meio, por ação de força osmótica, por ação de enzimas, entre outros (JACKSON; LEE, 1991; REINECCIUS, 1995; GOUIN, 2004).

A liberação controlada apresenta vantagens como modular a taxa de liberação do material ativo ao longo do tempo, minimizar ou evitar a perda de ingredientes durante o processamento e separar componentes reativos ou incompatíveis (POTHAKAMURY; BARBOSA-CÁNOVAS, 1995).

Na indústria de alimentos observa-se crescimento nas aplicações da microencapsulação devido às novas necessidades que se apresentam nas formulações de produtos. Deste modo, essa técnica deixa de ser somente um método de agregação de substâncias a uma formulação alimentícia para tornar-se uma fonte de ingredientes totalmente novos e com propriedades únicas (ANEKELLA; ORSAT, 2013).

Na maioria dos casos, os componentes alimentícios concentrados no interior das microcápsulas são liberados de acordo com o consumo do alimento ou durante seu preparo. A liberação é alcançada pela destruição da integridade da parede da microcápsula. Há casos em que a não liberação do material central é desejada até depois da ingestão do alimento, devendo ocorrer no sistema digestivo. É possível também que, em determinadas aplicações, pretenda-se que a liberação do material encapsulado nunca ocorra. Nestas situações, a parede da cápsula deve permanecer intacta tanto no preparo do alimento, quanto após a sua ingestão (THIES, 2003).

O desenvolvimento de microestruturas propícias à microencapsulação, tais como as obtidas no processo de coacervação complexa, requer conhecimentos sobre a organização molecular dos ingredientes (pequenos e grandes agrupamentos moleculares) e de suas propriedades físico-químicas, tais como densidade de carga, hidrofobicidade, massa molar e conformação frente a diferentes condições ambientais. A coacervação complexa é baseada na interação associativa que pode resultar da mistura de dispersões de polímeros que apresentam cargas opostas, usualmente uma proteína e um polissacarídeo. Nesse processo, o material a ser encapsulado, na maioria das vezes um composto lipofílico, é inicialmente emulsionado na mistura dos biopolímeros. Na sequência, as condições da emulsão (pH, força iônica, ou temperatura) são alteradas no sentido de promover a interação entre os polímeros, formando os coacervados. Estes se depositam na superfície das gotas emulsionadas, constituindo uma camada protetora e dando origem às microcápsulas (GOUIN, 2004). Dependendo da proporção entre os compostos poliméricos, da densidade de carga e da força iônica da solução, o tamanho e a estabilidade/solubilidade dos complexos proteína-polissacarídeo podem ser alterados. Somente sob certas condições (correta proporção entre os biopolímeros e pH ótimo) é que ocorre agregação das partículas levando à formação dos coacervados (SCHMITT; TURGEON, 2011). Portanto, é crucial que a preparação desses complexos ocorra sob condições apropriadas. Os complexos frequentemente contêm mais proteínas que polissacarídeos. Remunán-López e Bodmeier (1996) estudaram a formação de complexos de

gelatina-quitosana e a faixa ótima para a razão de mistura proteína:polissacarídeo foi de 10:1 até 20:1, sendo que acima ou abaixo dessa faixa o rendimento de coacervados diminuiu significativamente. No caso de complexos de albumina bovina e goma arábica observou-se uma razão proteína:polissacarídeo de 60:1 (VINAYAHAN; WILLIAMS; PHILLIPS, 2010). Esta proporção pode ser ainda maior, dependendo da elevada densidade de carga dos polissacarídeos.

Gelatina e goma arábica foram os primeiros materiais utilizados para coacervação complexa desde o trabalho pioneiro de Bungenberg de Jong e Kruyt (1929), sendo provavelmente o sistema de coacervação mais estudado e melhor compreendido (GOUIN, 2004). Porém, apesar de a goma arábica ser um material largamente utilizado na encapsulação de compostos lipofílicos, seu custo relativamente alto e flutuações em sua disponibilidade comercial têm motivado pesquisas sobre materiais encapsulantes alternativos (MADENE et al., 2006). Por outro lado, a gelatina, obtida pela hidrólise do colágeno, é uma proteína abundante no Brasil, além de ser biocompatível, biodegradável e solúvel na temperatura corporal, representando um material ideal para aplicações em alimentos e medicamentos. Um atributo adicional da gelatina, importante para a coacervação complexa, é o seu caráter anfótero, isto é, ela é carregada positivamente abaixo de seu ponto isoelétrico, o que permite a complexação com polissacarídeos aniônicos em baixos valores de pH (XIAO et al., 2014).

O alginato é um polissacarídeo linear constituído por duas unidades monoméricas, o ácido manurônico e o ácido gulurônico, as quais são unidas por ligações glicosídicas entre os carbonos C-1 e C-4 e variam em proporção, ordem e massa molar, sendo agrupadas em blocos sequenciais. As propriedades físicas e químicas do alginato são determinadas a partir das diferentes ligações glicosídicas e da proporção, distribuição e comprimento dos blocos (FUJIWARA et al., 2013). Almeida e Almeida (2004) estudaram a microencapsulação de pindolol em uma matriz de gelatina-alginato de sódio como um modelo para liberação prolongada de drogas intestinais, comparando com grânulos de alginato de cálcio que são conhecidos por serem incapazes de controlar a liberação da maioria das drogas insolúveis. Microcápsulas de gelatina-alginato carregadas de pindolol foram desenvolvidas utilizando reação de reticulação com formaldeído ou glutaraldeído. Vários parâmetros, tais como taxa de gelificação da matriz, eficiência de encapsulação, perfil de liberação da droga e taxa de rompimento da matriz, foram investigados, constatando-se a formação da matriz gelatina-alginato.

O óleo de palma além das suas diversas aplicações em larga escala na indústria de alimentos, como na fabricação de margarina, biscoitos, pães e sorvetes, mais recentemente tem sido utilizado na fabricação de sabões, detergentes, velas, produtos farmacêuticos, cosméticos e corantes naturais. É uma fonte significativa de antioxidantes, incluindo tocoferóis, tocotrienóis, carotenóides, fitoesteróis, compostos fenólicos e outros fitonutrientes (TEIXEIRA et al., 2013; EDEM, 2002). Sua microencapsulação por coacervação complexa pode proteger os compostos bioativos, facilitar a incorporação em formulações secas, bem como retardar a liberação no sistema digestivo, uma vez que os coacervados são insolúveis no pH ácido do estômago.

O controle da digestão de lipídeos no trato gastrointestinal é importante para o desenvolvimento de alimentos funcionais e produtos farmacêuticos. Como exemplo, pode-se citar o estímulo do íleo por alimentos pouco digeridos (proteínas, lipídeos e carboidratos), o que libera hormônios intestinais cujas ações interferem positivamente no controle da obesidade e em distúrbios metabólicos associados, sobretudo na resistência periférica à insulina (STRADER, 2006; LI; MCCLEMENTS, 2011).

Este trabalho tem por objetivo estudar a microencapsulação do óleo de palma por coacervação complexa, avaliando as propriedades de microcápsulas produzidas com o sistema convencional gelatina-goma arábica, além de explorar a formação de coacervados com o sistema alternativo gelatina-alginato de sódio. Esse sistema alternativo foi selecionado considerando-se que o alginato de sódio, assim como a gelatina, é um polissacarídeo abundante e relativamente barato, que se apresenta negativamente carregado e pode interagir com a gelatina em valores baixos de pH. Além disso, existem poucos trabalhos publicados sobre a produção de coacervados a partir desse sistema e, portanto, espera-se contribuir para aumentar o repositório de informações sobre o mesmo.

OBJETIVO GERAL

A proposta desse estudo foi investigar o processo de microencapsulação de óleo de palma pelo processo de coacervação complexa utilizando os pares gelatina/goma arábica e gelatina/alginato de sódio. Ao longo do trabalho também mostrou-se importante o desenvolvimento de um método analítico padronizado para determinação da eficiência de encapsulação do óleo de palma pelos processos avaliados.

Objetivos específicos

- Determinação e validação de uma metodologia analítica para quantificação do óleo de palma microencapsulado pelo processo de coacervação complexa.
- Estudo da formação de complexos eletrostáticos entre gelatina e alginato de sódio em diferentes razões de mistura dos biopolímeros e em diferentes valores de pH através da determinação do potencial zeta, neutralização das cargas pelo método turbidimétrico e reologia dos coacervados.
- Otimização do processo de microencapsulação de óleo de palma por coacervação complexa utilizando o sistema gelatina/goma arábica em diferentes razões de mistura dos biopolímeros, diferentes concentrações e diferentes proporções entre o recheio e o material de parede.
- Caracterização dos complexos formados em matrizes gelatina/goma arábica e gelatina/alginato de sódio através de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura e determinação da distribuição de tamanho das partículas.
- Estudo das condições de rompimento das microcápsulas obtidas em função do pH.

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO EM CAPÍTULOS

O presente trabalho encontra-se estruturado da seguinte forma:

Introdução e objetivos

Capítulo 1: Revisão bibliográfica: são apresentados os principais fundamentos teóricos que abrangem este estudo, incluindo informações referentes ao óleo de palma, aos biopolímeros utilizados como material de parede, à metodologia de coacervação complexa para microencapsulação e demais técnicas utilizadas como microscopia ótica, de varredura, potencial zeta, espectroscopia, análise de tamanho de partículas e reologia.

Capítulo 2: Desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de óleo de palma em microcápsulas produzidas por coacervação complexa: neste capítulo foi proposto um método espectrofotométrico para determinação do óleo de palma presente tanto externamente como internamente às microcápsulas obtidas por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como materiais de parede. Também foi realizada a validação do método analítico proposto.

Capítulo 3: Formação de complexos eletrostáticos de gelatina e alginato para encapsulação de óleo de palma: neste capítulo foi estudada a formação de complexos eletrostáticos a partir dos biopolímeros gelatina e alginato de sódio. As condições ótimas de coacervação foram determinadas pelo estudo do potencial zeta, técnica de turbidimetria e da análise do comportamento reológico dos coacervados em diferentes razões de mistura gelatina:alginato de sódio e diferentes valores de pH. Também foi analisada a morfologia dos complexos por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. Finalmente foi determinado o tamanho das partículas e avaliada a capacidade dessa matriz para microencapsulação de óleo de palma.

Capítulo 4: Produção e caracterização de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa em matrizes de gelatina e goma arábica: neste capítulo foi estudada a obtenção de microcápsulas de óleo de palma por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como materiais de parede. Os fatores investigados foram a concentração de gelatina e goma arábica, a proporção de óleo de palma em relação à concentração desses polímeros de parede e a proporção entre gelatina e goma arábica. Os coacervados obtidos foram analisados por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. Também foi determinada a distribuição de tamanho das partículas.

Conclusões gerais: neste item são apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

Apêndices

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, A. J. Cross-linked alginate-gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 431-439, 2004.
- ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 17-24, 2013.
- BUNGENBERG de JONG, H. G.; KRUYT, H. R. Coacervation (partial miscibility in colloid systems). **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v. 32, p. 849-856, 1929.
- CHEN, B. C.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Design of foods with bioactive lipids for improved health. In: DOYLE, M. P.; KLAENHAMMER, T. R. (Ed.). **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 35-56, 2013.
- EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 319-341, 2002.
- EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628-647, 2013.
- FUJIWARA, G. M.; CAMPOS, R.; COSTA, C. K.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MARQUES, F. A.; ZANIN, S. M. W. Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmaterol through the external ionic gelation technique. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49(3), 2013.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.
- JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the Food-Industry. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 24(4), p. 289-297, 1991.
- KANG, M. K.; DAI, J.; KIM, J.-C. Ethylcellulose microparticles containing chitosan and gelatin: pH-dependent release caused by complex coacervation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 355-359, 2012.

- LI, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Controlling lipid digestion by encapsulation of protein-stabilized lipid droplets within alginate-chitosan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1025-1033, 2011.
- MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release - A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41(1), p. 1-21, 2006.
- POTHAKAMURY, U.R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Fundamental aspects of controlled release in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 397-406, 1995.
- REINECCIUS, G. A. Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients. **American Chemical Society**, Washington, 214p., 1995.
- REMUNÁN-LÓPEZ, C.; BODMEIER, R. Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 135, p. 63-72, 1996.
- SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, p. 63-70, 2011.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33(6), p. 501-547, 1993.
- STRADER, A. P. Ileal transposition provides insight into the effectiveness of gastric bypass surgery. **Physiology & Behavior**, v. 88, p. 277-282, 2006.
- TEIXEIRA, C. B.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; da SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. da C. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 575-581, 2013.
- THIES, C. **Microcapsules**. Washington University. Elsevier Science Ltd., p. 3892-3903, 2003.
- VINAYAHAN, T.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Electrostatic interaction and complex formation between gum Arabic and bovine serum albumin. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 3367-3374, 2010.

VOLOSOV, A.; BIALER, M.; YAGEN, B. **Pharmaceutical compositions containing low-melting waxes.** Patente n° WO 00/01416, 2000.

XIAO, Z.; LIU, W.; ZHU, G.; ZHOU, R.; NIU, Y. A review of the preparation and application of flavor and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1482-1494, 2014.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

1.1 MICROENCAPSULAÇÃO

Micropartículas na formação de sistemas particulados estão se tornando cada vez mais importantes graças ao seu potencial de aplicação em uma gama de áreas, tais como aprisionamento de nutrientes e liberação controlada, revestimentos, materiais para embalagem e sistemas emulsionados. Tais partículas podem ser compostas de diferentes materiais como lipídios, proteínas, polissacarídeos e surfactantes. Os sistemas particulados mais comumente conhecidos são os complexos proteína-polissacarídeo, formados pela mistura de macromoléculas de cargas opostas (SCHOLTEN; MOSCHAKIS; BILIADERIS, 2014).

A microencapsulação é uma tecnologia em que pequenas partículas sólidas, líquidas ou gasosas, conhecidas como material de recheio ou ativo são revestidas por um material de parede, formando partículas denominadas microcápsulas, micropartículas, ou microesferas, diferindo em morfologia e estrutura interna. O material de parede, também denominado material externo ou agente encapsulante, é uma camada de polímero de espessura variável. A microcápsula é idealmente esférica com estrutura fortemente influenciada pelo material original e pelos métodos de preparação e com tamanho que pode oscilar desde frações de micron a alguns milímetros (SUAVE et al., 2006).

De acordo com a disposição do recheio, as microcápsulas produzidas podem ser mononucleadas, quando apresentam um único núcleo central, ou multinucleadas, quando há muitos núcleos dispersos, ou o material de recheio pode estar espalhado uniformemente em uma matriz (AZEREDO, 2005). As microcápsulas multinucleadas possuem estrutura tipo matriz e podem liberar recheio lentamente, caso a parede não tenha sido rompida. As microcápsulas mononucleadas possuem estrutura tipo reservatório e liberam todo o recheio rapidamente. Nessas microcápsulas o material de parede não está distribuído uniformemente pela superfície da gota de recheio e, assim, a parte mais fina da parede estará mais susceptível ao rompimento e liberação. Dessa forma, as microcápsulas multinucleadas possuem maior controle de liberação e são mais interessantes para produção industrial e aplicações, além de serem facilmente produzidas (DONG et. al., 2007).

A microencapsulação é uma técnica utilizada em diversas áreas, como a indústria de alimentos, farmacêutica (odor e sabor, liberação controlada e direcionada) e agrícola (pesticidas, insumos, sêmen, alimentação animal) e tem inúmeras finalidades, como transportar o ingrediente funcional até o local onde o ativo deverá agir, proteger o ingrediente

funcional de degradações químicas e biológicas (por exemplo, oxidação), mascarar as propriedades indesejáveis do componente ativo (por exemplo, odor e sabor) e controlar a liberação do ativo (THIES, 1994; GAN; CHENG; EASA, 2008).

Existem diversas técnicas de microencapsulação, divididas em três grupos conhecidos como métodos físicos, químicos e físico-químicos. Destacam-se entre os métodos físicos, o *spray drying*, *spray chilling*, *spray cooling*, cobertura por *spray* em leito fluidizado, extrusão, extrusão centrífuga em múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização. Os métodos químicos, por sua vez, são constituídos pela coacervação, envolvimento por lipossomas e separação em fase orgânica. Os métodos físico-químicos são representados pela inclusão molecular e polimerização interfacial (JACKSON; LEE, 1991). A escolha do método deve considerar fatores econômicos, a funcionalidade que o material ativo deve fornecer ao produto final, o mecanismo de liberação do recheio, tamanho de partícula desejada, entre outros.

A compreensão da tecnologia de microencapsulação e a potencial contribuição que as microcápsulas podem apresentar aos produtos alimentícios esbarra no conhecimento do fenômeno de transporte de massa, propriedades de materiais de parede, e uma compreensão do processo no qual pequenas partículas são produzidas. Uma vez que o principal objetivo da microencapsulação é controlar de alguma maneira o comportamento do transporte de massa, a parede das microcápsulas deve controlar a difusão do material para fora ou para dentro da microcápsula (THIES, 2003). O controle da taxa de liberação é muito desejado no desenvolvimento de microcápsulas. São variáveis que permitem esse controle: o coeficiente de difusão, a espessura e a porosidade da parede da cápsula, a variação na concentração de saturação do material de recheio e sua distribuição na partícula.

1.2 COACERVAÇÃO COMPLEXA

A microencapsulação por coacervação complexa tem sido utilizada em diversos segmentos na indústria, entre eles farmacêutico, alimentício, químico e cosmético, a fim de promover a liberação controlada de vários tipos de materiais de recheio, como aromas, medicamentos e tintas, com uma ampla variedade de aplicações (ALVIM; GROSSO, 2010).

Em muitas misturas de biopolímeros, a contribuição entrópica é muitas vezes maior do que a entálpica, de modo que a separação de fases dos biopolímeros acontece. Neste caso,

dois fenômenos de separação de fases podem ser observados, dependendo da afinidade entre os diferentes biopolímeros e o solvente. O primeiro, denominado incompatibilidade termodinâmica ou separação de fases segregativa, indica uma repulsão entre os biopolímeros. Claramente, as interações solvente-biopolímeros são favorecidas quando comparadas com as interações biopolímero-biopolímero ou solvente-solvente de modo que o sistema resulta em duas fases, sendo cada uma enriquecida com um dos biopolímeros. O segundo fenômeno é denominado separação de fases associativa e ocorre quando a interação entre os biopolímeros envolvidos é favorecida por possuírem cargas opostas. Ocorre em pH ligeiramente mais baixo do que o ponto isoelétrico da proteína e quando o polissacarídeo encontra-se ainda carregado negativamente (DOUBLIER et al., 2000). A complexação ocorre e pode produzir complexos solúveis ou uma separação de fase associativa em que coexistem duas fases, sendo uma rica em solvente com quantidades muito pequenas de biopolímero(s) e uma fase rica em biopolímero(s) que formam os chamados coacervados. A neutralização global das cargas é utilizada para causar a separação da fase de coacervado complexo rica em polímero (BUENO et al., 2011).

A microencapsulação pelo método de coacervação é um fenômeno físico-químico em que ocorre a separação espontânea de fases. Ela envolve três etapas: a) formação de três fases, em que uma fase líquida atua como veículo, uma fase do material a ser encapsulado, e uma terceira do encapsulante. A fase líquida rica em coloide se separa de uma solução macromolecular, como resultado de uma redução da solubilidade por meios químicos ou físicos, como alteração da temperatura ou de pH e adição de uma solução iônica concentrada; b) a fase rica em coloide fica num estado disperso e se apresenta como gotículas amorfas a que se dá o nome de coacervado. Em repouso, estas gotículas coalescem, formando uma camada líquida clarificada e homogênea rica em coloide, conhecida como camada de coacervado, a qual se deposita ao redor das gotículas do material ativo num revestimento contínuo, para formar a parede da cápsula; c) solidificação do material de parede e isolamento das cápsulas (AZEREDO, 2005; BUENO et al., 2011; GONSALVES et al., 2009).

A eficiência da microencapsulação por coacervação está associada às características dos polímeros envolvidos, do complexo formado e do recheio a ser encapsulado (GONSALVES et al., 2009). Desta forma, é usada tipicamente para encapsular óleos, óleos essenciais e flavorizantes, por serem compostos hidrofóbicos.

Dependendo da razão de mistura entre os compostos poliméricos, da densidade de carga e da força iônica da solução, o tamanho e a estabilidade/solubilidade dos complexos podem ser alterados. Somente sob certas condições (correta proporção entre os biopolímeros e pH ótimo) é que ocorre agregação das partículas levando à precipitação dos complexos insolúveis (SCHMITT; TURGEON, 2011). Portanto, é crucial preparar estes complexos sob condições apropriadas. A adição de polissacarídeos carregados negativamente a proteínas carregadas positivamente conduz à formação de complexos estáveis, um processo frequentemente acompanhado de reversão de carga. Os complexos frequentemente contêm mais proteínas que polissacarídeos. Remunán-López e Bodmeier (1996) estudaram a formação de complexos de quitosana-gelatina e a faixa de relação ótima entre proteína:polissacarídeo foi de 10:1 até 20:1, sendo que acima ou abaixo dessa faixa o rendimento de coacervados diminuiu significativamente. No caso de complexos de albumina bovina e goma arábica observou-se uma razão proteína:polissacarídeo de 60:1 (VINAYAHAN; WILLIAMS; PHILLIPS, 2010). Essa proporção pode ser ainda maior, dependendo da elevada densidade de carga dos polissacarídeos. Este fato pode ser explicado com base no elevado volume ocupado pela cadeia de um polissacarídeo expandido em comparação com uma proteína globular compacta (RICHARDSON, KASAPIS, 1998).

Algumas vantagens da coacervação complexa são as condições brandas de processo e a variedade de biopolímeros como possíveis materiais de parede (gelatina, albumina, goma arábica, celulose, alginato, caseinato, carragena, amido, pectina). Entretanto, ainda é uma técnica com muitas informações não comprovadas sobre o mecanismo e sistemas de liberação de hidrofóbicos. O entendimento da interação de um sistema contendo biopolímeros do tipo polissacarídeo e proteína é de fundamental importância para a compreensão dos efeitos na produção de microcápsulas por coacervação complexa e propriedades das microcápsulas, já que este par de biopolímeros é o mais utilizado como material de parede quando se usa essa técnica (SCHMITT et al., 1998).

Um exemplo típico de encapsulação por coacervação ocorre em sistemas com dois coloides hidrofílicos de cargas elétricas opostas. O sistema gelatina-goma arábica é o mais estudado e o processo é conduzido da seguinte forma, sob contínua agitação: o material do núcleo é emulsificado ou suspenso em uma das duas soluções (gelatina ou goma arábica), e a outra solução é então adicionada, formando-se assim um sistema com três fases. O pH inicial deve ser maior que 5,0 (ponto isoelétrico da gelatina tipo B); assim, ambos têm cargas

negativas e se repelem, sendo portanto imiscíveis. Com a diminuição gradual do pH até 3,8-4,3, a gelatina adquire cargas positivas, que interagem com as cargas negativas da goma arábica, formando-se microcápsulas que se depositam em torno das gotículas do núcleo. Posteriormente, deve-se promover a formação de ligações cruzadas do material com um aldeído, para assegurar maior integridade da cobertura (AZEREDO, 2005).

As micropartículas coacervadas podem ser secas, para que se estenda o tempo de estocagem das mesmas e para que se torne viável seu uso em produtos desidratados. Para isso podem ser utilizados métodos de secagem como liofilização, secagem em estufa, remoção de água por solventes e secagem em condições ambientes. Um problema desses métodos é que a maioria não permite a obtenção de partículas individualizadas, interferindo no tamanho do produto final e nas propriedades de liberação do recheio (THIES, 1994).

Nori et al. (2011) estudaram a microencapsulação de própolis usando isolado proteico de soja e pectina. Esses autores observaram que é possível encapsular o extrato de própolis por coacervação complexa utilizando os materiais de parede estudados e assim obter pó, livre de álcool e com a possibilidade de liberação sob condições controladas em alimentos. Concluíram que o processo preserva os compostos fenólicos e flavonoides presentes na própolis livre e a atividade antioxidante do material, além da sua atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*.

1.3 ÓLEO DE PALMA

A palma pertence ao gênero *Elaeis* e compreende as espécies *Elaeisguineensis* e *Elaeisoleifera*. Trata-se de um cultivo perene, que começa a produzir frutos a partir de três anos depois de semeada e com vida econômica de 20 a 30 anos. O óleo de palma é o segundo óleo vegetal mais importante do mundo. A Malásia e a Indonésia, no sudeste asiático, são os principais países produtores. No Brasil as áreas cultivadas são encontradas no Pará, Amazonas, Amapá e Bahia, sendo o Pará o maior produtor de óleo de palma do Brasil e onde se concentra mais de 80% da área plantada.

O óleo de palma possui diversas aplicações e, em larga escala, é utilizado na agroindústria alimentar, na fabricação de margarina, biscoitos, pães e sorvetes, e, mais recentemente, também na fabricação de sabões, detergentes, velas, produtos farmacêuticos,

cosméticos e corantes naturais. Nutricionalmente, o óleo de palma apresenta baixos níveis de colesterol, sendo facilmente digerível, assimilável e utilizado como fonte energética, além de ser uma fonte significativa de antioxidantes, incluindo tocoferóis, tocotrienóis, carotenoides, fitoesteróis, compostos fenólicos e outros fitonutrientes (TEIXEIRA et al., 2013; EDEM, 2002). É semi-sólido, constituído por alta concentração de ácidos graxos saturados e proporção característica de ácido oleico e linoleico, com propriedades físicas necessárias para diversos usos em alimentos. Seu alto conteúdo de antioxidantes naturais e sua estabilidade a temperaturas elevadas o convertem em um meio adequado para frituras, conferindo aos produtos uma vida de prateleira mais longa, além de ressaltar o sabor natural dos alimentos.

O óleo de palma, pelo seu alto teor de triglicérides saturados de alto ponto de fusão, não necessita de hidrogenação para atingir a consistência semelhante à de produtos gordurosos sólidos, como fabricação de gordura vegetal, *shortenings*, margarinas e *vanaspati*, produto gorduroso alternativo à manteiga animal usado em países asiáticos.

Grupos de pesquisa têm estudado a aplicação de substâncias oleosas (como o óleo de palma) aplicadas diretamente ao íleo para o tratamento do *Diabetes Mellitus* (DM) tipo 2. Este distúrbio metabólico se caracteriza por hiperglicemia e excreção do excesso de glicose na urina. As anormalidades endócrinas associadas ao *Diabetes Mellitus* são constituídas por um déficit da insulina absoluta ou relativa, manifestando uma secreção deficiente de insulina pelo pâncreas e/ou por uma ação deficiente da insulina nos tecidos-alvo. Uma possibilidade sugerida por diversos autores é o tratamento cirúrgico com a exclusão duodeno-jejunal e/ou interposição do segmento ileal que tem demonstrado controle clínico dos pacientes com DM tipo 2, reduzindo o uso de insulina ou anti-dietéticos orais. Para muitos autores, esse controle clínico ocorre devido à presença precoce de nutrientes no íleo que, assim, antecipa a produção de hormônios como *glucagon-likepeptide 1* (GLP-1), melhorando a ação insulínica e exercendo efeitos proliferativos e anti-apoptóticos nas células beta pancreáticas. O GLP-1 é secretado pelas células enteroendócrinas L do intestino em resposta à presença intraluminal de alimentos. Ele aumenta a secreção e a expressão gênica nas células produtoras de insulina e estimula o crescimento das células β , sendo sua secreção influenciada por carboidratos, lipídios e proteínas. O GLP-1 exerce algumas funções bem definidas, como o estímulo da secreção glicose-dependente da insulina; o aumento da transcrição do gene da insulina; a indução da neogênese e da proliferação das células β das ilhotas de Langerhans; a inibição da apoptose das células β ; o aumento da expressão fenotípica de células β diferenciadas; o

estímulo da produção de somatostatina e a redução da produção de glucagon (DRUCKER, 2003; POURNARAS; LE ROUX, 2009).

O estímulo do íleo por alimentos pouco digeridos libera hormônios intestinais, cujas ações interferem positivamente no controle da obesidade e em seus distúrbios metabólicos associados, sobretudo na resistência periférica à insulina. A simples interposição de um segmento de íleo nos segmentos mais proximais do intestino delgado é o procedimento cujos resultados mais enfatizam essa hipótese. Estudo da interposição de segmento de íleo terminal em jejuno proximal em animais de experimentação submetidos a um modelo de obesidade induzida por dieta demonstrou aumento significativo dos níveis de GLP-1 (STRADER, 2006).

A microencapsulação pode ser uma alternativa para que determinados nutrientes, como por exemplo o óleo de palma, sejam capazes de resistir ao pH ácido do estômago e outras condições do sistema digestivo e sejam absorvidos em regiões específicas, como o íleo (pH alcalino), o que estimularia a produção do hormônio GLP-1.

1.4 AGENTES ENCAPSULANTES

A escolha do material de encapsulação é baseada em três critérios principais: aplicação, economia e segurança (FUJIWARA et al., 2013).

Nos setores médico, farmacêutico e alimentício são necessárias a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a não toxicidade, e estes requisitos reduzem o número de polieletrólitos potencialmente disponíveis para serem utilizados. Deste modo, polissacarídeos e proteínas têm sido empregados extensivamente para encapsular substâncias biologicamente ativas por coacervação complexa (SILVA; ANDRADE, 2009).

Dois biopolímeros gelificantes em um mesmo sistema podem criar três tipos gerais de estrutura de rede (Figura 1.1):

- a) rede interpenetrante;
- b) rede acoplada; e
- c) separação de fases.

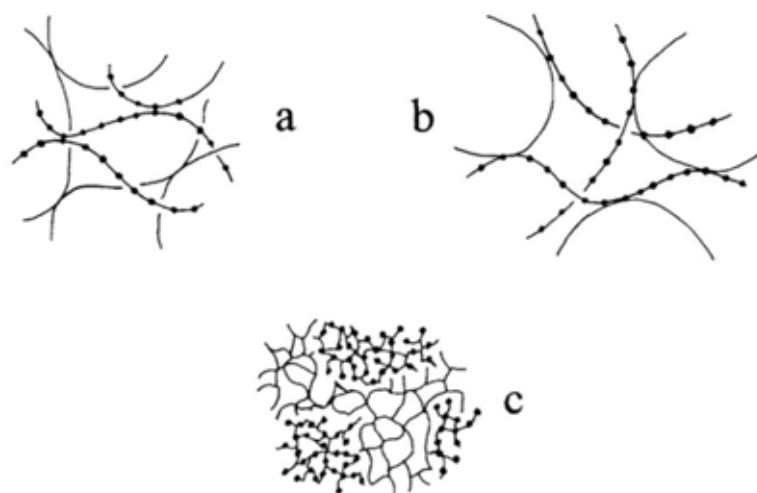


Figura 1.1 Topologia das três possíveis redes de sistemas formados por dois biopolímeros gelificantes: a) rede interpenetrante, b) rede acoplada e c) separação de fases (RICHARDSON, KASAPIS, 1998).

O modelo de rede interpenetrante representa a situação mais simples, raramente encontrada em géis de biopolímeros, onde cada um dos dois componentes forma separadamente duas estruturas de rede independentes (Figura 1.1a). Ambas as redes abrangem todo o sistema, interpenetrando-se mutuamente, mas a interação é exclusivamente topológica.

A interação em rede acoplada envolve uma associação direta entre dois diferentes polímeros para formar uma única rede (Figura 1.1b). Três tipos diferentes de ligação podem então surgir intermolecularmente: ligações covalentes, interações iônicas e cruzamentos cooperativos.

Quando interações favoráveis (tais como entre policátions e poliânions) estão ausentes, a incompatibilidade termodinâmica entre cadeias de biopolímeros distintos tende a fazer com que cada um se exclua do outro, de modo que a concentração eficaz de ambos é aumentada (Figura 1.1c). Isso também se aplica quando as energias de interação entre as cadeias envolvidas são pequenas (segmentos de cadeia desordenados) em comparação com as interações muito mais fortes de sequências ordenadas em géis de polissacarídeos (RICHARDSON, KASAPIS, 1998).

Em baixas concentrações, a incompatibilidade termodinâmica pode promover uma ordenação conformacional dentro de uma única fase, o que, para os sistemas de gelificação, pode aumentar a taxa de formação de rede (KASAPIS et al., 1993). Em concentrações mais elevadas, o sistema pode separar em duas fases líquidas distintas. Geralmente, a separação de

fases em sistemas de proteína-polissacarídeo em meio aquoso ocorre apenas quando a concentração total dos componentes macromoleculares excede 4% (TOLSTOGUZOV, 1986), embora haja variações de sistema para sistema.

Depois da fase da emulsão, o polissacarídeo pode subsequentemente ser utilizado para induzir a formação de gel e aumentar a viscosidade da membrana interfacial via reticulação química ou adição de complexos adicionais entre os polissacarídeos na interface e outros agentes gelificantes na fase contínua (NAKAGAWA; NAGAO, 2012).

Uma encapsulação eficiente é particularmente dependente do desempenho do agente encapsulante, o qual deve proteger o componente ativo ou núcleo da oxidação, da luz, da umidade e do contato com outras substâncias no armazenamento, prolongando o tempo de vida de prateleira. Também deve ser capaz de prevenir a perda dos componentes voláteis encapsulados e a obtenção de um produto final de fácil manuseio, que se incorpore, por exemplo, em alimentos secos. Consegue cumprir estas funções o agente encapsulante que tiver propriedades emulsificantes, que forme facilmente a película envolvente, que tenha baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos e apresente baixa higroscopicidade, seja econômico, de sabor agradável e de fácil obtenção. Um único material encapsulante não engloba todas estas propriedades, por isso, na prática, utilizam-se combinações de materiais encapsulantes. Geralmente, são utilizados como agentes encapsulantes os hidrocolóides, como gelatina, gomas vegetais, amidos modificados e proteínas (SHAHIDI; HAN, 1993). Na tentativa de se obter um ótimo material de parede, os pesquisadores utilizam misturas ou composições de vários materiais.

No caso da coacervação complexa, o uso de uma combinação de polímeros é intrínseco à técnica, uma vez que esta se baseia na formação de complexos entre os mesmos.

1.4.1 Gelatina

Gelatina é um derivado proteico do colágeno, extraído pelo aquecimento de tecidos conjuntivos, como tendões, cartilagens e ossos, além de pele de animais, como peixes, bovinos e suínos (KIM et al., 2006). O colágeno insolúvel é convertido em gelatina solúvel por tratamentos hidrolíticos. A principal propriedade da gelatina é sua capacidade de formar géis estáveis em temperaturas menores que 40 °C, desde que a concentração de gelatina na

solução seja no mínimo de 1%; em certos casos, essa transição sol-gel é reversível (NEKLYUDOV, 2003). Os géis de gelatina contêm ligações cruzadas ou “zonas de junção” formadas pelo retorno parcial à configuração “ordenada” de tripla hélice similar às sequências do colágeno original, separadas ao longo do contorno da cadeia por resíduos peptídicos em conformação “desordenada” (ROSS-MURPHY, 1998; RENARD; VAN DE VELDE; VISSCHERS, 2006).

A gelatina é um polímero natural, biodegradável, biocompatível e não tóxico. Sua composição típica contém 14% de umidade, 84% proteína e 2% de cinzas (RIX, 1990). A proteína consiste de uma mistura de aminoácidos, cuja composição depende da fonte da qual é extraída. Moléculas de gelatina contêm repetidas sequências de glicina-X-Y, onde X e Y são frequentemente prolina e hidroxiprolina (Figura 1.2). Esses três aminoácidos são os presentes em maior quantidade (GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000).

As repetidas sequências de aminoácidos de forma regular são necessárias para a formação da estrutura característica em tripla hélice na gelatina e em outras proteínas da família do colágeno. Essa estrutura é que afere a habilidade de formar gel, sendo os segmentos em tripla hélice a base para as ligações cruzadas e a formação da rede tridimensional (CLARK et al., 1990).

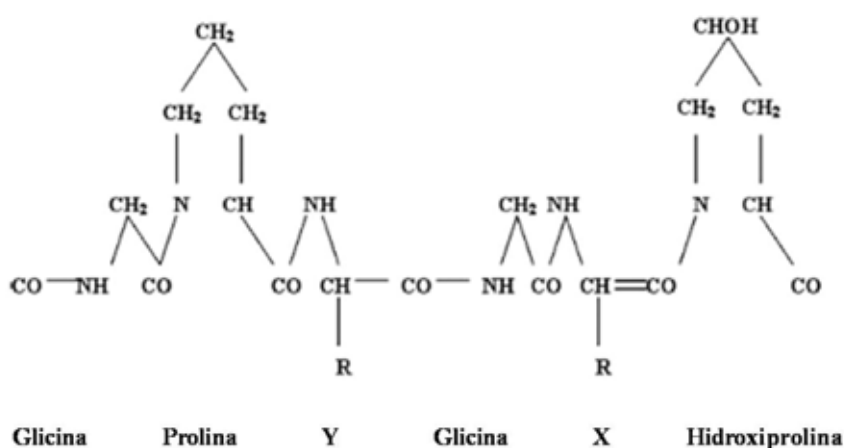


Figura 1.2 Estrutura repetida da gelatina, responsável pela estrutura em tripla hélice (BUREY et al., 2008).

A gelatina tem sido utilizada em aplicações na indústria de alimentos, fotográfica, cosmética e farmacêutica (BINSI et al., 2009). Recentemente, seu uso tem se expandido para novas aplicações como um coloide estabilizante, sendo agente de aeração e emulsificante. A

fonte e o tipo de colágeno influenciarão nas propriedades da gelatina resultante. A força de gel, a viscosidade e o ponto de fusão da gelatina dependem de sua massa molar e da sua distribuição e composição de aminoácidos.

As gelatinas possuem caráter anfótero, ou seja, apresentam-se negativamente carregadas acima de seu ponto isoelétrico e positivamente abaixo dele, o que permite seu emprego na técnica de microencapsulação por coacervação. O ponto isoelétrico varia em função da fonte e processo obtenção da gelatina. A gelatina obtida a partir da hidrólise ácida (tipo A) apresenta ponto isoelétrico na faixa alcalina, sendo em torno de 7,0 a 9,4, devido às condições do processamento menos rígidas, minimizando modificações nos grupos amida, o que mantêm o valor próximo do pH do colágeno. A gelatina obtida por hidrólise alcalina (tipo B) é submetida a longos tratamentos com álcali e apenas uma pequena porção dos grupos aminas resiste ao processo, que consiste em cerca de 90-95% de ácido carboxílico livre. Portanto, nesse caso, a proteína obtida apresenta ponto isoelétrico ácido na faixa de 4,5 e 5,3.

1.4.2 Goma Arábica

A goma arábica ou goma acácia é um sal neutro ou levemente ácido, constituído por uma mistura complexa de sais (íons cálcio, magnésio e potássio) obtida a partir do ácido arábico, extraída de duas espécies de acácia, *Acacia senegal* e *Acacia seyal*. Para provocar sua produção são feitos cortes longitudinais paralelos e pouco profundos nos troncos dessas árvores, de 40 a 60 cm de comprimento, ou em alternativa retiram-se pequenos pedaços de casca, deixando exposta a zona ferida.

Possui frações com diferentes estruturas químicas. A fração principal, representada por cerca de 70% da goma, é constituída de cadeias de polissacarídeos com pouco ou nenhum material nitrogenado entre elas por um arranjo altamente ramificado de galactose, arabinose, ramnose e ácido glicurônico (ISLAM et al., 1997). A fração proteica representa cerca de 2% da goma ligada covalentemente ao carboidrato e exerce um papel crucial na determinação das propriedades emulsificantes e estabilizantes da goma (DUCCEL et al., 2004; AZEREDO, 2005). Apresenta configuração enovelada e pode possuir carga, o que estaria relacionado à sua eficácia no processo de coacervação complexa.

A goma arábica é inodora, quase insípida, insolúvel em álcool etílico, solúvel em água e, quando comparada a outros polissacarídeos de massa molar similar, apresenta baixa viscosidade. Sabe-se que a goma é negativamente carregada acima do pH 2,2, e que, em pH menor que 2,2, a dissociação dos grupos carboxilas é suprimida.

A goma arábica é considerada como o material de parede para microcápsulas por excelência, devido à sua alta solubilidade, baixa viscosidade, baixa higroscopicidade, boas propriedades emulsificantes, sabor e aroma suaves, formação de filmes nas interfaces, e ação protetora contra a oxidação de voláteis, durante o processamento e estocagem. Por outro lado, tem alto custo e problemas de disponibilidade, pois é produzida em regiões sujeitas a variações climáticas imprevisíveis e conflitos políticos, o que pode comprometer sua oferta. Assim, a busca por substitutos totais ou parciais para a goma arábica tem sido incentivada (AZEREDO, 2005).

1.4.3 Alginato de sódio

O alginato é um biomaterial que tem apresentado inúmeras aplicações em ciências biomédicas e engenharia devido às suas propriedades favoráveis como biocompatibilidade e facilidade de gelificação. Hidrogéis de alginato têm sido aplicados na cicatrização de feridas, liberação controlada de medicamentos e aplicações de engenharia de tecidos biológicos, uma vez que estes géis possuem semelhança estrutural com as matrizes extracelulares dos tecidos e podem ser manipulados para desempenhar papéis críticos (LEE; MOONEY, 2012). Algina é um nome coletivo para o ácido algínico e seus diversos sais.

Comercialmente disponível, o alginato é tipicamente extraído de algas pardas (Phaeophyceae), incluindo *Laminaria hyperborea*, *Laminariadigitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1990). Ele está presente como componente estrutural da parede e nos espaços intercelulares. A extração envolve tratamento com soluções aquosas alcalinas, normalmente de hidróxido de sódio (NaOH) (CLARK; GREEN, 1936). O extrato é filtrado, e cloreto de sódio ou de cálcio é adicionado ao filtrado para precipitação do alginato. Este sal de alginato pode ser transformado em ácido algínico, por tratamento com ácido clorídrico (HCl) diluído. Depois de mais uma purificação e conversão, o alginato de sódio em pó solúvel em água é produzido (RINAUDO, 2008).

O ácido algínico é um polímero linear contendo seguimentos formados por sequencias de: a) ácido D-manurônico (M); b) ácido L-gulurônico (G) e c) monômeros alternados de ambos ácidos urônicos. A proporção e o tamanho desses seguimentos variam com a espécie da alga, e interferem nas propriedades e funções dos polímeros. Admite-se que a função da algina nas algas vivas esteja relacionada à: i) estrutura da parede celular e coesão dos tecidos; ii) resistência e flexibilidade do talo; iii) seletividade de cátions e iv) proteção contra a dessecação. O emprego comercial da algina está ligado, basicamente, a estas mesmas propriedades. A Figura 1.3 representa a estrutura do **a)** ácido β -D-manurônico, **b)** α -L-gulurônico e **c)** alginato. A diferença na sequência e no conteúdo de blocos determinará a flexibilidade da cadeia, influenciando na solubilidade e na estabilidade do gel que será formado. Blocos MG, por exemplo, formam cadeias mais flexíveis e mais solúveis em pHs baixos e a estabilidade do gel está diretamente relacionada ao conteúdo de blocos G (ERTESVÁG; VALLA, 1998). Alginatos ricos em blocos G formam géis rígidos e quebradiços na presença de íons Ca^{2+} enquanto a predominância de M (em bloco) ou MG resultam em géis elásticos. A quantidade e a distribuição de cada monômero dependem da espécie, da seção e da idade da alga a partir da qual o alginato foi isolado. As ligações glicosídicas resultantes nas posições 1 e 4 são equatoriais no β -D-manuronato e axiais no α -L-guluronato (GACESA, 1988).

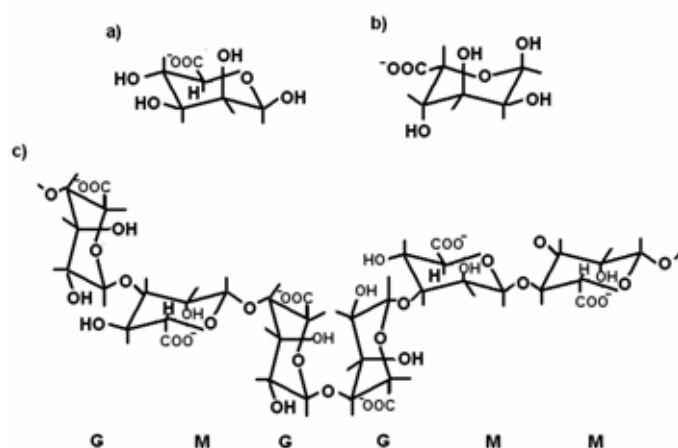


Figura 1.3 Estrutura química do alginato de sódio. **a)** ácido β -D-manurônico; **b)** α -L-gulurônico e **c)** alginato (GAVA, 2008).

As propriedades físicas e químicas do alginato são determinadas a partir das diferentes ligações glicosídicas e da proporção, distribuição e comprimento dos blocos, e são importantes para sua aplicação (LISBOA et al., 2007).

O alginato tem sido utilizado em vários segmentos na indústria, entre eles no setor alimentício, de cosméticos, medicamentos e também na indústria têxtil e de papel. Atualmente destaca-se por suas aplicações inovadoras na área médica e farmacêutica. Em função de suas características é empregado como espessante, estabilizante de emulsões e de espuma, agente de encapsulação, agente de gelificação, agente de formação de filmes e de fibras sintéticas, entre outras possibilidades (MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011).

O uso do alginato como material encapsulante é muito importante, por ser um polímero natural de relativo baixo custo, de fácil obtenção, biocompatível, atóxico e biodegradável, que não necessita utilização de solventes orgânicos e nem condições rigorosas de temperatura para a formação das partículas (FUJIWARA et al., 2010).

No processo de microencapsulação, o tamanho das micropartículas obtidas com o alginato como material de parede está diretamente relacionado com a concentração e a viscosidade da solução de alginato empregada, observando-se que baixas concentrações favorecem a redução do tamanho das partículas. Entretanto, concentrações reduzidas diminuem também a resistência mecânica e a estabilidade das micropartículas em condições gastrointestinais (SACCHETIN et al., 2010).

1.5 QUANTIFICAÇÃO DO ATIVO EM MICROCÁPSULAS

Para determinar a eficiência dos métodos de microencapsulação, bem como para realizar estudos de liberação *in vitro* do material ativo que foi microencapsulado, faz-se necessário dispor de métodos capazes de quantificar o material retido nas microcápsulas.

A Tabela 1.1 apresenta os métodos utilizados para determinação da eficiência de encapsulação, E (%), em trabalhos de 2010 até o presente. Observa-se uma grande variedade de métodos e condições não-padronizadas, o que indica a necessidade de estabelecer e validar um método padronizado para a determinação da eficiência de encapsulação, possibilitando a comparação entre os resultados obtidos com maior segurança.

Tabela 1.1 Métodos utilizados para determinação da eficiência de encapsulação em microcápsulas obtidas por coacervação complexa.

Recheio	Parede	Metodologia para determinação da Eficiência de encapsulação: E(%)	Referência
Metronidazol, diclofenaco sódico e indometacina	Pectina / gelatina e alginato / gelatina	$E(\%) = \left(\frac{Q_p}{Q_t} \right) \times 100$ <p>E(%) = porcentagem de encapsulação; Q_p = quantidade do fármaco microencapsulado (g); Q_t = é o produto entre a quantidade do fármaco presente em cada mg de amostra e a massa total de amostra produzida (g).</p> <p>A quantidade de fármaco microencapsulado foi determinada através da solubilização de 100 mg de microcápsulas em 50 mL de tampão de ácido bórico (pH = 9,0) e agitado a 50 °C por 5 horas, seguido de resfriamento, filtração e análise do fármaco em comprimento de onda específico (277 nm para diclofenaco sódico e 320 nm para indometacina). Para metronidazol, Q_p foi determinado pela digestão de 100 mg de microcápsulas em 10 mL de HCl 5N em temperatura ambiente e 277 nm.</p>	... (1.1) SARAVANAN; RAO, (2010)
Óleo de soja e oleoresina de páprica	Gelatina e goma arábica	$E(\%) = \left(\frac{\text{massa do ativo encapsulado}}{\text{massa total do ativo inicial}} \right) \times 100$ <p>A massa de material ativo encapsulado foi determinada pela subtração entre a massa perdida durante o processo e a massa total do ativo inicial. Essa massa perdida durante o processo, ou seja, a massa não encapsulada foi determinada removendo-se cuidadosamente o material aderido na haste do homogeneizador e no Becker utilizando-se etanol anidro como solvente e quantificado por medidas de absorbância em 452 nm.</p>	ALVIM; GROSSO, (2010) ... (1.2)

Própolis Isolado proteico de 2,0 mL de etanol (99,5°) foi adicionado em 0,2 g de amostra para que o álcool NORI et al.,
soja e pectina dissolvesse a própolis presente externamente. A mistura foi agitada e centrifugada (2011)

(4000g) por 2 minutos. Os compostos fenólicos foram quantificados por espectroscopia em 740 nm. A eficiência de encapsulação foi calculada usando a equação (1.3).

$$E(\%) = \left(\frac{w_2 - w_1}{w_2} \right) \times 100 \quad \dots (1.3)$$

w_1 = concentração de própolis no sobrenadante (não encapsulado) de uma quantidade conhecida de microcápsulas;

w_2 = quantidade de própolis adicionado para preparo da mesma quantidade de microcápsulas.

Óleo essencial de Gelatina e goma Cerca de 5 g de microcápsulas precipitadas (antes da liofilização) foi adicionado a LV et al., (2012)
jasmim arábica um frasco cônico de 150 mL. Em seguida, 30 ml de etanol anidro foi adicionado

para dissolver o material do núcleo. O frasco foi selado com uma tampa de vidro, colocado em ultrassom a 30 °C por 15 min, em seguida, transferido para um banho com circulação de água a 30 °C por 15 min. O objetivo do uso do ultrassom foi destruir os materiais de parede; ao passo que a incubação em banho com circulação de água foi para dissolver o óleo essencial. Após a extração total, sulfato de sódio anidro foi adicionado para absorver o conteúdo de água presente. O conteúdo foi filtrado e transferido para um balão de fundo redondo para evaporação e o teor residual foi calculado por pesagem antes e depois da evaporação. A quantificação foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando uma curva de calibração.

Óleo refinado	Gelatina tipo A (suína) e goma arábica	A eficiência de encapsulação foi determinada quantificando-se o óleo presente superficialmente. Partiu-se de 3 g de microcápsulas misturadas em 30 mL de éter de petróleo e agitadas em vórtex por 1 minuto à temperatura ambiente. A mistura foi filtrada em papel de filtro separador de fases e transferida para um frasco de 100 mL de fundo redondo pesado previamente. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo e a quantidade de óleo superficial determinada por diferença de peso.	ZHANG et al., (2012)
Ácido ascórbico	Gelatina tipo A (suína) e alginato	Uma quantidade conhecida de micropartículas contendo ácido ascórbico foi triturada num almofariz, transferida cuidadosamente para um balão volumétrico de 100 mL contendo água (pH = 7,4 mantido por uma solução tampão de fosfato) e mantida durante a noite, com agitação contínua, para dissolver o ácido ascórbico contido nas micropartículas. A solução foi recolhida e o ácido ascórbico presente no interior das micropartículas determinado empregando-se um espectrofotômetro. A eficiência de microencapsulação (%) foi calculada utilizando-se uma curva de calibração e a equação (1.4).	DEVI; KAKATI (2013)
		$E(\%) = \left(\frac{w_1}{w_2} \right) \times 100 \quad \dots (1.4)$	
		w_1 = massa de ácido ascórbico encapsulado em massa w_2 de micropartículas;	
		w_2 = massa conhecida de micropartículas.	
Ácido ascórbico	Gelatina e goma arábica	Eficiência de encapsulação foi determinada pela diferença entre a massa total de ácido ascórbico quantificada nas cápsulas e a quantificada na superfície. Solução de ácido oxálico a 1% (m/m) contendo 0,025% de 2,5-diclorofenolindofenol (DCFI)	COMUNIAN et al., (2013)

(m/v) foi utilizado para medir os níveis de ácido ascórbico por titulação. Aproximadamente 50 mg de DCFI foi dissolvido em 100 ml de água quente, contendo 42 mg de NaHCO₃. Esta solução foi diluída em 200 mL de água após resfriamento. Os tratamentos foram titulados em uma solução de ácido oxálico a 1% (m/m). A concentração de ácido ascórbico nas amostras foi calculada de acordo com a quantidade de solução consumida na titulação em comparação com a solução padronizada de DCFI. A Eficiência de microencapsulação, E(%) foi obtida através da equação (1.5).

$$E(\%) = \frac{(\text{ácido total} - \text{ácido na superfície}) \times 100}{\text{ácido total}} \quad \dots (1.5)$$

Após a determinação de um método analítico é necessário que seja feita sua validação, sendo este um passo importante para demonstrar que o método de análise sob investigação é adequado ao uso pretendido, assegurando a qualidade e confiabilidade nos resultados durante a rotina (RUELA et al., 2009).

Para a validação de um método espectrofotométrico é preciso primeiramente realizar um espectro de absorção para verificar a seletividade. No comprimento de onda de maior absorção realiza-se uma curva de calibração para investigar a linearidade que é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. É um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio de repetibilidade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão. Entende-se como repetibilidade ou precisão intracorrida: concordância entre os resultados em um curto período de tempo. Precisão intermediária ou precisão intercorridas: concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em diferentes dias, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor verdadeiro.

A robustez do método mede a sua estabilidade frente a pequenas variações e, se este não for afetado por estas variações, indica que o método é robusto (RIBANI et al., 2004; COSTA et al., 2012). O método também deve ser estável em diferentes condições de armazenamento e em um intervalo de tempo que permita que as análises sejam executadas por um período de até 24 horas representando menor custo e praticidade.

1.6 POTENCIAL ZETA E ESTEQUIOMETRIA

A coacervação complexa entre dois políons é dependente de vários parâmetros, sendo a condição mais importante que os íons possuam cargas opostas o suficiente para que ocorra a interação entre eles. Esta condição implica em um processo altamente sensível ao pH, em que as cargas dos políons mudam com os valores de pH (DUCEL et al., 2004).

Para determinar o valor de pH para o qual existe máxima interação entre os biopolímeros, ou seja, neutralização das cargas, faz-se necessário medir a mobilidade eletroforética das moléculas, que é a técnica mais aceita de medida indireta, a partir da qual é possível calcular o potencial zeta. Uma solução diluída é introduzida em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida movem-se na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado. O quociente de velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade eletroforética (DUCEL et al., 2004).

Conversão dos valores de mobilidade eletroforética para valores de potencial zeta é obtida multiplicando-se o valor de mobilidade eletroforética (ζ) por um fator de permissividade (ϵ) que depende da natureza do meio dispersante e considerando a viscosidade do meio de dispersão (η) como descrito pela equação de Smoluckowski (equação 1.6).

$$V = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad \dots (1.6)$$

A estequiometria de cargas entre os biopolímeros para determinada condição do meio, é um parâmetro importante na definição das quantidades mássicas a serem misturadas de cada um para que o balanço ideal seja atingido e a coacervação bem sucedida. O excesso de um dos polímeros leva a uma quantidade de cargas excedentes no sistema que pode prejudicar a formação do coacervado (SCHMITT et al., 1999).

A estequiometria de um complexo eletrostático depende da conformação e da carga global dos reagentes. Devido a limitações topológicas, proteínas globulares e cadeias de polissacarídeos aniônicos rígidos não conseguem contato entre todos seus grupos carregados. Ao contrário, estruturas de proteínas desdobradas (caseína, gelatina e algumas globulinas desnaturadas em meio ácido) tendem a formar o máximo contato com um polissacarídeo com carga oposta. No entanto, proteínas com uma estrutura desdobrada usualmente formam

complexos insolúveis eletricamente neutros, onde as cargas dos componentes são mutuamente neutralizadas (TOLSTOGUZOV, 2003). Em outras palavras, a quantidade de complexos neutros formados por uma proteína desdobrada e um polissacarídeo aniônico em complexos insolúveis é igual à fração de suas cargas. Isto significa que a estequiometria dos complexos depende do valor do pH do sistema e da proporção entre os reagentes macromoleculares, porém independe da quantidade inicial de reagentes macromoleculares. Assim, quando o pH diminui, os complexos insolúveis são enriquecidos com polissacarídeos aniônicos. Depois da precipitação de complexos insolúveis de uma composição constante correspondente a certo pH, o excesso de um biopolímero permanece em solução (TOLSTOGUZOV, 2003). A Figura 1.4 ilustra uma representação esquemática da evolução da turbidez ao longo da acidificação para um sistema hipotético, contendo uma proteína que interage com um polieletrólito forte (curva sólida) ou com um polieletrólito com pKa fixo em pH = 2,0 (curva pontilhada) (MATTISON et al., 1999; WEINBRECK et al., 2003).

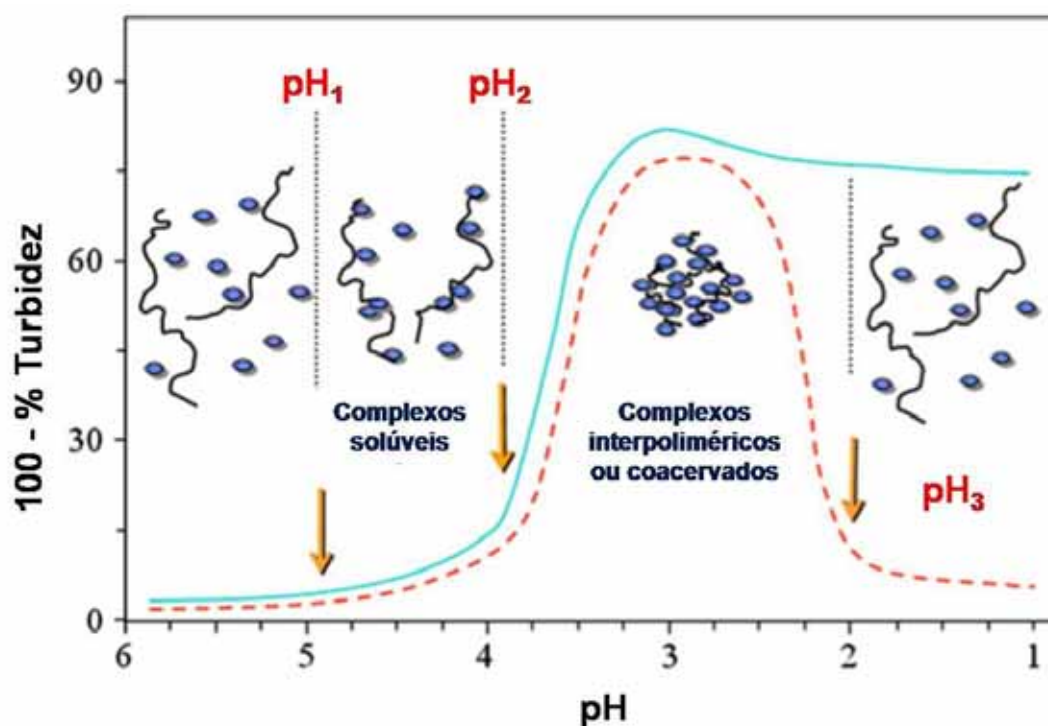


Figura 1.4 Representação esquemática da evolução da turbidez ao longo da acidificação para um sistema hipotético, contendo uma proteína que interage com um polieletrólito forte (curva sólida) ou com um polieletrólito com pKa fixo em pH = 2,0 (curva pontilhada). pH1, indica a formação de complexos solúveis, pH2 indica a formação de complexos interpoliméricos ou coacervados e pH3 indica o pKa do polissacarídeo e a consequente dissociação dos complexos. (Adaptado de MATTISON et al., 1999; WEINBRECK et al., 2003).

1.7 MICROSCOPIA

A microscopia é uma técnica que pode ser usada para uma melhor explicação das propriedades físicas bem como das medidas reológicas e de textura dos alimentos (AGUILERA, 2000).

Avanços na tecnologia computacional e o desenvolvimento de programas de análise mais sofisticados têm permitido uma rápida análise de imagens de microestrutura, permitindo a obtenção de informações como área, comprimento, volume, formas entre outras dos diferentes componentes de cada sistema.

O método comumente empregado para a caracterização das microcápsulas é o da microscopia ótica, por ser um método simples, econômico e rápido, que fornece as primeiras diretrizes sobre o processo de encapsulação. A análise morfológica das microcápsulas é essencial para observar visualmente se ocorreu a formação destas, a integridade das paredes e a distribuição de tamanho das mesmas e do material encapsulado. As microscopias ótica e eletrônica de varredura estão entre os métodos mais importantes para caracterização das microcápsulas e posterior avaliação do processo de encapsulação, junto a outros métodos como por exemplo: a) análise térmica; b) analisador de tamanho de partículas; c) cromatografia e espectroscopia; d) compressão estática; e) mobilidade eletroforética; f) a cromatografia e a espectroscopia; que avaliam, respectivamente, as estruturas gerais, externas e internas; a estrutura fina; tamanho da partícula; a composição da parede e do material interno; a resistência ao cisalhamento; a mudança de peso; o comportamento de liberação (ROCHA, 2009).

1.8 REOLOGIA

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento dos materiais. Existem três maneiras de deformar uma substância: cisalhamento, extensão e compressão.

A relação específica que se desenvolve entre a tensão aplicada e a deformação resultante para um determinado material pode ser expressa em termos de suas propriedades reológicas. Assim, esses dois parâmetros mecânicos (a tensão e a deformação) formam a base para a classificação dos materiais – sob o ponto de vista reológico – em três grupos principais:

elásticos, plásticos e viscosos (VÉLEZ-RUIZ, 2002). Nos processos de engenharia, dados de viscoelasticidade podem ser muito úteis no entendimento de vários problemas (STEFFE, 1996).

De acordo com Steffe (1996) e Vélez-Ruiz (2002) existem numerosos tópicos de interesse na indústria de alimentos que se relacionam à reologia:

- Aplicação e cálculos da engenharia de processos, envolvendo o projeto de uma grande variedade de equipamentos, tais como tubulações, bombas, extrusores, misturadores, trocadores de calor, viscosímetros e outros;
- Caracterização física de sólidos, líquidos e semi-sólidos;
- Desenvolvimento de novos produtos e reformulação;
- Controle de qualidade de produtos finais ou intermediários;
- Testes de vida de prateleira;
- Avaliação da textura correlacionando com a avaliação sensorial;
- Compreensão da estrutura dos materiais.

Métodos microscópicos têm sido amplamente utilizados para descreverem a formação de estruturas pela interação entre proteínas e polissacarídeos em combinação com a caracterização reológica (DOUBLIER et al., 2000).

Exemplos particularmente importantes da funcionalidade entre proteínas e polissacarídeos são a capacidade de alterar as características de escoamento de fluidos e interagir quando hidratados com outras espécies moleculares dispersas ou dissolvidas que se ligam, podendo quelar, complexar, emulsificar, encapsular, flocular, estabilizar ou suspender-se (RICHARDSON; KASAPIS, 1998).

Devi e Kakati (2013) estudaram a formação de microcápsulas de gelatina A e alginato para encapsular ácido ascórbico através da reologia do sobrenadante. Esses autores avaliaram a variação da viscosidade em diferentes concentrações de gelatina e alginato. A viscosidade mínima observada foi quando a gelatina representava 77,77 % (m/v) sendo provável que nessa concentração existe a máxima reação entre os dois biopolímeros resultando na formação dos complexos eletrolíticos. Isso se dá pelo fato da concentração dos biopolímeros na fase sobrenadante ser a mínima possível. Associado a testes de turbidimetria, esses autores

concluíram que a proporção ótima entre gelatina A e alginato para obtenção de coacervados é de 3,5:1.

A estrutura molecular do polissacarídeo tem um efeito importante sobre a capacidade de gelificação ou do coacervado formado quando em solução. Weinbreck et al. (2004) estudaram as propriedades reológicas de coacervados de proteína de soro de leite/goma arábica em função do pH e observaram que o pH desempenha um papel importante na viscosidade da fase coacervada. Uma viscosidade máxima foi encontrada em pH 4,0, que é o pH no qual as interações eletrostáticas entre a proteína e o polissacarídeo foram mais fortes. Atribuiu-se às interações eletrostáticas entre proteínas do soro e goma arábica o elevado comportamento viscoso dos coacervados. De fato, misturas de mesma composição em proteína do soro e goma arábica mas em pH acima do ponto isoelétrico mostrou um comportamento mais elástico que viscoso. Do ponto de vista reológico, concluíram que a fase coacervada se comporta mais como uma dispersão de partícula viscosa do que uma solução de polímero viscoelástico concentrada.

A viscosidade máxima dos coacervados nas condições de mistura que conduziram à completa neutralização de carga dos dois biopolímeros também foi observada em mistura de β -lactoglobulina e goma arábica (SCHMITT; KOLODZIEJCZYK; LESER, 2005). Neste caso, um efeito adicional de tempo foi descrito, de forma que após 48 horas os coacervados evoluíram para uma fase mais elástica. Este comportamento pode ser devido à reorganização das moléculas de proteínas ao longo das cadeias de polissacarídeos. Quando foram usados polissacarídeos menos globulares que a goma arábica como pectinas ou goma xantana que são bastante lineares, os coacervados foram descritos como sendo mais semelhante a gel. Assim, é possível concluir que a estrutura de cada polissacarídeo influencia nas propriedades reológicas dos coacervados finais (TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007).

1.9 TAMANHO DAS PARTÍCULAS

A coacervação é um método físico-químico de separação de fases, que resulta em partículas normalmente de 2 a 1200 μm (GHOSH, 2006). É considerado um método simples e de baixo custo (BANSODE et al., 2010) de alta eficiência para encapsulação de drogas e de grande controle do tamanho das partículas observado pela estreita distribuição de tamanho das

mesmas (YEO; BAEK; PARK, 2001) porém pode ocorrer agregação de microcápsulas e dificuldade para produção em grande escala (TAKADA et al., 1995).

Saravanan e Rao (2010) ao produzirem microcápsulas de pectina/gelatina e alginato/gelatina para microencapsulação de metronidazol, diclofenaco sódico e indometacina nas mesmas condições, obtiveram partículas de diferentes tamanhos. O diâmetro médio das microcápsulas de metronidazol foi o menor, sendo 45 μm e 41 μm para pectina-gelatina e alginato-gelatina, respectivamente. Para diclofenaco sódico foi 94,6 μm e 82,3 μm e para indometacina foi 120,94 μm e 110,64 μm para pectina-gelatina e alginato-gelatina, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, J. M. Microstructure and Food Product Engineering. **Food Technology**. v. 54(11), p. 56-65, 2000.
- ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30(4), p. 1069-1076, 2010.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16(1), p. 89-97, 2005.
- BANSODE, S.S; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, p. 38-43, 2010.
- BINSI, P. K.; SHAMASUNDAR, B. A.; DILEEP, A. O.; BADI, F.; HOWELL, N. K. Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthushamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 132-145, 2009.
- BUENO, C. M.; ALVIM, I. D.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; PORTELLA, M. C.; GROSSO, C. R. F. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14(1), p. 65-73, 2011.
- BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 48(5), p. 361-377, 2008.
- CLARK, D. E.; GREEN, H. C. **Alginic acid and process of making same**. US Patent 2036922, 1936.
- CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B.; NISHINARI, K.; WATASE, M. Shear Modulus-Concentration Relationships for Biopolymer Gels. Comparison of Independent and Cooperative Crosslink Descriptions. In: BURCHARD, W.; ROSS-MURPHY, S. B, (Ed), **Physical Networks: Polymers and Gels**, Elsevier Applied Science. p. 209-219, 1990.

- COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; MATOS JUNIOR, F. E.; BALIEIRO, J. C. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, p. 373-379, 2013.
- COSTA, M. A. B.; RICCI-JÚNIOR, E.; SANTOS, E. P.; MANSUR, C. R. E.; CAMPOS, V. E. B. Desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de sulfasalazina em suspensão oral: comparação do método espectrofotométrico e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**, v. 35(4), p. 808-813, 2012.
- DEVI, N.; KAKATI, D. K. Smart porous microparticles based on gelatin / sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 193-204, 2013.
- DONG, Z. J.; TOURE, A.; JIA, C. S.; ZHANG, X. M.; XU, S. Y. Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v. 24(7), p.634–646, 2007.
- DOUBLIER, J. -L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 202-214, 2000.
- DRUCKER, D. J. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. **Molecular Endocrinology**, v. 17, p. 161-171, 2003.
- DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2004.
- EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 319-341, 2002.
- ERTESVÁG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.

- FUJIWARA, G. M.; KAMINSKI, G. T. A.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B.; TIBERIO, C. C.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W. Comparação entre os perfis de liberação de azul de metileno a partir de micropartículas de alginato-quitosana em pH ácido. **Visão Acadêmica**, v. 11(2), 2010.
- FUJIWARA, G. M.; CAMPOS, R.; COSTA, C. K.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MARQUES, F. A.; ZANIN, S. M. W. Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49(3), p. 537-547, 2013.
- GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, p. 161-182, 1988.
- GAN, C-Y.; CHENG, L-H; EASA, A. M. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 563-569, 2008.
- GAVA, A. J. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.
- GHOSH, S. K. Functional coatings and microencapsulation: a general perspective. In: GHOSH, S. K. (Ed.), **Functional Coatings: by Polymer Microencapsulation**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, p. 1-28, 2006.
- GILSENAN, P. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 191-195, 2000.
- GONSALVES, J. K. M. C.; COSTA, A. M. B.; DE SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. H.; NUNES, R. S. Microencapsulação do óleo essencial de Citrus sinensis (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5(11), p. 1-8, 2009.
- ISLAM, A. M.; PHILLIPS, G. O.; SLJIVO, A.; SNOWDEN, M. J.; WILLIAMS, P. A. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 11(4), p. 493-505, 1997.
- JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the Food Industry. **Food Science and Technology – LWT**, v. 24(4), p. 289-297, 1991.
- KASAPIS, S.; MORRIS, E. R.; NORTON, I. T.; BROWN, C. R. T. **Carbohydrate Polymers**, v. 21, p. 261-268, 1993.

- KIM, J. C.; LEE, H. Y.; KIM, M. H.; LEE, H. J.; KANG, H. Y.; KIM, S. M. Preparation and characterization of chitosan/gelatin microcapsules containing triclosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, p. 52-56, 2006.
- LISBOA, A. C. V. C.; VALENZUELA, M. G. S.; GRAZIOLI, G.; DÍAZ, F. R. V.; SOGAYAR, M. C. Polymeric microcapsules production from sodium alginic acid for cell therapy. **Materials Research**, v. 10(4), p. 353-358, 2007.
- LV, Y.; ZHANG, X.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 225-233, 2012.
- MATTISON, K. W.; WANG, Y.; GRYMONTPRÉ, K.; DUBIN, P. L. Micro and Macro phase behavior in protein-polyelectrolyte complexes. **Macromolecular Symposia**, v. 140, p. 53-76, 1999.
- MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, v. 21(4), p. 305-310, 2011.
- NAKAGAWA, K.; NAGAO, H. Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin-acacia complex coacervation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 411, p. 129-139, 2012.
- NEKLYUDOV, A. D. Nutritive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39(3), p. 229-238, 2003.
- NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILHO, C. J. C. Microencapsulation of própolis extract by complex coacervation. **Food Science and Technology - LWT**, v. 44, p. 429-435, 2011.
- POURNARAS, D. J.; LE ROUX, C. W. Obesity, gut hormones, and bariatric surgery. **World Journal of Surgery**, v. 33, p. 1983-1988, 2009.
- REMUNÁN-LÓPEZ, C.; BODMEIER, R. Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 135, p. 63-72, 1996.

- RENARD, D.; VAN DE VELDE, F.; VISSCHERS, R. W. The gap between food gel structure, texture and perception. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 423-431, 2006.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, H. C.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27(5), p. 771-780, 2004.
- RICHARDSON, R. K.; KASAPIS, S. **Rheological methods in the characterization of food biopolymers**. In: WETZEL, D.; CHARALAMBOUS, G., (Ed). Instrumental Methods in Food and Beverage Analysis. London: Elsevier Science, 1998.
- RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.
- RIX, A. Gelling and whipping agents. In Jackson, E. B. **Sugar Confectionery Manufacture**. New York: Van Nostrand Reinhold, Glasgow; Blackie, 1990.
- ROCHA, G. A. **Produção, caracterização, estabilidade e aplicação de microcápsulas de licopeno**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP. Campinas, 2009.
- ROSS-MURPHY, S. B. Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions. **Journal of Rheology**, v. 39(6), p. 1451-1463, 1998.
- RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro. **Química Nova**, v. 32(1), p. 165-168, 2009.
- SACCHETIN, P. S. C.; MORAES, A. M.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v. 33(2), p. 263-268, 2010.
- SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 808-816, 2010.

- SCHMITT, C.; SANCHES, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and techno functional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 38(8), p. 689-753, 1998.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 483-496, 1999.
- SCHMITT, C.; KOLODZIEJCZYK, E.; LESER, M. E. Interfacial and foam stabilization properties of β -lactoglobulin-acacia gum electrostatic complexes. In: DICKINSON, E., (Ed.). **Food Colloids: Interactions, Microstructure and Processing**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, p. 289-300, 2005.
- SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, p. 63-70, 2011.
- SCHOLTEN, E.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Biopolymer composites for engineering food structures to control product functionally. **Food Structure**, v. 1(1), p. 39-54, 2014.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33(6), p. 501-547, 1993.
- SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T. Evaluating conditions for the formation of chitosan/gelatin microparticles. **Polímeros**, v. 19(2), p. 133-137, 2009.
- SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 71-78, 1990.
- STEFFE, F.L. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, Freeman Press, East Lansing, 1996. 418 p.
- STRADER, A. P. Ileal transposition provides insight into the effectiveness of gastric bypass surgery. **Physiology & Behavior**, v. 88, p. 277-282, 2006.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7(2), 2006.

- TAKADA, S.; UDA, Y.; TOGUCHI, H.; OGAWA, Y. Application of a spray drying technique in the production of TRH-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 49, p. 180-184, 1995.
- TEIXEIRA, C. B.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; da SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. da C. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 575-581, 2013.
- THIES, C. (Ed.). Complex Coacervation Characterization. In: **HOW to make microcapsules: combined lecture and laboratory manual**, Thies Technology, St. Louis, Missouri, 1994.
- THIES, C. **Microcapsules**. Washington University. Elsevier Science Ltd., p. 3892-3903, 2003.
- TOLSTOGUZOV, V. B. In: MITCHELL, J. R.; LEDWARD, D. A., (Ed.). **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier, p. 385-415, 1986.
- TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 1-23, 2003.
- TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, p. 166-178, 2007.
- VÉLEZ-RUIZ, J. Relevance of rheological properties in food process engineering. In: WELTI-CHANES, J.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; AGUILERA, J. M. **Engineering and Food for the 21st Century**. Boca Raton, CRC Press, p. 307-326, 2002.
- VINAYAHAN, T.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Electrostatic interaction and complex formation between gum Arabic and bovine serum albumin. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 3367-3374, 2010.
- WEINBRECK, F.; de VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; de KRUIF, C. G. Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 293-303, 2003.

WEINBRECK, F.; WIENTJES, R. H. W.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G. W.; de KRUIF, C. G. Rheological properties of whey protein/gum Arabic coacervates. **Journal of Rheology**, v. 48, p. 1215-1228, 2004.

YEO, Y.Ç.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 213-230, 2001.

ZHANG, K.; ZHANG, H.; HU, X.; BAO, S.; HUANG, H. Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 61-66, 2012.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de óleo de palma em microcápsulas produzidas por coacervação complexa

Trabalho submetido à revista Química Nova.

Development and validation of analytical method for palm oil determination in microcapsules produced by complex coacervation

Paulo H. M. Marfil^{a,b*}, Felipe H. T. Vasconcelos^a, Márcia H. Pontieri^c and

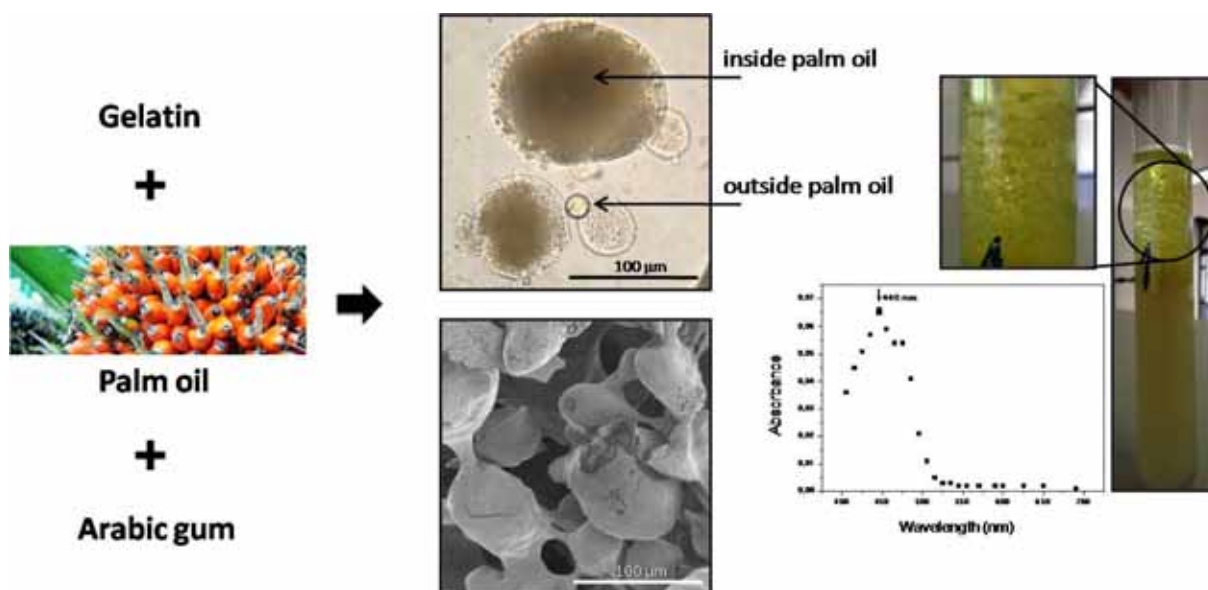
Vânia R. N. Telis^b

^a Department of Food Engineering - Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), 38064-200, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

^b Department of Food Engineering and Technology - São Paulo State University (UNESP), 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

^c Department of Sugar Ethanol Technology – Federal University of Paraíba (UFPB), 58055-000, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Graphical Abstract



Development and validation of a spectrophotometric method to be used in the determination of the microencapsulation efficiency of palm oil by complex coacervation.

ABSTRACT

Microencapsulation of palm oil may be a mechanism to protect and promote controlled release of its bioactive compounds. For optimization of the microencapsulation process, it is necessary to accurately quantify the palm oil present externally and internally to the microcapsules. This work aimed at developing and validating a spectrophotometric method to be used in the determination of the microencapsulation efficiency of palm oil by complex coacervation. Gelatin and gum arabic (1:1) were used as wall material, in a concentration of 5% (w/v), with palm oil, in the same concentration. The coacervates were obtained at pH 4.0 \pm 0.1, decanted for 24 hours, frozen (-40°C) and lyophilized for 72 hours. First, the extraction of external palm oil through five successive washes with organic solvent was standardized. Next, the best method to accomplish the rupture of the microcapsules was investigated. Through successive extractions with hexane, it was possible to determine the amount of palm oil contained internally. Measurements were made in a spectrophotometer and the proposed method showed to be of low cost, fast, and easy to implement. In addition, the validation step allowed us to observe that the method is safe and reliable, since it proved to be specific, accurate, precise, and robust.

Keywords: palm oil, gelatin, gum arabic, encapsulation, spectrophotometry.

2.1 INTRODUCTION

The stimulation of ileum by poorly digested foods releases gut hormones, whose actions interfere positively in the control of obesity and in its associated metabolic disorders, especially in peripheral insulin resistance (STRADER, 2006). Microencapsulation of palm oil by complex coacervation can be an alternative to the transport of this nutrient to ileum without being digested, which stimulates the production of intestinal hormones. This may be a prospective treatment for type 2 Diabetes Mellitus (DM), a metabolic disorder characterized by hyperglycemia and the excretion of glucose excess in the urine. Microencapsulation of palm oil can also be used as an alternative method for weight reduction.

Microencapsulation is capable of protecting a compound and promoting its controlled release, being a process of great importance in pharmaceutical and food industries. The complex coacervation is based on the associative interaction that can occur when mixing solutions of oppositely charged biopolymers. The first step in the process of microencapsulation by complex coacervation consists in the emulsification of the core material (active compound), usually an oily phase, in an aqueous solution of the biopolymer blend (wall material). The conditions of the environment (pH, ionic strength, temperature) are then changed in order to promote coacervation, which leads to deposition of the newly formed coacervate around the core material, building a protective biopolymer capsule (GOUIN, 2004; SILVA et al., 2012).

For optimization of the microencapsulation process, it is necessary to quantify the core material located inside the microcapsules. Some authors proposed the determination of the core material losses in the complex coacervation process by washing the homogenizer rod and the weighing beaker with organic solvent, and then quantifying the active compound using spectrophotometry (ALVIM; GROSSO, 2010). Another possibility is to perform the washing of the microcapsules with organic solvent and, after its evaporation, weigh the non-microencapsulated oil. Subsequently, the same samples are submitted to a Soxhlet extraction, the solvent evaporates, and the material is weighed to quantify the microencapsulated oil. Thus, it is possible to quantify the microencapsulated and non-microencapsulated active material and estimate losses during process (CALVO et al., 2012).

In spite of the variety of methods applied to evaluate the microencapsulation efficiency through quantification of the core material allocated inside and outside the

capsules, there is lack of standardization of the applied methodologies. Therefore, the objective of the present study was to develop and to validate an analytical method that is accurate for quantifying palm oil present externally and internally to the microcapsules produced by gelatin-gum arabic complex coacervation, besides being easy to use and cost-effective.

2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 Material

Palm oil was microencapsulated by complex coacervation using bovine skin gelatin (240 *bloom*) (Gelita, Mococa, Brazil) and gum arabic (Synth, Diadema, Brazil) as wall material. The pH adjustment for encapsulation was carried out with hydrochloric acid solution (0.5 M) (Impex, Diadema, Brazil).

Buffer solutions at different pH were prepared using potassium hydrogen phthalate ($C_8H_5O_4K$) 0.1 M (Impex, Diadema, Brazil), potassium phosphate (KH_2PO_4) 0.1 M (Êxodo Científica, Hortolândia, Brazil), sodium hydroxide (NaOH) 0.1 M (Proquímios, Rio de Janeiro, Brazil), ammonia (NH_3) 1 M (Impex, Diadema, Brazil), ammonium chloride (NH_4Cl) 1 M (Proquímios, Rio de Janeiro, Brazil), and hydrochloric acid (HCl) 0.1 M, all analytical grade reagents. Hexane (Dinâmica, Diadema, Brazil) was used as solvent for the extraction of palm oil. The materials were weighed on an analytical balance (MARCONI / JK 200).

Two commercial palm oils were used for specificity tests: Hemmer[®] (Blumenau, Santa Catarina, Brazil), and Marabá[®], palm oil export quality, containing 25% of soybean oil (Mauá, São Paulo, Brazil).

2.2.2 Methods

2.2.2.1 Production of palm oil microcapsules

The methodology used to obtain the microcapsules by complex coacervation is schematized by the flowchart in Figure 2.1. Gelatin and gum arabic were used in the same

proportion, and the quantity of total polymer was fixed in 5.0 % (w/v) on a dry basis. The ratio between the quantity of filling (palm oil) and wall materials was 1:1. The gelatin solution was heated to 50 ± 3 °C, followed by homogenization in a disperser (IKA, T25D Ultra-Turrax, Germany) at 15,000 rpm, for 5 minutes, to obtain complete dissolution. Then, gum arabic solution (50 ± 3 °C) and water (twice the volume of the system) were added in a magnetic stirrer. Temperature was controlled (50 ± 3 °C) throughout the process. HCl (0.5 M) was used to adjust pH (4.0 ± 0.1), using a digital pH meter meter (Tecnal, TEC-3MP, Brazil) and the system was immersed in an ice bath, keeping constant agitation to slow cooling, until 10 ± 2 °C. The system was covered with aluminum foil to protect it from light and was kept in a refrigerator (5 °C) for 24 hours to complete precipitation of the microcapsules produced. Subsequently, excess of water was eliminated; the decanted particles were arranged in aluminum trays and frozen in ultra-freezer (Liobrás, FV 500, Brazil) at -40 °C, for 24 hours. Drying was carried out by lyophilization. The samples remained in the lyophilizer (Liobrás, L101, Brazil), for 72 hours. Then, the samples were ground in a mortar, wrapped for protection against the light, and stored in a desiccator for the tests.

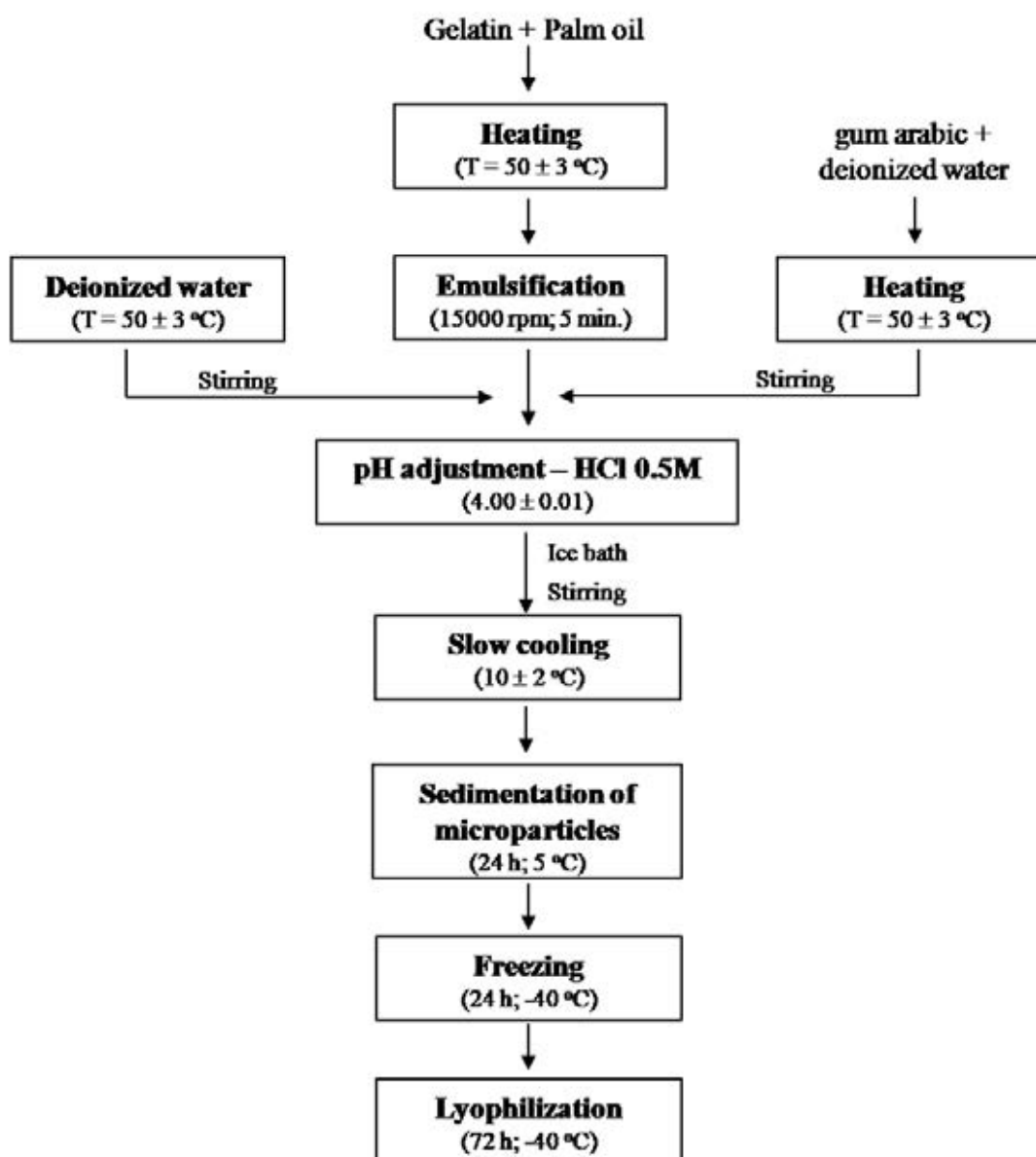


Figure 2.1 Flowchart of the production of palm oil microcapsules by complex coacervation.

2.2.2.2 Morphology of palm oil microcapsules

The morphology of the palm oil microcapsules was analyzed by light microscope (Bioval - São Paulo, Brazil) coupled with a Sony Cyber-shot camera (DSC-W150), 8.1 mega pixels. The microcapsule samples were spread over glass slides and were coated with cover slips.

Ultrastructural analysis was carried out with a scanning electron microscope (SEM). The lyophilized samples were placed in a sample holder under carbon tape and metalized with

a thin layer of gold and palladium (Polaron, SC7620 Sputter, UK). The SEM analysis was conducted in a Scanning Electron Microscope 400L Magellan XHR (SEM Electron Microscopy Ltd., US) using voltage of 2.0 kV, in the Laboratory of Structural Characterization (LCE) of the Department of Materials Engineering (DEMa) from the Federal University of São Carlos (UFSCar).

2.2.2.3 Choice of solvent and selection of optimum wavelength

Ethanol and hexane were tested as potential solvents for palm oil through qualitative assays. A sample of palm oil was put into a test tube with 10 mL of each solvent and stirred for 2 minutes for complete dissolution.

For selection of the optimum wavelength, a solution was prepared with palm oil and hexane ($1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and the absorption spectrum was determined from 400 to 690 nm in UV-visible spectrophotometer (Hach, DR/2010, USA). The same absorption spectrum was determined for a sample of 0.2 g of microcapsules without palm oil, produced according to the flowchart of Figure 2.1.

2.2.2.4 Solubility of microcapsules

Palm oil microcapsules (0.2 g) were stirred in acetic acid, in heated water at 60 °C, or in sodium hydroxide solution (pH = 12), for one minute and, then, 10 mL of hexane was used for palm oil extraction. Assays were performed in triplicate and analyzed qualitatively.

2.2.2.5 Choice of the best pH for palm oil releasing

A 0.1 g sample of the microcapsules was placed in a separatory funnel (125 mL) with 10 mL of buffer of specific pH and stirred for one minute. Then, 5 mL of hexane was added and, again, stirred for one minute. The system was set aside until total segregation. Aqueous and organic phases (hexane + palm oil) were separated and the absorbance was read. Buffer pH was between 0.95 and 12.05.

2.2.2.6 Standardizing time and number of external washes of the microcapsules

A method of successive extractions was proposed to quantify palm oil present externally to the microcapsules (not microencapsulated).

To determine the time required for washing, 12 tubes containing 0.2000 ± 0.0023 g of sample and 5 mL of hexane were prepared. The tubes were divided into four groups. The first group was stirred for 30 s, the second for 1.0 min., the third for 1.5 min., and the last for 2.0 min., continuously.

After stirring, the organic phase was transferred to a 25 mL volumetric flask and the volume was completed with hexane. Absorbance measurements were performed to quantify the palm oil extracted from the outside of the microcapsules using UV-visible spectrophotometer (Hach, DR/2010, USA) at a wavelength of 446 nm.

2.2.2.7 Disruption standardization procedure and number of extractions of microcapsules

To determine the number of extractions necessary for rupturing the capsules, 0.2 g of sample, 5 mL of buffer ($\text{pH} = 9.5 \pm 0.1$), and 5 mL of hexane were added to five tubes and stirred for 1 minute. The organic phase was removed and subjected to absorbance reading at 446 nm. Then, 5 mL of hexane was added again and the process was repeated until the sixth extraction.

2.2.2.8 Validation of proposed analytical methodology

The validation parameters of the proposed analytical procedure were performed according to recommendations of the current legislation of Resolution RE 899, of May 25, 2003 (ANVISA, 2003) and of the document DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2003), according to Category I "quantitative tests for determination of active ingredient in pharmaceutical products or raw materials." Thus, specificity, linearity and range, precision (repeatability), intermediate precision (interday precision), accuracy, and robustness were evaluated.

2.2.2.8.1 Specificity

Samples of 0.2030 ± 0.0010 g of microcapsules produced without palm oil were subjected to the proposed analytical methodology. The organic phases obtained from the washing of the microcapsules and after the disruption had their absorption spectrum determined in the range between 400 and 690 nm, using a spectrophotometer (Hach, DR/2010, USA). Aliquots of 0.03 g of two commercial palm oil samples were dissolved in 25 mL of hexane and the absorption spectrum was determined in the same conditions. All assays were performed in duplicate.

2.2.2.8.2 Linearity and range

The linearity was evaluated from the preparation of calibration curves in the interval 200-3200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, for two different days. A stock solution was prepared by weighing approximately 0.5 g of the palm oil used for microencapsulation in a 10 mL beaker and transferred to a 25 mL volumetric flask using hexane as the solvent. The resulting stock solution had a concentration of 20,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and, from this, six dilutions were made with hexane in a volumetric flask of 10 mL, resulting in concentrations of 200, 400, 600, 800, 1600, and 3200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Each volumetric flask was stirred until complete mixing of the samples. Absorbance of each dilution was read at a wavelength of 446 nm, always starting from the most dilute to the most concentrated. The values obtained were used to establish the calibration curve, and the coefficient of determination (R^2) was used to assume linearity of points. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were determined from equations 2.1 and 2.2, using the data from the two analytical curves (ANVISA, 2003).

$$\text{LD} = s \left(\frac{3}{\alpha} \right) \quad \dots(2.1)$$

$$\text{LQ} = s \left(\frac{10}{\alpha} \right) \quad \dots(2.2)$$

where s is the standard deviation of the intercept with the y axis in the two calibration curves and α is the slope of the line.

2.2.2.8.3 Precision

To determine the intra-run precision (repeatability), six solutions were prepared at an intermediate concentration of the linearity curve ($1600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), by the same analyst, and the absorbance obtained in the spectrophotometer was used throughout all this study (Hach, DR/2010, USA). To determine the intermediate or inter-run precision (reproducibility), twelve replicates were prepared at a concentration of $1600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ by another analyst, and absorbance measurements were done in two different spectrophotometers (Instrutherm, UV-1000A and BIOSPECTRO, SP22). For both repeatability and intermediate precision, the coefficient of variation (CV), expressed by equation 2.3, was considered as the criteria for acceptance.

$$\text{CV} = \left(\frac{s}{\bar{X}} \right) 100\% \quad \dots(2.3)$$

where s is the standard deviation and \bar{X} the average of n measurements.

2.2.2.8.4 Accuracy

To determine the accuracy of the method, a known aliquot of palm oil was mixed with a known mass of empty microcapsules. External washing of this mixture was performed, as proposed, for determination of the external palm oil (non-microencapsulated oil). Assays were performed in triplicate ($n = 3$) and, using the calibration curve, the recovery percentage of the original palm oil was calculated.

2.2.2.8.5 Robustness and Stability

To determine robustness of the method, three spectrophotometers of different suppliers were used: HACH (DR/2010), Instrutherm (UV-1000A), and BIOSPECTRO (SP22). The stability of solutions was evaluated at room temperature ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) for 12, 24, and 36 hours and at different storage conditions. Solutions at a concentration of $1600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were prepared and stored in volumetric flasks, protected and non-protected from light.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

Figures 2.2A and 2.2B show the morphological characteristics of palm oil microcapsules obtained by complex coacervation in light and scanning electron microscopy, respectively.

The images reveal that the microcapsules are spherical, of varied sizes, present solid wall and have average diameter $284.74 \pm 207.26 \mu\text{m}$.

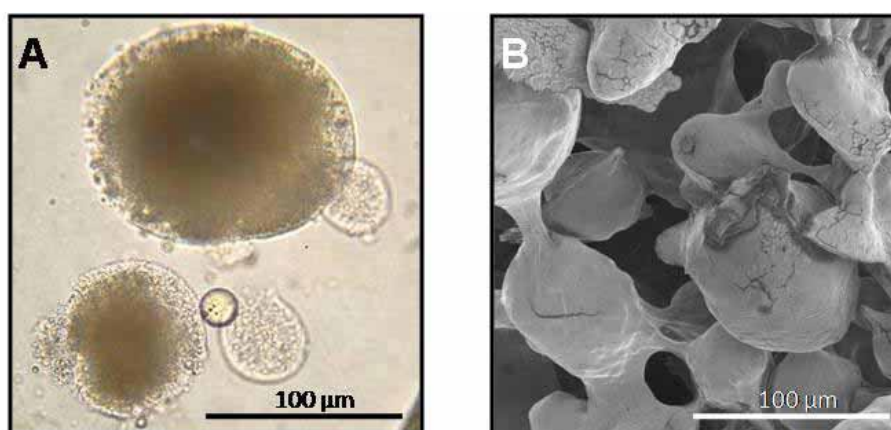


Figure 2.2 Micrographs of the microcapsules of palm oil produced by complex coacervation. **A)** Light microscopy. **B)** Scanning Electron Microscopy (2.0 kV).

2.3.1 Development of the analytical method for determination of palm oil in microcapsules produced by complex coacervation

2.3.1.1 Choice of solvent and selection of the optimum wavelength

The palm oil samples were analyzed visually for the occurrence of phase separation, after testing their solubility in ethanol and hexane. A single phase was obtained only in samples where the palm oil was dissolved in hexane, thus being chosen as the most suitable solvent. The optimum wavelength for palm oil detection in solution was determined as being 446 nm (Figure 2.3A).

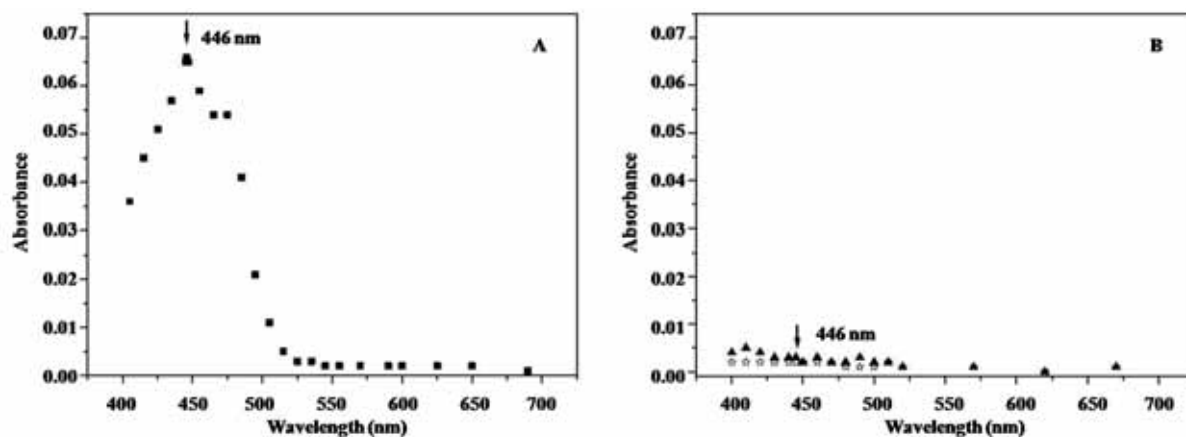


Figure 2.3 A) Absorption spectrum (400 to 690 nm) to determine the best wavelength for palm oil detection in solution ($1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). B) Absorption spectrum of the microcapsules without the addition of palm oil. (▲ = without disruption; ☆ = after disruption).

Microcapsules without the addition of palm oil were prepared and a sample of 0.2 g was subjected to extraction of the surface oil with hexane (without disruption of the microcapsules). This procedure was then followed by disruption of the capsules and extraction of the oil located inside them. The wall material did not interfere with the absorbance values over the entire range of wavelengths investigated, indicating that the wavelength of 446 nm can be used for quantification of palm oil (Figure 2.3B).

2.3.1.2 Solubility of microcapsules

After qualitative analysis of solubility tests, it was observed that, among the solvents studied, only the solution of NaOH ($\text{pH} = 12.1 \pm 0.1$) resulted in a yellowish solution due to the release of the microencapsulated palm oil. After these tests, the best pH for the rupture of the palm oil microcapsules was studied.

2.3.1.3 Choice of the best pH for palm oil releasing

Figure 2.4 shows a clear trend to higher solubility of the palm oil microcapsules at higher pH values. In pH of 12.1 ± 0.1 , the resulting solution showed high viscosity, which

prevented the separation of the solvent and made it difficult to measure absorbance. The pH of 9.5 ± 0.1 was, therefore, adopted to subsequent measurements.

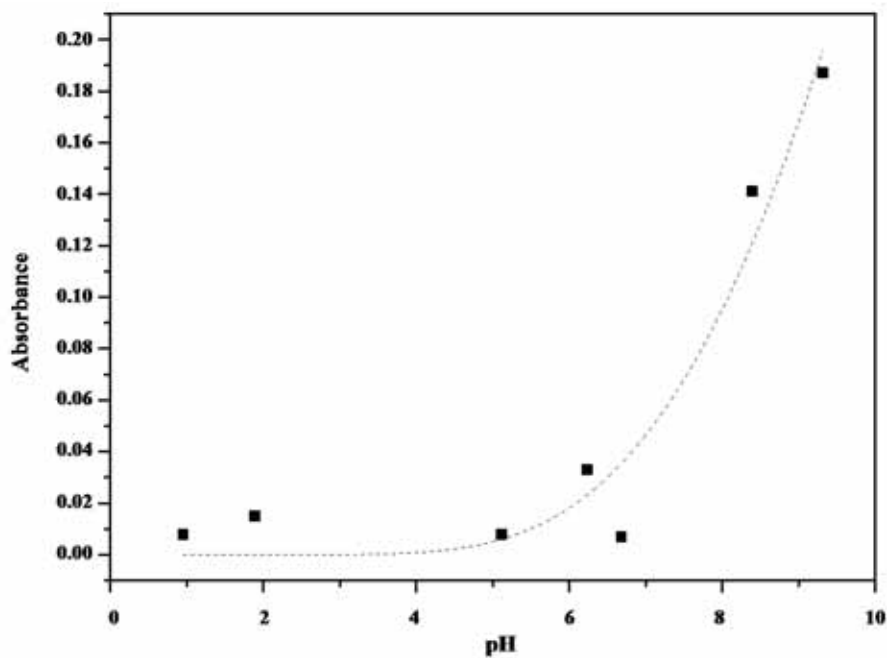


Figure 2.4 Influence of pH on solubility of the palm oil microcapsules.

The trend line shown in Figure 2.4 is the result of the adjustment of an exponential function (Equation 2.4) that best fit the experimental data ($R^2 > 0.95$).

$$y = 20.85e^{\frac{-45.8}{x+0.5}} \quad \dots(2.4)$$

2.3.1.4 Standardizing time and number of external washes of the microcapsules

After washing the microcapsules uninterruptedly from 30 seconds to 2.0 minutes, no significant difference ($p < 0.05$) was observed among absorbance values, showing that, for a period of up to two minutes, the microcapsules may be washed extracting the same amount of palm oil as in a shorter time interval (Table 2.1). These results indicate that the solvent is capable of solubilizing the non-microencapsulated oil without interacting with the filling of the microcapsules.

Table 2.1 Absorbance values as affected by the time of external washing of the microcapsules.

Time (min.)	Absorbance 1	Absorbance 2	Absorbance 3	Average ± standard deviation
0.5	0.033	0.034	0.034	0.034 ^a ±0.001
1.0	0.035	0.035	0.032	0.034 ^a ±0.002
1.5	0.034	0.037	0.036	0.036 ^a ±0.002
2.0	0.036	0.035	0.034	0.035 ^a ±0.001

^a values with same letter did not show significant difference, $p < 0.05$.

As microcapsules with significant amount of non-microencapsulated palm oil may be present, it is possible that only one wash results in saturation of the solvent without removing external palm oil entirely. Therefore, four washes of 30 seconds each were standardized and, in each extraction, the organic phase is removed to a 25 mL volumetric flask and a new aliquot of solvent (5 mL) is added. Thus, the total time of contact between solvent and sample does not exceed 2.0 minutes. After the extractions, hexane was used to complete the volume of the flasks (25 mL).

2.3.1.5 Disruption standardization and number of extractions of microcapsules

The absorbance data obtained after each extraction of microencapsulated palm oil is shown in Figure 2.5. After each new extraction, there is a gradual decrease in absorbance values, tending to zero after the sixth extraction. Qualitative analysis of this data allows us to observe that, after the second extraction, similar amounts of palm oil were extracted from inside the microcapsules for all the samples. On the other hand, in the first two extractions, it was observed that, in some samples, higher amounts of palm oil were extracted in the first wash than in the second one (Figure 2.6, tubes 1 and 3), whereas the other samples showed opposite behavior (Figure 2.6, tubes 2 and 4). This fact can be associated with the interaction between the buffer and the sample, which can result in a more viscous suspension, hindering the contact of the solvent with the entire sample. After data analysis and visual observation of the samples, two new steps were proposed to this extraction method. The first modification was related to the sequence of actions in the first extraction; rather than adding 5 mL of buffer and 5 mL of hexane and stirring for one minute, the sequence adopted started with addition of buffer, followed by stirring for one minute, subsequent addition of hexane, and finally stirring

for one minute. Thus, there is greater contact between the buffer and the sample. The second modification was to insert a new step after the second extraction, which consisted of adding 3 mL of buffer, followed by stirring for one minute, addition of hexane, and further stirring for one minute (Figure 2.7A). Thus, the objective was to facilitate the stirring process (decreasing viscosity) and increase the contact between the sample and the buffer, in order to maximize the microcapsules rupture and, hence, the extraction of microencapsulated palm oil, as can be visualized in detail in Figure 2.7A. After the sixth extraction, only a small quantity of solute was observed in the organic phase (Figure 2.7B).

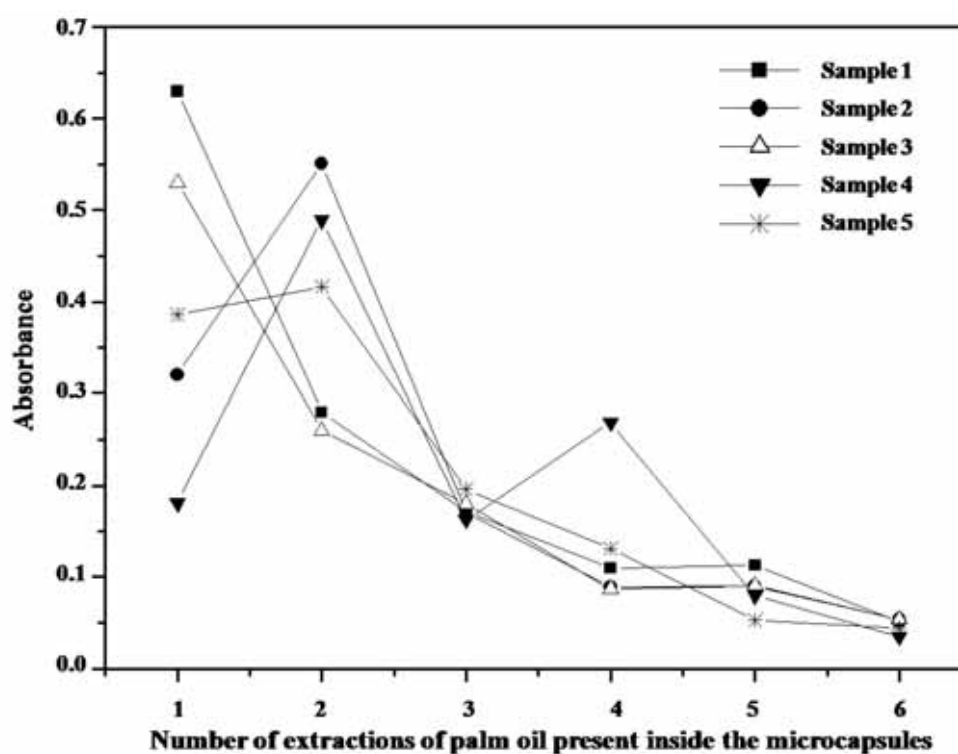


Figure 2.5 Absorbance values as affected by the number of extractions of palm oil present inside the microcapsules produced by complex coacervation.

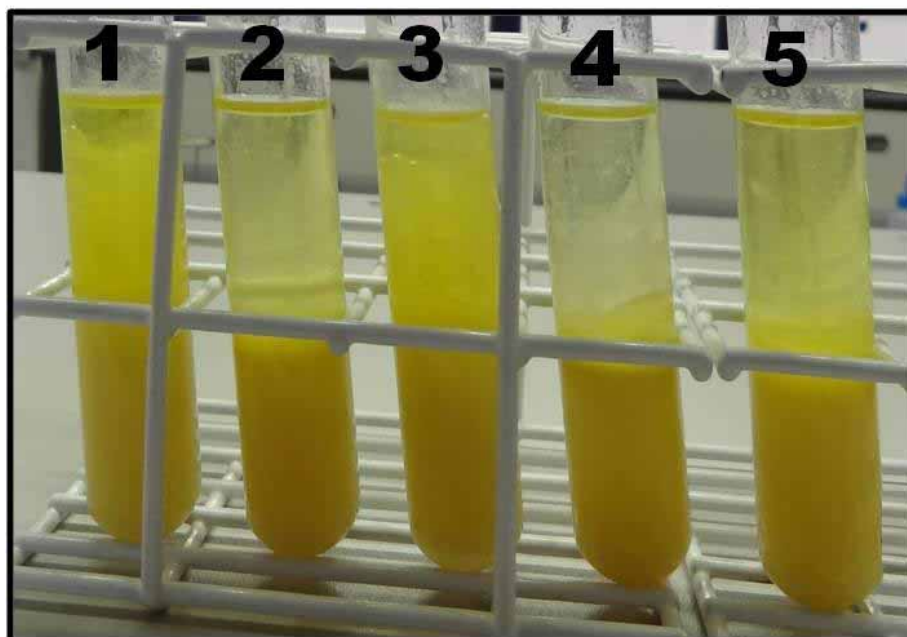


Figure 2.6 Palm oil microcapsules after first extraction with the addition of buffer (pH = 9.5) and hexane followed by stirring for one minute.

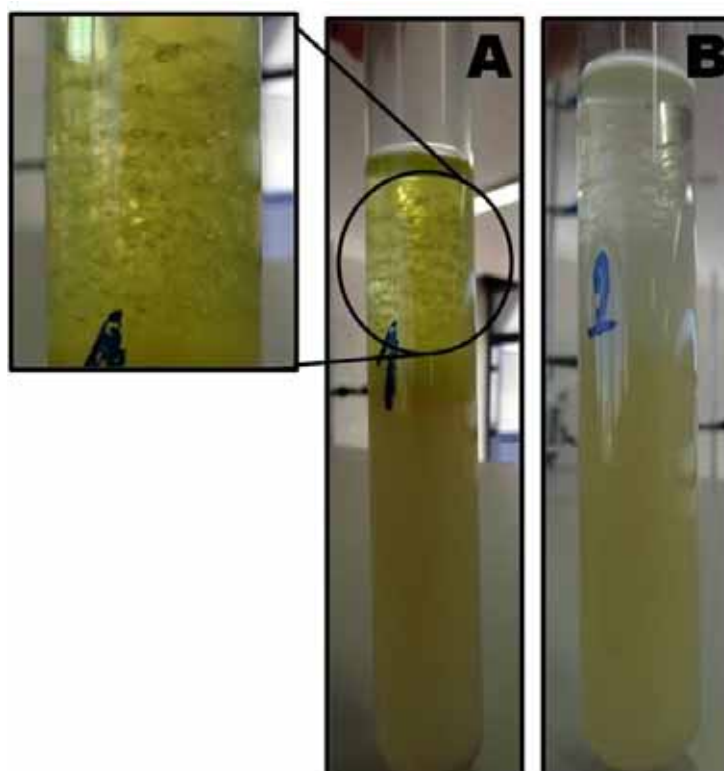


Figure 2.7 Microcapsules of palm oil after modification of the methodology proposed for disruption and quantification of the number of extractions. A) After the second addition of buffer, followed by stirring for one minute, addition of hexane, and further stirring for one minute. Featured detail of ruptured microcapsules. B) Samples of microcapsules after last extraction.

2.3.1.6 Validation of the analytical method

2.3.1.6.1 Specificity

The specificity of the spectrophotometric method proposed in the wavelength of 446 nm was confirmed, as the wall material of the microcapsules did not interfere in absorbance (Figures 2.3A and 2.3B). Moreover, Figure 2.8 shows the absorption spectra of palm oil of trademarks Marabá® and Hemmer®, in which it is possible to observe the highest value of absorbance at a wavelength of 446 nm for both samples. The absorbance values of trademark Marabá® were lower, since this oil presents 25% soybean oil in its composition.

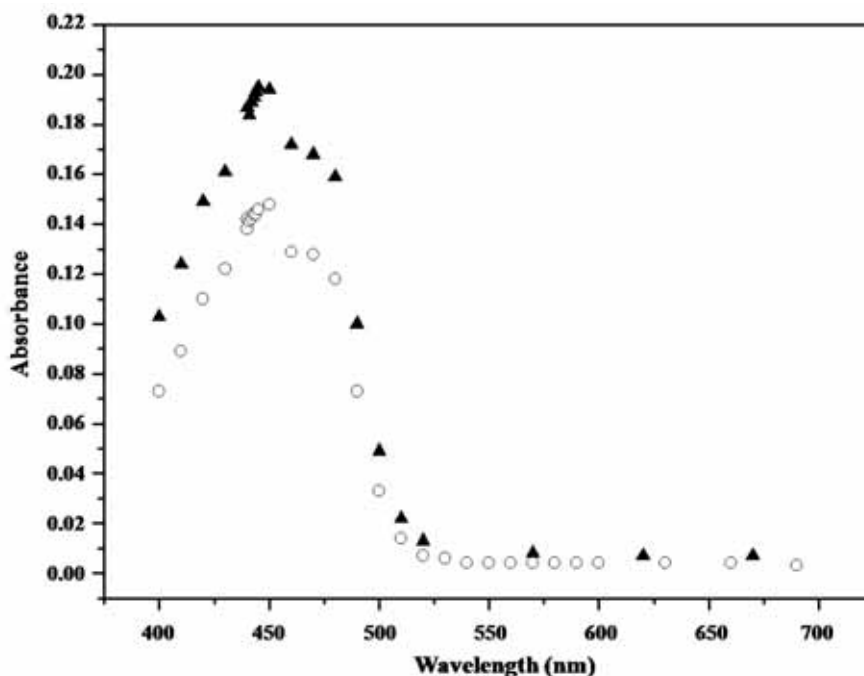


Figure 2.8 Absorption spectra (400 to 690 nm) of solutions of palm oil of two different brands. (○ = Marabá®; ▲ = Hemmer®).

2.3.1.6.2 Linearity and interval

The calibration curves showed correlation coefficient (r) higher than 0.9998, indicating a linear relationship between absorption and palm oil concentration (Figure 2.9). The values found for the lower limit of detection (LD) and lower limit of quantification (LQ) were 36.21 and 120.71 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. These two values were lower than the quantification value of the method (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), thus proving that it is suitable for the proposed objectives.

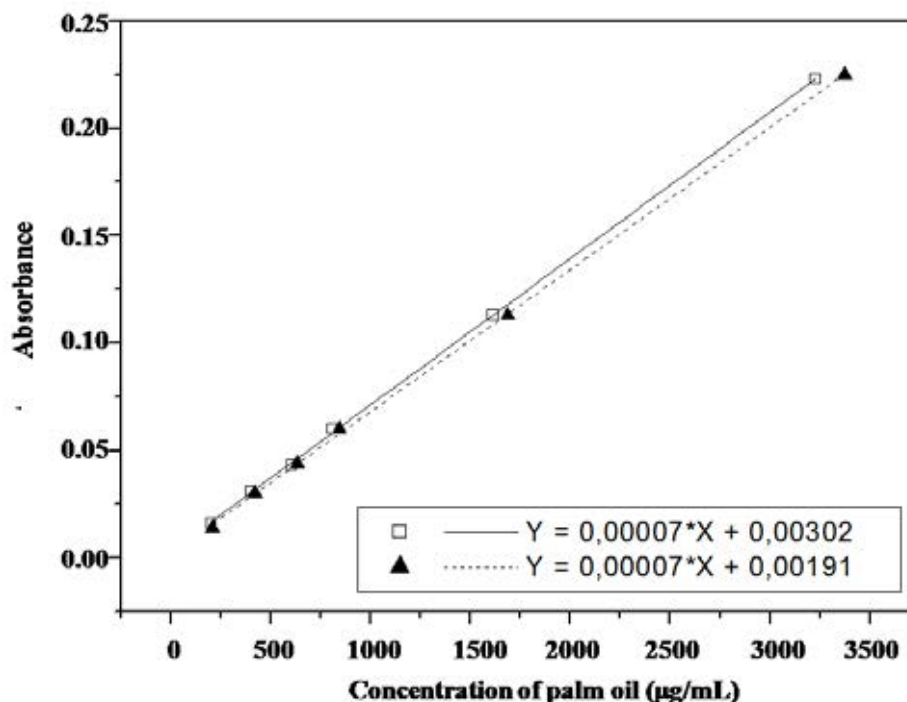


Figure 2.9 Calibration curve for palm oil solutions.

2.3.1.6.3 Precision

The analytical parameters of precision (repeatability) and intermediate precision (reproducibility) were evaluated using the coefficient of variation (CV) and both were considerably lower than 5 % (Table 2.2). These results are satisfactory according to RE 899 of May 29, 2003 (ANVISA, 2003). It can be stated that the method is precise intra-run and inter-run.

2.3.1.6.4 Accuracy

The result obtained for accuracy is shown in Table 2.2 and lies within the acceptance criteria, namely between 98 and 102 % (COSTA et al. 2012). A coefficient of variation (CV) of 0.98 % was observed, being lower than 5.0 % (ANVISA, 2003). According to the rules of the ICH (International Conference on Harmonization), the accuracy is confirmed as long as precision, linearity, and specificity are established. Thus, the proposed spectrophotometric method for quantifying the amount of palm oil present outside and inside the microcapsules is accurate, since the accuracy, the linearity, and specificities showed to be adequate (ICH, 2005).

2.3.1.6.5 Robustness and Stability

The robustness of the spectrophotometric method was demonstrated through the conditions employed in the intermediate precision test, using different analysts and equipment. The modifications did not change the results, which remained within the acceptance criteria, indicating that the method is accurate for both types of precision evaluated (Table 2.2).

The solutions stored in volumetric flask and volumetric flask protected from light for up to 36 hours at room temperature (25 ± 2 °C) showed stable absorbance values, allowing more convenience in the execution of the method.

Table 2.2 Results of validation of the spectrophotometric method for quantification of palm oil microencapsulated by complex coacervation.

Validation parameters	Spectrophotometric method
Linearity	$r=0.99989$ $r=0.99984$
LD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	36.21
LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	120.71
Repeatability (n=6)	CV = 1.50%
Intermediate precision (n=12)	CV = 3.86%
Accuracy (n=3)	$101.87 \pm 0.99\%$

2.4 CONCLUSIONS

It was possible to quantify the palm oil present externally through successive extractions with hexane and absorbance reading at 446 nm. It was also possible to rupture the microcapsules using buffer at pH 9.5 ± 0.1 and to quantify the core material through six extractions with the same solvent. The proposed analytical method meets the guidelines of the current legislation, being economical, quick, easy to perform, and suitable for the purposes.

Acknowledgment

Authors acknowledge São Paulo Research Foundation - FAPESP (Grants 2010/09614-3 and 2014/02910-7), and the Laboratory of Chemistry of the Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM) for allowing the use of its entire infrastructure.

REFERENCES

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 899, de 29/05/2003: *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, Ministério da Saúde: Brasil, 2003.
- ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n.4, p. 1069-1076, 2010.
- CALVO, P.; CASTAÑO, A. L.; LOZANO, M.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. **Food Research International**, v. 45, p. 256-261, 2012.
- COSTA, M. A. B.; RICCI-JÚNIOR, E.; SANTOS, E. P.; MANSUR, C. R. E.; CAMPOS, V. E. B. Desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de sulfassalazina em suspensão oral: comparação do método espectrofotométrico e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 808-813, 2012.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.
- ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B(R1): **Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology**, Geneva, 2005.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, 2ª ed., INMETRO: Rio de Janeiro, 2003.
- SILVA, D.F., FAVARO-TRINDADE, C.S., ROCHA, G.A., and THOMAZINI, M. Microencapsulation of lycopene by gelatin-pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 185-190, 2012.
- STRADER, A. P. Ileal transposition provides insight into the effectiveness of gastric bypass surgery. **Physiology & Behavior**, v. 88, p. 277-282, 2006.

CAPÍTULO 3

Formação de complexos eletrostáticos de gelatina e alginato para encapsulação de óleo de palma

Trabalho submetido à revista Food Biophysics.

Formation of electrostatic complexes of gelatin and alginate to microencapsulation of palm oil

PAULO H. M. MARFIL ^{1,2*}; BRUNA B. PAULO ¹; ANA C. B. M. ANHÊ ³;

VÂNIA R. N. TELIS ¹

¹ Department of Food Engineering and Technology - São Paulo State University (UNESP), 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

² Department of Food Engineering - Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), 38064-200, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

³ Department of Environmental Engineering - Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), 38064-200, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

ABSTRACT

Formation of electrostatic complexes between gelatin and sodium alginate was investigated as a possible system to microencapsulate palm oil by complex coacervation. Gelatin and sodium alginate solutions were prepared (0.25% w/v) in different pH values (2.0, 3.0, 3.5, 4.0, and 5.0) to zeta potential measurements at 50 °C. Turbidity (absorbance measurement at 590 nm) and morphology (light microscopy imaging) analyzes were carried out in blends of different gelatin:sodium alginate mixing ratios (0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, and 1:0) keeping a fixed amount of total polymers (0.25% w/v). Gelatin:sodium alginate blends at biopolymer ratios 1:1, 2:1, 3:1, and 4:1 were also prepared with 2.5% (w/v) total polymers to rheological analysis. Homogenization of palm oil (2.5% w/v) in gelatin solution was performed at 15,000 rpm for 5 minutes and the coacervation pH was 3.5 ± 0.1 . The obtained coacervates were decanted for 24 hours, frozen (-40°C) and lyophilized. The morphology was analyzed by scanning electron microscopy, whereas the amount of palm oil retained by the complexes was determined by extraction with hexane and quantified by spectrophotometry. In the pH range studied, sodium alginate was negatively charged and gelatin was positively charged, resulting in electrostatic interaction and complex coacervation. The highest turbidity values were observed at pH 3.5 and optical micrographs showed complexes with irregular format. The pH 3.5 and the gelatin:sodium alginate ratio of 3:1 and 4:1 showed the highest viscosity. Freeze-dried particles presented irregular format and sponge-like structure, with low retention of palm oil (<40%).

Keywords: microencapsulation, complex coacervation, zeta potential, rheology.

3.1 INTRODUCTION

Microencapsulation techniques have been widely used in food industry aiming to protect bioactive material against adverse environmental conditions such as light, oxygen, moisture and interactions with other compounds. They also slow and, in some cases, may promote the modulated release of the encapsulated compound under pre-established conditions, stabilizing the product and increasing its lifetime (JACKSON; LEE, 1991).

Several techniques can be used for microencapsulation of hydrophobic compounds such as palm oil, including complex coacervation. The complex coacervation is a process wherein the associative separation occurs, i.e., the electrostatic interaction between two oppositely charged polymers in solution and the consequent overall neutralization of charges promote the separation of a biopolymer-rich phase called coacervate (DICKINSON, 2003; DOUBLIER et al., 2000). The deposition of such insoluble complexes around a hydrophobic core creates a barrier, thus allowing its encapsulation. Complex coacervation has been applied in different industry sectors, including pharmaceutical, food, chemical and cosmetic, being typically used to encapsulate a variety of flavors, nutraceutical oils, nutrients, vitamins, enzymes, pigments, and pharmaceuticals (ALVIM; GROSSO, 2010; GOUIN 2004).

Generally, the core material microencapsulated by complex coacervation must be insoluble or scarcely soluble in the coacervation medium. Thus, this technique is typically used to encapsulate oils, essential oils and flavors, as they are hydrophobic compounds (MADENE et al., 2006). The most important physicochemical parameters controlling complex coacervate formation are pH, ionic strength, biopolymer mixing ratio, total biopolymer concentration, and polymer charge density (SCHMITT; TURGEON, 2011).

The choice of the encapsulating material is based on three main criteria: application, economy and security. In the medical, pharmaceutical and food sectors, biocompatibility, biodegradability, and non-toxicity are required and these requirements reduce the number of potentially available polyelectrolytes for use. Thus, polysaccharides and proteins have been extensively used to encapsulate biologically active substances by complex coacervation (XIAO et al., 2013; SILVA; ANDRADE, 2009).

The most studied and well understood coacervation system is probably the pair gelatin/gum arabic (GOUIN, 2004). Nevertheless, although gum arabic is extensively used as

an encapsulation matrix for oils and flavors, its high cost and irregular availability have motivated research for alternative encapsulation matrices (MADENE et al., 2006). On the other hand, gelatin is an abundant protein prepared by the hydrolytic degradation of collagen. In addition, it is biocompatible, biodegradable, edible and soluble at the body temperature, becoming an ideal material for food and pharmaceutical applications. Another attribute of gelatin that is important for microencapsulation by complex coacervation is its amphoteric character, i.e., gelatin is positively charged below its isoelectric point, which permits complexation with negatively charged polysaccharides at lower pH (DEVI; KAKATI, 2013; XIAO et al., 2013).

Alginate is an anionic linear polysaccharide containing 1,4-linked D-mannuronic acid and L-guluronic acid residues, which is obtained from brown seaweed using a dilute alkaline extraction. The resulting solution is treated with mineral acids and finally converted to sodium alginate. Sodium alginate is a natural, biocompatible, biodegradable, and hydrophilic polymer, which has been applied to micro-particulate formulations for drug delivery mainly because of its bio-adhesion, gelation, and pH-responsive properties (PAL; PAULSON; ROUSSEAU, 2012).

Palm oil is a rich source of antioxidants, including tocopherols, tocotrienols, carotenoids, phytosterols, phenolic compounds, and other phytonutrients (TEIXEIRA et al., 2013; EDEM, 2002). Microencapsulation by complex coacervation may be able to give protection and promote the controlled release of palm oil compounds, as well as facilitating its incorporation in dry systems. An additional benefit of palm oil microencapsulation is its application possibility in the treatment of Diabetes Mellitus Type 2 and for body weight reduction in obese people. The stimulation of ileum by barely digested foods releases gut hormones, whose actions interfere positively in the control of obesity and in the associated metabolic disorders, especially in peripheral insulin resistance (LI; MCCLEMENTS, 2011; STRADER, 2006). Microencapsulation of palm oil by complex coacervation can be an alternative to the transport of certain nutrients, such as palm oil, to the ileum without being digested, which stimulates the production of intestinal hormones.

The purpose of this study was to investigate the formation of electrostatic complexes between gelatin and sodium alginate, as an alternative to the classical pair gelatin/gum arabic, to microencapsulate palm oil by the complex coacervation technique. The characteristics of

complexes, including rheology, morphology, size, and encapsulation efficiency were investigated as affected by pH and gelatin:sodium alginate mixing ratio.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Material

The material to be encapsulated was commercial palm oil, whereas the encapsulants were gelatin type B from bovine skin (240 bloom) (Gelita, Mococa, Brazil) and sodium alginate (Dinâmica, Diadema, Brazil). The pH adjustment was carried out with hydrochloric acid solution (0.5 M) and measured with a digital pH meter (Tecnal, model Tec-3MP, Brazil). All materials were weighed on an analytical balance (Chyo, model JK 200, Japan).

3.2.2 Zeta Potential

The zeta potential of 0.25% (w/v) gelatin and sodium alginate solutions as a function of pH (2.0, 3.0, 3.5, 4.0, and 5.0) was determined at the coacervation temperature (50 °C) using a Zeta Plus Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA).

3.2.3 Sample preparation

Blends of gelatin and sodium alginate were prepared using a fixed amount of total polymer 0.25% (w/v) to zeta potential analysis and stoichiometric assay and 2.5% (w/v) to rheological tests. Gelatin solution was heated to 50 ± 3 °C and stirred in an Ultra-Turrax (IKA T25 D, Staufen, Germany) at 15,000 rpm for 5 minutes to obtain complete dissolution. Then, it was mixed with the sodium alginate solution (50 ± 3 °C) in a magnetic stirrer by adding water (twice the volume of the system). Throughout the process, the temperature of the polymeric system was controlled at 50 ± 3 °C. The pH was adjusted to the desired value and the system was kept under stirring for 10 minutes.

Coacervates were prepared to microscopic analysis in systems containing 2.5 g (w/v) of palm oil and 2.5 g of total wall polymers at gelatin:sodium alginate mixing ratios of 2:1, 3:1, and 4:1. Palm oil was homogenized in the gelatin solution at 15,000 rpm for 5 minutes,

following by mixing with the sodium alginate solution (50 ± 2 °C) and pH adjustment to 3.5 ± 0.1 . The coacervates were decanted for 24 hours, frozen at -40 °C for 24 hours and lyophilized for 72 hours (Liobras, Brazil).

3.2.4 Rheological tests

Blends of gelatin:sodium alginate solutions were prepared at different biopolymer mixing ratios (1:1, 2:1, 3:1, and 4:1). After pH adjustment to 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, and 4.5, the systems were kept under refrigeration (5.0 °C) for 24 hours to complete decantation of coacervates. The supernatant was removed and aliquots of 2.0 mL of the decanted phase were used to rheological measurements in an AR 2000ex rheometer (TA Instruments, Delaware, USA) with geometry of serrated parallel plate ($\varnothing 40$ mm) and gap of 1000 μm , at 25 °C. Samples were subjected to two ramps of shear rate ($\dot{\gamma}$): increasing shear rate (0.1 to 100 s^{-1}) and decreasing shear rate (100 to 0.1 s^{-1}), with a time interval (25 min) at constant shear rate (10 s^{-1}) between the ramps.

3.2.5 Stoichiometric assay

Investigation of the proper stoichiometry to gelatin and sodium alginate coacervation was carried out by turbidimetric method (ANTONOV; ZUBOVA, 2001) in blends of gelatin:sodium alginate solutions at different biopolymer mixing ratios (1:1, 2:1, 3:1, 4:1, and 5:1) with a total amount of polymers fixed at 0.25% (w/v), in pH values of 2.0, 3.0, 3.5, 4.0 and 5.0.

Aliquots of 3 mL were placed in cuvettes for absorbance measurements in UV-visible spectrophotometer (Hach, model DR/2010, USA) at a wavelength of 590 nm. Special attention should be taken when applying this methodology. After adjustment of the desired pH, the time elapsed between sample insertion in the cuvette and absorbance reading must not exceed 10 seconds. It was observed that exceeding this time interval might give chance to precipitation of the formed complexes, which interferes with absorbance readings.

3.2.6 Microscopy

3.2.6.1 Light Microscopy

The morphology of the microcapsules or complexes formed was analyzed with samples obtained in the stoichiometric assays (item 2.5) in all pH values using a light microscope (Bioval - São Paulo, Brazil) coupled with a camera Sony Cyber-shot (DSC-W150) 8.1 mega pixels. The samples were spread over glass slides and were covered with cover slips. The morphology of the formed complexes was assessed immediately after their production.

3.2.6.2 Scanning Electron Microscopy

The lyophilized samples were placed over carbon tape, metalized with a thin layer of gold and palladium in the sputter Polaron SC7620 (Ringmer, UK) and analyzed by Scanning Electron Microscope Magellan 400L XHR (SEM Electron Microscopy Ltd., USA) using voltage of 2.0 kV.

3.2.7 Particle size

Particle size was determined by a Laser Diffraction Particle Size Distribution Analyzer LA-950 (HORIBA, Japan) using ethanol (PA) as the dispersing medium.

The results were expressed in terms of average particle diameter ($D_{(4,3)}$) which is obtained by equation (3.1). The calculation of $D_{(4,3)}$ considers the average diameter of each particle (D_i) which is obtained by the square root of the product between the largest and smallest diameter (geometric mean) of n particles analyzed.

$$D_{(4,3)} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} D_i^4 v_i}{\sum_{i=1}^{i=n} D_i^3 v_i} \quad \dots(3.1)$$

where:

$$D_i = \sqrt{D_s d_i}$$

v_i = percentage of particles with the same D_i to a total of n particles;

D_s = projection of the largest dimension of a particle;

d_i = projection of the smallest dimension of a particle.

3.2.8 Quantification of palm oil not microencapsulated

The concentration of palm oil present outside of the particles was determined by four successive 30-second extractions with hexane. Quantification was performed by absorbance measurements at 446 nm referring to a previously prepared standard curve.

3.2.9 Water content analysis

The initial water content of the wall biopolymers was measured by the gravimetric method at 105 °C for six hours (AOAC, 1998).

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Zeta Potential

As expected in view of its amphoteric character, gelatin showed to be charged positively in the low pH range studied, except at pH 5.0 that presented the highest standard deviations between experimental data and negative average charge value (Figure 3.1). The high observed deviations at pH 5.0 results from the vicinity of the isoelectric point of the protein. On the other hand, the sodium alginate solution was negatively charged throughout the pH range studied, with zeta potential values varying in the range of -12 mV (pH 2.0) to -42 mV (pH 4.0). The measured absolute values of zeta potential were lower than the observed by Klemmer et al. (2012), which were in the range of -10 mV (pH 2.0) to -67 mV (pH 4.0). These differences may be attributed to variations on the pattern at which the 1,4-linked D-mannuronic acid and L-guluronic acid residues are arranged. According to Gombotz and Wee (1988), the composition and extent of the residue sequences and the molecular weight determine the physical properties of the alginates and the molecular variability is dependent on the organism and tissue from which the alginates are isolated.

The greatest difference between the positive charge of the protein and negative charge of the polysaccharide was detected at pH 3.5. Since formation of electrostatic complexes requires oppositely charged components, the conditions of complexation depend on the properties of both proteins and polysaccharides. For anionic polysaccharides bearing a negative charge, complexation with proteins occurs only under conditions where they are positively charged, which requires a pH below their isoelectric point. For many proteins this is around 5-6 (SCHOLTEN; MOSCHAKIS; BILIADERIS, 2013). The pKa of alginate is around 3.4. In the range of pH studied, alginate chains carry a global negative net charge, whereas gelatin has a global positive net charge.

Ducel et al. (2004) studied the microencapsulation of oil droplets using proteins extracted from cereals (alpha gliadin) and legumes (peas globulin). Zeta potential measurements showed that in the pH range of 2 to 5, proteins showed a positive charge near to 10 mV values. These authors have also studied the behavior of gum arabic, carboxymethylcellulose and alginate, which exhibited negative zeta potential at the pH range studied, whereas the absolute value increased with increasing pH typically between $2.2 < \text{pH} < 4.5$, where ionization of the carboxylic acid groups of these molecules occurs.

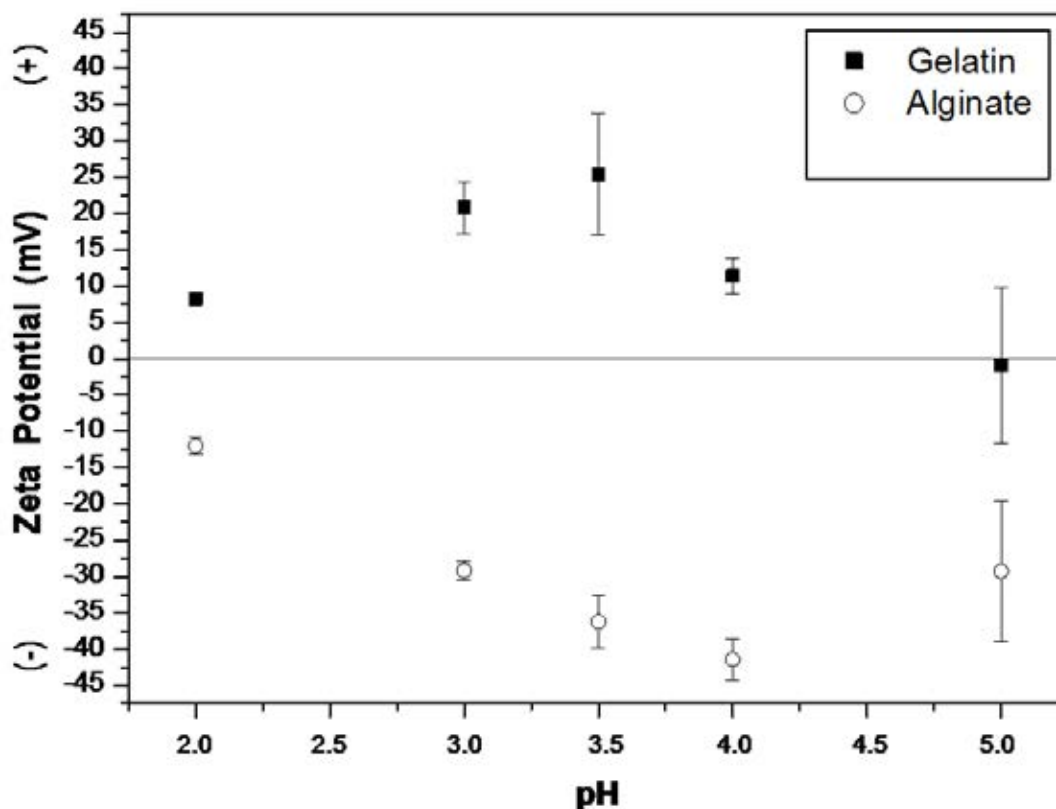


Figure 3.1 Zeta potential measurements of gelatin and sodium alginate solutions (0.25% w/v) as a function of pH at the coacervation temperature (50 °C).

3.3.2 Rheological study

In general, the viscosity of coacervates decreased with increasing shear rate in the biopolymer mixing ratios of 1:1, 2:1, 3:1, and 4:1 (Figures 3.2 and 3.3), characterizing a shear-thinning behavior. According to Kruif, Weinbreck and Vries (2004), the coacervate phase is a liquid phase with a dynamic structure, reversible upon deformation and, from a rheological point of view, behaves rather like a viscous particle dispersion than a concentrated viscoelastic polymer solution.

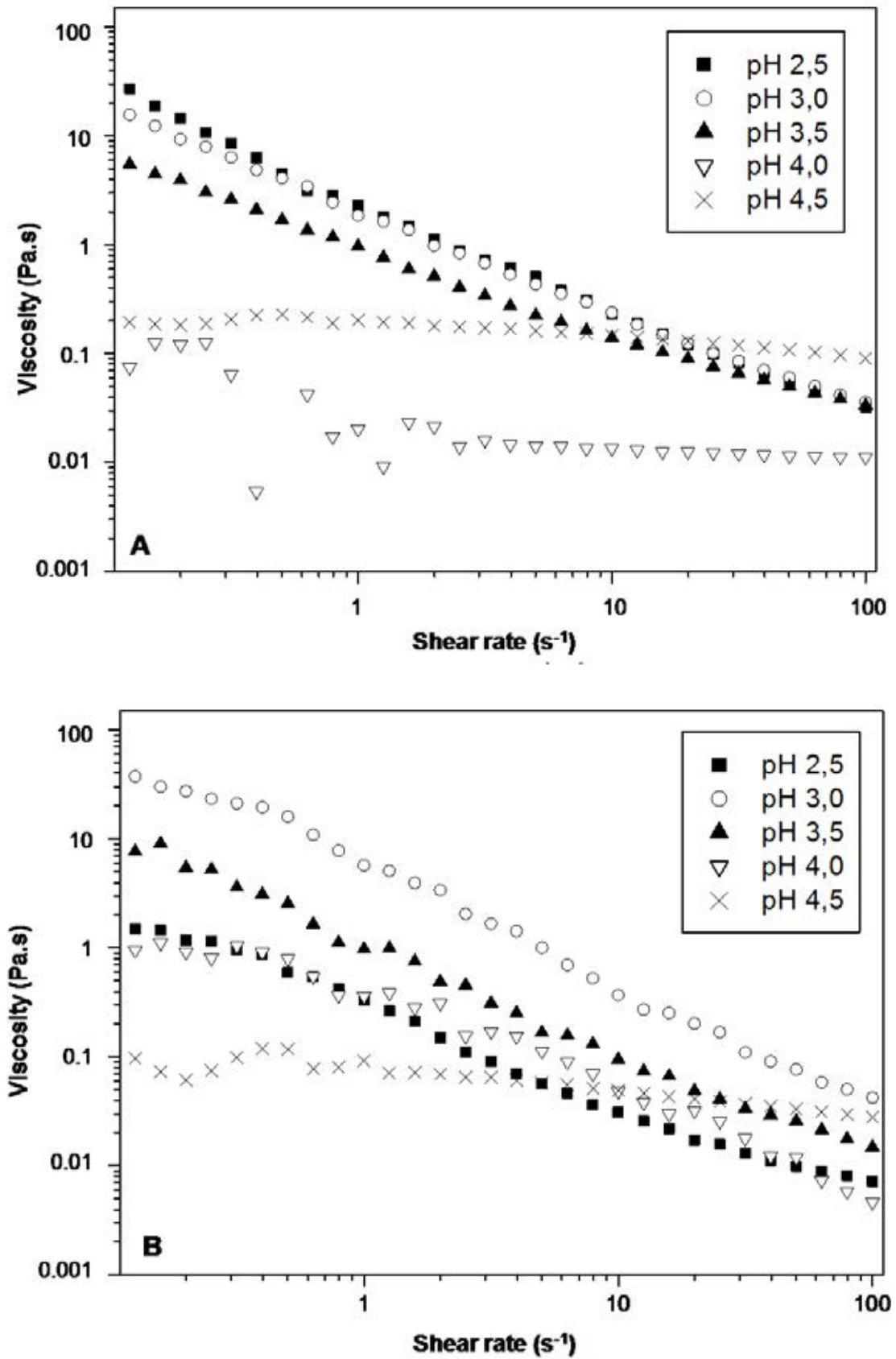


Figure 3.2 Viscosity of gelatin:sodium alginate coacervates as function of shear rate with a total polymer concentration fixed at 2.5% (w/v). **A)** 1:1; **B)** 2:1.

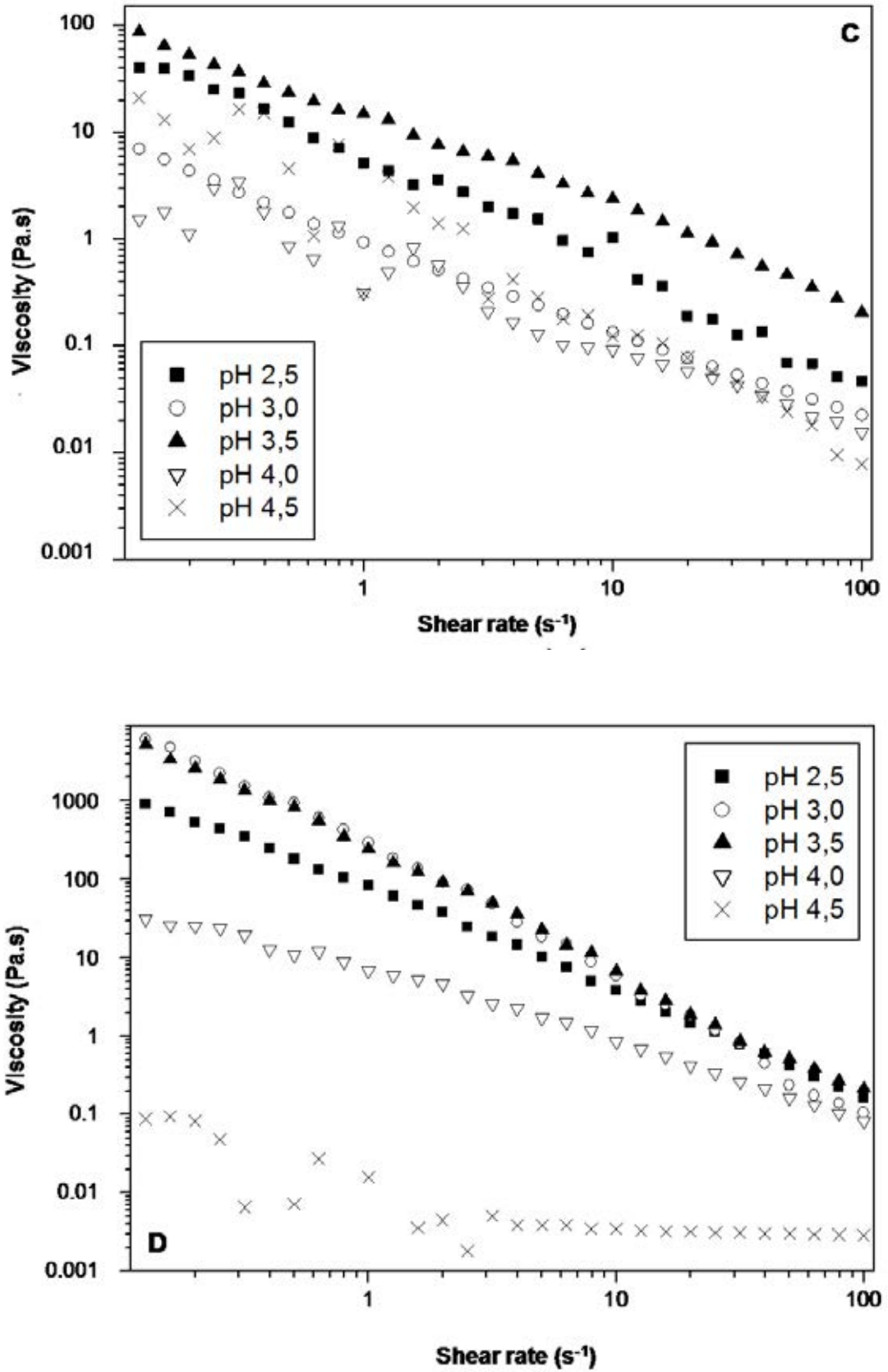


Figure 3.3 Viscosity of gelatin:sodium alginate coacervates as function of shear rate with a total polymer concentration fixed at 2.5% (w/v). C) 3:1; D) 4:1.

The highest viscosity exhibited by the gelatin:sodium alginate coacervates was observed at pH 3.0 ± 0.1 in the mixing ratios of 1:1 and 2:1 (Figure 3.2), and at pH 3.5 ± 0.1 in mixing ratios of 3:1 and 4:1 (Figure 3.3). The effect of pH on the viscosity of coacervates can be better evaluated in Figure 3.4, which shows the viscosity of gelatin:sodium alginate coacervates at mixing ratios of 1:1, 2:1, 3:1 and 4:1 for pH values between 2.5 and 4.5 obtained at shear rate fixed at 10 s^{-1} . The maximum viscosity observed indicates the conditions corresponding to the highest degree of complexation between gelatin and sodium alginate, i.e., the more intensive formation of coacervates. The highest values of viscosity were observed at the ratio 4:1 ($2.5 < \text{pH} < 3.5$) and 3:1 (pH 3.5). Stone; Teymurova and Nickerson (2014) hypothesized that the higher viscosity of the coacervate phase at a specific pH is induced by electrostatic attractive interactions between the protein-polysaccharide chains, resulting in the formation of a loosely packed coacervate structure with entrapped solvent.

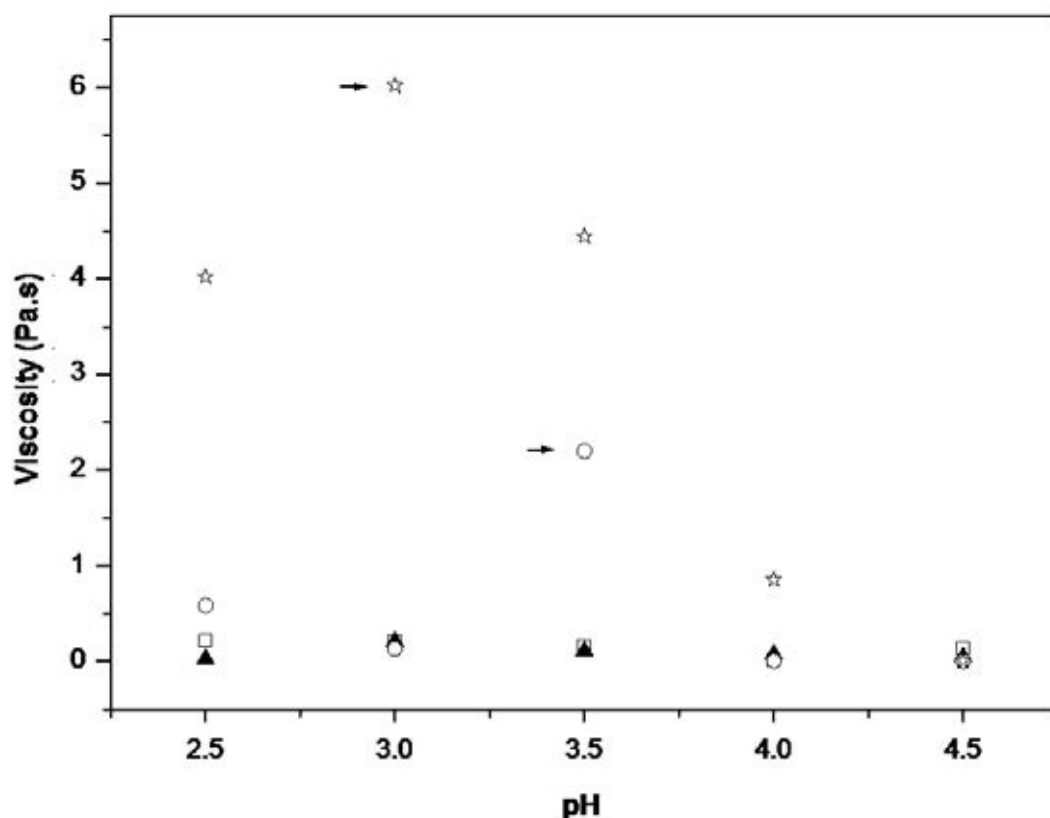


Figure 3.4 Viscosity of coacervates obtained at different gelatin:sodium alginate mixing ratios at shear rate of 10 s^{-1} (□ = 1:1; ▲ = 2:1; ○ = 3:1; ☆ = 4:1).

3.3.3 Stoichiometric assay

The influence of different gelatin:sodium alginate mixing ratios on the complex formation intensity was studied through turbidity analyzes. The highest absorbance values were observed at $\text{pH } 3.5 \pm 0.1$ for the mixing ratios of 3:1, 4:1 and 5:1, as shown in Figure 3.5. For the proportions of 1:1 and 2:1, the highest absorbance values were exhibited at $\text{pH } 3.0 \pm 0.1$. The highest turbidity value obtained corresponds to stronger electrostatic attraction, i.e., the pH correspondent to the maximum absorbance value represents electrical equivalence, in which there is greater intensity of electrostatic attraction between the systems (LV et al., 2012).

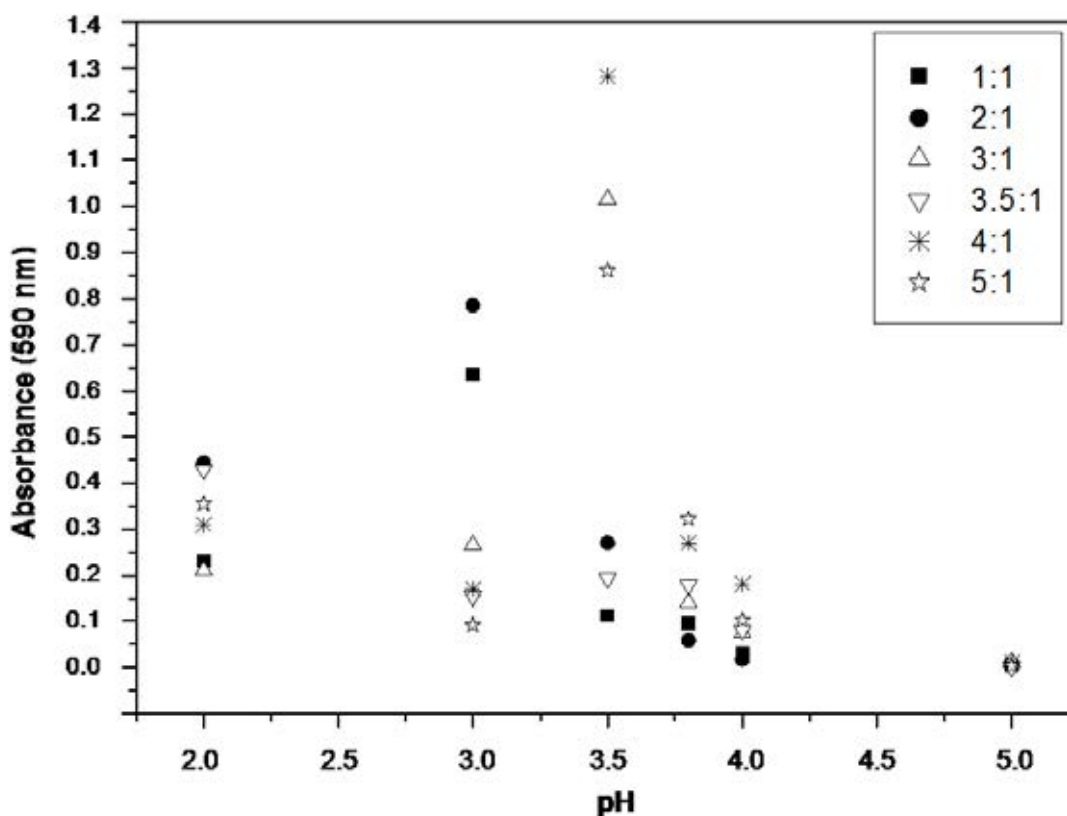


Figure 3.5 Absorbance of gelatin:sodium alginate systems (0.25% w/v) at 590 nm as function of pH.

The appearance of turbidity is usually attributed to appearance of scattering particles or droplets in the medium, related to coacervate formation. Light scattering is dependent on

the size of the dispersed particles, the wavelength of the light, the refractive index of the particles relative to that of the medium and the particle concentration (DUCEL et al., 2004). There is clear evidence that the composition, or better the stoichiometry, of the complexes is mainly determined by the charge density of the poly-ions. Charge neutrality is nearly achieved at one specific pH for each biopolymer ratio (KRUIF, WEINBRECK, VRIES, 2004).

Optimal conditions for the formation of polyelectrolyte complex of gelatin:sodium alginate were evaluated by Devi and Kakati (2013) through turbidity and relative viscosity analyzes at various ratios of gelatin:sodium alginate and at different pH values, resulting in gelatin-A:sodium alginate mixing ratio of 3.5:1 and pH = 3.75. Klemmer et al. (2012) observed the maximum formation of coacervates in mixtures of pea protein isolate and alginate (0.1% w/v) at pH 2.5 in the mixing ratio of 4:1.

3.3.4 Morphology of gelatin:sodium alginate blends

3.3.4.1 Light microscopy

Some systems showed high turbidity values as a result of complex coacervate formation. Complexes were formed, instead of spherical microcapsules, depending on several parameters, specially the ratio between the biopolymers. Other factors directly influence the formation of microcapsules, such as physicochemical properties, including charge density, nature of polysaccharide and molar mass, as well as the isoelectric point of the protein (MATTISON; BRITAIN; DUBIN, 1995; MATTISON et. al, 1999).

Figure 3.6 shows microscopy images of the complexes obtained, highlighting the systems with the highest absorbance values for each ratio of gelatin:sodium alginate.

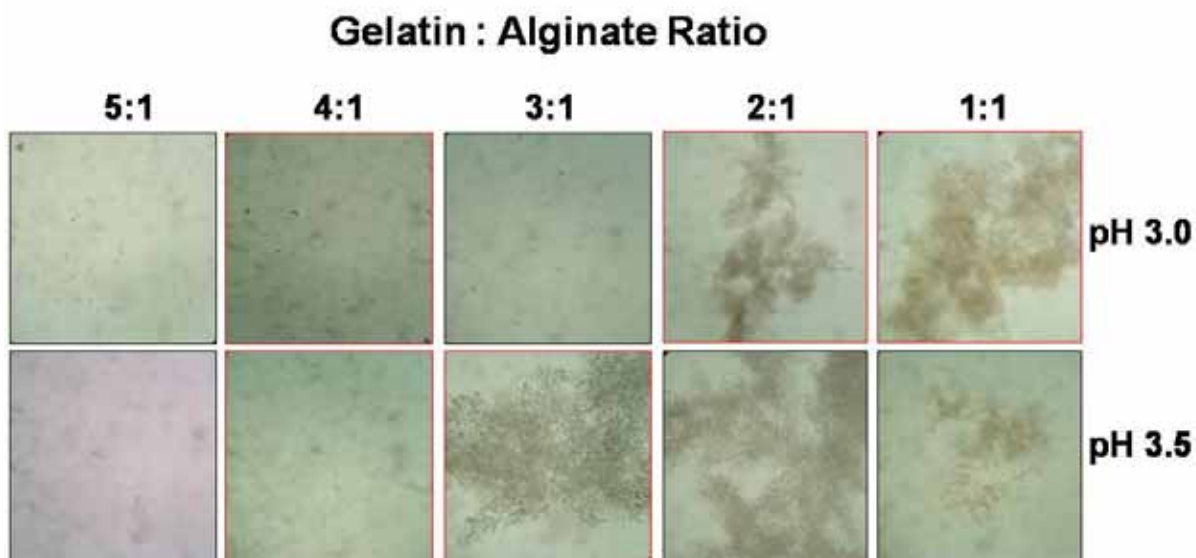


Figure 3.6 Light microscopy of systems composed of gelatin:sodium alginate at mixing ratios of 5:1; 4:1; 3:1; 2:1, and 1:1.

3.3.4.2 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The gelatin:sodium alginate mixing ratios of 2:1, 3:1, and 4:1 at pH 3.5 showed the highest potential for coacervate formation, in such a way that these conditions were selected to carrying out palm oil microencapsulation assays. The morphological analysis showed that these complexes were very porous, presenting irregular format and sponge-like structure in all biopolymer mixing ratios analyzed (Figure 3.7). In fact, the obtained systems produced precipitates rather than coacervates.

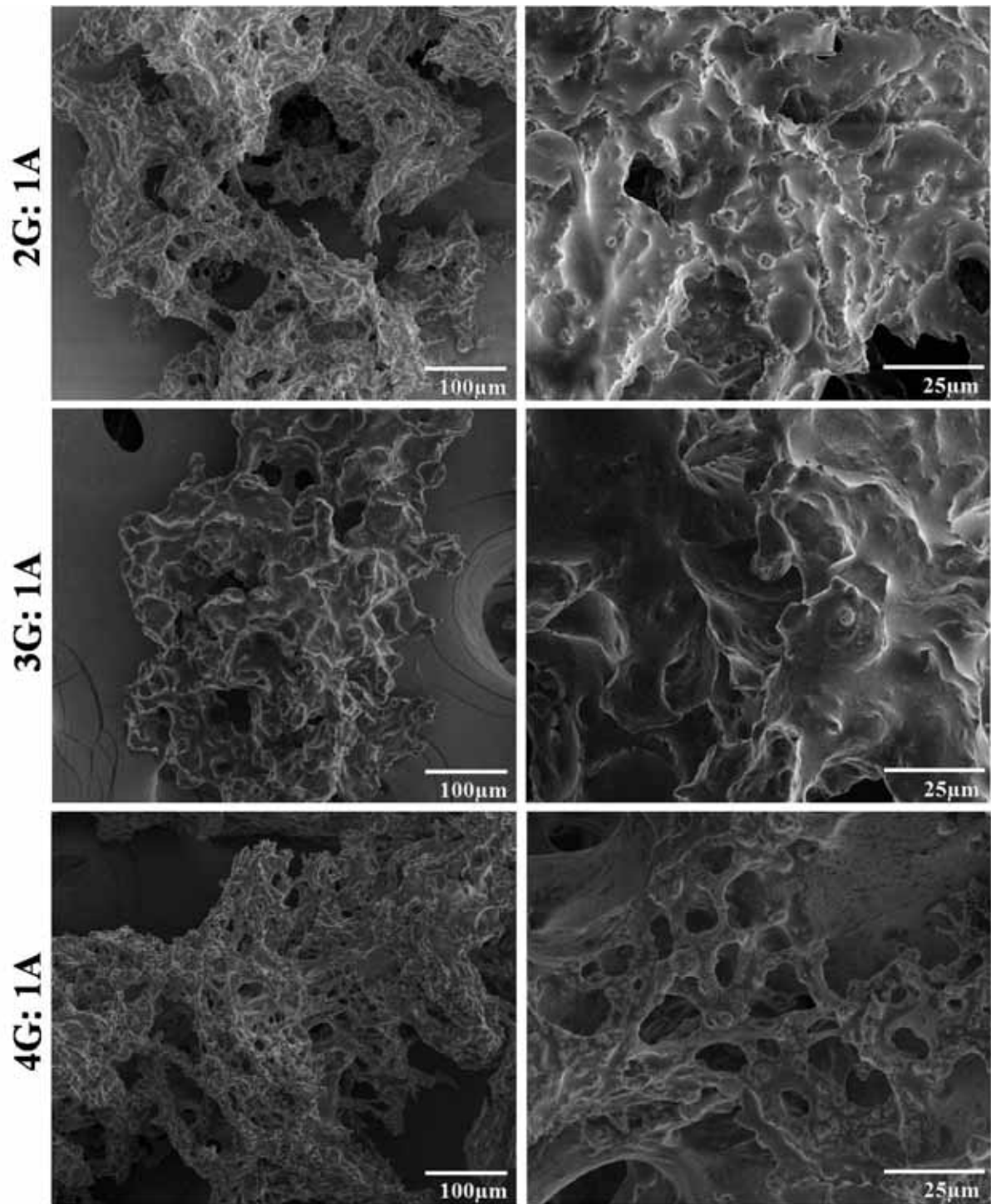


Figure 3.7 Scanning electron micrographs of palm oil complexes in gelatin:sodium alginate matrices at biopolymer mixing ratios of 2:1, 3:1, and 4:1 using voltage of 2.0 kV.

3.3.5 Particle size and quantification of palm oil microencapsulated

The analysis of size distribution of over five hundred particles resulted in mean diameters shown in Table 3.1. Particles exhibited highly disperse size distributions (Figure 3.8), evidenced by the high values of standard deviations.

Table 3.1 Particle sizes of gelatin and sodium alginate containing palm oil.

Gelatin:Alginate	D₄₃ (µm) ± standard deviation	Concentration of outside palm oil (%)
2:1	170.3 ± 22.2 ^a	0.97 ± 0.04 ^a
3:1	455.7 ± 47.8 ^b	0.98 ± 0.01 ^a
4:1	447.2 ± 154.5 ^b	0.66 ± 0.01 ^b

The optical micrographs corresponding to systems subjected to particle size analysis were also included in Figure 3.8. The images shown the sponge nature of the complexes, which were not able to emulsify and encapsulate the added palm oil. Extraction of palm oil present externally in the gelatin:sodium alginate complex in proportions of 2:1, 3:1 and 4:1 showed that more than 65 % of palm oil added to the systems was solubilized by the hexane.

Devi and Kakati (2013) succeeded in obtaining coacervated microparticles suitable for encapsulating ascorbic acid using the pair gelatin:alginate at very similar biopolymer ratio (3.5:1) an pH (3.75) to those used in the present work. On the other hand, these authors used Tween 80 as surfactant and genipin as a crosslinking agent, which certainly contributed to improve the microparticle characteristics. SEM micrographs of microparticles prepared by using different amount of genipin showed that without the addition of crosslinker, no microparticles were formed. Instead, the whole polymer became a lump like product. Thus crosslinking was necessary to harden the soft aqueous phase microparticles formed within the oil phase (DEVI; KAKATI, 2013).

An additional process particularity important to produce gelatin:alginate coacervate particles suitable for oil encapsulation seems to be the type of acid used in the pH adjustment step. Saravanan & Rao (2010) concluded that gelatin-alginate coacervation could be produced only with acetic acid. This could be due to precipitation of free alginic acid from sodium

alginate solution during the addition of strong acid such as HCl. The precipitated alginic acid is insoluble in water, hence unable to complexate with gelatin. These authors used various acidifiers, including hydrochloric acid, citric acid, sulphuric acid, nitric acid, and acetic acid to pH adjustment in order to induce complex coacervation between gelatin-pectin and gelatin-alginate. Gelatin-pectin- coacervation was induced with all tested acidifiers, whereas gelatin-alginate- coacervation was induced only with acetic acid. Observation of the stages of gelatin-alginate coacervation in an optical microscope after acid addition in the vicinity of the coacervation pH revealed that coacervation was induced with acetic acid, whereas the other acids produced precipitates and citric acid (a weak acid) produced no coacervation. According to the authors, acetic acid may be weaker than the alginic acid to induce precipitation from its sodium salt; at the same time it is good enough to induce coacervation.

In spite of the effect of acid type, Shinde and Nagarsenker (2009) reported coacervation production using the pair gelatin-alginate at pH 4.0 and gelatin:alginate ratio of 4:1, even though they had employed hydrochloric acid to pH adjustment. This evidence permits to hypothesize that, apart from the type of acid employed, in addition to using surfactants and crosslinking agents, the source of the biopolymers employed is also an important factor for coacervation. Change in type of gelatin and alginate may also affect formation of suitable coacervates.

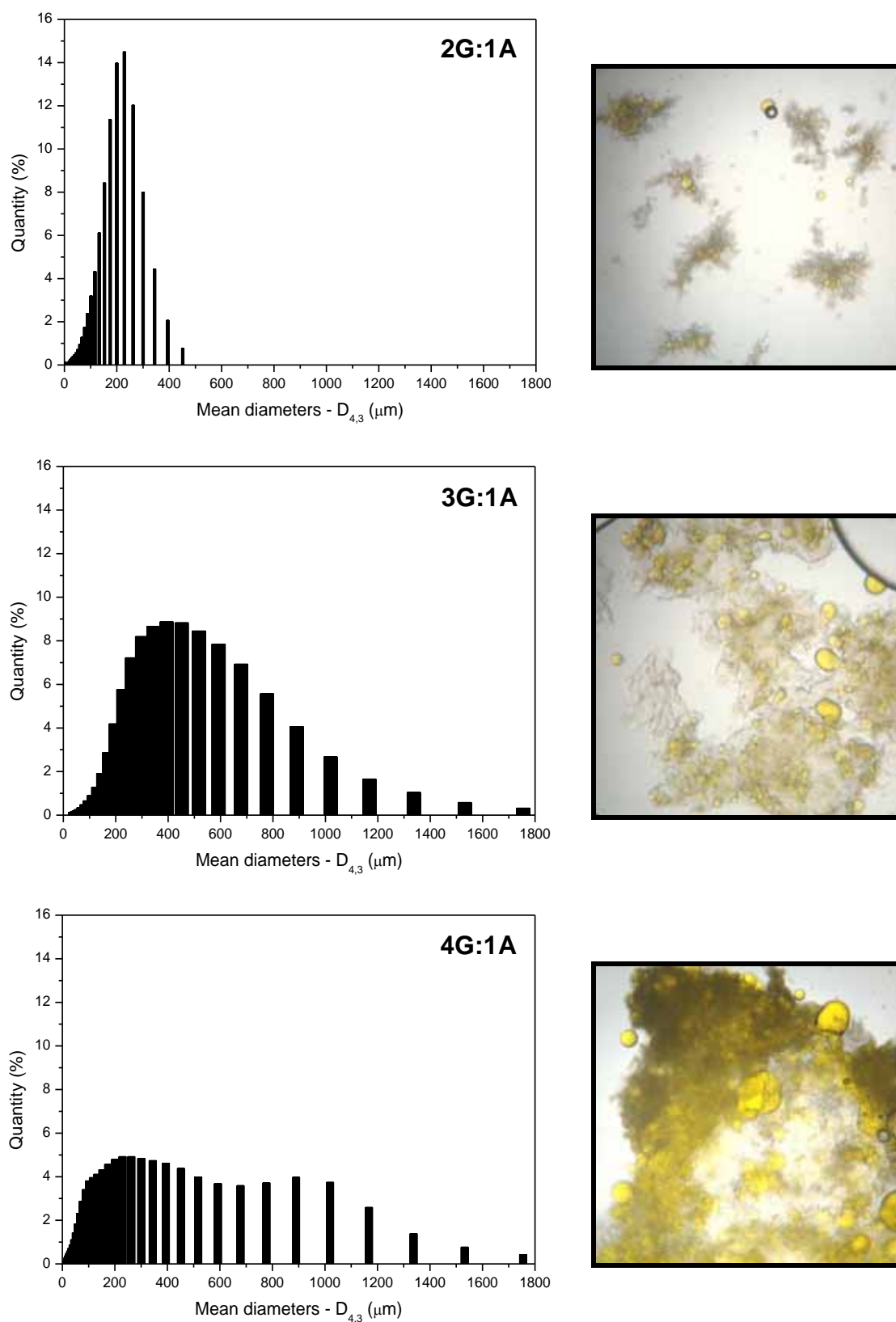


Figure 3.8 Particle size distribution of palm oil complexes in gelatin:sodium alginate matrix at mixing ratios of 2:1, 3:1, and 4:1 and pH 3.5.

3.4 CONCLUSIONS

Determination of zeta potential of gelatin and sodium alginate solutions indicated a greater difference between the positive charges of gelatin and negative of sodium alginate at pH 3.5. The rheology of coacervates of gelatin and sodium alginate at the mixing ratio of 4:1 and pH 3.0 to 3.5, and at mixing ratio of 3:1 and pH 3.5 showed the highest viscosity values, suggesting optimum pH of 3.5 for complexation between the biopolymer pair. The same conditions showed to be satisfactory in the stoichiometric study, indicating that the systems containing gelatin and sodium alginate at the ratio of 3:1 and 4:1 at pH 3.5 were the most suitable for palm oil microencapsulation. Nevertheless, the morphological study of the complexes revealed an irregular shape and sponge-like structure. In addition, ultrastructural analysis exhibited a porous structure. The complexes showed values of mean diameter [$D_{(4.3)}$] between $170.3 \pm 22.2 \mu\text{m}$ and $455.7 \pm 47.8 \mu\text{m}$ and the ratio of 4:1 (gelatin:sodium alginate) were the most efficient for palm oil encapsulation. Additional research must be carried out to clearly state the influence of processes variables, including the acid type used for pH adjustment, the source of gelatin and sodium alginate, as well as the use of surfactants and crosslinkers in order to improve the coacervate characteristics.

Acknowledgements

The authors thank to FAPESP (grant n° 2010/09614-3), to Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa from the São Paulo State University for enabling zeta potencial measurements, and to Dra. Izabela Dutra Alvim from Institute of Food Technology, Campinas, for particle size measurements.

REFERENCES

- ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30(4), p. 1069-1076, 2010.
- ANTONOV, Y. A.; ZUBOVA, O. M. Phase state of aqueous gelatin-polysaccharide (1)-polysaccharide(2) systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, p. 67-71, 2001.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**, 16th ed., v. 1-2, Arlington, 1998.
- DEVI, N.; KAKATI, D. K. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of Food Engineering**, v. 117(2), p. 193-204, 2013.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25-39, 2003.
- DOUBLIER, J. -L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 202-214, 2000.
- DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. **Colloids and Surfaces A: Physic chemistry Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2004.
- EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 319-341, 2002.
- GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 31(3), p. 267-285, 1998.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

- JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the Food Industry. **Food Science and Technology - LWT**, v. 24(4), p. 289-297, 1991.
- KLEMMER, K. J.; WALDNER, L.; STONE, A.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 130, p. 710-715, 2012.
- KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 340-349, 2004.
- LI, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Controlling lipid digestion by encapsulation of protein-stabilized lipid droplets within alginate-chitosan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1025-1033, 2011.
- LV, Y.; ZHANG, X.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 225-233, 2012.
- MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release - A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41(1), p. 1-21, 2006.
- MATTISON, K. W.; BRITAIN, I. J.; DUBIN, P. L. Protein-polyelectrolyte phase boundaries. **Biotechnology Progress**, v. 11(6), p. 632-637, 1995.
- MATTISON, K. W.; WANG, Y.; GRYMONTRE, K.; DUBIN, P. L. Micro and macro- phase behaviour in protein-polyelectrolytes complexes. **Macromolecular Symposia**, v. 140(1), p. 53-76, 1999.
- PAL, K.; PAULSON, A. T.; ROUSSEAU, D. **Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems**. In: EBNESAJJAD, S. (Ed.). Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics. Elsevier, p. 329-363, 2012, 472 p.
- SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 808-816, 2010.

SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, p. 63-70, 2011.

SCHOLTEN, E.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Biopolymer composites for engineering food structures to control product functionality. **Food Structure**, v. 1(1), p. 39-54, 2013.

SHINDE, U. A.; NAGARSENKER, M. S. Characterization of gelatin-sodium alginate complex coacervation system. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71(3), p. 313-317, 2009.

SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T. Evaluating conditions for the formation of chitosan/gelatin microparticles. **Polímeros**, v. 19(2), p. 133-137, 2009.

STONE, A. K.; TEYMUROVA, A.; NICKERSON, M. T. Formation and Functional Attributes of Canola Protein Isolate-Gum Arabic Electrostatic Complexes. **Food Biophysics**, v. 9, p. 203-212, 2014.

STRADER, A. P. Ileal transposition provides insight into the effectiveness of gastric bypass surgery. **Physiology & Behavior**, v. 88, p. 277-282, 2006.

TEIXEIRA, C. B.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; da SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. da C. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 575-581, 2013.

XIAO, Z.; LIU, W.; ZHU, G.; ZHOU, R.; NIU, Y. A review of the preparation and application of flavor and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1482-1494, 2014.

CAPÍTULO 4

**Produção e caracterização de
microcápsulas de óleo de palma obtidas
por coacervação complexa em matriz de
gelatina e goma arábica**

Produção e caracterização de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa em matriz de gelatina e goma arábica

MARFIL, P. H. M.^{1,2}; PAULO, B. B.¹; ALVIM, I. D.³; TELIS, V. R. N.^{1,*}

¹ Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, UNESP - Universidade Estadual Paulista, 15054-000. São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

² Departamento de Engenharia de Alimentos, UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 38064-200. Uberaba, Minas Gerais, Brasil;

³ Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolates, ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 13070-178, Campinas, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A microencapsulação do óleo de palma pode ser capaz de protegê-lo e promover sua liberação controlada. Este trabalho teve como objetivo otimizar as condições de produção de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa e caracterizá-las quanto à morfologia e distribuição de tamanho das partículas. Os materiais de parede utilizados foram gelatina e goma arábica, sendo investigada a concentração desses materiais (2,5; 5,0 e 7,5% (p/v)), a proporção entre gelatina:goma arábica (1:2; 1:1; 2:1) e a proporção do recheio em relação à concentração de materiais (75; 100 e 125%) seguindo um planejamento fatorial central composto com uma repetição do ponto central. A homogeneização do óleo de palma na solução de gelatina foi realizada sempre a 15.000 rpm por 5 minutos. O pH de coacervação foi $4,0 \pm 0,01$ e os coacervados obtidos foram decantados por 24 horas, congelados (-40°C) e liofilizados por 72 horas. A eficiência de encapsulação [E(%)] foi determinada através da quantificação de óleo de palma por método espectrofotométrico utilizando hexano como solvente. A morfologia foi analisada por microscopia ótica e eletrônica de varredura e a

distribuição de tamanho de partículas por difração a laser. Os maiores valores de E(%) foram obtidos na proporção entre gelatina:goma arábica de 1:1 ou 2:1, utilizando óleo de palma em até 100% em relação à concentração do material de parede, numa concentração de biopolímeros de 2,5 até 7,5%. Em relação à morfologia, altas concentrações de materiais de parede (>7,5%) e proporções de gelatina maiores que de goma arábica (2:1 ou mais) dificultaram ou impediram a formação de microcápsulas esféricas ou ovais. As microcápsulas apresentaram valores de diâmetro médio $[D_{(4,3)}]$ entre $97,1 \pm 5,5 \mu\text{m}$ e $689,1 \pm 69,8 \mu\text{m}$. A distribuição de tamanho das partículas mostrou que o aumento da concentração dos biopolímeros e da proporção do óleo de palma em relação aos materiais de parede contribuíram para a formação de microcápsulas maiores. A relação proteína:polissacarídeo apresentou uma influência ainda maior sobre o tamanho das partículas, sendo que a relação 1:2 resultou em microcápsulas de menores diâmetros.

Palavras-chave: óleo de palma, microencapsulação, coacervação complexa, gelatina, goma arábica.

ABSTRACT

Microencapsulation of palm oil may be able to protect it and promote its controlled release. This study aimed to optimize conditions of palm oil microcapsules production obtained by complex coacervation, in addition to characterizing the particle morphology and its size distribution. Gelatin and gum arabic were used as wall materials and the concentration of these materials [2.5, 5.0 and 7.5% (w/v)], the ratio between gelatin and gum arabic (1:2; 1:1; 2:1) and ratio between encapsulated and wall materials (75, 100, and 125%) were investigated following a factorial central design with a central point repetition. The homogenization of palm oil in gelatin solution was performed at 15,000 rpm for 5 minutes. Coacervation pH was $4,0 \pm 0,01$ and the obtained coacervates were decanted for 24 hours, frozen (-40°C) and lyophilized for 72 hours. The encapsulation efficiency [E(%)] was determined by quantifying palm oil by spectrophotometric method using hexane as solvent. The morphology was analyzed by light and scanning electron microscopy and the particle size distribution by laser diffraction. The highest values of E(%) were obtained in the proportion of gelatin and gum arabic 1:1 or 2:1, using 100% palm oil in relation to the concentration of the wall material, which could vary in concentration from 2.5 to 7.5% biopolymers. Regarding morphology, high concentrations of wall materials ($> 7.5\%$) and gelatin ratio greater than gum arabic (2:1 or more) hampered or prevented the formation of spherical or oval microcapsules. Microcapsules showed values of average diameter [$D_{(4,3)}$] between 97.1 ± 5.5 and 689.1 ± 69.8 μm . Particle size distribution showed that increasing the concentration of polymers and the proportion of palm oil in relation to wall materials contributed to formation of larger microcapsules. The protein: polysaccharide ratio showed higher influence on the particle size, and the 1:2 ratio resulted in smaller microcapsule diameter.

Keywords: palm oil, microencapsulation, complex coacervation, gelatin, gum arabic.

4.1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Microcápsulas produzidas por coacervação complexa apresentam um excelente controle de liberação do ativo (DONG et al., 2008). O processo de coacervação complexa envolve pelo menos dois polímeros de cargas diferentes sob um conjunto de condições. Na maioria dos casos, esses dois biopolímeros incluem moléculas de proteína e polissacarídeo. A interação entre proteína e polissacarídeo na coacervação complexa, bem como vários outros fatores como o pH, temperatura, concentração e proporção dos biopolímeros envolvidos na coacervação, proporção do recheio e velocidade de homogeneização têm sido amplamente estudados (de KRUIF; WEINBRECK; de VRIES, 2004; DOUBLIER et al., 2000; TURGEON et al. 2003; TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007; YE, 2008; LV et al., 2012).

O óleo de palma é uma fonte significativa de antioxidantes, incluindo tocoferóis, tocotrienóis, carotenoides, fitoesteróis, compostos fenólicos e outros fitonutrientes (TEIXEIRA et al., 2013; EDEM, 2002). Sua microencapsulação por coacervação complexa pode proteger os compostos bioativos e facilitar a incorporação em formulações secas. O interesse na microencapsulação de óleo de palma também se encontra associado à possibilidade deste nutriente ser utilizado como alternativa para o tratamento da obesidade e do *Diabetes Mellitus* (DM) tipo 2. A microencapsulação do óleo de palma por coacervação complexa pode retardar sua liberação no sistema digestivo, uma vez que os coacervados são insolúveis no pH ácido do estômago, fazendo com que esse nutriente chegue ao íleo sem ser digerido. Por sua vez, o estímulo do íleo por alimentos pouco digeridos libera hormônios intestinais, cujas ações interferem positivamente no controle da obesidade e em distúrbios metabólicos associados, sobretudo na resistência periférica à insulina (STRADER, 2006).

Para otimização do processo de microencapsulação por coacervação complexa é importante que se conheça a estequiometria entre os biopolímeros envolvidos, ou seja, a proporção ideal entre os materiais de parede para que ocorra a neutralização total das cargas. Além disso, é importante conhecer a quantidade de recheio que pode ser utilizada em relação a esses materiais. Esses parâmetros exercem influência sobre a eficiência do processo de encapsulação e sobre a morfologia e tamanho das microcápsulas obtidas por coacervação complexa.

Gelatina e goma arábica foram os primeiros materiais utilizados para coacervação complexa desde o trabalho pioneiro de Bungenberg de Jong e Kruyt (1929). Goma arábica é um complexo aniônico arabinose-galactose, com a cadeia principal bastante ramificada nas laterais por cadeias de galactose, arabinose, ramnose e ácido glucurônico. É carregada negativamente por quase toda faixa de pH, exceto em pH extremamente baixo, em que a dissociação do grupo carboxílico é suprimida (OSMAN et al., 1993).

Diante do exposto, objetivou-se otimizar as condições de produção de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa e caracterizá-las morfológicamente. Os materiais de parede utilizados foram gelatina e goma arábica, sendo investigada a concentração dos biopolímeros, a proporção entre gelatina e goma arábica e a proporção do recheio em relação à concentração de materiais de parede.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

Óleo de palma foi microencapsulado por coacervação complexa utilizando-se como material de parede gelatina extraída de pele bovina, tipo B, com força de gel de 240 *bloom* (Gelita, Brasil) e goma arábica (Synth, Brasil). O ajuste do pH de coacervação ($4,0 \pm 0,1$) foi realizado com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M. Todos os materiais foram pesados em balança analítica (Chyo, modelo JK 200, Japão).

4.2.2 Preparo das microcápsulas de óleo de palma

A metodologia utilizada para a obtenção das micropartículas por coacervação complexa está esquematizada no fluxograma da Figura 4.1. As variáveis avaliadas foram a razão entre proteína e polissacarídeo (expressa pela fração mássica de gelatina em relação ao total de biopolímeros), a concentração total de biopolímeros e a razão entre material de parede e recheio (Tabela 4.1). A concentração dos biopolímeros foi sempre calculada em base seca, ou seja, levou-se em consideração a umidade desses materiais para determinação da massa a ser utilizada no processo de coacervação complexa. Um planejamento central rotacional composto foi aplicado com uma repetição do ponto central, resultando em dezesseis ensaios (Tabela 4.2).

Tabela 4.1 Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental.

Variável	-1,73	-1	0	+1	+1,73
Concentração dos materiais de parede (%)	0,80	2,50	5,00	7,50	9,21
Proporção entre gelatina e goma arábica (fração mássica de gelatina em relação ao total de biopolímeros)	0,219	0,333	0,500	0,667	0,781
Proporção de recheio em relação aos materiais de parede (%)	57,96	75,00	100,00	125,00	142,05

A solução de gelatina foi aquecida a 50 ± 3 °C e agitada em dispersor (IKA, T25D Ultra-Turrax, Alemanha) a 15.000 rpm por 5 minutos, a fim de obter sua completa dissolução. Em seguida, foi misturada à solução de goma arábica (50 ± 3 °C) em agitador magnético, adicionando-se água (o dobro do volume do sistema). Durante todo o processo, houve o controle da temperatura (50 ± 3 °C) do sistema polimérico. Foi utilizado HCl 0,5 M para ajuste do pH ($4,0 \pm 0,1$) com auxílio de um pHmetro digital (TECNAL, modelo Tec-3MP, Brasil). Em seguida, o sistema foi imerso em um banho de gelo mantendo-se agitação constante para que ocorresse um resfriamento lento até 10 ± 2 °C. O sistema foi coberto com papel alumínio para proteção contra luz e levado a um refrigerador (5 °C) por 24 horas para completa precipitação das microcápsulas formadas. Posteriormente o excesso de água foi eliminado, as partículas decantadas foram dispostas em bandejas de alumínio e levadas ao congelamento em ultra freezer (Liobrás, modelo FV 500, Brasil) a -40 °C por 24 horas. A secagem foi realizada por liofilização. As amostras permaneceram no liofilizador (Liobrás, modelo L101, Brasil) por aproximadamente três dias consecutivos. Posteriormente, as amostras foram maceradas em almofariz, protegidas da iluminação e armazenadas em dessecador para realização dos ensaios.

Tabela 4.2 Planejamento experimental para preparo das microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa.

Ensaio	Concentração de material de parede (%)	Fração mássica de gelatina em relação ao total de biopolímeros / Proporção Gelatina:goma arábica	Proporção de recheio em relação aos materiais de parede (%)
1	2,50	0,333 / 1:2	75,00
2	2,50	0,667 / 2:1	75,00
3	2,50	0,333 / 1:2	125,00
4	2,50	0,667 / 2:1	125,00
5	7,50	0,333 / 1:2	75,00
6	7,50	0,667 / 2:1	75,00
7	7,50	0,333 / 1:2	125,00
8	7,50	0,667 / 2:1	125,00
9	0,80	0,500 / 1:1	100,00
10	9,21	0,500 / 1:1	100,00
11	5,00	0,500 / 1:1	57,96
12	5,00	0,500 / 1:1	142,05
13	5,00	0,219 / 1:3,56	100,00
14	5,00	0,781 / 3,56 : 1	100,00
15*	5,00	0,500 / 1:1	100,00
16*	5,00	0,500 / 1:1	100,00

* Referem-se ao Ponto Central.

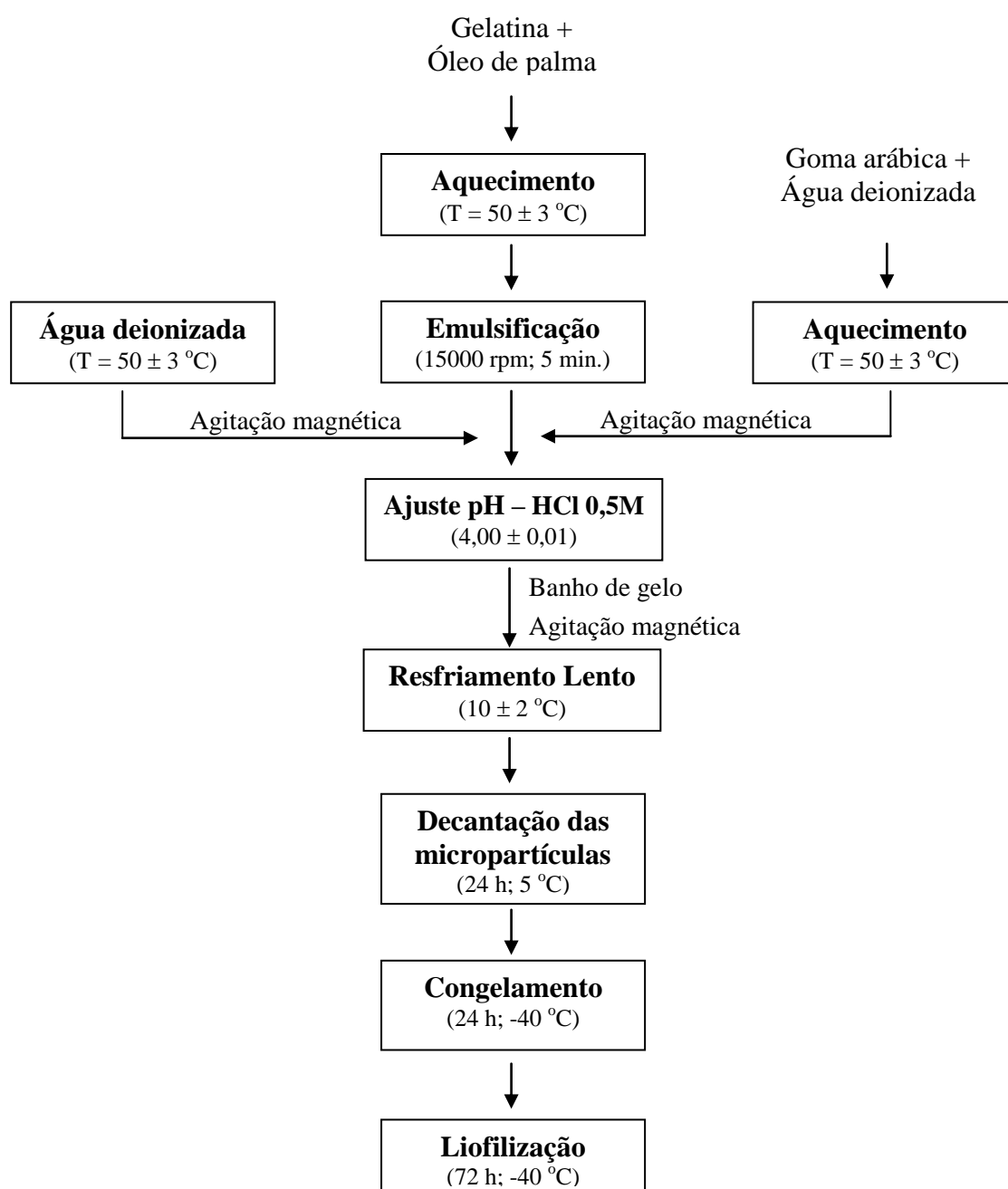


Figura 4.1 Fluxograma do processamento de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa.

4.2.3 Quantificação do óleo de palma microencapsulado

A concentração de óleo de palma presente externamente e internamente nas partículas foi determinada utilizando hexano como solvente conforme método analítico desenvolvido no Capítulo 2. A quantificação foi realizada utilizando medidas de absorvância a 446 nm e uma curva padrão.

A eficiência de encapsulamento [E(%)] foi determinada pela relação entre o óleo de palma presente internamente e o óleo de palma total que foi retido no processo, ou seja, a soma entre óleo presente internamente e externamente nas microcápsulas (equação 4.1). A E(%) foi expressa em porcentagem.

$$E(\%) = \left(\frac{\text{Óleo interno}}{\text{Óleo retido}} \right) \times 100 \quad \dots(4.1)$$

4.2.4 Determinação de umidade

A umidade dos biopolímeros utilizados e das microcápsulas de óleo de palma foi determinada por método gravimétrico em estufa a 105 °C por seis horas (AOAC, 1998).

4.2.5 Morfologia dos coacervados

4.2.5.1 Microscopia ótica

A morfologia das microcápsulas foi avaliada em três condições: após a obtenção dos coacervados, após a liofilização e após sua reidratação. As amostras foram colocadas diretamente sobre lâminas e cobertas com lamínula, com exceção da desidratada, que foi coberta com glicerina. Foi utilizado microscópio ótico (Bioval, modelo L – 2000, Brasil) com câmera fotográfica digital de 8,1 megapixels (Sony Cyber-shot, DSC-W150, Brasil) acoplada.

4.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise ultraestrutural foi realizada em amostras de microcápsulas representativas das diferentes morfologias observadas em microscopia ótica. Elas foram dispostas em porta amostra sobre fita de carbono, metalizadas com uma fina camada de ouro e paládio em metalizador (Polaron SC7620, Reino Unido) e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM Electron Microscopy Ltd, Magellan 400L XHR, EUA) utilizando voltagem de 2,0 kV.

4.2.6 Distribuição de tamanho das partículas

O tamanho das partículas foi determinado utilizando analisador de distribuição de tamanho de partículas por difração a laser (HORIBA, modelo LA-950, Japão), com etanol (PA) como meio dispersante. Os resultados da difração de laser são reportados em termos de volume, de modo que o volume médio pode ser usado para definir o ponto central, embora a mediana seja frequentemente mais utilizada do que a média quando se utiliza esta técnica. A Figura 4.2 ilustra a projeção vertical e horizontal de uma partícula esférica e outra de formato irregular, sendo possível identificar a projeção do maior (D_s) e do menor (d_i) diâmetro. No caso de partícula esférica, D_s é igual a d_i que é o próprio diâmetro da partícula.



Figura 4.2 Projeção horizontal e vertical de partículas para determinação do maior (D_s) e menor (d_i) diâmetro projetado.

Os resultados são expressos em termos de diâmetro médio das partículas [$D_{(4,3)}$] que é obtido pela equação (4.3). O cálculo de $D_{(4,3)}$ considera o diâmetro médio de cada partícula (D_i) que é obtido pela raiz quadrada do produto entre o maior e menor diâmetro (média geométrica) das n partículas analisadas.

$$D_{(4,3)} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} D_i^4 v_i}{\sum_{i=1}^{i=n} D_i^3 v_i} \quad \dots(4.3)$$

onde:

$$D_i = \sqrt{D_s d_i}$$

v_i = porcentagem de partículas que apresentam mesmo D_i para um total de n partículas;

D_s = projeção da maior dimensão de uma partícula;

d_i = projeção da menor dimensão de uma partícula.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Otimização das condições de produção das microcápsulas de óleo de palma

4.3.1.1 Eficiência de encapsulamento – E(%)

Os fatores concentração de biopolímeros, quantidade de recheio em relação à concentração dos materiais de parede e proporção entre gelatina:biopolímeros totais foram analisados dois a dois em relação à E(%).

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de E(%) de óleo de palma, são apresentados na Tabela 4.3. Os efeitos dos fatores, em negrito, são significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Tabela 4.3 Efeito estimado, erro, coeficiente t e grau de significância estatística, para cada fator no modelo codificado para E(%).

Fatores	Efeito Estimado	Erro Padrão	t (1)	F	Significância Estatística (p)
Concentração (L)	5,337	0,219	24,394	595,09	0,026
Concentração (Q)	-8,741	0,266	-32,907	1082,87	0,019
Recheio (L)	-13,599	0,219	-62,163	3864,26	0,010
Recheio (Q)	-6,088	0,266	-22,919	525,28	0,028
Proporção (L)	30,225	0,219	138,163	19088,96	0,005
Proporção (Q)	-47,690	0,266	-179,547	32237,23	0,004
Concentração x Recheio	-0,135	0,286	-0,471	0,22	0,720
Concentração x Proporção	-26,069	0,286	-91,204	8318,12	0,007
Recheio x Proporção	9,211	0,286	32,225	1038,43	0,020
Falta de ajuste	-	-	-	2072,72	0,017

Através da Tabela 4.3, verifica-se que todas as variáveis independentes lineares, quadráticas e as interações, exceto a interação entre concentração e recheio, foram estatisticamente significativas sobre a E(%), em um nível de 95% de confiança.

Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste em relação a 95% de confiança, através do teste F, na análise de variância (ANOVA).

O modelo codificado proposto para representar a E(%) de óleo de palma, dentro dos limites de concentração, recheio e proporção entre gelatina e biopolímeros totais é descrito pela Equação (4.4):

$$E(\%) = - 217,14 + 23,40*C - 0,67*C^2 - 0,004*R^2 + 981,07*P - 848,95*P^2 - 31,22*C*P + 1,15*R*P$$

... (4.4)

onde:

C = concentração de biopolímeros utilizados como material de parede (%);

R = quantidade de recheio utilizado em relação a quantidade de biopolímeros totais (%);

P = proporção entre gelatina e biopolímeros totais (-).

O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0,87, indicando que o modelo explicou 87,0% da variação dos dados observados.

As Figuras 4.3 a 4.5 apresentam os gráficos de contorno gerados através do modelo proposto, considerando os pontos médios das variáveis concentração, recheio e proporção.

A Figura 4.3 apresenta a relação das variáveis concentração de biopolímeros e quantidade de recheio ambas em relação à E(%). Observa-se que os maiores valores de E(%) foram obtidos quando o recheio foi adicionado até 100% em relação à concentração dos materiais de parede na faixa de 2,5 a 7,5%.

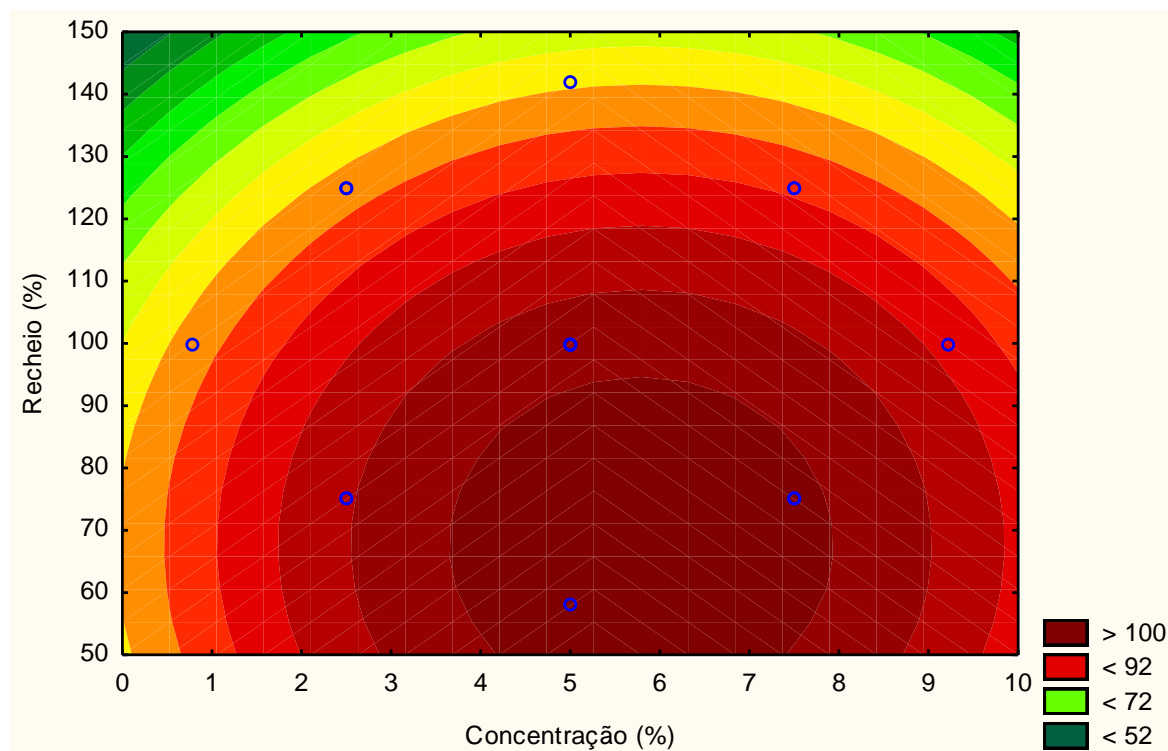


Figura 4.3 Gráfico de contorno variando-se a concentração de biopolímeros (%) e a quantidade de recheio (%) em relação à E(%).

Na Figura 4.4 é apresentado o gráfico de contorno das variáveis concentração de biopolímeros e proporção entre gelatina:goma arábica (expressa pela fração mássica de gelatina com referência ao total de biopolímeros). Observa-se que na proporção de 1:1 (0,5) encontram-se os maiores valores de E(%), independentemente da concentração de materiais de parede. Também é possível observar resultados similares na proporção entre gelatina:goma arábica de 0,67 (2:1).

Na Figura 4.5 observa-se o gráfico de contorno que mostra o efeito da quantidade de recheio e da proporção entre gelatina:goma arábica. É possível verificar que a proporção entre gelatina:goma arábica apresenta um maior efeito sobre a E(%) que a quantidade de recheio. Os melhores resultados de E(%) foram obtidos nas proporções de 1:1 (0,5) e 2:1 (0,67) entre gelatina:goma arábica, respectivamente.

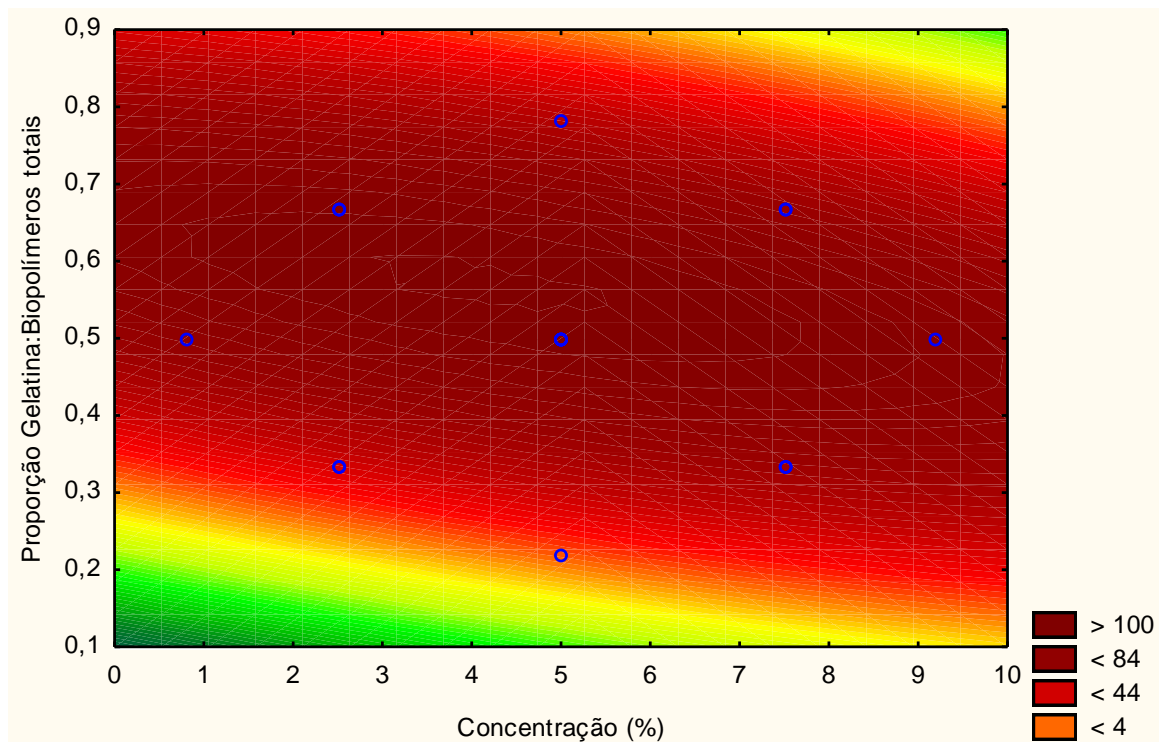


Figura 4.4 Gráfico de contorno variando-se a concentração de biopolímeros (%) e a proporção entre gelatina e biopolímeros totais em relação à E(%).

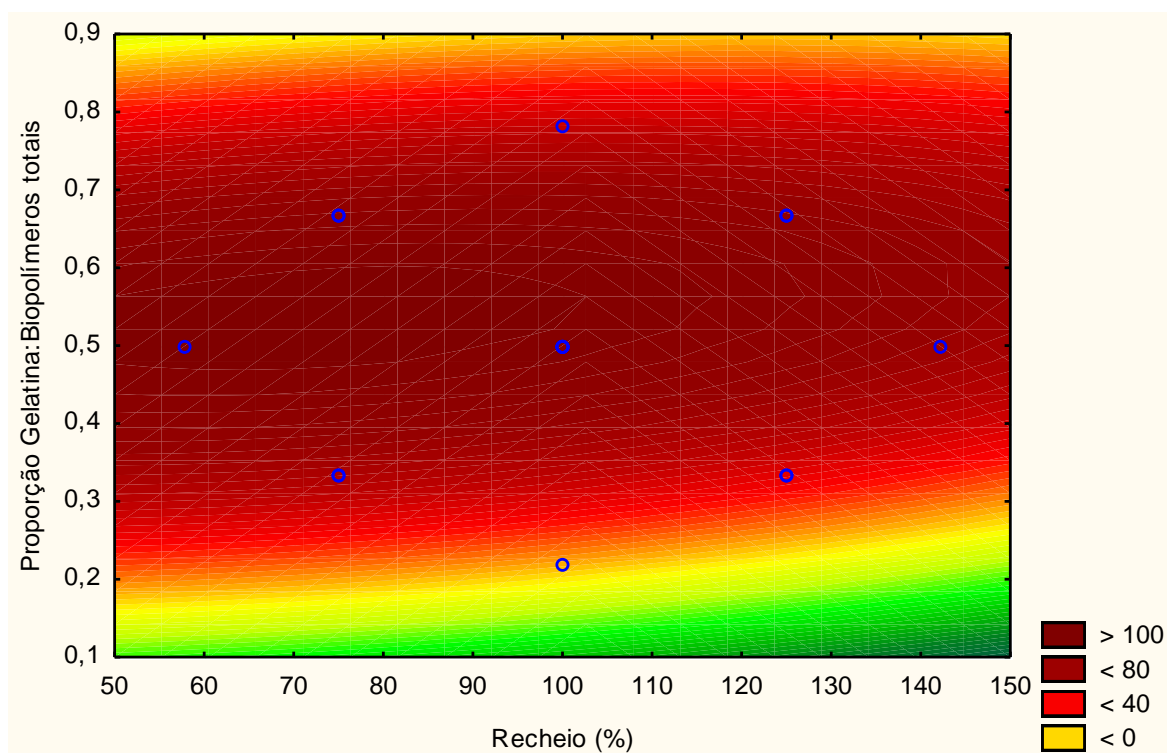


Figura 4.5 Gráfico de contorno variando-se a quantidade de recheio (%) e a proporção entre gelatina e biopolímeros totais em relação à E(%).

De modo geral foi observado que os maiores valores de E(%) foram obtidos na proporção entre gelatina:goma arábica de 1:1 ou 2:1, utilizando óleo de palma em até 100% em relação à concentração do material de parede. Essa observação aplica-se na faixa de concentração de materiais de parede de 2,5 até 7,5%.

Weinbreck et al. (2003), ao estudarem o processo de coacervação entre β -lactoglobulina e goma arábica, observaram a formação de complexos em sistemas contendo até 15% de biopolímeros e em pH 4,0, porém as condições ótimas para coacervação foram encontradas numa concentração de 2% e numa razão de proteína e polissacarídeo de 2:1. Em misturas de pectina e gelatina, foi observado que em concentrações de biopolímeros de aproximadamente 17% houve a supressão da formação de complexos (PLASHCHINA; ZHURAVLEVA; ANTONOV, 2007). Sugere-se que o aumento da viscosidade do meio em altas concentrações de polímeros dificulta a interação das moléculas para formação dos complexos.

Lv et al. (2012) estudaram a formação de microcápsulas de gelatina e goma arábica na proporção de 1:1. Medidas de potencial zeta mostraram ponto isoelétrico da gelatina em pH 4,75 e goma arábica carregada negativamente por toda a faixa de pH estudada (3,0 a 6,5). O potencial zeta nulo da mistura desses biopolímeros foi obtido em pH 3,75. Ao realizarem ensaios de turbidimetria e analisarem as partículas em microscópio ótico observaram o pH ótimo de coacervação em 4,1.

4.3.2 Morfologia e distribuição de tamanho das microcápsulas de óleo de palma

4.3.2.1 Morfologia das microcápsulas de óleo de palma

A morfologia das microcápsulas foi analisada por microscopia ótica em três condições: após a obtenção dos coacervados, após a liofilização e após a reidratação. As dezesseis formulações estudadas foram divididas em quatro grupos, de acordo com a similaridade das características morfológicas, conforme apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Morfologia das microcápsulas de óleo de palma em matriz de gelatina e goma arábica.

	Amostra	Conc. Parede	Conc. Recheio	Gelatina: Polímeros totais	Observações quanto à Morfologia
Grupo 1	1	2,5	75	0,333	Microcápsulas esféricas, polinucleadas e de tamanhos variáveis.
	2	2,5	75	0,667	
	4	2,5	125	0,667	
	9	0,8	100	0,500	
	15	5,0	100	0,500	
	16	5,0	100	0,500	
	11	5,0	58	0,500	
	12	5,0	142,1	0,500	
Grupo 2	5	7,5	75	0,333	Microcápsulas com predomínio de formatos esféricos e polinucleadas. Presença de formatos tipo bastonete ou irregulares.
	7	7,5	125	0,333	
	10	9,205	100	0,500	
Grupo 3	6	7,5	75	0,667	Complexos em formato de bastonetes ou formando tramas irregulares, em geral pontiagudas e de tamanhos variáveis.
	8	7,5	125	0,667	
	14	5	100	0,781	
Grupo 4	3	2,5	125	0,333	Complexos polinucleados em formato de bastonetes e formatos irregulares, presença de muito óleo não encapsulado (externo).
	13	5	100	0,219	

A Figura 4.6 apresenta uma amostra representativa de cada um dos quatro grupos de microcápsulas de óleo de palma, sendo que as letras **a** até **c** referem-se às microcápsulas após coacervação, após liofilização e após reidratação, respectivamente. É possível observar que a hidratação das microcápsulas após liofilização resulta em material com morfologia similar ao material úmido. A análise morfológica das microcápsulas liofilizadas mostra que a forma original foi parcialmente mantida (Figura 4.6; 1-4b), indicando a presença de pontes responsáveis por manter a forma original, caso contrário seriam inteiramente fundidas em uma massa amorfa.

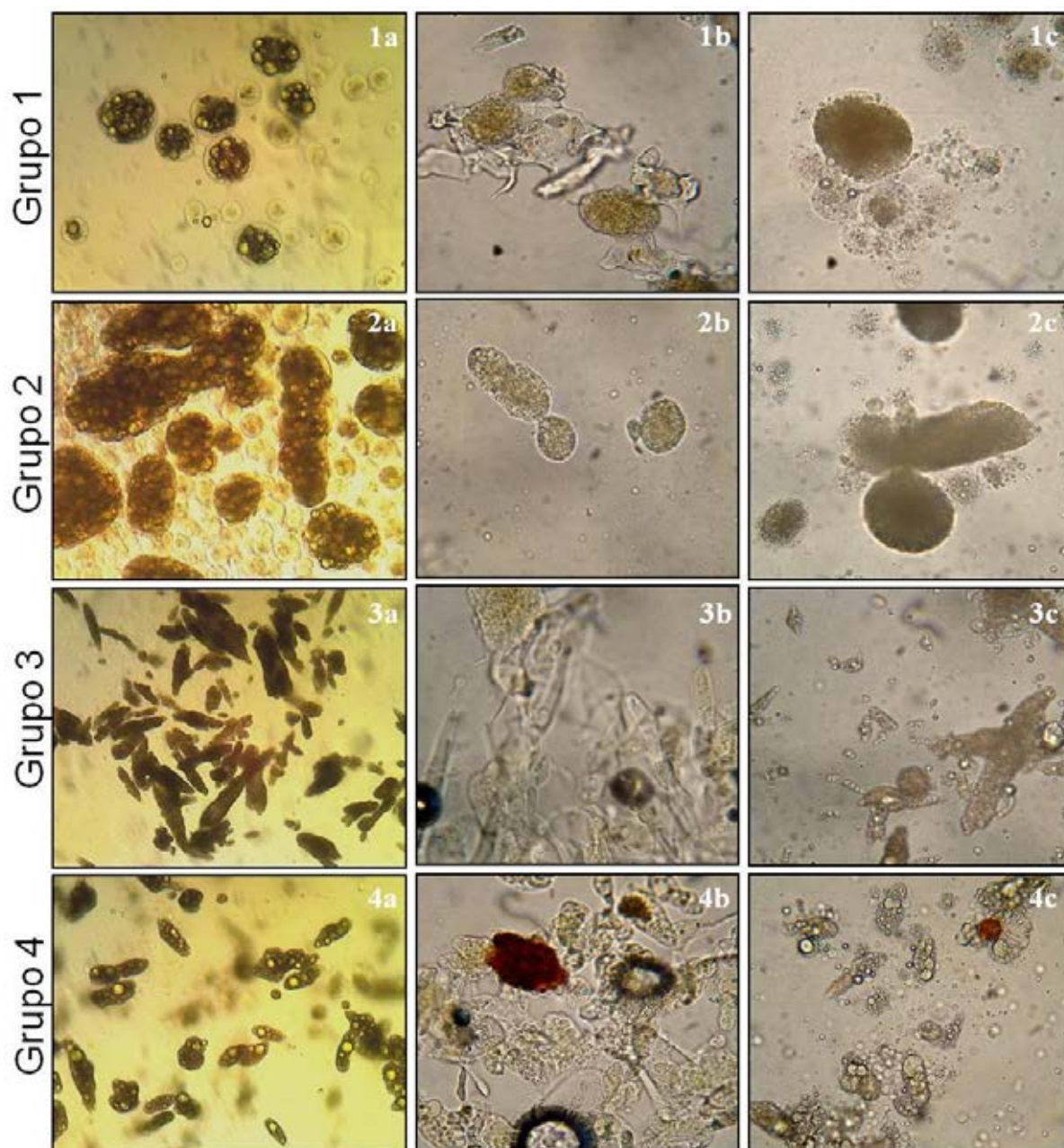


Figura 4.6 Microscopia ótica das microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa (grupos 1, 2, 3 e 4), sob as seguintes condições: **a)** após coacervação, **b)** após liofilização e **c)** após rehidratação.

A Figura 4.7 apresenta as microcápsulas de óleo de palma de cada amostra pertencente ao grupo 1, enquanto que a Figura 4.8 mostra microcápsulas das amostras que constituem os grupos 2 a 4. Todas as imagens referem-se a microcápsulas que foram reidratadas após a liofilização.

O grupo 1 apresenta as amostras que resultaram na formação de microcápsulas em sua maioria esféricas. Neste grupo estão amostras com concentrações de polímeros de até 5,0%. Observa-se que, independentemente da proporção entre gelatina:goma arábica e de recheio, em baixas concentrações de polímeros é possível a obtenção de cápsulas esféricas e polinucleadas.

Em concentrações maiores que 5,0% de polímeros de parede, a proporção entre gelatina:goma arábica e a quantidade de recheio utilizada influenciam na morfologia das micropartículas ou mesmo impedem sua formação. No Grupo 2 estão amostras contendo mais que 7,5% de polímeros de parede que resultam em partículas em formato de bastonetes ou em formatos irregulares, todos polinucleados. No terceiro grupo, as amostras contêm 7,5% de material de parede sendo a proporção de gelatina:goma arábica 2:1, ou 5,0% de polímeros de parede numa proporção de gelatina maior que de goma arábica. Essas condições resultam na obtenção de complexos de tamanho e formatos diversos, polinucleados, não sendo possível a obtenção de microcápsulas esféricas ou ovais.

Uma última situação foi observada (grupo 4) quando a proporção de gelatina foi muito menor em relação à goma arábica, numa concentração total de polímeros de 2,5 ou 5,0%. Foram obtidos complexos polinucleados e de formatos irregulares. Apesar desse grupo conter as amostras que foram capazes de reter maior quantidade de óleo de palma, esse óleo retido ficou principalmente distribuído na parte externa das microcápsulas. Essas amostras apresentaram as menores E(%) dentre as demais. Em detalhe (destacado por setas) pode ser observada a grande quantidade de óleo de palma não encapsulada (Figura 4.8).

De forma geral, é possível verificar que altas concentrações de materiais de parede (>7,5%) e proporções de gelatina maiores que de goma arábica (2:1 ou mais) dificultam ou impedem a formação de microcápsulas esféricas ou ovais.

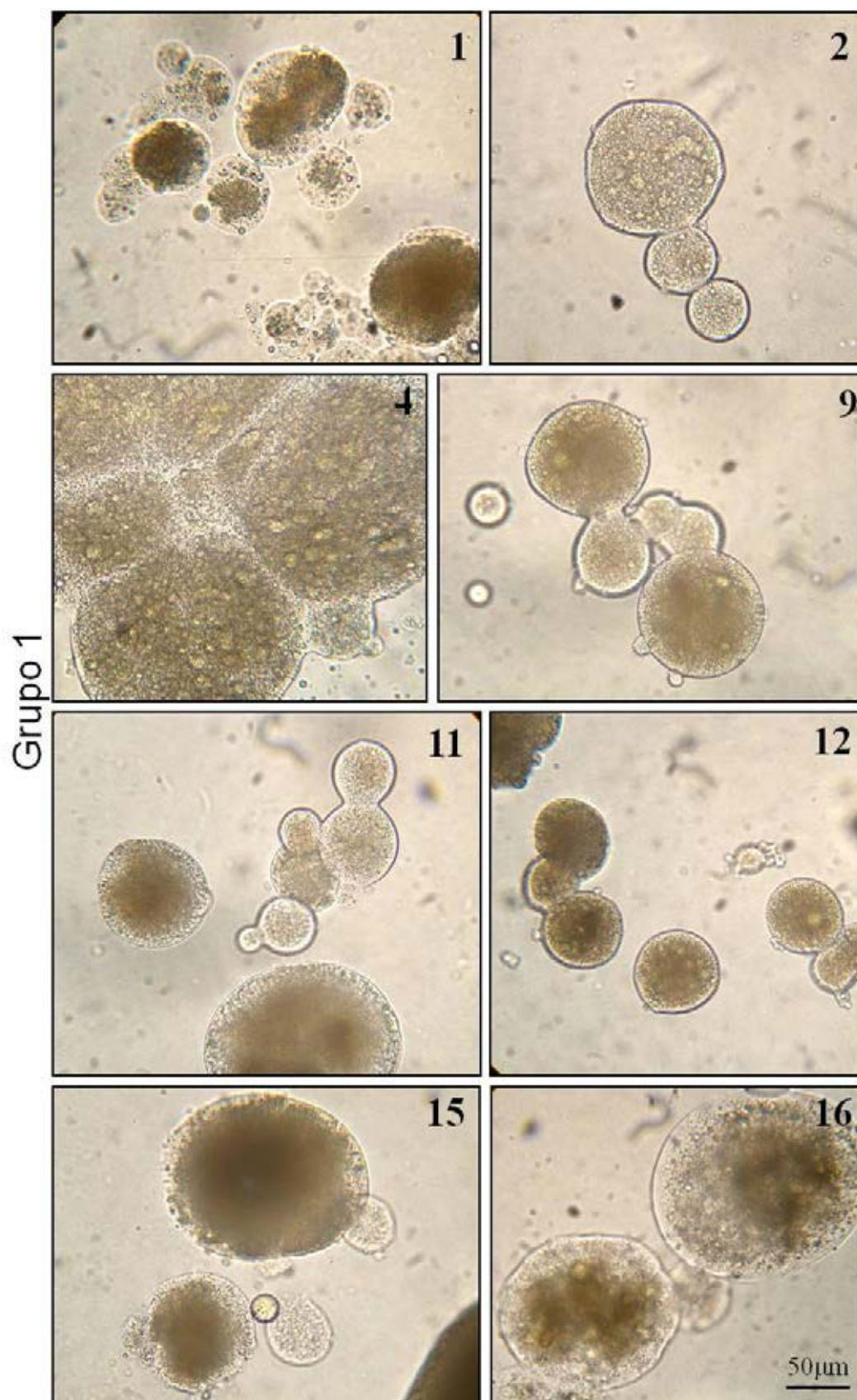


Figura 4.7 Morfologia de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa. Amostras pertencentes ao grupo 1.

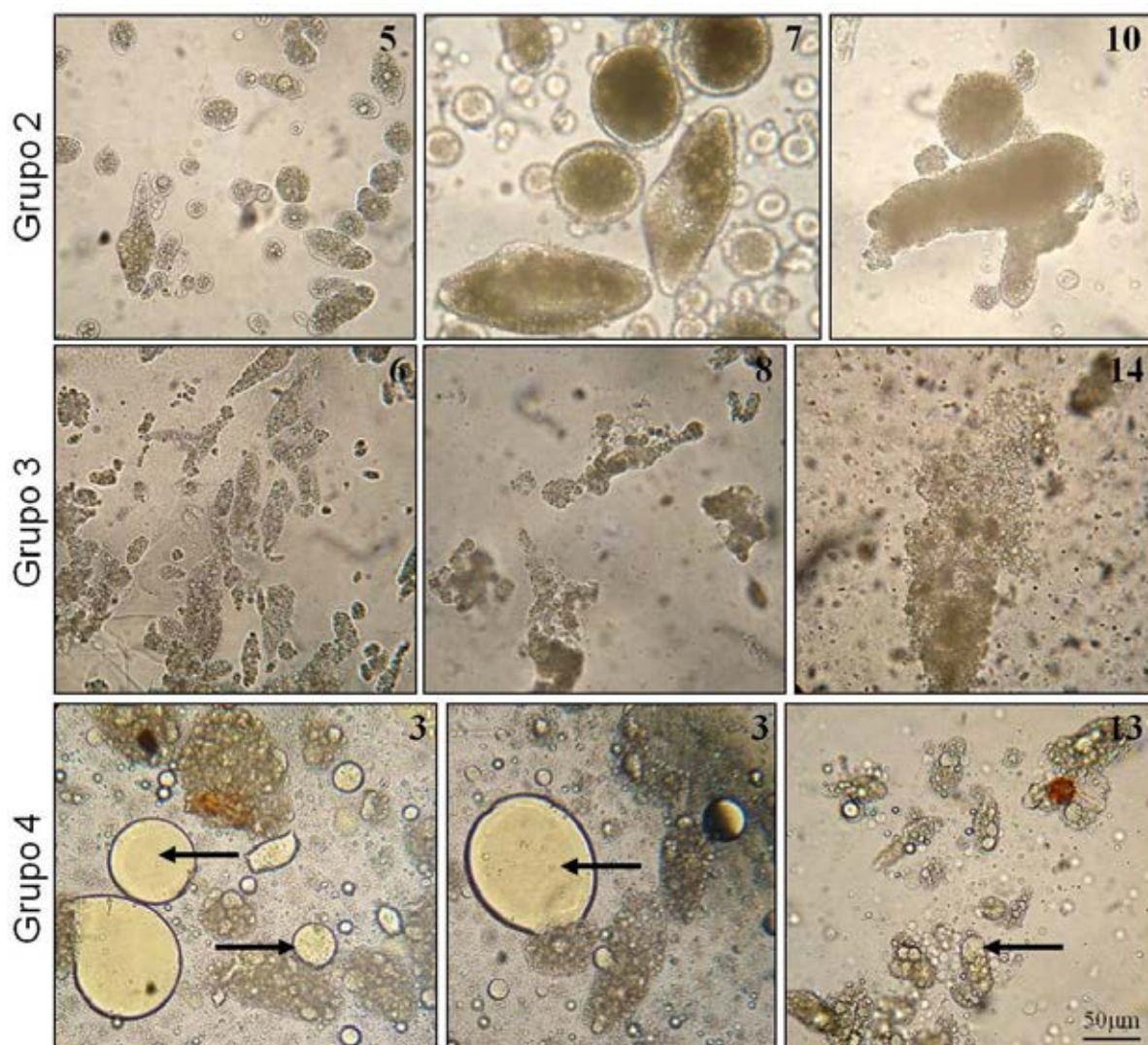


Figura 4.8 Morfologia de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa. Amostras pertencentes ao grupo 2, 3 e 4. No grupo 4, em destaque a grande quantidade de óleo de palma que não foi microencapsulado.

De acordo com Schmitt et al. (1999), polímeros em excesso podem ocasionar um excedente de cargas, prejudicando a formação dos complexos. Além disso, o aumento da viscosidade, causado pela alta concentração de polímeros em solução também pode interferir na formação das micropartículas, uma vez que a mobilidade das macromoléculas pode diminuir a ponto da competição com as moléculas do solvente se tornar maior. O fator limitante quando se trabalha com sistemas gelatina-polissacarídeo, em pH abaixo do ponto isoelétrico, é geralmente a concentração de gelatina, já que ela não desenvolve uma carga positiva suficiente para associação eletrostática de mesma razão com o polissacarídeo.

Yoon et al. (2005) estudaram a microencapsulação de aroma por coacervação complexa com gelatina e goma arábica para aplicação em pães congelados. Observaram que a concentração dos materiais de parede e a taxa de emulsificação do óleo na gelatina influenciaram a morfologia das partículas, a distribuição de tamanho e a liberação do aroma durante o forneamento dos pães, ou seja, sob aquecimento. As microcápsulas foram produzidas sem agentes químicos de reticulação, como glutaraldeído ou formaldeído, por serem tóxicos e, conseqüentemente, inapropriados para produtos farmacêuticos e alimentícios. Comparando a emulsificação em 3000 e 9000 rpm, os autores mostraram que as menores taxas de homogeneização resultaram nas microcápsulas menos resistentes ao aquecimento. Com relação à concentração das soluções de biopolímeros utilizados como material de parede, esses autores observaram que microcápsulas produzidas com maiores concentrações foram menos resistentes ao aquecimento, sendo que, intuitivamente, seria esperado o contrário.

Comunian et al. (2013) microencapsularam ácido ascórbico utilizando gelatina e goma arábica como materiais de parede. Foram preparadas nove formulações de microcápsulas contendo gelatina:goma arábica sempre na proporção 1:1 e ácido ascórbico nas proporções 50%, 75% e 100% utilizando 2,5 %, 5,0 % e 7,5 % (p/v) desses biopolímeros. Em todos os ensaios obtiveram microcápsulas esféricas, multinucleadas, ligeiramente solúveis e higroscópicas. A condição que conferiu maior estabilidade ao ativo foi a proporção de 75% entre recheio e material de parede em solução de 2,5% (p/v).

As Figuras 4.9 e 4.10 apresentam a microscopia eletrônica de varredura microcápsulas de óleo de palma em matriz de gelatina e goma arábica liofilizadas, representativas do Grupo 1 e 2 a 4, respectivamente. No geral, exibiram superfícies lisas e contínuas e ausência de fissuras e poros, sugerindo uma cobertura completa do recheio.

GRUPO 1

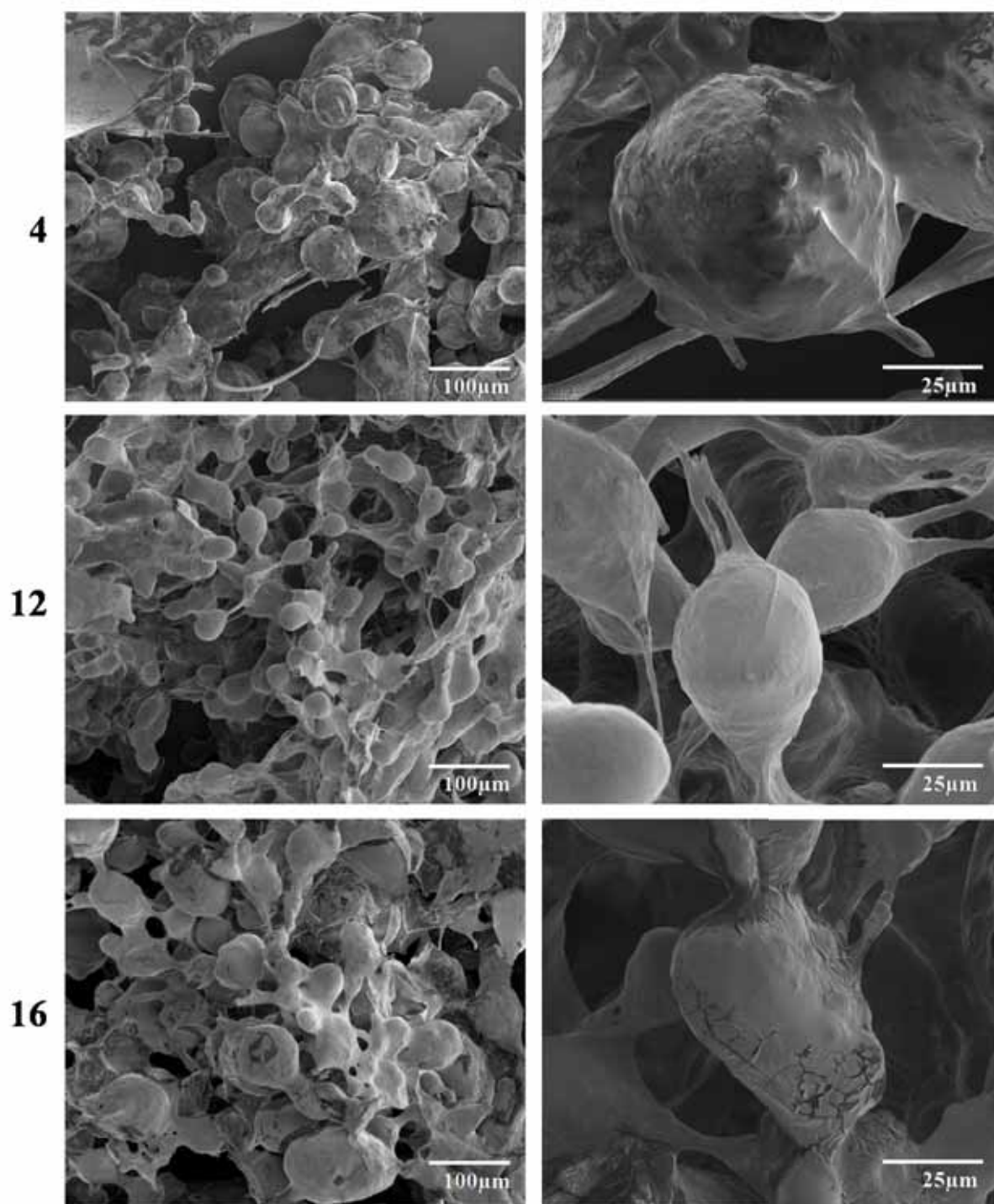


Figura 4.9 MEV de microcápsulas de óleo de palma obtidas por coacervação complexa em matrizes de gelatina e goma arábica representantes do grupo 1 analisadas em voltagem de 2,0 kV. Amostra 4 contém 2,5 % de material de parede, 125% de recheio em relação a parede e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,667. Amostra 12 contém 5,0 % de material de parede, 142,1 % de recheio em relação à parede e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,500. Amostra 16 refere-se ao ponto central e contém 5,0 % de material de parede, 100,0 % de recheio em relação à parede e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,5.

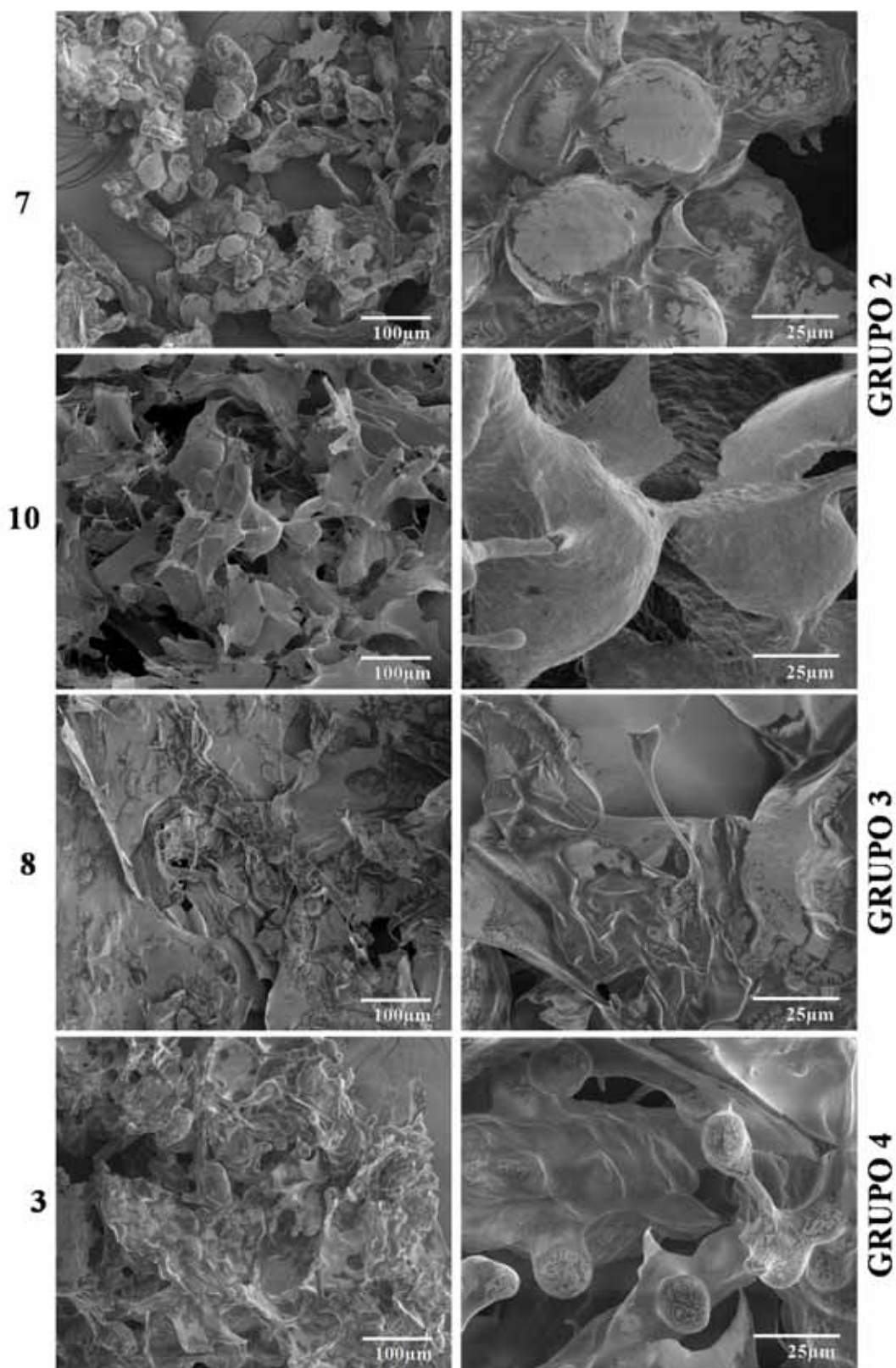


Figura 4.10 MEV de microcápsulas de óleo de palma representantes dos grupos 2, 3 e 4 analisadas em voltagem de 2,0 kV. Amostras 7 e 10 contêm 7,5 % e 9,205 % de material de parede, 125% e 100 % de recheio e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,333 e 0,5, respectivamente. Amostras 8 e 3 contêm 7,5 % e 2,5 % de material de parede, ambas 125 % de recheio em relação à parede e proporção entre gelatina e polímeros totais de 0,667 e 0,333, respectivamente.

4.3.2.2 Distribuição de tamanho das microcápsulas de óleo de palma

As medidas de tamanho das microcápsulas foram realizadas para as amostras dos grupos 1 e 2. Os valores de diâmetro médio [$D_{(4,3)}$] com os respectivos desvios padrão são apresentados na Tabela 4.5. Observa-se que foram obtidos valores de $D_{(4,3)}$ entre $97,1 \pm 5,5 \mu\text{m}$ e $689,1 \pm 69,8 \mu\text{m}$.

Destacam-se as amostras 9 (grupo 1) e 5 (grupo 2), por apresentaram valores menores que os demais grupos. A amostra 9 foi preparada na proporção 1:1 de gelatina:goma arábica, utilizando a proporção de recheio para material de parede de 100 %. Ressalta-se o fato de que essa amostra apresenta a menor concentração de biopolímeros totais (0,8 %). Ao compararmos a distribuição de tamanho de partículas dessa amostra com o ponto central (amostras 15 e 16, Tabela 4.6), produzido nas mesmas condições exceto pela concentração de biopolímeros totais (5,0 %), observam-se grandes diferenças, sugerindo que a maior concentração de biopolímeros contribui para a formação de microcápsulas maiores.

Tabela 4.5 Valores de $D_{(4,3)}$ das amostras do Grupo 1 e 2.

	Amostra	$D_{(4,3)}$ (μm) \pm desvio padrão
GRUPO 1	1	$203,9 \pm 51,4^b$
	2	$208,9 \pm 27,5^b$
	4	$243,6 \pm 40,1^b$
	9	$106,6 \pm 3,8^c$
	11	$196,5 \pm 70,8^b$
	12	$689,1 \pm 69,8^a$
	15	$262,9 \pm 17,2^b$
GRUPO 2	16	$306,6 \pm 64,6^b$
	5	$97,1 \pm 5,5^c$
	7	$130,9 \pm 36,8^c$
	10	$341,6 \pm 33,8^b$

Outro fato importante é a amostra 12 (grupo 1) que apresentou o maior valor de diâmetro médio em relação às demais amostras. As amostras 15 e 16 (ponto central) foram obtidas nas mesmas condições da amostra 12, diferenciando-se apenas na proporção de recheio em relação à quantidade de material de parede (142 %). Comparando-se a distribuição de tamanho de partículas dessas amostras, sugere-se que essa maior proporção de óleo de palma contribui para obtenção de partículas maiores.

Dong et al. (2011) microencapsularam óleo de menta em soluções de 2,5% (m/v) de gelatina tipo A:goma arábica na proporção 1:1. Analisaram as microcápsulas por microscopia *laser* confocal observando que as partículas são transparentes, esféricas, multinucleadas e o óleo fica concentrado no centro. Esses autores observaram que com o aumento da relação núcleo/parede de 1:2 para 4:1, a morfologia das microcápsulas mudou de esférica para irregular e ao mesmo tempo o tamanho das partículas e do recheio (teor de óleo nas microcápsulas) aumentou gradualmente, porém a espessura da parede diminuiu. Quando a relação núcleo:parede aumentou de 1:1 para 2:1, a quantidade de gotículas na emulsão aumentou de forma significativa e conseqüentemente resultou em grandes microcápsulas esféricas e multinucleadas. Ao aumentar a razão de 2:1 para 4:1 observou-se cápsulas de grandes diâmetros, multinucleadas e que se colidiram umas com as outras produzindo microcápsulas ainda maiores, multinucleadas e de formato irregular.

No grupo 2 (Tabela 4.7) as amostras 5 e 7 apresentaram pequeno diâmetro quando comparada às demais. Essas amostras foram produzidas com uma proporção de gelatina:goma arábica de 1:2 e 7,5 % biopolímeros, sendo que a amostra 5 utilizou menor proporção recheio/parede (75 %) comparado à amostra 7 (125%). Trata-se de amostras com altas concentrações de biopolímeros, para as quais eram esperados diâmetros maiores. Além disso, possuem diferentes proporções de recheio/parede (75% e 125%) e não apresentarem diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diâmetros médios. Assim, sugere-se que a relação proteína:polissacarídeo tenha uma influência ainda maior sobre o tamanho das partículas quando comparado a concentração de biopolímeros e a proporção de recheio em relação ao material de parede.

Tabela 4.6 Distribuição do tamanho de partículas de amostras (Am.) do Grupo 1.

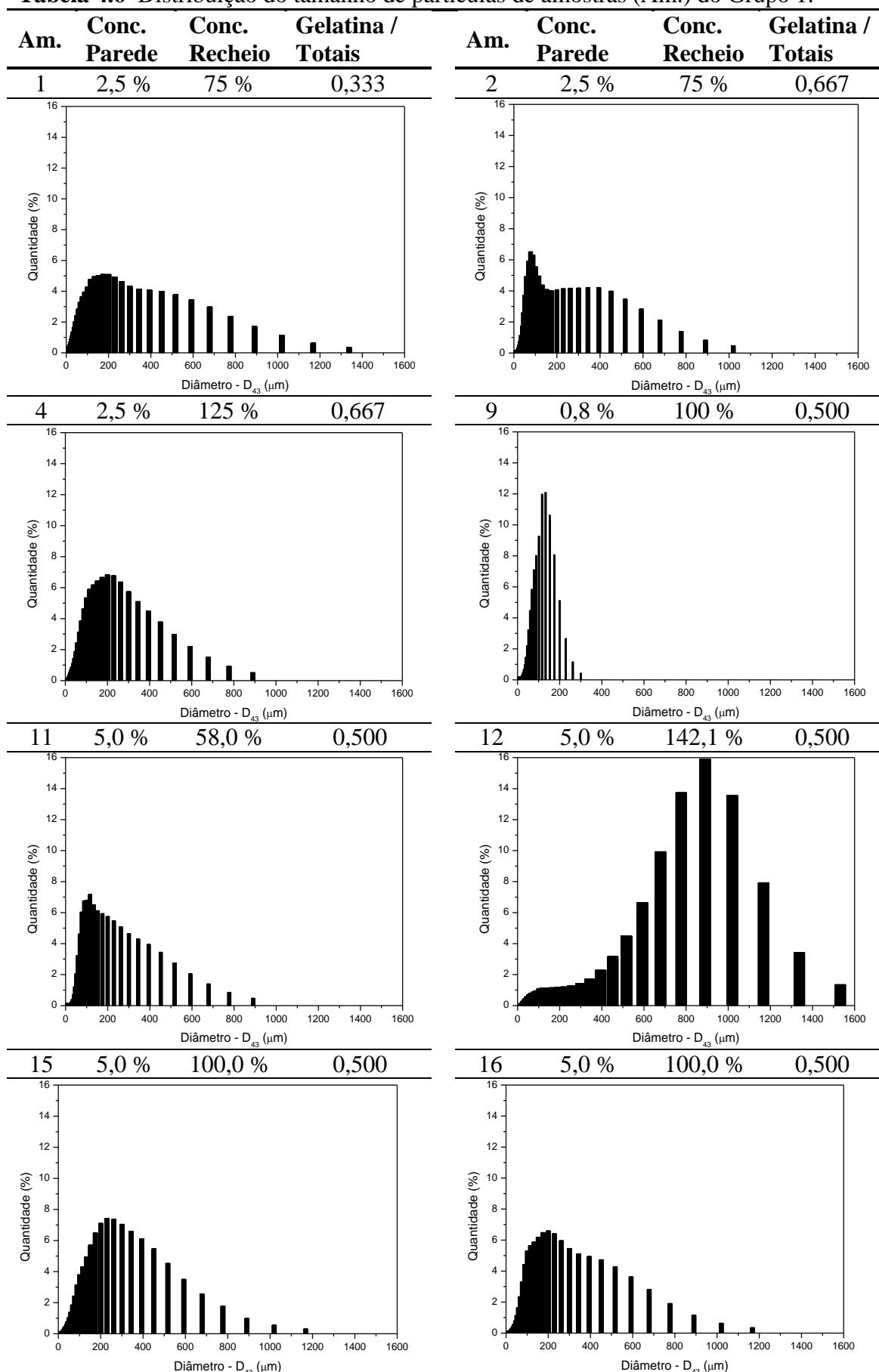


Tabela 4.7 Distribuição do tamanho de partículas de amostras (Am.) do Grupo 2.

Am.	Conc. Parede	Conc. Recheio	Gelatina / Totais
5	7,5 %	75,0 %	0,333
7	7,5 %	125,0 %	0,333
10	9,205 %	100,0 %	0,5

4.4 CONCLUSÕES

Os maiores valores de E(%) foram obtidos na proporção entre gelatina:goma arábica de 1:1 ou 2:1, utilizando óleo de palma em até 100% em relação à concentração do material de parede, numa concentração de biopolímeros de 2,5 até 7,5%.

Quanto à morfologia, altas concentrações de materiais de parede (>7,5%) e proporções de gelatina maiores que de goma arábica (2:1 ou mais) dificultaram ou impediram a formação de microcápsulas esféricas ou ovais.

Em geral, as microcápsulas exibiram superfícies lisas e contínuas e ausência de fissuras e poros, sugerindo uma cobertura completa do recheio.

As microcápsulas apresentaram valores de diâmetro médio [$D_{(4,3)}$] entre $97,1 \pm 5,5 \mu\text{m}$ e $689,1 \pm 69,8 \mu\text{m}$. A distribuição do tamanho das partículas mostrou que o aumento da concentração dos biopolímeros e da proporção do óleo de palma em relação aos materiais de parede contribuiu para a formação de microcápsulas maiores. A relação proteína:polissacarídeo apresentou uma influência ainda maior sobre o tamanho das partículas, sendo que a relação 1:2 resultou em microcápsulas de menores diâmetros.

Agradecimentos

Dra. Izabela Dutra Alvim do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas – SP, pelas medidas do tamanho de partículas.

REFERÊNCIAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**, 16th ed., v. 1-2, Arlington, 1998.
- BUNGENBERG de JONG, H. G.; KRUYT, H. R. Coacervation (partial miscibility in colloid systems). **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v. 32, p. 849-856, 1929.
- COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; MATOS JUNIOR, F. E.; BALIEIRO, J. C. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, p. 373-379, 2013.
- DONG, Z. J.; XI, S. Q.; HUAB, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X. M.; XUA, S. Y. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 63(1), p. 41-47, 2008.
- DONG, Z.; MA, Y.; HAYAT, K.; JIA, C.; XIA, S.; ZHANG, X. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 455-460, 2011.
- DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5(3-4), p. 202-214, 2000.
- EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 319-341, 2002.
- de KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; de VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9(5), p. 340-349, 2004.
- LV, Y.; ZHANG, X.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 225-233, 2012.

- OSMAN, M. E.; WILLIAMS, P. A.; MENZIES, A. R.; PHILIPS, G. O. Characterization of commercial samples of gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41(1), p. 71-77, 1993.
- PLASHCHINA, I. G.; ZHURAVLEVA, I. L.; ANTONOV, Y. A. Phase behavior of gelatin in the presence of pectin in water-acid medium. **Polymer Bulletin**, v. 58(3), p. 587-596, 2007.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 483-496, 1999.
- STRADER, A. P. Ileal transposition provides insight into the effectiveness of gastric bypass surgery. **Physiology & Behavior**, v. 88, p. 277-282, 2006.
- TEIXEIRA, C. B.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; da SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. da C. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 575-581, 2013.
- TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: Phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8(4-5), p. 401-414, 2003.
- TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, p. 166-178, 2007.
- WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; DE KRUIF, C. G. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. **Biomacromolecules**, v. 4(2), p. 293-303, 2003.
- YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications – A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43(3), p. 406-415, 2008.
- YOON, Y.; BELLAS, E.; FIRESTONE, W.; LANGER, R.; KOHANE, D. S. Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7518-7525, 2005.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível padronizar o processo de quantificação do óleo de palma presente externamente nas microcápsulas de óleo de palma produzidas por coacervação complexa de gelatina:goma arábica através de cinco extrações sucessivas com hexano e leitura da absorbância em 446 nm. O rompimento das microcápsulas foi realizado com uso de solução tampão de amônia/cloreto de amônio ($\text{pH} = 9,5 \pm 0,1$) e o óleo de palma presente no interior das microcápsulas foi quantificado através de seis extrações com hexano. O método analítico proposto atendeu às diretrizes da legislação vigente, sendo de baixo custo, rápido, de fácil execução e adequado para a finalidade proposta.

No estudo da formação de complexos eletrostáticos de gelatina e alginato de sódio, observou-se que o pH 3,5 apresenta a maior diferença entre cargas positivas da gelatina e negativas do alginato de sódio. O estudo reológico e os ensaios de turbidimetria também evidenciaram o pH 3,5 em proporções de gelatina:alginato de sódio 3:1 e 4:1 como as condições mais indicadas para a complexação. O estudo morfológico dos complexos mostrou que estes apresentam formato irregular e estrutura esponjosa, com tamanho entre $170,3 \pm 22,2 \mu\text{m}$ e $455,7 \pm 47,8 \mu\text{m}$. Embora as eficiências de encapsulação do óleo de palma tenham sido baixas, a proporção gelatina:alginato 4:1 foi a que demonstrou o maior potencial para essa aplicação.

Por outro lado, a matriz gelatina:goma arábica mostrou-se adequada para a microencapsulação de óleo de palma. Os maiores valores de eficiência de encapsulação foram obtidos na proporção entre gelatina:goma arábica de 1:1 ou 2:1, utilizando óleo de palma em até 100% em relação à concentração do material de parede, numa concentração de biopolímeros de 2,5 até 7,5%. Altas concentrações de materiais de parede ($>7,5\%$) e proporções de gelatina maiores que de goma arábica (2:1 ou mais) dificultaram ou impediram a formação de microcápsulas esféricas ou ovais. Em geral, as microcápsulas exibiram superfícies lisas e contínuas e ausência de fissuras e poros, sugerindo uma cobertura completa do recheio. As microcápsulas apresentaram valores de diâmetro médio [$D_{(4,3)}$] entre $97,1 \pm 5,5$ e $689,1 \pm 69,8 \mu\text{m}$.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da composição da parede dos coacervados de óleo de palma, através da visualização da distribuição dos biopolímeros, utilizando microscopia laser confocal.
- Avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de palma microencapsulado.
- Estudar a influência de variáveis do processo sobre a morfologia das partículas, como por exemplo, taxa de agitação, taxa de resfriamento e condições de liofilização dos coacervados.
- Verificar a eficácia do uso de agentes reticulantes para obtenção de microcápsulas gastro resistentes.
- Estudo das condições de rompimento das microcápsulas obtidas em função do pH e da ação de enzimas presentes no suco gástrico.
- Para a matriz gelatina:alginato de sódio, estudar a influência de variáveis como o tipo de ácido utilizado para ajuste de pH de coacervação, a fonte de gelatina e alginato bem como o uso de agentes reticulantes para melhorar as características dos coacervados.

Apêndices

APÊNDICE A

PREPARO DE TAMPÕES PARA ESTUDO DO ROMPIMENTO DAS MICROCÁPSULAS DE ÓLEO DE PALMA OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

1 SOLUÇÕES NECESSÁRIAS PARA PREPARO DOS TAMPÕES

1.1 Solução de ftalato ácido de potássio ($C_8H_5O_4K$) 0,1M

- Secar aproximadamente 4 g de ftalato de potássio em estufa a 110°C por 30 minutos;
- Transferir para dessecador e esperar esfriar;
- Pesas 2,042 g do ftalato seco, solubilizar com água e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100mL;
- Completar o volume com água destilada, tampar e agitar.

1.2 Solução fosfato de potássio (KH_2PO_4) 0,1M

- Secar aproximadamente 5 g de KH_2PO_4 em estufa a 110°C por 30 minutos;
- Transferir para dessecador e esperar esfriar;
- Pesas 3,4025 g do sal seco, solubilizar com água e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL;
- Completar o volume com água destilada, tampar e agitar.

1.3 Solução Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M

- Utilizando bequer de 500 mL, pesar 10,0 g de hidróxido de sódio;
- Transferir o bequer para banho de gelo e solubilizar o hidróxido de sódio com água destilada. CUIDADO: reação exotérmica;
- Deixar esfriar e transferir para balão volumétrico de 250 mL;
- Completar o volume com água destilada, tampar e agitar.

1.4 Solução de amônia (NH₃) 1M

- Pipetar 6,7 mL de NH₄OH concentrado e transferir para balão volumétrico de 100 mL contendo aproximadamente 50 mL de água destilada;
- Completar o volume até a marca do menisco com água destilada, tampar e agitar.

1.5 Solução de cloreto de amônio (NH₄Cl) 1M

- Pesar 5,35 g de NH₄Cl, solubilizar com água e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL;
- Completar o volume com água destilada, tampar e agitar.

1.6 Solução de HCl 0,1M (pH = 1)

- Pipetar 0,83 mL de HCl concentrado e transferir para balão volumétrico de 100 mL contendo aproximadamente 50 mL de água destilada;
- Completar o volume até a marca do menisco com água destilada, tampar e agitar.

2 PREPARO DAS SOLUÇÕES TAMPÕES

2.1 Solução tampão de pH = 2,2: Ftalato ácido de potássio + HCl

Em balão volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de solução de ftalato ácido de potássio 0,1M e 46,70 mL de solução de HCl 0,1M, completar o volume com água destilada, agitar e conferir o pH.

2.2 Solução tampão de pH = 5,8: Ftalato ácido de potássio + NaOH

Em balão volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de solução de ftalato ácido de potássio 0,1M e 43 mL de solução de NaOH 0,1M, completar o volume com água destilada, agitar e conferir o pH.

2.3 Solução tampão de pH = 6,8: fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaOH}$)

Em balão volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de solução de fosfato de potássio 0,1M e 23,65 mL de solução de NaOH 0,1M, completar o volume com água destilada, agitar e conferir o pH.

2.4 Solução tampão de pH = 7,4: fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaOH}$)

Em balão volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de solução de fosfato de potássio 0,1M e 39,50 mL de solução de NaOH 0,1M, completar o volume com água destilada, agitar e conferir o pH.

2.5 Solução tampão de pH = 8,0: fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaOH}$)

Em balão volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de solução de fosfato de potássio 0,1M e 46,80 mL de solução de NaOH 0,1M, completar o volume com água destilada, agitar e conferir o pH.

2.6 Solução tampão de pH = 9,24: amônia/cloreto de amônio

Em balão volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de NH_3 1M e 50 mL de solução de NH_4Cl 1M, agitar e conferir o pH.

2.7 Solução tampão de pH = 10,2: amônia/cloreto de amônio

Em balão volumétrico de 100 mL adicionar 10 mL de NH_3 1M e 90 mL de solução de NH_4Cl 1M, agitar e conferir o pH.

2.8 Solução pH = 12,3: solução NaOH 0,02M

Em balão volumétrico de 100 mL adicionar 20 mL de solução de NaOH 0,1M, completar o volume com água destilada, agitar e conferir o pH.

APÊNDICE B

PROTOCOLO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÓLEO DE PALMA EM MICROCÁPSULAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

1 INTRODUÇÃO

Trata-se de um método espectrofotométrico para quantificação de óleo de palma em microcápsulas de gelatina e goma arábica obtidas por coacervação complexa.

2 MATERIAIS

- Espectrofotômetro UV-Visível ($\lambda = 446 \text{ nm}$);
- Balança analítica;
- Agitador tipo vórtex;
- Tubos de ensaio com tampa rosqueável e estante para suporte;
- Balões volumétricos de 25 mL;
- Pipetas de 5 mL com pipetadores;
- Solução de NH_3 (1M);
- Solução de NH_4Cl (1M).

3 METODOLOGIA

3.1 Determinação da curva de calibração

- Preparar uma solução estoque de óleo de palma e hexano;
- Partindo da solução estoque preparar seis soluções de concentração conhecida e efetuar a leitura da absorbância no comprimento de onda de trabalho ($\lambda = 446\text{nm}$);
- Obter a curva de calibração e ajustar equação de reta ($y = ax + b$) aos dados experimentais observando a qualidade do ajuste (R^2).

3.2 Preparo da solução tampão (pH = 9,5 ± 0,1)

Para preparo da solução tampão (pH = 9,5 ± 0,1) é necessário primeiramente o preparo de uma solução de amônia (NH₃) 1M e outra solução de cloreto de amônio (NH₄Cl) 1M. após preparo dessas soluções em balão volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de NH₃ 1M e 50 mL de solução de NH₄Cl 1M, agitar e conferir o pH.

3.2.1 Preparo da solução de amônia (NH₃) 1M

- Pipetar 6,7 mL de NH₄OH concentrado e transferir para balão volumétrico de 100 mL contendo aproximadamente 50 mL de água destilada;
- Completar o volume até a marca do menisco com água destilada, tampar e agitar.

3.2.2 Preparo da solução de cloreto de amônio (NH₄Cl) 1M

- Pesar 5,35 g de NH₄Cl, solubilizar com água e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL;
- Completar o volume com água destilada, tampar e agitar.

3.3 Extração de óleo de palma presente externamente

- Pesar amostra e transferir para tubo de ensaio com tampa rosqueável.
- Adicionar 5 mL de hexano e agitar por trinta segundos;
- Transferir o solvente com auxílio de uma pipeta de 5 mL com pipetador para balão volumétrico de 25 mL;
- Adicionar nova alíquota de 5 mL de hexano e repetir o processo de agitação seguida da transferência da fase orgânica para balão volumétrico;
- Repetir esse processo até a quarta extração;
- Na última extração adicionar 5 mL de hexano, deixar as microcápsulas decantarem e fazer a remoção da fase orgânica para balão volumétrico;
- Por fim, completar o volume do balão volumétrico com hexano até o menisco;
- Fazer as leituras de absorbância no espectrofotômetro ($\lambda = 446 \text{ nm}$).

3.4 Rompimento das microcápsulas e extração de óleo de palma presente internamente

Após a extração externa do óleo de palma, com as mesma amostras, proceder com o rompimento das microcápsulas e extrações do óleo de palma efetuando as seguintes etapas:

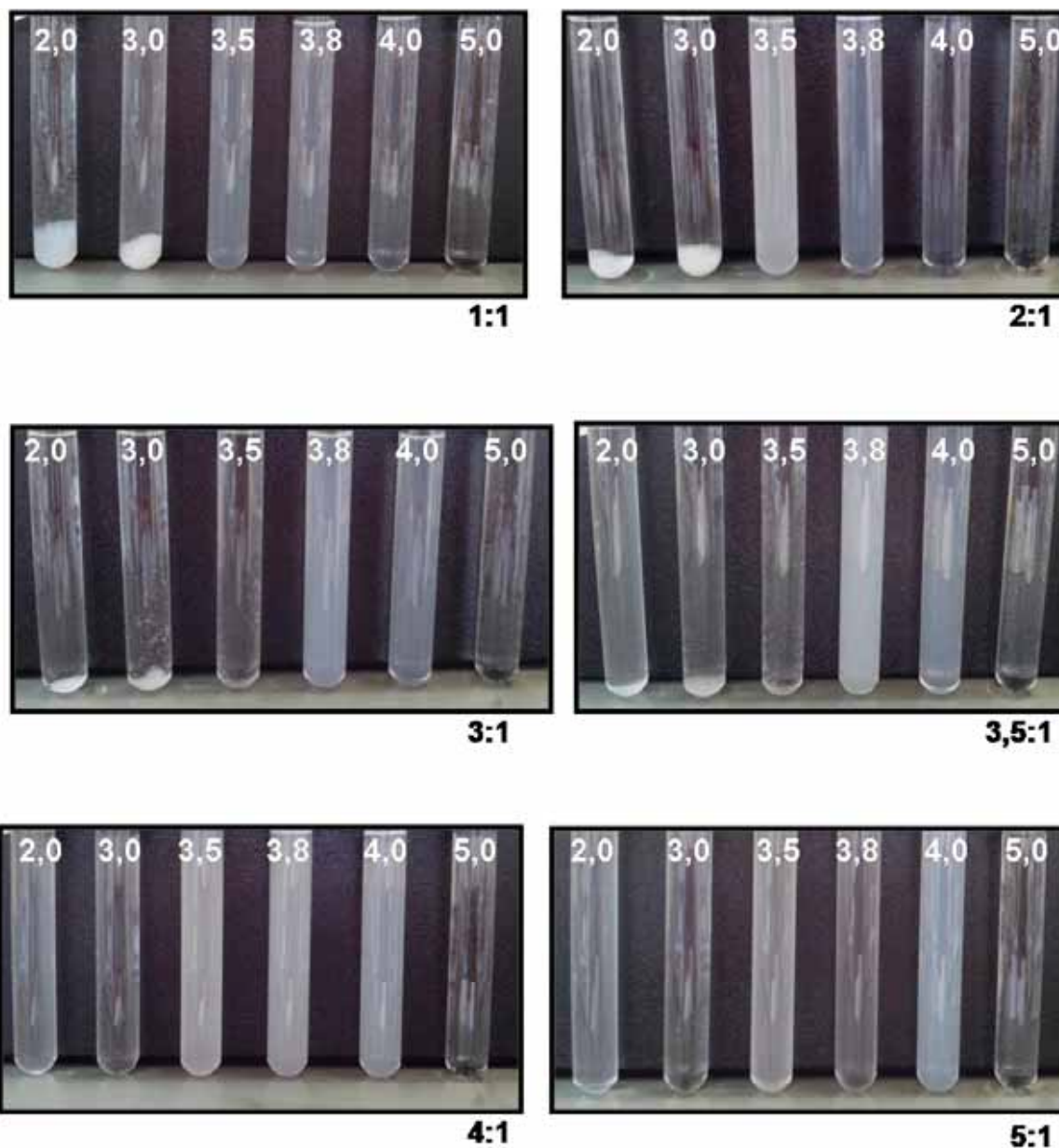
- Adicionar 5 mL do tampão amônia/cloreto de amônio ($\text{pH} = 9,5 \pm 0,1$) no tubo e agitar por um minuto;
- Adicionar 5 mL de hexano e agitar por um minuto;
- Esperar que a fase densa decante e remover a fase orgânica, com auxílio de pipeta de 5 mL e pipetador, para um balão volumétrico de 25 mL (primeira extração);
- Adicionar novamente 5 mL de hexano e repetir este processo de extração (segunda extração);
- Adicionar 3 mL de tampão e agitar o tubo por um minuto;
- Adicionar 5 mL de hexano seguida da agitação por um minuto;
- Esperar que a fase densa decante e remover a fase orgânica, com auxílio de pipeta de 5 mL e pipetador, para um balão volumétrico de 25 mL (terceira extração);
- Adicionar novamente 5 mL de hexano e repetir a extração (quarta extração);
- A quinta e sexta extração devem ser realizadas da mesma forma que as anteriores, porém adicionando-se 3 mL de hexano apenas.
- Completar o volume do balão volumétrico com hexano até o menisco;
- Fazer as leituras de absorvância no espectrofotômetro ($\lambda = 446 \text{ nm}$).

4 RESULTADOS

Através dos valores de absorvância utilizar a curva de calibração e obter a concentração de óleo de palma presente externamente e internamente nas microcápsulas.

APÊNDICE C

SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ESTEQUIOMETRIA PARA ESTUDO DOS COACERVADOS DE GELATINA E ALGINATO DE SÓDIO



Coacervados de gelatina e alginato de sódio nas proporções de 1:1; 2:1; 3:1; 3,5:1; 4:1 e 5:1. Números superiores indicam o pH de cada amostra (2,0 a 5,0).