



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5510 – ESTÁGIO SUPERVISIONADO

ESTUDO DA ESTABILIDADE DO CORANTE
NATURAL BETALAÍNA MICROENCAPSULADO COM
MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA/ALGINATO

Acadêmica: Bethânia Luiza Horst

Orientadora: Prof^a. Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza

Florianópolis, novembro de 2005.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5510 – ESTÁGIO SUPERVISIONADO

ESTUDO DA ESTABILIDADE DO CORANTE
NATURAL BETALAÍNA MICROENCAPSULADO COM
MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA/ALGINATO

Bethânia Luiza Horst

Relatório apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, para a obtenção da aprovação na disciplina QMC5510 – Estágio Supervisionado sob orientação da Prof^ª. Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza.

Florianópolis, novembro de 2005.

“É incrível a força que as coisas têm, quando é necessário que elas aconteçam”

(C.V.)

AGRADECIMENTOS

De forma muito especial aos meus dois amores: ao meu marido Ricardo por seu companheirismo, seu amor e sua paciência e a minha Pequena (Júlia) por ter chego em um momento tão especial e ter enchido ainda mais minha vida de alegrias e de sentido.

À Tatiane por sua amizade, dedicação e presença em muitos dos momentos marcantes de minha vida.

À minha família que sempre me apoiou e me deu forças para continuar mesmo nos momentos mais difíceis.

À professora Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

A todo o grupo QUITTECH, e em especial ao Alexandre, à Karin e a Karen pela amizade e apoio.

Aos meus colegas que estiveram comigo durante toda a graduação e tornaram todos os momentos mais especiais, em especial a Bruna e em especial a Lidiane pela ajuda que me deu.

A Deus por cada dia que passo ao lado das pessoas que amo e que me fazem feliz.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	7
	LISTA DE TABELAS	8
	LISTA DE ABREVIATURAS	9
1	RESUMO	10
2	INTRODUÇÃO	11
2.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.2	JUSTIFICATIVA	20
2.3	OBJETIVOS	21
2.3.1	Objetivo Geral	21
2.3.2	Objetivos Específicos	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Materiais e Reagentes	23
3.1.1	Equipamentos	23
3.1.2	Reagentes	24
3.2	Métodos	24
3.2.1	Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana	24
3.2.2	Preparação das Microesferas de Quitosana/Alginato	24
3.2.3	Microencapsulação do Corante Betalaína pelo Método de Coacervação	24
3.2.4	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	25
3.2.5	Estudo da Morfologia do Material Formado entre Quitosana, Alginato e Corante	25
3.2.6	Análise Termogravimétrica (TGA)	25
3.2.7	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	25
3.2.8	Estudos de Liberação do Corante em Função do pH	26
3.2.9	Determinação do Grau de Intumescimento	26
3.2.10	Estudos de Liberação do Corante em Função da Temperatura	27
3.2.11	Estudos de Liberação do Corante na Presença e na	27

	Ausência de Luz	
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana (% GD)	28
4.2	Espectro UV – Visível para o Corante Betalaína	29
4.3	Caracterização das Microesferas por Espectroscopia no Infravermelho	30
4.4	Análise da Morfologia das Microesferas Utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	32
4.5	Análise Termogravimétrica (TGA) das Amostras de Microesferas de Quitosana/Alginato	34
4.6	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para as Microesferas de Quitosana/Alginato	35
4.7	Estudos de Liberação do Corante em Função do pH	36
4.8	Determinação do Grau de Intumescimento	38
4.9	Estudos de Liberação do Corante em Função da Temperatura	39
4.10	Estudos de Liberação do Corante na Presença e na Ausência de Luz	40
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula geral de betalaínas. (A) o ácido betalâmico está presente em todas as moléculas de betalaínas. (B) a estrutura representa uma betacianina ou uma betaxantinas, dependendo dos substituintes R_1 e R_2 .	13
Figura 2. Estrutura química da betanina.	13
Figura 3. Produtos de decomposição da betanina	15
Figura 4. Estrutura química do alginato de sódio	19
Figura 5. Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b)	20
Figura 6: Curva de titulação condutimétrica da quitosana.	28
Figura 7. Espectro eletrônico UV-VIS para o corante betatalaína obtido em solução aquosa.	30
Figura 8: Espectro de infravermelho – a) quitosana, b) alginato, c) quitosana/ alginato, d) quitosana/alginato/corante e e) corante.	31
Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura das microesferas: a- microesfera de quitosana/alginato; b- corte de uma microesfera de quitosana/alginato; c- população de microesferas de quitosana/alginato contendo corante; d- superfície de uma microesfera de quitosana/alginato contendo corante.	33
Figura 10: Análise termogravimétrica (TGA) – a) quitosana, b) alginato, c) quitosana /alginato, d) quitosana/alginato/corante e e) corante	35
Figura 11: Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) – a) quitosana, b) alginato, c) quitosana/alginato, d) quitosana/ alginato /corante e e) corante	36
Figura 12: Perfil da curva de liberação do corante betalaína a pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 a $T = 25^\circ\text{C}$.	37
Figura 13: Perfil da curva de liberação do corante betalaína nas temperaturas de 25,0, 30,0, 35,0 e 45,0 $^\circ\text{C}$ e em pH 4,0.	39
Figura 14: Perfil da curva de liberação do corante betalaína na presença e ausência de luz em pH 1,0 e a 25 $^\circ\text{C}$.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grau de intumescimento para as microesferas de quitosana/alginato sem corante e com o corante betalaína em pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0.	38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%GD	Grau de desacetilação da quitosana
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo de absorção
dTG	Primeira derivada da análise termogravimétrica
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
GI	Grau de intumescimento
IV	Espectroscopia no infravermelho
k	Condutância (mS/cm)
M	Unidade de concentração: Molaridade (mol L ⁻¹)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mt	Quantidade de corante liberado no tempo t
Mf	Quantidade de corante total liberado
T	Temperatura
TGA	Análise termogravimétrica
V	Volume (L)
V₁	Volume de NaOH empregado para atingir o 1º ponto de equivalência na obtenção do %GD
V₂	Volume de NaOH empregado para atingir o 2º ponto de equivalência na obtenção do %GD
W	Massa de microesferas de quitosana (mg)

1. RESUMO

Os corantes artificiais têm sido questionados, com relação aos benefícios para a saúde, por certos segmentos da população, e esta tendência aliada à publicidade contínua e adversa, tem aumentado o interesse por corantes naturais.

As betalaínas são o grupo de compostos responsáveis pela coloração vermelha da beterraba. Sua instabilidade frente a fatores como pH, temperatura, oxigênio molecular, luz, metais e outros compostos é a maior limitação tecnológica considerando seu uso como corante em alimentos.

Atualmente para conferir estabilidade, melhorar a solubilidade e facilitar o manuseio dos corantes naturais, tem se utilizado a tecnologia de microencapsulação. A microencapsulação é uma técnica que possibilita o isolamento e a manutenção de substâncias ativas no interior de uma microestrutura, com dimensões variando de alguns micrometros até alguns milímetros de diâmetro, funcionando como verdadeiros reservatórios do agente ativo. Recentemente, surgiu o interesse no uso de biopolímeros como agentes encapsulantes de corantes naturais.

Este trabalho visa o estudo da estabilidade do corante natural betalaína microencapsulado em matriz polimérica de quitosana/alginate frente a fatores como pH, temperatura e luz. As microesferas de quitosana/alginate contendo corante foram preparadas pelo método de coacervação de fases. As amostras obtidas foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises térmicas (TGA e DSC). As análises de MEV mostram que as microesferas apresentam-se com poros e fissuras. A cinética de liberação do corante a diferentes pH indicou uma liberação mais rápida em pH 1,0 e mais lenta em pH 5,0. Os estudos de liberação a diferentes temperaturas em pH 4,0 indicam uma maior velocidade de liberação a 45°C. Estudos de liberação na ausência e presença de luz a pH 1,0, indicam que na ausência de luz a liberação torna-se mais lenta.

Palavras-chave: betalaína; quitosana/alginate; microencapsulação.

2. INTRODUÇÃO

2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os principais fatores para avaliar a qualidade dos alimentos, do ponto de vista organoléptico ou sensorial, são cor, sabor e textura, mas a cor pode ser considerada o mais importante deles; por este motivo o desenvolvimento de produtos de aparência atrativa é importante.

Como o consumo de alimentos naturais tem diminuído, enquanto que o de alimentos processados tem aumentado, a cor dos alimentos vem sendo um importante aspecto a ser observado no processo de formulação de alimentos (SCHOEFS, 2004). Para oferecer cor aos alimentos processados, faz-se o uso de corantes, tanto naturais quanto artificiais. Porém, recentemente, os corantes artificiais têm sido questionados por certos segmentos da população, e esta tendência aliada à publicidade contínua e adversa, tem aumentado o interesse pelos corantes de origem natural (CARVALHO, 1994; KUSUHARA, 1998). A adição de corantes naturais para dar cor aos alimentos processados, pode ser consideravelmente desejável, por não apresentar efeitos tóxicos (SIMÃO, 1985; SAIJA et al., 1990) e por apresentar vários efeitos terapêuticos (BAJ et al., 1983; HEINONEN et al., 1998). Contudo, é necessário notar que corantes sintéticos tem conhecidas vantagens sobre os naturais, tais como alto poder de pigmentação, estabilidade, facilidade no processamento e estocagem, sendo mais baratos e disponíveis em quantidades ilimitadas (WISSGOT & BORTLIK, 1996).

Com a finalidade de tornar os corantes naturais mais competitivos, observa-se nas últimas décadas, que as pesquisas estão voltadas muito mais para os corantes naturais e estão direcionadas desde para a descoberta de novos pigmentos, até o estudo da estabilidade e aplicabilidade destes pigmentos em alimentos industrializados (DAMASCENO, 1988; FRANCIS, 1989; SHAHIDI & HAN, 1995; STRINGHETA, 1999).

Os pigmentos naturais em alimentos são derivados de diversas substâncias: i) substâncias fenólicas e produtos de sua oxidação; ii) derivados de porfirinas, como grupo heme e clorofilas; iii) pigmentos escuros produzidos enzimaticamente ou não-enzimaticamente (Maillard); iv) complexos de metais com proteínas ou compostos fenólicos; v) carotenóides e pigmentos relacionados (POTHAKAMURY, 1995).

O concentrado de beterraba, de coloração vermelha, é obtido do suco da *Beta vulgaris ruba*, por prensagem ou extração aquosa e posterior purificação. O produto é constituído de vários pigmentos, pertencentes à classe das betalaínas (Figura 1). Seu principal cromóforo (75 a 95%) no suco é a betanina (Figura 2). O produto concentrado é solúvel em água e insolúvel em óleo (ARAÚJO, 1999).

Betalaínas são pigmentos que contém nitrogênio e são solúveis em água (STRACK et al., 2003). Os pigmentos betalaínas podem ser descritos como um sistema 1,2,4,7,7-pentasubstituído 1,7 - diazoheptamético (VON ELBE & SCHWARTZ, 1996). Eles podem ser divididos em dois grupos estruturais, as betaxantinas amarelas e as betacianinas vermelho-violeta, dependendo dos substituintes $R_1 - N - R_2$. Mais de 50 betalaínas são bem conhecidas, e todas elas têm a mesma estrutura básica, em que R_1 e R_2 podem ser hidrogênio ou um substituinte aromático. Sua cor é atribuída a uma dupla banda de ressonância (BÖHM & RINK, 1988). A conjugação de um núcleo substituinte aromático com o cromóforo 1,7- diazoheptamético muda a absorção máxima de 480 nm nas betaxantinas para 540 nm nas betacianinas (STRACK et al., 1993). A cor é devido à estrutura de ressonância; se o grupo R_1 ou R_2 estende a ressonância, por exemplo, anel aromático (ciclodopa-5-O-glicosídeo), o pigmento é vermelho e denominado de betacianina; se a ressonância do cromóforo com os substituintes com os substituintes R_1 e R_2 não é estendida, por exemplo R_1 ou R_2 é um aminoácido (glutamina e/ou ácido glutâmico), o pigmento é amarelo e denominado betaxantina.

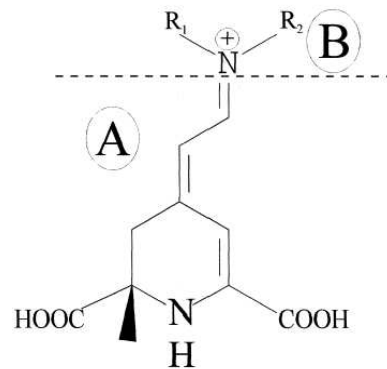


Figura 1. Fórmula geral de betalaínas. (A) o ácido betalâmico está presente em todas as moléculas de betalaínas. (B) a estrutura representa uma betacianina ou uma betaxantina, dependendo dos substituintes R_1 e R_2 .

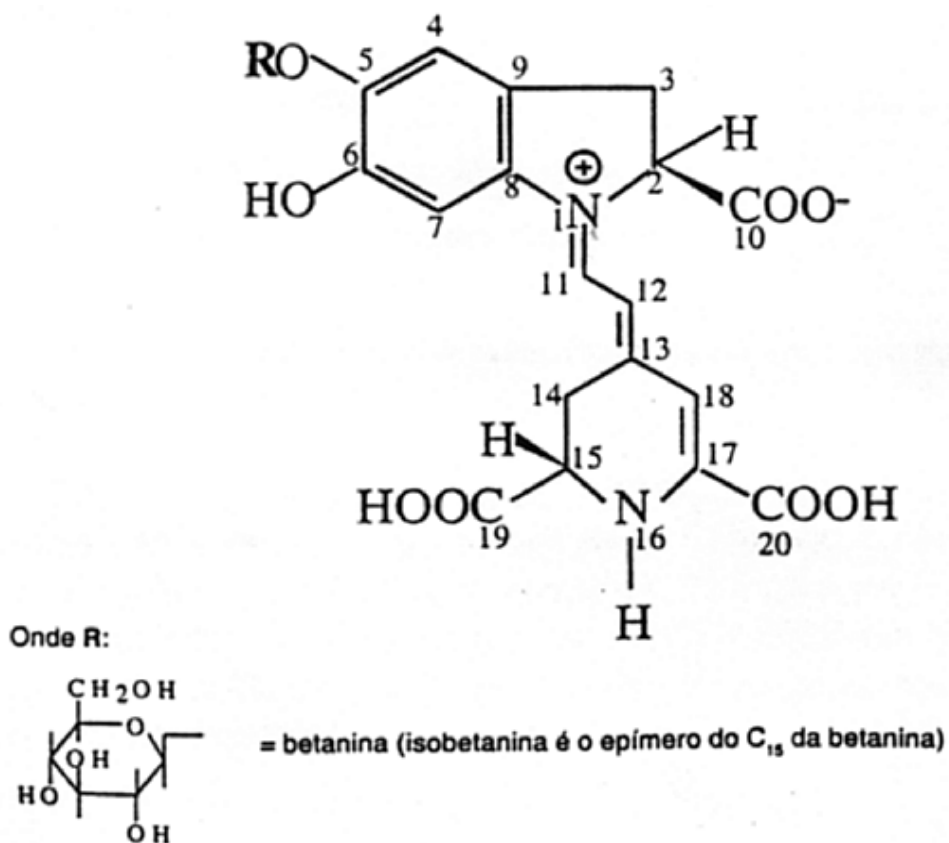


Figura 2. Estrutura química da betanina.

Quando betalaínas são usadas como corantes em alimentos, a estabilidade da cor é o maior interesse. Existem vários fatores que afetam a estabilidade destes pigmentos durante a preparação, processamento e estocagem dos alimentos como luz, pH, temperatura, íons metálicos entre outros. A estabilidade de soluções de betanina é dependente do pH. Huang e Von Elbe (1987) mostraram que o pH ótimo para estabilidade máxima da betanina na presença de oxigênio está entre 5,5 e 5,8. A temperatura também mostra um claro efeito sobre a estabilidade das betalaínas (DRDÁK & VALLOVÁ, 1990). O aquecimento de soluções de betanina produz uma gradual redução da cor vermelha, e eventualmente o aparecimento de uma cor marrom clara. A degradação por exposição à luz de betalaínas segue uma cinética de primeira ordem. Quando betacianinas foram expostas à luz fluorescente, observou-se que a degradação foi maior em pH 3,0 do que em pH 5,0 (von ELBE et al., 1974).

A molécula de betanina contém três grupos carboxílicos, sendo que dois apresentam pKa de 3,4 e um átomo de nitrogênio quaternário ($>N^+=$) com uma fraca carga positiva neutralizada por um grupo carboxil na posição 2, o qual resulta num pigmento com propriedades anfotéricas. Apresenta, também, dois grupos hidroxila (pKa=8,5) nas posições 5 e 6, onde o da posição 5 encontra-se esterificado com uma molécula de glicose via β -ligação (NILSSON, 1970).

O mecanismo de degradação da betanina, mediada por temperatura e/ou pH, envolve ataque nucleofílico na posição C₁₁, originando os compostos de degradação: ácido betalâmico e ciclodopa-5-O-glicosídeo. Sob aquecimento e condições ácidas pode ocorrer a formação de pequenas quantidades de betanina descarboxilada, isobetanina e neobetanina (Figura 3).

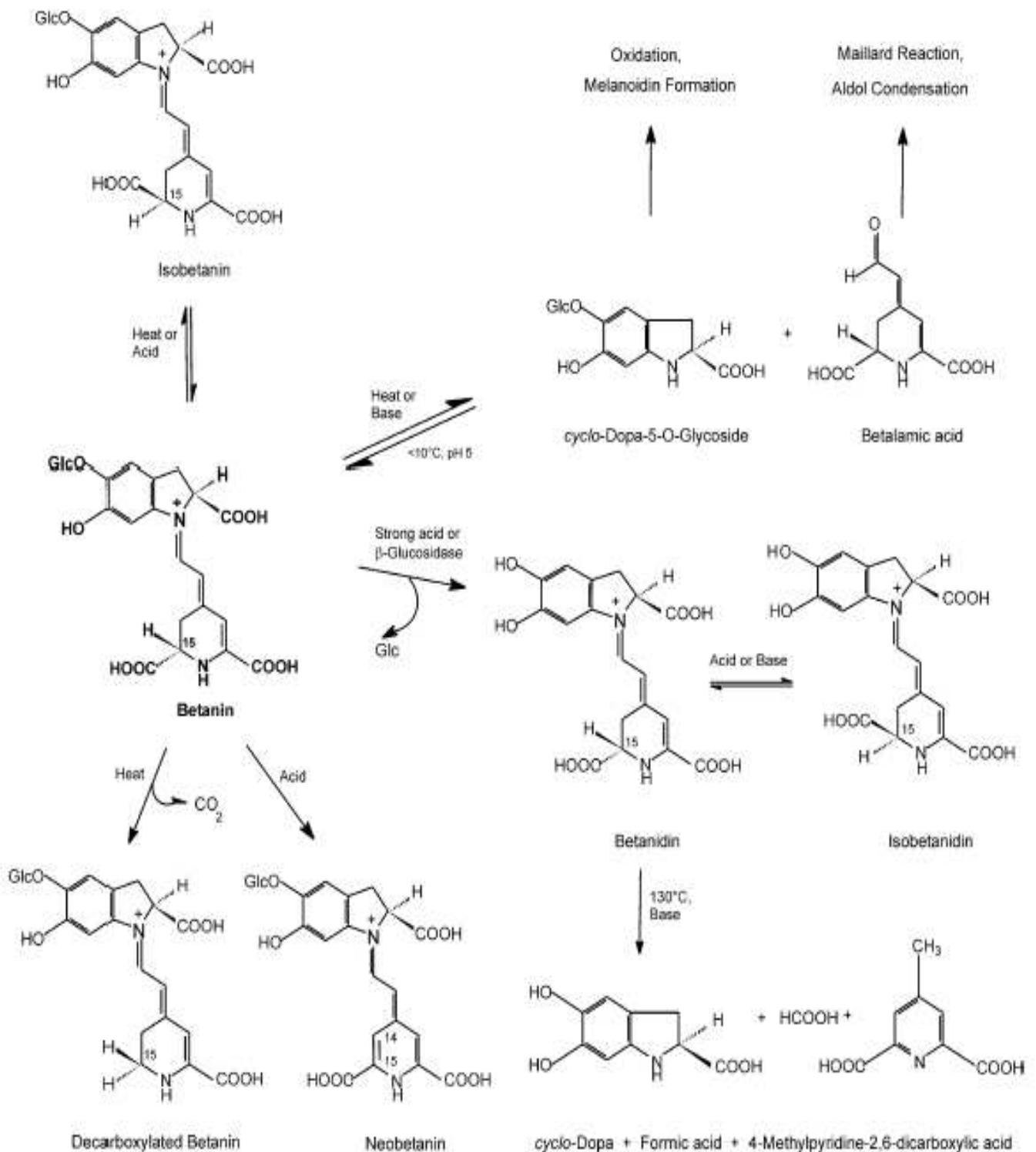


Figura 3. Produtos de decomposição da betanina.

Fonte: F.C. Stintzing and R. Carle / Trends in Food Science & Technology 15 (2004) 19–38.

As betalaínas são empregadas como corante em alimentos na forma de pó (corante puro) e extrato de beterraba vermelha. O extrato tem maior preferência como corante em relação ao pó frente muitas aplicações, pois este último apresenta menor força tintorial. O uso de betalaínas como corante é reforçado pelo fato de que estas são destituídas de atividades mutagênica e toxicidade aguda. Entretanto, fatores como luz, pH, temperatura, oxigênio, entre outros, afetam a sua estabilidade durante a preparação, processamento e estocagem dos alimentos, onde conseqüentemente a cor, inicialmente vermelha, pode ser alterada (ARAÚJO, 1999). Assim, a utilização do corante de beterraba em alimentos ainda é limitada fazendo-se necessário o desenvolvimento de técnicas de proteção ao corante contra as várias adversidades existentes.

Sendo assim, a indústria de alimentos necessita de tecnologias que protejam os corantes naturais do meio ambiente, devido à instabilidade destes na presença de luz, ar, umidade e temperaturas elevadas (FRANCIS, 1989).

Para promover a proteção necessária aos corantes naturais, tem sido utilizada a técnica de microencapsulação que é um processo no qual ocorre a formação de micropartículas onde um ingrediente ativo é recoberto por uma fina camada de outro material. A microencapsulação possibilita o isolamento e a manutenção de substâncias ativas no interior de uma microestrutura.

As micropartículas podem ter vários diâmetros (0,2-5000 μm) e formas, dependendo do material e do método usado para prepará-las (BALASSA & FANGER, 1971). A retenção de materiais ativo no interior de micropartículas é governada por fatores como sua natureza química, incluindo a funcionalidade química, a relativa volatilidade e polaridade (GOUBET et al., 1998).

As membranas que formam as micropartículas podem ser polímeros naturais ou sintéticos. O termo micropartícula é genérico e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, microesferas e microcápsulas. Denominam-se microesferas aqueles sistemas em que o ingrediente ativo, encontra-se homogeneamente disperso no interior da matriz polimérica. Dessa forma, obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Microcápsulas, ao contrário, constituem sistemas reservatórios, onde é possível

identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Nesse caso, a substância ativa encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica isolando o núcleo do meio externo (SPARKS, 1981).

Teoricamente, qualquer material que necessite ser protegido, isolado ou lentamente liberado pode ser encapsulado. Atualmente, existem diversos métodos para preparação ou obtenção de micropartículas, os quais podem ser classificados em: a) Métodos Físicos: Spray dryer, spray chilling, spray cooling, leite fluidizado, extrusão centrífuga de multiorifícios, co-cristalização e liofilização, b) Métodos Químicos: Inclusão molecular e polimerização interfacial, c) Métodos Físico-químicos: Coacervação, separação de fase orgânica e formação de lipossomas (KING, 1995; BENITA, 1996).

Os mecanismos de liberação dos materiais contidos nas microcápsulas podem variar, sendo os principais: a) fratura; b) difusão; c) dissolução ou fusão e d) biodegradação (WHORTON & REINECCIUS, 1995).

A microencapsulação objetiva promover as seguintes ações a um material, de modo que ele mantenha a sua eficiência reativa em relação ao meio externo: i) proteção contra luz, umidade e oxigênio; ii) redução da taxa de transferência de massa; iii) fácil manipulação do núcleo através da diminuição da higroscopicidade, de modo a manter o escoamento constante; posicionamento do núcleo mais uniformemente em uma mistura, em função de seu diâmetro, quando usado em pequenas quantidades e manutenção da integridade da estrutura; iv) liberação controlada e gradativa sob condições de pH, calor entre outros; v) facilidade de manuseio e estocagem do ingrediente líquido, e retenção de compostos voláteis de sabor e aroma, para liberação sob condições pré-definidas (DZIEZAK, 1988; ENGELHARDT et al.,1988). Com relação aos corantes, a técnica de microencapsulação pode ser utilizada visando melhorar a solubilidade, facilitar o manuseio e aumentar a estabilidade.

O encapsulante ideal deve proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos, ter solubilidade em água e não possuir sabor desagradável, no caso de consumo oral. A escolha do encapsulante dependerá das propriedades químicas e físicas do

ingrediente encapsulado, do processo utilizado para formar a micropartícula e das propriedades desejadas. Os encapsulantes mais comuns são hidrocolóides de gomas vegetais, gelatina, amido modificado, dextrinas, lipídeos e emulsificantes e algumas fontes alternativas como a quitosana (DZIEZAK, 1988; SHAHIDI & HAN, 1995). Novos procedimentos para preparar materiais híbridos, com a mistura de polímeros naturais ou sintéticos, também têm sido muito investigados (CRESCENZI et al., 1997).

Vários têm sido os estudos que mostram a viabilidade de se complexar quitosana e alginatos para dar estabilidade a complexos hidrogéis (SMITHA et al., 2005; LI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005; YE et al., 2005; WEN-TAO et al., 2005; KANTI et al., 2004; WONG et al., 2002). Complexação de quitosana com alginato reduz a porosidade das microesferas de alginato e a quitosana adquire um nível maior de força mecânica.

Os alginatos pertencem a uma extensa classe de polímeros polissacarídeos que formam suspensões hidrocolóides em água (NARAYANI et al., 2000; TOLSTOGUZOV, 2004). Alginato de sódio (Figura 4) é um sal de sódio de ácido algínico e é um polímero aniônico solúvel em água. O ácido algínico é um conhecido polissacarídeo natural, extraído de algas marinhas pardas, que é consistido de resíduos de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico unidos por ligação (1 \rightarrow 4) de composição e seqüência variada (KADOKAWA et al., 2005). Uma das propriedades excelentes de alginatos é sua habilidade em formar hidrogéis irreversíveis e estáveis ao calor quando processados com cátions divalentes (HAIR et al., 1996; KIM et al., 2003; WANG et al., 2003). Eles também são biocompatíveis, hidrofílicos e biodegradáveis em condições fisiológicas normais (BECKER et al., 2001). Por isso, alginato de sódio tem sido usado para a formação de materiais híbridos combinado com polímeros catiônicos, tal como a quitosana, por meio de polimerização.

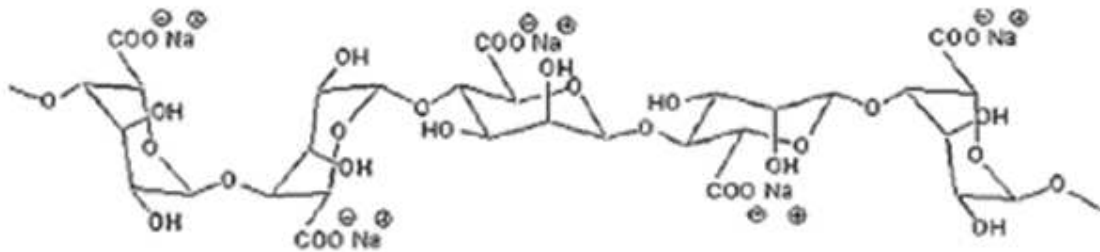


Figura 4. Estrutura química do alginato de sódio.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico derivado da quitina pela desacetilação alcalina e tem sido usada para reforçar microesferas de alginato (MURATA et al., 1993) baseado na interação eletrostática entre grupos carboxilato do alginato e grupos amino da quitosana (HAAS et al., 1996). A quitosana (Figura 5 - b) é composta principalmente de glucosaminas, 2-amino-2-desoxi- β -D-glicopirranose, podendo ainda conter unidades de glicosamina acetilada. Desta forma, qualquer polímero quitina que possua um grau de desacetilação maior do que 40%, já pode ser considerado quitosana (TAN et al., 1998). Os grupos amino presentes em toda a extensão da cadeia polimérica, dão a quitosana um caráter de polieletrólito catiônico ($pK_a \gg 6,5$), fazendo com que o polímero seja solúvel em soluções com o $pH < 6,5$ (MUZZARELLI, 1973; KRAJEWSKA, 2004). A quitosana é biologicamente renovável, biodegradável, biocompatível, não mutagênica, não tóxica e biofuncional (LI et al., 2005).

Em função destas características, a matriz de quitosana apresenta grandes possibilidades de formar filmes, fibras e membranas de microcápsulas (MUZZARELLI, 1973).

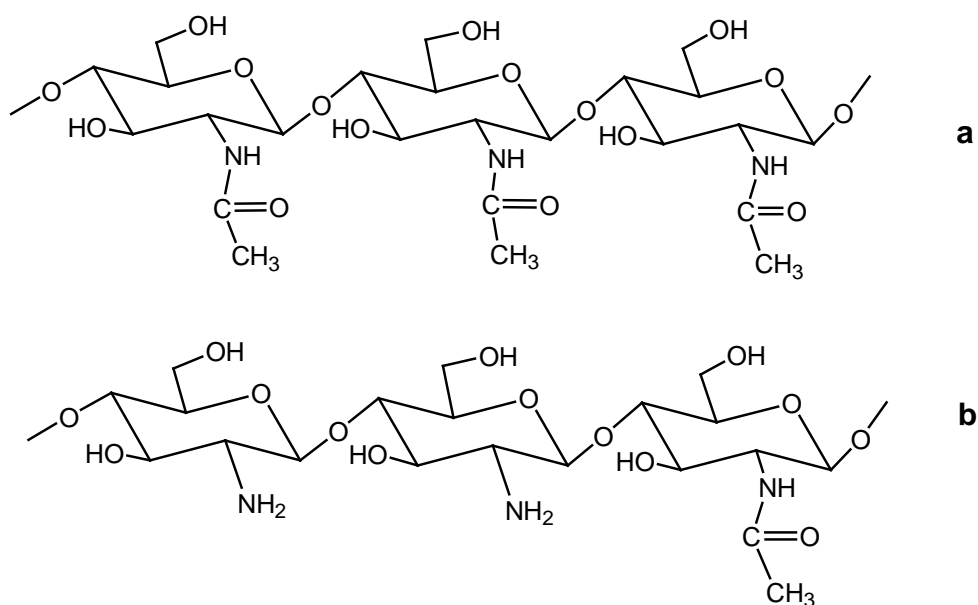


Figura 5. Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).

A rara solubilidade da quitosana, propriedades de solução, caráter de polieletrólito, atributos físicos, atividade química e biológica, tornam a quitosana um biopolímero atrativo para muitas aplicações comerciais. A quitosana pode ser empregada como: suporte de drogas para uso oral, na agricultura (tratamento de sementes, inseticidas), no processamento de alimentos e biotecnologia, na produção de papel, têxtil, produtos fotográficos, agentes quelante de metais pesados e como adsorvente de corantes (SANFORD & HUTCHINGS, 1997; CHEN et al., 1996).

2.2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o consumo de alimentos naturais tem diminuído enquanto o consumo de alimentos industrializados tem aumentado. Na produção destes alimentos manufaturados, são usados vários aditivos alimentícios (conservantes, fermentos, corantes etc.). O uso de aditivos nos alimentos é justificado pela

restauração ou compensação das perdas produzidas no decorrer da industrialização dos mesmos, devido à sobrecarga tecnológica empregada.

Dentre as três principais características de um alimento, cor, sabor e textura, a cor se apresenta como atributo sensorial mais marcante, e muitas vezes é uma característica decisiva na escolha de um produto pelo consumidor. Para a indústria de alimentos, a cor é considerada um parâmetro importante no controle de qualidade. Existe uma tendência mundial do uso de corantes naturais em detrimento dos sintéticos. Apesar das limitações no processamento e o alto custo, o uso de corantes naturais em alimentos no mundo está crescendo e este crescimento é devido à percepção do consumidor de que “o natural é uma opção mais saudável”.

Com a finalidade de tornar os corantes naturais mais competitivos, observa-se, nas últimas décadas, que as pesquisas estão voltadas muito mais para os corantes naturais e estão direcionadas desde para a descoberta de novos pigmentos, assim como para o estudo da estabilidade e aplicabilidade destes pigmentos em alimentos industrializados.

Fatores como luz, pH, temperatura, oxigênio, entre outros, afetam a estabilidade de betalaínas durante a preparação, processamento e estocagem dos alimentos, onde conseqüentemente a cor, inicialmente vermelha, pode ser alterada.

Assim, a utilização do corante de beterraba em alimentos ainda é limitada, fazendo-se necessário o desenvolvimento de técnicas de proteção ao corante contra as várias adversidades existentes.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa o estudo da estabilidade do corante natural betalaína microencapsulado com matriz polimérica de quitosana/alginato, frente a fatores como pH, temperatura e luz.

2.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Caracterizar o biopolímero quitosana através da porcentagem de grupos amino (%GD).
- ii) Preparar microesferas de quitosana/alginato pelo método de coacervação de fases.
- iii) Caracterizar as microesferas de quitosana/alginato através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho (IV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC).
- iv) Microencapsular o corante betalaína utilizando como matriz polimérica quitosana/alginato, através do método de coacervação de fases.
- v) Caracterizar as microesferas de quitosana/alginato contendo corante através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho (IV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC).
- vi) Avaliar a estabilidade do material microencapsulado frente à fatores como pH, temperatura e presença ou ausência de luz.
- vii) Estudar a cinética de liberação do corante: a determinação da quantidade de corante microencapsulado foi determinada através de espectroscopia UV-Vis acompanhando o aparecimento do corante liberado a partir das microesferas.
- viii) Determinar o grau de intumescimento das microesferas de quitosana/alginato e quitosana/alginato contendo corante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS E REAGENTES

3.1.1. EQUIPAMENTOS

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica marca Shangping Eletronic, modelo FAI 6045. As medidas de pH foram feitas com pH-metro marca Corning, modelo pH / íon analyser 350.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro modelo U-3000, marca Hitache.

As microesferas foram produzidas utilizando-se uma bomba peristáltica, Ismatec Reglo, modelo 78016-30. Para os estudos de liberação e grau de intumescimento, utilizou-se o banho termostatizado Shaker Bath, da marca Lab Line.

A morfologia interna e externa das microesferas foi realizada utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Philips, modelo XL 30, do Laboratório de Materiais (LabMat), do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas utilizando-se um Analisador Termogravimétrico Shimadzu TGA 50.

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas utilizando-se um Analisador Shimadzu DSC 50.

As análises de Infravermelho foram realizadas utilizando-se um aparelho de Infravermelho Perkin Elmer FTIR.

A titulação condutimétrica foi realizada utilizando-se um titulador automático da marca Schott Gerate, modelo T80/20 e um condutivímetro da marca Mettler Toledo, modelo MC 226.

3.1.2. REAGENTES

O biopolímero quitosana, grau de desacetilação 82,75%, foi adquirido da Purifarma, Brasil. O biopolímero alginato de sódio foi adquirido da empresa Sigma. O corante betalaína foi fornecido pela Christen – Hansen Ind. & Com. Ltda. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA:

Para determinar o teor de grupos amino presentes na quitosana, foi realizada titulação condutimétrica, adaptando-se o método de RAYMOND (1993). Este consiste na dissolução da quitosana (200 mg) na presença de 20 mL de HCl 0,3 mol L⁻¹, sendo em seguida diluído com 200 mL de água destilada, para uma boa dispersão do polímero na solução. Conduziu-se a titulação com NaOH 0,1 mol L⁻¹, através de adições de 0,2 mL de titulante até o volume final de 100 mL. A titulação condutimétrica foi realizada em triplicata.

3.2.2. PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA/ALGINATO:

As microesferas de quitosana/alginato foram preparadas pelo método de separação de fases (coacervação). Dissolveu-se o alginato de sódio em água obtendo-se uma solução viscosa 4% (m/v) que foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica, sobre uma solução de CaCl₂ 0,50 mol L⁻¹. As microesferas formadas foram mergulhadas em uma solução de quitosana 3,5% (m/v) por aproximadamente 2 minutos e posteriormente lavadas com água destilada e secas à vácuo.

3.2.3. MICROENCAPSULAÇÃO DO CORANTE BETALAÍNA:

Pelo método de separação de fases ou coacervação, uma solução 4% (m/v) de alginato de sódio contendo uma quantidade adequada do corante betalaína (1:1 m/m) foi preparada e gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica sobre uma solução de CaCl₂

0,50 mol L⁻¹. As microesferas formadas foram mergulhadas em uma solução de quitosana 3,5% (m/v) por aproximadamente 2 minutos e posteriormente lavadas com água destilada e secas à vácuo.

3.2.4. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV): Os espectros no infravermelho foram obtidos na região de 4000 – 400 cm⁻¹, em pastilhas de KBr.

3.2.5. ESTUDO DA MORFOLOGIA DO MATERIAL FORMADO ENTRE QUITOSANA, ALGINATO E CORANTE: A morfologia interna e externa, porosidade, e tamanho das microesferas de quitosana/alginato e quitosana/alginato contendo corante foram avaliados em Microscópio Eletrônico de Varredura. As amostras foram colocadas em suportes, recobertas com ouro e micrografadas. O diâmetro médio de cada amostra foi obtido a partir da média de uma população de microesferas, utilizando-se medidas dos diâmetros dos eixos vertical e horizontal. Para todas as amostras, foram analisados cortes transversais, para avaliar as características internas da amostra.

3.2.6. ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA): Análises termogravimétricas foram realizadas com o objetivo de avaliar as variações de massa em função da temperatura dos materiais formados. As análises foram efetuadas sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50,0 mL/min e velocidade de aquecimento de 10°C/min, numa faixa de temperatura de 25°C a 800°C .

3.2.7. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC): Análises de DSC foram realizadas para as amostras com o objetivo de avaliar possíveis interações entre os polímeros e o corante. As amostras foram analisadas sob atmosfera de nitrogênio, com taxa de aquecimento de 10° C/ min na faixa de temperatura de 25°C a 350°C.

3.2.8. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DO CORANTE EM FUNÇÃO DO pH: Amostras (25,0 mg) de microesferas de quitosana/alginato contendo o corante

foram suspensas em 25,0 mL de tampão pH 1,0 (HCl 0,1 mol L⁻¹), 2,0 (HCl 0,1 mol L⁻¹), 3,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹), 4,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹) e 5,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹), sendo que o pH dessas soluções foi acertado usando-se uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. As soluções foram mantidas sob agitação constante (150 rpm) em banho termostatizado a 25,0 ± 0,1 °C. Após intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas de 3,0 mL da amostra foram retiradas e analisadas no comprimento de onda máximo do corante (534 nm). Depois das leituras, a solução foi devolvida ao erlenmeyer. A porcentagem de corante liberada foi determinada usando-se uma curva de calibração que relaciona a absorbância com a concentração conhecida do corante puro (mg%) no mesmo tampão em que a cinética foi conduzida, sendo o experimento realizado em triplicata para cada pH.

3.2.9. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO: A determinação do grau de intumescimento foi realizada em soluções tampão de pH 1,0 (HCl 0,1 mol L⁻¹), 2,0 (HCl 0,1 mol L⁻¹), 3,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹), 4,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹) e 5,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹), sendo que o pH dessas soluções foi acertado usando-se uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. As microesferas de quitosana/alginato com e sem corante, secas em estufa, foram inicialmente pesadas (25 mg) e mantidas nos diferentes tampões (25 mL) à 25 °C sob agitação de 150 rpm. Em intervalos de tempo pré-determinados as microesferas eram retiradas das soluções tampão, secas em papel absorvente para retirar o excesso de solução e pesadas novamente até o momento em que não houve mais variação de massa. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t, foi calculado pela equação 1:

$$\%GI = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde W_t e W_o referem-se às massas das amostras no tempo t e no estado seco, respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.10. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DO CORANTE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA: Amostras (25,0 mg) de microesferas de quitosana/alginato

contendo corante foram suspensas em 25,0 mL de tampão pH 4,0 (CH_3COOH 0,1 mol L^{-1}); o pH da solução foi acertado usando-se uma solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} . As soluções foram mantidas sob agitação constante (150 rpm) em banho termostaticado a 25,0, 30,0, 35,0 e 45 (\pm 0,1) $^{\circ}\text{C}$. Após intervalos de tempo pré-determinados, 3,0 mL da amostra foram analisados no comprimento de onda máximo do corante (534 nm). Depois das leituras, a solução foi devolvida ao erlenmeyer. A porcentagem de corante liberada foi determinada usando-se uma curva de calibração que relaciona a absorbância com a concentração conhecida do corante puro (mg%) no mesmo tampão em que a cinética foi conduzida, sendo o experimento realizado em triplicata.

3.2.11. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DO CORANTE NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE LUZ: Amostras (25,0 mg) de microesferas de quitosana/alginato contendo corante foram suspensas em 25,0 mL de tampão pH 1,0 (HCl 0,1 mol L^{-1}); o pH da solução foi acertado usando-se uma solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} . As soluções foram mantidas sob agitação constante (150 rpm) em banho termostaticado a $25,0 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$. Para avaliar o efeito da presença e ausência de luz, o erlenmeyer foi recoberto com papel alumínio e as leituras foram feitas com a menor intensidade de luz possível no local. Após intervalos de tempo pré-determinados, 3,0 mL da amostra foram analisados no comprimento de onda máximo do corante (534 nm). Depois das leituras, a solução foi devolvida ao erlenmeyer. A porcentagem de corante liberada foi determinada usando-se uma curva de calibração que relaciona a absorbância com a concentração conhecida do corante (mg%) no mesmo tampão em que a cinética foi conduzida, sendo o experimento realizado em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA (% GD)

Uma das mais importantes propriedades é o grau de desacetilação, o qual determina se o polímero é quitina ou quitosana. Arbitrariamente, o grau de desacetilação $\geq 40\%$ define o material polimérico como quitosana (TAN et al., 1998).

Vários métodos são descritos para a determinação do grau de desacetilação da quitosana, sendo a titulação condutimétrica o método escolhido em função da sua simplicidade e precisão. A maneira como a titulação foi conduzida já foi descrita anteriormente. A curva dos valores de condutância, k , versus volume de titulante apresenta dois pontos de inflexão (Figura 6), sendo o primeiro correspondente a neutralização de HCl em excesso na solução e o segundo referente à neutralização do polímero protonado.

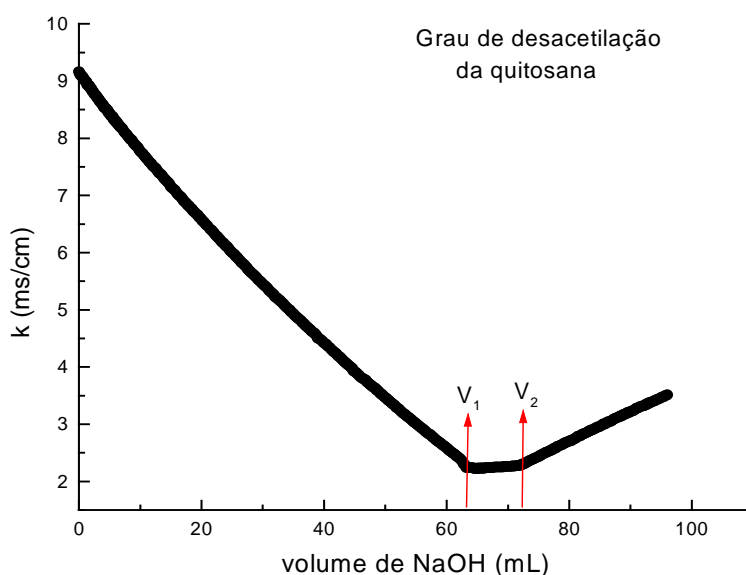


Figura 6: Curva de titulação condutimétrica da quitosana.

A diferença entre os dois pontos de equivalência corresponde ao volume de base requerido para neutralizar os grupos amino. A porcentagem de grupos amino, ou seja, o grau de desacetilação foi calculada pela equação:

$$\% \text{ GD} = \frac{M(V_2 - V_1)161}{W} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde M é a concentração da solução de NaOH em mol L⁻¹, V₁ e V₂ são os volumes de NaOH em mL empregados para neutralizar o excesso de ácido clorídrico e a quitosana protonada, respectivamente, 161 é a massa de uma unidade monomérica do polímero e W é a massa de amostra em mg empregada na titulação. O grau de desacetilação calculado por este método foi de 82,75%, sendo que este valor representa a média de três determinações.

4.2. ESPECTRO UV – VISÍVEL PARA O CORANTE BETALAÍNA

A Figura 7 ilustra o espectro de UV – VIS do corante betalaína em solução aquosa e seu respectivo comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$). A partir do espectro de absorção da solução do corante, no qual mediu-se a absorbância na faixa de 350 a 750 nm, o valor de $\lambda_{\text{máx}}$ foi determinado em 534 nm. Os espectros apresentaram uma pequena diferença de comportamento na faixa de pH estudado, variando entre 532 a 536 nm.

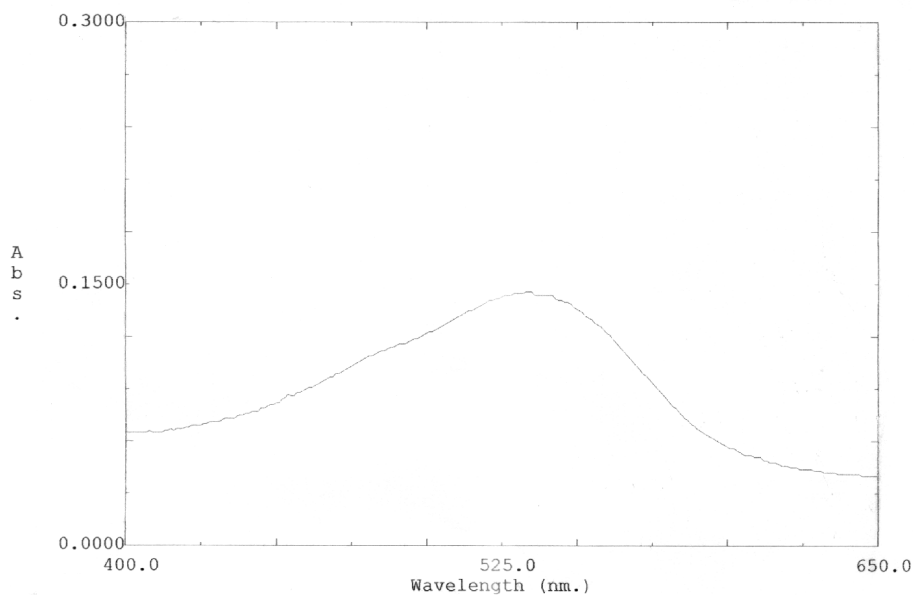


Figura 7. Espectro eletrônico UV-VIS para o corante betatalaína obtido em solução aquosa.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A Figura 8 apresenta os espectros de infravermelho dos biopolímeros quitosana e alginato de sódio, das microesferas de quitosana/alginato com e sem corante e do corante puro.

No espectro de infravermelho da quitosana (Figura 8-a), observam-se bandas de grupos característicos desse polímero como a banda em 3448 cm^{-1} atribuída à deformação axial da ligação OH, a banda 2922 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C-H, a banda 1654 cm^{-1} atribuída a absorção da carbonila do grupo —N—C=O , a banda 1600 cm^{-1} referente a deformação do grupo NH_2 e a banda 1081 cm^{-1} atribuída à deformação axial do grupo C-O de álcool primário.

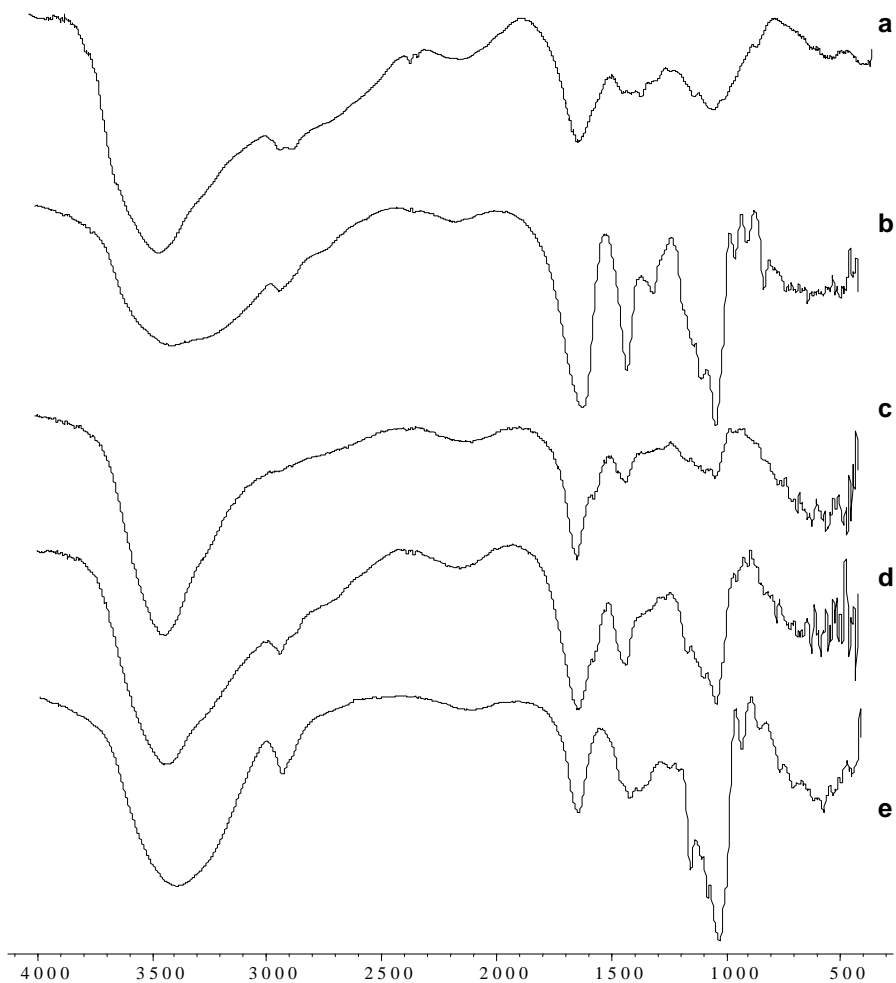


Figura 8: Espectro de infravermelho – a) quitosana, b) alginato, c) quitosana/ alginato, d) quitosana/alginato/corante e e) corante.

O espectro de infravermelho do alginato de sódio (Figura 8-b) mostra um pico largo em torno de 3391 cm^{-1} devido a grupos OH, dois picos em 1610 cm^{-1} e 1418 cm^{-1} atribuídos aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo COO^- , respectivamente, um pico fino em torno de 1030 cm^{-1} referente ao grupo C–O–C e a banda em 821 cm^{-1} referente ao estiramento C–O, relativo aos ácidos manurônico e gulorônico como registrado por Huang (1999) e Yeom (1998).

O espectro de infravermelho do corante betalaína (Figura 8-e), apresenta duas bandas características do íon carboxilato em 1640 cm^{-1} e 1417 cm^{-1} atribuídos a deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente. Outra

banda em 1025 cm^{-1} referente ao grupo C—O—C. E banda em 1153 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} e 1328 cm^{-1} , referentes ao grupo NH.

No espectro de quitosana/alginato (Figura 8-c) observa-se que houve um estreitamento da banda em torno de 3391 cm^{-1} que pode estar relacionado com interação através de ligações hidrogênio entre a quitosana e o alginato de sódio (SMITHA et al., 2005) e uma redução do pico em torno de 1030 cm^{-1} em relação ao espectro do alginato de sódio. Nota-se também o desaparecimento de um pico presente nos espectros da quitosana e do alginato de sódio em torno de 2950 cm^{-1} e o aparecimento de um pequeno pico em torno de 1561 cm^{-1} , o qual pode ser atribuído à interação entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxilatos do alginato de sódio (RIBEIRO et al., 2005).

As bandas observadas no infravermelho da quitosana/alginato (Figura 8-c) e quitosana/alginato com corante (Figura 8-d) estão muito próximas, porém observa-se a presença de um pico em 2928 cm^{-1} no espectro das amostras de quitosana/alginato com corante que não é observado no espectro de quitosana/alginato. Além de um aumento na intensidade dos picos 1027 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} em relação ao espectro das microesferas de quitosana/alginato.

Os espectros de infravermelho para as amostras de quitosana/alginato contendo corante sugerem uma possível interação entre a matriz polimérica e o corante.

4.4. ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS MICROESFERAS UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura fornece informações sobre as características morfológicas das microesferas como a presença de fissuras e poros, permitindo uma análise rápida e direta de eficiência do processo de encapsulação. A presença de fissuras e rachaduras na superfície das microesferas pode comprometer a proteção oferecida ao material encapsulado. Pode-se também observar a partir do MEV, a homogeneidade do tamanho das microesferas formadas.

De um modo geral, as microesferas produzidas neste trabalho apresentaram boa esfericidade. A estrutura externa das microesferas de quitosana/alginato e quitosana/alginato contendo corante mostrou-se com porosidade, rugosidade e com fissuras (Figura 9).

Foram feitas secções transversais nas microesferas para avaliação das características internas de cada amostra, as quais são mostradas na Figura 9-b. Através da análise das secções transversais, pode-se perceber que as microesferas apresentaram porosidade e fissuras.

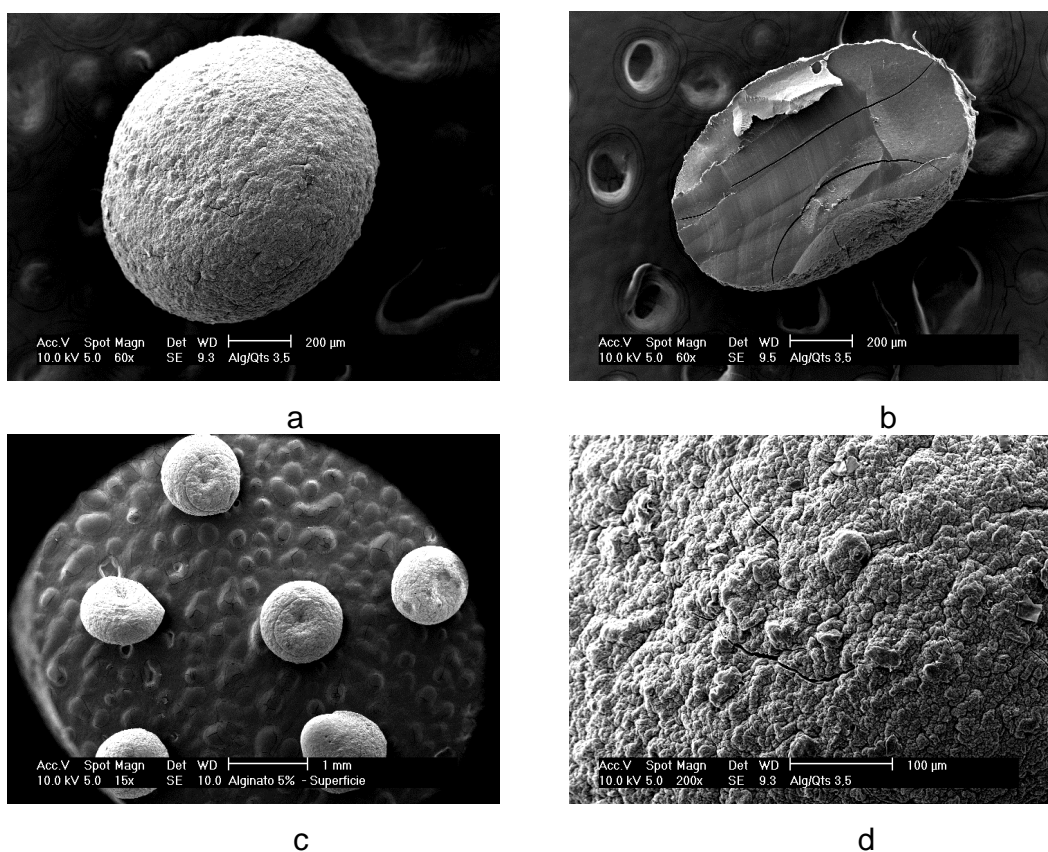


Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura das microesferas: a- microesfera de quitosana/alginato; b- corte de uma microesfera de quitosana/alginato; c- população de microesferas de quitosana/alginato contendo corante; d- superfície de uma microesfera de quitosana/alginato contendo corante.

A média de tamanho para as microesferas foi de 973 μm para as microesferas de quitosana/alginato e 982 μm para as microesferas de quitosana/alginato contendo corante.

4.5. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DAS AMOSTRAS DE MICROESFERAS DE QUITOSANA/ALGINATO

As microesferas com e sem corante foram caracterizadas por análise termogravimétrica (TGA), Figura 10. Para efeito de comparação é apresentado também a análise termogravimétrica dos biopolímeros e do corante.

Observa-se para todas as amostras uma perda de massa na faixa de 50-100°C correspondente à etapa de desidratação das amostras.

A quitosana apresenta também um pico de decomposição em 323,21°C (Figura 10-a), sendo que o alginato apresenta além da etapa de desidratação quatro estágios de decomposição em 239,32°C, 264,47°C, 450,40°C e 735,28°C (Figura 10-b). Segundo registros da literatura, os produtos de decomposição em torno de 450,40°C e 735,28°C são caracterizados com o material carbonáceo (SOARES et al., 2004). O corante puro apresenta picos de decomposição em 190,20°C, 244,14°C, 274,24°C e 329,83°C.

As microesferas de quitosana/alginato (Figura 10-c) sofrem um processo de desidratação seguido por seis etapas de decomposição 206,13°C, 219,27°C, 297,96°C, 447,94°C, 702,44°C e 760,53°C. A curva de TGA para as amostras de quitosana/alginato contendo corante (Figura 10-d) apresenta uma etapa de desidratação seguida por etapas de decomposição em 218,31°C, 309,57°C, 473,44°C e 764,17°C.

Os resultados de TGA sugerem uma interação entre o corante e a matriz polimérica com formação de um novo material de maior estabilidade térmica quando comparado com as microesferas de quitosana/alginato sem corante. Este novo material se decompõe em temperaturas ligeiramente maiores e apresenta

um número menor de estágios de decomposição quando comparado com as microesferas sem corante.

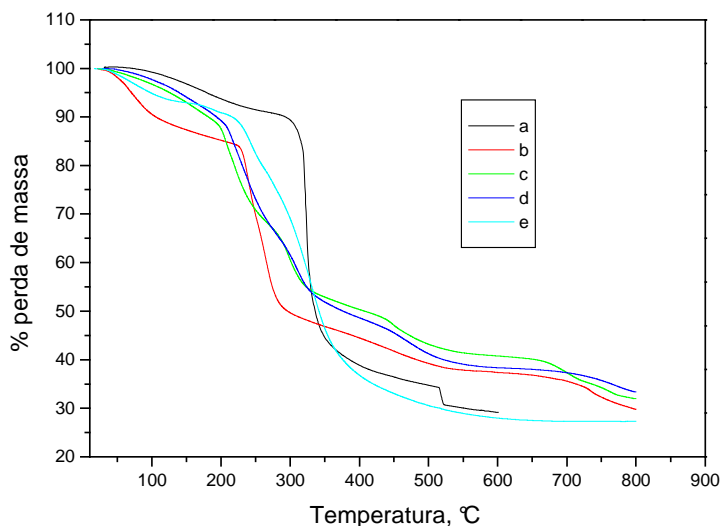


Figura 10: Análise termogravimétrica (TGA) – a) quitosana, b) alginato, c) quitosana /alginato, d) quitosana/alginato/corante e e) corante.

4.6. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) PARA AS MICROESFERAS DE QUITOSANA/ALGINATO

A Figura 11 apresenta a análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) da quitosana, do alginato de sódio, do corante, das microesferas de quitosana/alginato e das microesferas de quitosana/alginato contendo corante.

Observa-se para todas as amostras, um pico endotérmico em torno de 70-110°C correspondente ao processo de remoção de água (umidade) presente nas amostras.

Os resultados de DSC mostram que a quitosana (Figura 11-a) e o alginato de sódio (Figura 11-b) apresentam picos exotérmicos de decomposição em 300°C e 250,34°C, respectivamente. O corante (Figura 11-e) apresenta picos endotérmicos em 186,42°C, 204,40°C e 211,26°C.

A curva para as microesferas de quitosana/ alginato (Figura 11-c) mostra dois picos endotérmicos, um devido à presença de umidade na amostra e outro em 193,26°C, provavelmente resultante da interação entre os grupos amino da quitosana e carboxilato do alginato de sódio. Pode-se observar também, a presença de um pico exotérmico largo por volta de 278°C que pode ser atribuído aos polímeros, ocorrendo um deslocamento para temperaturas mais baixas.

O perfil da curva para as microesferas de quitosana/alginato contendo corante (Figura 11-d) mostra um pico endotérmico em 193,29°C, já discutido para as microesferas sem corante, e um pico exotérmico deslocado para temperaturas mais baixas, 241,79°C. Este deslocamento para temperaturas mais baixas pode ser atribuído a possíveis interações entre o corante e a matriz polimérica.

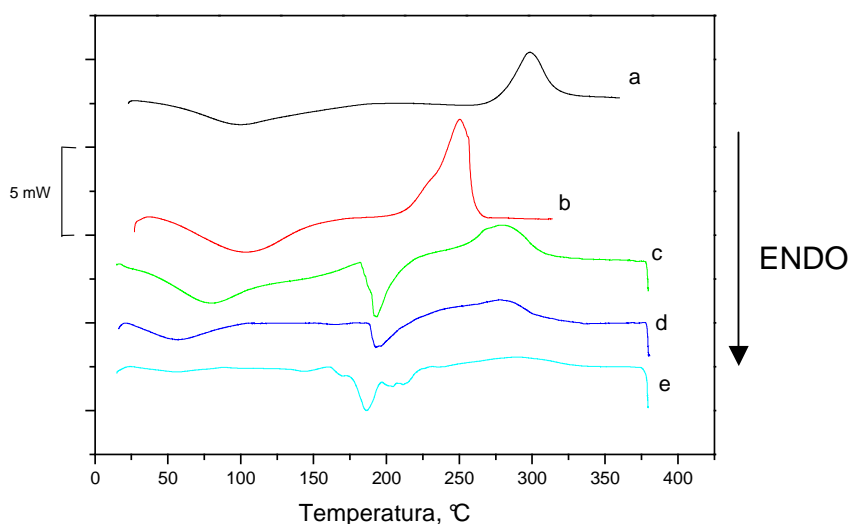


Figura 11: Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) – a) quitosana, b) alginato, c) quitosana /alginato, d) quitosana/alginato/corante e e) corante.

4.7. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DO CORANTE EM FUNÇÃO DO pH

A quantidade de corante betalaína liberado com o tempo (M_t) foi determinada pelo monitoramento do meio de liberação a 534 nm, em um espectrofotômetro UV-Vis. A quantidade total de corante liberado (M_f) foi obtida após manter o mesmo algumas horas em solução.

O aspecto geral da curva de liberação do corante betalaína está mostrado na Figura 12, a qual mostra um gráfico da fração de corante liberado (M_t) em relação ao total liberado (M_f) em função do tempo.

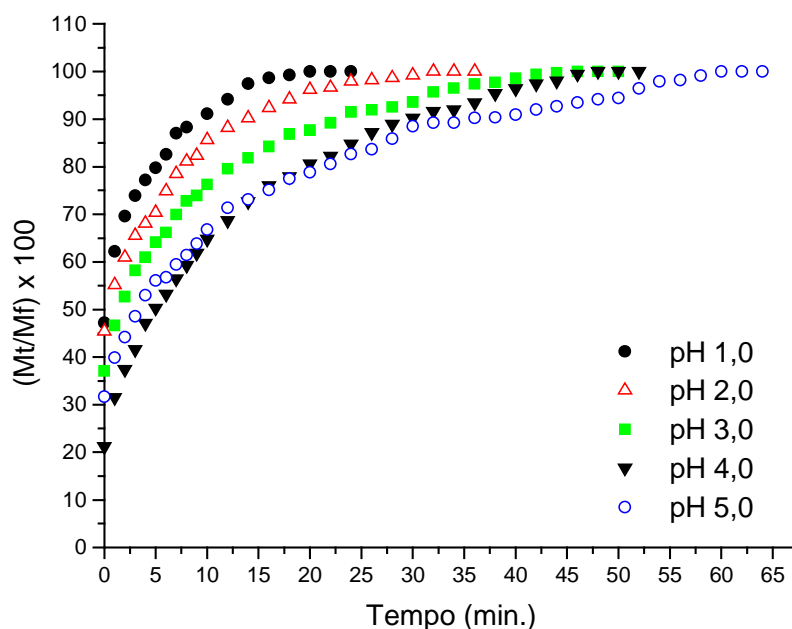


Figura 12: Perfil da curva de liberação do corante betalaína a pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 a $T = 25^\circ\text{C}$.

Observa-se que todo o corante é liberado a partir da matriz polimérica de quitosana/alginate em menos de uma hora considerando-se os pH 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0. Observa-se através do gráfico da Figura 12, que conforme a um aumento de pH a liberação torna-se mais lenta, sendo que a liberação do corante betalaína a partir da matriz de quitosana/alginate foi mais rápida em pH 1,0 e mais lenta em pH 5,0.

As curvas de calibração utilizadas para a determinação das diferentes concentrações de corante e conseqüentemente da massa de corante liberada foram feitas mantendo-se as soluções tampão empregadas nos estudos de liberação e utilizando-se o $\lambda_{\text{máx}} = 534 \text{ nm}$. A absorbância foi plotada em função do tempo, obtendo-se as curvas de calibração para cada pH.

4.8. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO

Recentemente, muitos são os esforços para elucidar o mecanismo de liberação de núcleos ativos a partir de matrizes hidrofílicas (FERRERO et al., 2000; ROY & ROHERA, 2002; LLABOT et al., 2004; POPA et al., 2000). Neste contexto, as cinéticas de liberação têm se tornado alvo para entender o processo de liberação.

A literatura tem mostrado que a liberação de solutos a partir de matrizes hidrofílicas é uma interação complexa entre intumescimento, difusão, erosão e relaxação (HARLAND et al., 1988). A penetração gradual de água produz intumescimento para formar um gel hidratado através da qual o soluto tem que passar pela dissolução e difusão para o meio aquoso (MUNDAY & COX, 2000). Portanto, na prática, matrizes poliméricas geralmente liberam o soluto via combinação de vários mecanismos (PEPPAS & SAHLIN, 1989).

A Tabela 1 apresenta os dados de grau de intumescimento para as microesferas com e sem corante. Pode-se observar que as microesferas com corante apresentam maior grau de intumescimento, sendo que este valor aumenta à medida que o pH também aumenta. Este resultado, sugere que os fatores intumescimento e difusão possam estar influenciando no processo de liberação do corante betalaína a partir da matriz quitosana/alginato.

Tabela 1: Grau de intumescimento para as microesferas de quitosana/alginato sem corante e com o corante betalaína nos pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0.

pH	GI % das microesferas de quitosana/alginato sem corante	GI % das microesferas de quitosana/alginato com corante
1,0	77,38	102,57
2,0	52,40	83,18
3,0	70,70	113,45
4,0	95,86	668,08
5,0	159,09	726,32

4.9. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DO CORANTE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Com o objetivo de avaliar os efeitos da variação de temperatura na liberação do corante betalaína a partir da matriz polimérica quitosana/alginato, fez-se o estudo de liberação do corante a pH 4,0 e nas temperaturas de 25,0, 30,0, 35,0 e 45,0 °C. Este estudo foi conduzido em pH 4,0, pois o mesmo apresentou uma liberação do corante relativamente lenta, e assim foi possível acompanhar a liberação com o aumento da temperatura.

A Figura 13 apresenta as curvas cinéticas obtidas no estudo. Pode-se observar a partir do gráfico que com o aumento de temperatura a liberação do corante torna-se mais rápida.

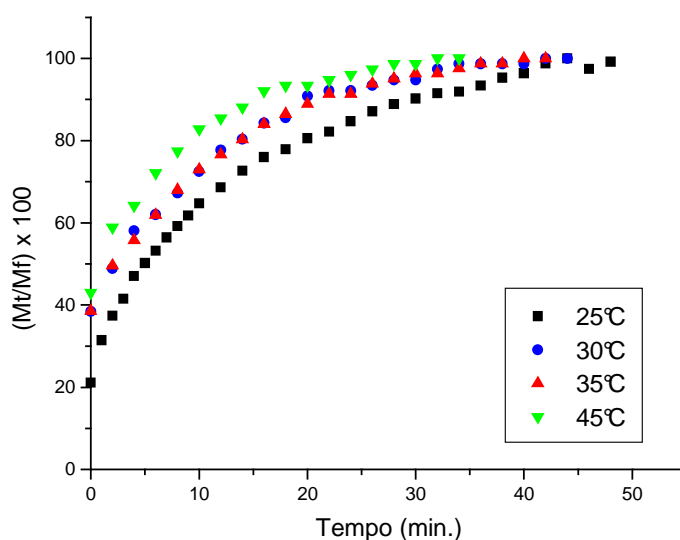


Figura 13: Perfil da curva de liberação do corante betalaína nas temperaturas de 25,0, 30,0, 35,0 e 45,0 °C e em pH 4,0.

4.10. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DO CORANTE NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE LUZ

Com o objetivo de avaliar os efeitos da presença e ausência de luz na liberação do corante betalaína a partir da matriz polimérica quitosana/alginato, fez-se um estudo preliminar de liberação do corante em pH 1,0, na presença e na ausência de luz. O pH 1,0 foi escolhido para este estudo pelo fato de ter apresentado uma liberação mais rápida nos estudos de liberação à diferentes pH.

A Figura 14 apresenta as curvas cinéticas obtidas no estudo. Pode-se observar a partir do gráfico que na presença de luz a liberação é mais rápida, enquanto que na ausência ocorre um aumento no tempo de liberação.

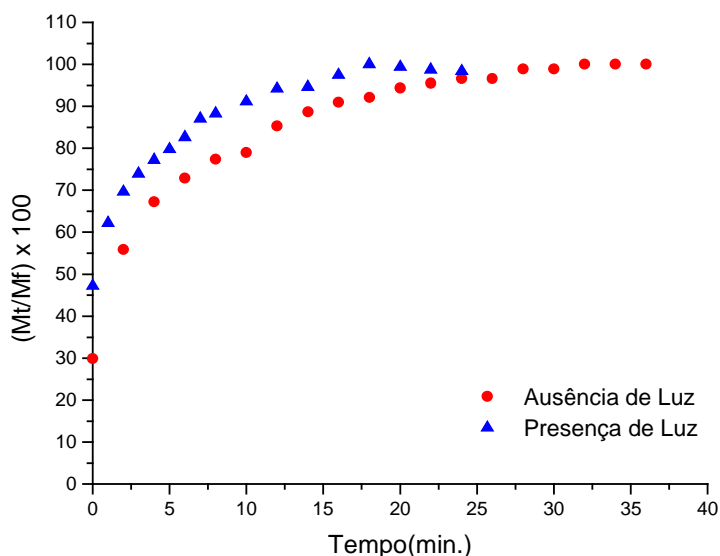


Figura 14: Perfil da curva de liberação do corante betalaína na presença e ausência de luz em pH 1,0 e 25 °C.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Neste trabalho, investigou-se a eficiência dos biopolímeros quitosana e alginato, como agentes encapsulantes do corante natural betalaína. O uso de encapsulante adequado pode proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos.
- A análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que as microesferas de quitosana/alginato, com e sem corante, apresentaram-se com poros, fissuras e rugosidade. A presença de fissuras pode comprometer a eficiência do processo de microencapsulação.
- Os espectros de infravermelho para as amostras sugerem que ocorre interação entre os polímeros quitosana e alginato, e entre estes e o corante.
- Os dados das análises termogravimétricas indicam maior estabilidade térmica para as microesferas contendo corante, as quais apresentam temperatura de decomposição ligeiramente maior quando comparadas com as microesferas sem corante.
- Os dados de calorimetria diferencial de varredura mostram que houve uma interação entre a quitosana e o alginato de sódio; o perfil da curva para as microesferas de quitosana/alginato contendo corante indica uma interação entre o corante e os biopolímeros.
- Os estudos de liberação em diferentes pH indicam que a liberação do corante torna-se mais lenta conforme a um aumento de pH, sendo que a liberação mais rápida ocorre em pH 1,0 e a mais lenta em pH 5,0
- Os estudos a diferentes temperaturas indicam que o aumento da temperatura torna a liberação mais rápida.
- Os estudos de liberação na presença e ausência de luz mostram que a liberação do corante na presença de luz é mais rápida.
- Os dados cinéticos sugerem que a liberação do corante betalaína a partir da matriz quitosana/alginato é uma interação entre intumescimento e difusão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. M.A. Química de alimentos: teoria e prática. Viçosa: UFV, 1999.
- BAJ, A. et al. Quantitative evaluation of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins by high-resolution gas chromatography and high - performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.279, p.365-372, 1983.
- BALASSA, L. L., FANGER, G. O. Microencapsulation in food Industry. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 1971, 2, 245–265.
- BECKER T. A., KIPKE D. R., BRANDON T. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. *J Biomed Mater Res*. 2001; 54:76–86.
- BENITA, S. Microencapsulation methods and industrial application. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996.
- BÖHM, H., RINK, E. Betalains. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press. New York, 1988, 449–463.
- CARVALHO, P. R. N. Potencialidades dos corantes naturais. *Revista Brasileira Corantes Naturais*, v.1, n.1, 1994.
- CHEN, R. H., TSAIH, M. L., LIN, W. C. Effects of chain flexibility of chitosan molecules on the preparation, physical and release characteristics of the prepared capsule. *Carbohydrate polymers*, n.31, p. 141-148, 1996.
- CRESCENZI, V. et al. New hydrogels based on carbohydrate and on carbohydrate-synthetic polymer networks. *Polymer Gels and Networks*, 5, 225–239, 1997.
- DAMASCENO, V. Corantes, Guerra aos sintéticos ressuscita os naturais. *Química e Derivados*, 1988.
- DRDÁK, M., VALLOVÁ, M. Kinetics of the thermal degradation of betanine. *Die Nahrung*, 1990; 34: 307–310
- DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 42, 4, p.136-48, 1988.
- ENGELHARDT, J. et al. *Natcol Quaterly Information Bulletin*, 2, 4-10, 1988.
- FERRERO, C., MUÑOZ-RUIZ, A., JIMÉNEZ-CASTELLANO, M. R. Fronts movements as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation. *Int. J. Pharm.* 202, 21-28, 2000.

FRANCIS, F.J. Food Colorants: Anthocyanins. *Critical. Food Science and Nutrition*, v. 28, p. 273 -314, 1989.

GOUBET, I., LEOUERE, J. L., VOILLEY, A. J. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and their physical state – a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1981–1990, 1998.

HAAS, S. et al. Oral immunization with a model protein entrapped in microspheres prepared from derivatized alpha-amino acids. *Vaccine*, 1996, 14, 785–791.

HAIR, P. R., CHANDY, T., SHARAMA, C. P. Chitosan/calciumalginate beads for oral delivery of insulin. *Journal of Applied Polymer Science*, 59, 1795–1801, 1996.

HARLAND, R. S. et al. Drug: polymer matrix swelling and dissolution. *Pharm. Res.* 5 (8), 488-494, 1988.

HEINONEN, A.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N. Antioxidant activity of berry phenols on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, v.46, p. 4107-4112, 1998.

HUANG, A. S., VON ELBE, J. H. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science*, 52, 1689–1693, 1987.

HUANG, R. Y. M., PAL, R., MOON, G. Y., J. *Membrane Sci*, 160, 101, 1999.

KADOKAWA J., SAITOU S., SHODA S. Preparation of alginate-polymethacrylate hybrid material by radical polymerization of cationic methacrylate monomer in the presence of sodium alginate. *Carbohydrate Polymers* 60, 2005, 253–258.

KANTI P. et al. Dehydration of ethanol through blend membranes of chitosan and sodium alginate by pervaporation. *Separation and Purification Technology* 40, 2004, 259–266.

KIM, S. J. et al. Characteristics of electrical responsive alginate/poly (diallyldimethylammonium chloride) IPN hydrogel in HCl solutions. *Sensors and Actuators B*, 96, 1–5, 2003.

KING, A. H. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing hydrocolloids. In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A. *Encapsulation and controlled release of food ingredients*. Washington, DC: p. 8 – 25, 1995.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan- based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 126-139, 2004.

KUSUHARA, K. Corantes naturais utilizados em alimentos no Japão. In: SBCN (Sociedade Brasileira de Corantes Naturais) [on line] Disponível na Internet (em 03/08/2005) via [www.http://uesb.br/sbcn.html](http://uesb.br/sbcn.html).

LI Z. et al. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26, 3919–3928, 2005.

LLABOT, J. M., MANZO, R. H., ALLEMANDI, D. A. Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potencial use as mucoadhesive drug delivery system. *International Journal Pharmaceutics*, v. 276, 59-66, 2004.

MUNDAY, D.L., COX, P. L. Compressed xanthan and karaya gum matrices hydration, erosion and drug release mechanisms. *Int. J. Pharm.*, 203, 179-192, 2000.

MURATA, Y. et al. Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads-effects of chitosan on gel matrix erosion. *Int. J. Pharm.* 96, 130–145, 1993.

MUZZARELLI, R. A. A. Natural chelating polymers. Pergamon Press, Oxford, 1973.

NARAYANI, R., GITA, V. B., AMARNATHAN, T. Preparation and evaluation of alginate films for periodontal drug delivery. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 14, 1–4, 2000.

NILSSON, T. Studies into the pigments in beetrot. *Lantbrukhögskolans Annaler*, v. 36, p. 179-219, 1970.

PEPPAS, N. A., SAHLIN, J.J. A simple equation for description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.*, 57, 169-172, 1989.

POPA, M. I. et al. Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan. *Reactive & Functional Polymers*, v. 45, 35-43, 2000.

POTHAKAMURY, U. R., BARBOSA – CANOVÁS, G. V. Trends in food Sci & technology, 6, 1995.

RAYMOND, L., FREDRICK, G.M., MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid state NMR. *Carbohydrate Research*, v. 246, p. 331-336, 1993.

RIBEIRO A. J. et al. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25, 31–40, 2005.

ROY, D. S., ROHERA, B. D. Comparative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and HPC, and study of drug release from their matrices. *Eur, J. Pharm. Sci.*, 16, 193-199, 2002.

SAIJA, A. et al. Effect of Vaccinium myrtillus anthocyanins on thiodothyronine transport into brain in the rat. *Pharmacological Research*, v.22, n.3, p. 59-60, 1990.

SANFORD, P. A., HUTCHINGS, G. P. Chitosan a natural cationic biopolymer commercial applications. In: YALPINI, M., Industrial polysaccharides: genetic engineering structure / property relations and applications, p. 363 – 367, 1997.

SCHOEFS B. Determination of pigments in vegetables, Review. Journal of Chromatography A, 1054 (2004) 217–226.

SHAHIDI, F., HAN, X. Q. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.33, n.6, p. 501-547, 1995.

SIMÃO, A. M. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. 2º ed., São Paulo, 1985.

SMITHA B., SRIDHAR S., KHAN A.A. Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. European Polymer Journal 41, 1859–1866, 2005.

SPARKS, R. E. Microencapsulation. In: Kirk - Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology, 3 ed. John Wiley and Sons, New York, v. 15, p. 470, 1981.

STRACK, D., STEGLICH, W., WRAY, V. Betalains. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), Methods in Plant Biochemistry, Vol. 8, Alkaloids and Sulphur Compounds (Waterman, P.G., Ed.). Academic Press, London, pp. 421–450, 1993.

STRACK, D., VOGT, T., SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. Phytochemistry, 62, 247–269, 2003.

STRINGHETA, P. C. et al. Revista Brasileira de Corantes Naturais, 3, 1999.

TAN, C. S. et al. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination. Talanta, v. 45, p. 713-719, 1998.

TOLSTOGUZOV, V. Why are polysaccharides necessary? Food Hydrocolloids, 18, 873–877, 2004.

VON ELBE, J. H., MAING, I., AMUNDSON, C. H. Color stability of betanin. Journal of Food Science, v. 39, p. 334-337, 1974.

VON ELBE, J.H., SCHWARTZ, S. J. Colorants. In: FENNEMA O. R. Food Chemistry, 3 ed. New York, Marcel Dekker, Inc., 1996, Cap. 10, p. 651-722.

WANG, L. et al. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. Biomaterials, 24, 3475–3481, 2003.

WEN-TAO Q. et al. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate–chitosan–alginate microcapsule. Biochemical Engineering Journal 25, 2005, 151–157.

WHORTON, C., REINECCIUS, G. A. Evaluation of the mechanism associated with the release of encapsulation flavor materials from maltodextrin matrices. In: Encapsulation and controlled release of food ingredients. Risch, S. J. and Reineccius, G. A.. Eds. American Chemical Society. Washington, D C, p.143-160, 1995.

WISSGOT, U., BORTLIK, K. Prospects for new food colorants. *Trends Food Sci. Technol.*, 1996; 7: 298–302.

WONG T. W. et al. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. *Journal of Controlled Release* 84, 2002, 99–114.

YE S. et al. Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films. *Journal of Controlled Release*, 2005.

YEOM, C. K., LEE, K. H. *Appl. Polym. Sci.* 67, 209, 1998.