

Matheus Vinicius de Oliveira Brisola Maciel

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTICULAS
DE ZEÍNA CARREGADAS COM TIMOL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto.

Coorientador: Dr. Fabiano Cleber Bertoldi

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Maciel, Matheus Vinicius de Oliveira Brisola
Obtenção e caracterização de micropartículas de zeína
carregadas com timol / Matheus Vinicius de Oliveira
Brisola Maciel ; orientador, Pedro Luiz Manique Barreto ;
coorientador, Fabiano Cleber Bertoldi. - Florianópolis, SC,
2014.

86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. microencapsulação de
compostos ativos. 3. antioxidantes naturais. 4.
microencapsulação por spray-drying. 5. timol. I. Barreto,
Pedro Luiz Manique. II. Bertoldi, Fabiano Cleber. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Matheus Vinicius de Oliveira Brisola Maciel

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTICULAS
DE ZEÍNA CARREGADAS COM TIMOL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2014.

Prof.^a Roseane Fett, Dr.^a
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr. Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Jane Mara Block, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Sílvia Maria Martelli, Dr.^a
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof.^a Edna Regina Amante, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais,
Elio Brisola Maciel e Maria Odete de
Oliveira Maciel meus grandes mestres
e meus irmãos Marília e Mathias.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade.

À Capes pela bolsa concedida.

À Fapesc pelo financiamento.

Ao professor Dr. Pedro Luiz Manique Barreto pela oportunidade, orientação, confiança, incentivo e amizade.

À todos os (as) professores (as) do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pelo conhecimento compartilhado e pela infraestrutura disponibilizada em especial à professora Dr.^a Edna Regina Amante e professora Dr.^a Carmen Maria Oliveira Müller (Laboratório de Frutas e Hortaliças).

À professora Dr.^a Sílvia Maria Martelli da Universidade Federal da Grande Dourados por todo o apoio, ajuda e amizade em todo desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Dr. Marcone Augusto L. de Oliveira da Universidade Federal de Juíz de Fora pela pronta ajuda na análise estatística.

Ao professor Dr. Guilherme Mariz de Oliveria Barra do Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Compósitos do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSC, pela análise termogravimétrica em especial ao Dr. Rodrigo Cercená pela atenção e realização da análise.

À professora Dr.^a Hellen K. Stulzer e à professora Dr.^a Elenara Maria T. L. Senna do Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC por disponibilizarem seus laboratórios, em especial aos alunos Francine Schütz, Paola Borba, Rafael Nicolay, Georgia Kasten e Marihá Pinotti.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) pela infraestrutura disponibilizada e a técnica Renata pela ajuda prestada.

Ao professor Dr. Michael Ramos Nunes do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina pelas análises de adsorção de nitrogênio e toda a colaboração intelectual prestada.

À Epagri, em especial ao pesquisador Dr. Fabiano Cleber Bertoldi, pela parceria e colaboração na coorientação do projeto.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aos amigos Victor Pires, Valdinei Lara, Walmor Bindi Júnior, Gustavo Pereira, Aline da Rosa Almeida, Larissa Naida, Jefferson Rotta, pelo incentivo e apoio.

À minhas queridas colegas e amigas de laboratório, Cleonice G. da Rosa, Carolina M. Noronha, Sabrina M. de Carvalho, Renata Lino, Gabriela Rocha, Bruna Jummes, Amanda Fernandes e Ana Paula Zapelini pela ajuda e por estarem sempre presentes dividindo seus conhecimentos e experiências.

À Janaina Cardoso Marques por sempre acreditar e me apoiar em tudo e por ter dividido parte da sua vida comigo.

A todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

À Deus e minha família pelo incentivo, segurança, apoio e amor.

Meus sinceros agradecimentos!

*“Se posso aprender também posso ensinar
aberto ao novo
e nunca cristalizar”*
Dead Fish

RESUMO

O timol, composto natural encontrado no óleo essencial do orégano e do tomilho, apresenta efeitos benéficos como atividade antioxidante e antimicrobiana e é muito utilizado na indústria de alimentos. No entanto, seu uso pode ser limitado pela sua alta instabilidade a fatores ambientais como a temperatura, oxigênio, luz e umidade. A degradação do timol pode ser retardada pela microencapsulação, técnica em que o composto ativo é envolvido por uma matriz que protege e possibilita a liberação controlada. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar micropartículas de zeína carregadas com timol. As micropartículas foram obtidas pelo processo de atomização (*spray-drying*). A temperatura de secagem e a proporção de timol na amostra foram definidas através da metodologia de superfície de resposta, onde as melhores condições selecionadas foram, 3,85% (g de timol/100g de zeína) e 130 °C de temperatura de secagem. Nessa condição uma eficiência de encapsulação de 49,5% foi atingida e as micropartículas obtiveram diâmetro médio de 14,3 µm de acordo com a análise por difração de feixe de *laser*. Em uma segunda etapa as micropartículas foram reticuladas utilizando os compostos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e (1*R*,2*R*,6*S*)-2-Hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8 dieno-5-carboxilato de metila (genipin) e sua morfologia foi alterada, uma vez que seu formato esférico não foi encontrado após esse processo. A ligação promovida pela reticulação entre as cadeias da proteína diminuiu os sítios de ligação disponíveis, diminuindo a absorção de água em relação às não reticuladas. Isso foi evidenciado pela isoterma de sorção de água. As análises térmicas mostraram que a microencapsulação proporcionou proteção ao timol até uma temperatura acima da temperatura de degradação do composto puro. Os testes de liberação realizados mostraram que as micropartículas não reticuladas apresentaram uma liberação mais acentuada do timol chegando a 90% de liberação no primeiro dia. As micropartículas reticuladas mostraram liberação mais lenta classificada como não-fickiana, com maior resistência na taxa de relaxamento das cadeias proteicas reduzindo a liberação do timol.

Palavras-chave: timol, micropartículas, *spray-drying*, liberação controlada.

ABSTRACT

Thymol is a natural compound found in the essential oil of oregano and thyme, with antioxidant and antimicrobial activities. It is highly used in the food industry. Its use may be, however, limited due to high unstableness to environmental factors such as temperature, oxygen, light and humidity. Thymol degradation may be delayed by microencapsulation by which the active compound is wrapped in a matrix that protects and makes possible controlled release. Current research produces and characterizes microparticles of thymol-bearing zein. Microparticles were obtained by spray-drying and drying temperature and thymol percentage in the sample were defined by response surface methodology in which the best conditions were 3.85% (g thymol/100g zein) and drying temperature at 130 °C, obtaining 49.5% encapsulation efficiency. Microparticles had an average diameter 14.3 µm following laser diffraction analysis. Microparticles were then reticulated by compounds 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and (*1R,2R,6S*)-2-Hydroxy-9-(hydroxymethyl)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8 dieno-5-carboxylate of methyl (genipin), with changed morphology since sphere shape was not possible after the process. Bond provided by reticulation between protein chains decreased available sites and reduced water absorption when compared with non-reticulated ones. Water sorption isotherm is evidence of the above. Thermal analyses showed that microencapsulation protected thymol up to a temperature above the degradation of the pure compound. Release tests also demonstrated that non-reticulated microcapsules had a greater thymol release, reaching 90% during the first day. Reticulated microparticles revealed a slower release, classified as non-Fickian release, with a greater resistance in relax rate of the protein chains, with a decrease in thymol release.

Keywords: thymol, microparticle, spray-drying, controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do timol e carvacrol.....	29
Figura 2 - Secção transversal da semente de milho mostrando a localização dos principais componentes.....	33
Figura 3 - Recobrimento da superfície do sólido pelo gás adsorvente em quatro estágios.....	38
Figura 4 - Isotermas (n versus P/P0) do tipo I ao tipo VI.....	39
Figura 5 - Representação da partícula destacando uma camada superficial de 10% do volume.....	43
Figura 6 - Superfície de resposta para micropartículas de zeína contendo timol. Eficiência de encapsulação em função da % de timol e da temperatura.....	51
Figura 7 - Micrografias das micropartículas de zeína carregadas com timol. Onde A e C estão em uma magnificação de 500 vezes e B e D 1500 e 3000 vezes, respectivamente.	52
Figura 8 - Micrografias das MP-EDC em magnificação de 500 vezes (A) e 30 vezes (B).....	53
Figura 9 - Micrografias das MP-Genipin em magnificação de 1500 vezes (A) e 30 vezes (B).	53
Figura 10 - Distribuição de tamanho médio de partículas de zeína carregadas com timol. Dados obtidos por MEV.	54
Figura 11 - Análise cumulativa dos dados obtidos por análise das micrografias das micropartículas de zeína carregadas com timol.	55
Figura 12 - Distribuição de tamanho das MP-Zeína. Dados obtidos por MEV.....	56
Figura 13 - Distribuição de tamanho das MP-Zeína por análise no Mastersizer 2000.	56

Figura 14 - Isoterma de sorção de água para MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.....	58
Figura 15 - Isoterma de adsorção (A) e dessorção (D) de nitrogênio para MP-Zeína, MP-Vazia, MP-EDC e MP-Genipin onde P/P0 é a pressão relativa e n é a quantidade de gás adsorvida/dessorvida.	59
Figura 16 - Espectro de FTIR para timol (A), zeína pura (B), MP-Zeína (C), MP-EDC (D) e MP-Genipin (E).....	63
Figura 17 - Curva termogravimétrica do timol, MP-vazia, MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.....	64
Figura 18 - Curva obtida para as leituras de inibição de DPPH em diferentes concentrações de MP-Zeína.	67
Figura 19 - Liberação do timol em intervalo de 0 a 7 dias para as amostras; MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.	68
Figura 20 - Percentagem de liberação do timol em função do tempo (horas) para as MP-Zeína.....	69
Figura 21 - Liberação do timol pela razão M_t/M_∞ em função do tempo para as MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis codificados para realização do experimento de microencapsulação de timol em matriz de zeína no <i>spray-dryer</i>	41
Tabela 2 - Distribuição dos experimentos para secagem de micropartículas de zeína carregadas com timol no <i>spray-dryer</i>	49
Tabela 3 - Resultados da extração superficial, extração total e eficiência de encapsulação do timol nas MP-Zeína	50
Tabela 4 - Distribuição de tamanho das MP-Zeína por difração de feixe de <i>laser</i> e MEV	57
Tabela 5 - Parâmetros de GAB para isoterma de sorção de água das MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.	58
Tabela 6 - Resultados para caracterização das MP-Zeína, MP-Vazia, MP-EDC e MP-Genipin quanto ao volume e área da superfície e poros.	60
Tabela 7 - Classificação dos poros segundo seu diâmetro.	60
Tabela 8 - Resultados para o ângulo de contato, energia livre superficial total (γ^T (mN/m)), dispersiva (γ^d (mN/m)) e polar (γ^p (mN/m)) utilizando o modelo de Owens & Wendt.	61
Tabela 9 - Resultados das características de fluidez da Zeína e da MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.	65
Tabela 10 - Classificação da fluidez de pós.	66
Tabela 11 - Parâmetros obtidos para a equação $Mt/M_\infty = k_a t^n$ para as amostras, MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AA%	atividade antioxidante
A _{BET}	Área superficial
Abs _{amostra}	absorbância da amostra
Abs _{branco}	absorbância do controle branco
Abs _{controle}	absorbância do controle negativo
A _{CMP}	área cumulativa
A _{m_t-plot}	área do microporo
Au	ouro
a _w	atividade de água
BET	modelo de Brunauer, Enmet e Teller
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
d _{ap}	densidade aparente
D _{BJH}	diâmetro médio do poro
d _{cp}	densidade compactada
d ₁₀	10% de volumes cumulativos
d ₅₀	50% de volumes cumulativos
d ₉₀	90% de volumes cumulativos
EC ₅₀	concentração suficiente para inibir 50% do radical
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EE%	Eficiência de encapsulação
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GAB	modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IR	infravermelho
I _{carr}	Índice de Carr's
I _{hauser}	Índice de Hauser
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MP-EDC	micropartícula de zeína reticulada com EDC
MP-genipin	micropartícula de zeína reticulada com genipin
MP-Vazia	micropartícula vazia
MP-Zeína	micropartícula de zeína carregada com timol
nm	nanômetro
RO ₂	radical peroxil
R-O·	radical fenoxil
R ²	Coefficient of determination
Rh _{MP}	raio hidráulico
Se _{t-plot}	superfície externa

TBHQ	t-Butil-hidroquinona
TGA	Análise termogravimétrica
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
V_{BJH}	Volume do poro
V_c	volume constante
V_{cMP}	volume cumulativo
V_{m_t-plot}	volume do microporo
X_w	teor de umidade de equilíbrio
$-\alpha$	ponto axial inferior
$+\alpha$	ponto axial superior
-OH	grupo hidroxila
μm	micrômetro
μL	microlitro
γ^d	Energia livre superficial dispersiva (apolar)
γ^p	Energia livre superficial polar
γ^T	Energia livre superficial total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1	ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS	27
3.2	TIMOL.....	28
3.3	MICROENCAPSULAÇÃO	29
3.4	ZEÍNA	33
3.5	SISTEMA DE LIBERAÇÃO DO COMPOSTO ATIVO	35
3.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS	36
3.6.1	Eficiência de encapsulação.....	36
3.6.2	Morfologia e distribuição de tamanho	36
3.6.3	Isoterma de sorção de água.....	37
3.6.4	Isoterma de adsorção de nitrogênio	37
3.7	RETICULAÇÃO POLIMÉRICA	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAL.....	41
4.2	MÉTODOS	41
4.2.1	Planejamento experimental	41
4.2.2	Microencapsulação por Spray-drying	41
4.2.3	Eficiência de encapsulação.....	42
4.2.4	Determinação do total de timol	42
4.2.5	Determinação do timol superficial.....	43
4.3	RETICULAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	43
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS	44
4.4.1	Morfologia	44
4.4.2	Distribuição de Tamanho.....	44
4.4.3	Isoterma de Sorção de Água	44
4.4.4	Isoterma de adsorção de nitrogênio	45
4.4.5	Ângulo de contato	45
4.4.6	Determinação da energia livre superficial.....	46
4.4.7	Espectroscopia no infravermelho.....	46
4.4.8	Análise termogravimétrica	46

4.4.9	Determinação da densidade aparente e densidade compactada	47
4.5	ENSAIOS DE DPPH.....	47
4.6	TESTES DE LIBERAÇÃO.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
5.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	49
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	52
5.2.1	Morfologia.....	52
5.2.2	Distribuição de tamanho.....	54
5.2.3	Isoterma de sorção de água	57
5.2.4	Isoterma de adsorção de nitrogênio.....	59
5.2.5	Ângulo de contato e energia livre superficial.....	61
5.2.6	Espectroscopia no infravermelho.....	62
5.2.7	Análise termogravimétrica	63
5.2.8	Determinação da densidade, índice de Carr's e índice de Hauser	65
5.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	66
5.4	TESTE DE LIBERAÇÃO	68
6	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Compostos bioativos termossensíveis e voláteis oriundos de plantas apresentam grande importância na indústria de alimentos, bem como, na farmacêutica e cosmética. Esses compostos podem apresentar diversas funções biológicas que despertam interesse, como por exemplo, atividade antioxidante e antimicrobiana. Porém, seu uso pode se tornar limitado pela alta instabilidade a fatores ambientais como, luz, calor e umidade. Dessa forma a estocagem e preservação desses ingredientes durante o processamento tornam-se um desafio tecnológico a ser enfrentado. Os óleos essenciais são ricos nesses compostos de interesse e também podem apresentar limitações no seu uso, pois podem reagir com outros componentes da formulação alterando suas propriedades (PARRIS, COOKE e HICKS, 2005; MÜLLER, 2011).

Entre as alternativas empregadas para prolongar a estabilidade desses compostos, destaca-se a microencapsulação, que consiste em encapsular sólidos ou líquidos dentro de matrizes ou sistemas reservatórios poliméricos (WATTS et al., 1990; AZEREDO, 2005; MADENE et al, 2005).

A tecnologia de microencapsulação tem sido utilizada na indústria de alimentos há muitos anos e inclui o revestimento de pequenas partículas de compostos como por exemplo, acidulantes, óleos essenciais e aromas (DESAI; PARK, 2005).

Na indústria de alimentos o processo de microencapsulação é aplicado por uma variedade de razões, entre elas estão a proteção do material do núcleo da degradação e redução da sua reatividade com o ambiente exterior; a diminuição da taxa de transferência do material do núcleo para o exterior; alterações nas características físicas do material para facilitar sua manipulação; liberação controlada ao longo de um determinado tempo ou em um determinado ponto; mascarar sabor dentre outras razões (DESAI; PARK, 2005).

Para a obtenção de micropartículas, um dos métodos mais utilizados é o *spray-drying*, que por empregar baixo tempo de exposição dos compostos a temperaturas elevadas, consegue preservar esses compostos evitando a perda de sua atividade biológica. Para isso a escolha da matriz polimérica é muito importante devendo ser levado em consideração diversos fatores como, solubilidade, toxicidade, custo, ligação com o composto de interesse entre outros. Nesse contexto, o uso de proteínas como matriz para obtenção de micropartículas é uma alternativa viável. A zeína, uma prolamina do milho, apresenta baixa

hidrofilicidade e boa capacidade de formação de filme e ligação com compostos de interesse, o que a torna um excelente material para esse fim (SHUKLA; CHERYAN, 2001; XU et al., 2008; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011). Suas propriedades podem ainda ser melhoradas ou aprimoradas para determinadas aplicações, como a liberação controlada e aumento da estabilidade da proteína proporcionando maior proteção ao núcleo. Isso pode ser alcançado com o uso de agentes reticulantes que promovem ligações covalentes estáveis entre segmentos das cadeias da proteína. Esses agentes assim como os antioxidantes e antimicrobianos podem ser de origem natural atendendo uma demanda crescente para esse tipo de produto.

Dentro deste contexto o presente trabalho teve como objetivo desenvolver micropartículas de zeína carregadas com timol, composto natural presente em óleos essenciais como o de orégano e tomilho. A reticulação dessas micropartículas foi realizada utilizando dois agentes naturais o genipin e o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). As micropartículas obtidas foram caracterizadas quanto a sua morfologia, distribuição de tamanho, estabilidade a umidade e temperatura, além de testes relacionados a sua atividade antioxidante e a liberação do timol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar micropartículas de zeína carregadas com timol.

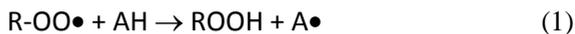
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da concentração de timol na formulação e da temperatura de secagem sobre a eficiência de encapsulação do timol utilizando o delineamento central composto.
- Caracterizar as micropartículas com maior eficiência de encapsulação quanto as suas propriedades físico-químicas através de análises termogravimétricas, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho, isotermas de sorção de água e de nitrogênio e compressibilidade/compactabilidade do pó.
- Avaliar a liberação do timol das micropartículas de zeína bem como a atividade antioxidante do timol liberado.
- Reticular as micropartículas de zeína carregadas com timol utilizando EDC e Genipin.
- Avaliar a influência da reticulação nas propriedades físico-químicas das partículas e na liberação do timol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS

Os antioxidantes são moléculas que têm a capacidade de proteger os metabólitos contra a oxidação. Nos alimentos podem ser adicionados para proteger os mesmos contra o processo oxidativo de seus próprios componentes. Em alguns casos podem ser adicionados como agentes flavorizantes e que apresentem atividade antioxidante. As especiarias foram e são utilizadas durante séculos para mascarar e atrasar a deterioração de alimentos durante o armazenamento ou preparo (CADENAS; PACKER, 2002; LIN; JAIN; YAN, 2014). O uso de aditivos antioxidantes sintéticos tais como Butil-hidroxitolueno (BHT) e o Butil-hidroxianisol (BHA) podem ser controversos por apresentar efeitos adversos na saúde humana, quando presentes em quantidades superiores as indicadas, dessa forma sua substituição por antioxidantes naturais é cada vez mais comum na indústria de alimentos. Entre alguns exemplos de antioxidantes estão os antioxidantes primários que incluem compostos fenólicos, tais como os tocoferóis, os já citados BHT e BHA; o galato de propila, de octila e de dodecila e o *t*-butilhidroquinona (TBHQ). Outros compostos, os chamados antioxidantes secundários, podem atuar por uma variedade de mecanismos podendo ser agentes quelantes de metais (ácidos cítrico, málico e tartárico), removedores de oxigênio (ácido ascórbico, palmitato de ascorbila), podem realizar a conversão de hidroperóxidos em espécies não radicalares (fosfolipídios), absorção por radiação UV ou desativação do oxigênio singlete (carotenóides). Os antioxidantes naturais podem ser encontrados em diversas plantas, como por exemplo, o alecrim, orégano, tomilho e com maior frequência são isolados de seus respectivos óleos essenciais (HAN, 2005; MOZAFARI et al, 2006; JONGJAREONRAK et al., 2008; YEN; YANG; MAU, 2008; SHAHIDI; ZHONG, 2010; GARGIULO et al, 2013). A maioria dos antioxidantes oriundos de plantas são fenóis, que agem como antioxidantes (AH) porque seu grupo -OH elimina os radicais reativos, como por exemplo o radical peróxil ($RO_2 \cdot$ - Equação 1).



O radical fenoxil resultante ($A-O\cdot$) é pouco reativo e substituí o radical RO_2 que apresenta grande reatividade. Além disso, os fenóis apresentam mecanismos adicionais de ação antioxidante, como quelação de íons de metais de transição (CADENAS; PACKER, 2002).

Tradicionalmente os radicais livres são tidos como os principais causadores do envelhecimento precoce e doenças degenerativas. Porém, algumas pesquisas revelam que alguns desses radicais são essenciais para manter as funções celulares. Dessa forma deve-se alcançar um equilíbrio entre os radicais e os antioxidantes, o chamado equilíbrio oxidativo (LIN; JAIN; YAN, 2014).

Dentre as fontes naturais de compostos antioxidantes estão os óleos essenciais de especiarias. Existem diversas formas de extração desses óleos essenciais e entre os mais usados estão a extração por arraste de vapor de água e a extração por fluído supercrítico. Esses óleos voláteis são em sua maioria compostos por terpenóides, aldeídos, fenóis, alcoóis, cetonas entre outros em menores quantidades. Sua alta atividade biológica também inclui a inibição do crescimento microbiano (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005). Os óleos essenciais extraídos do orégano e tomilho apresentam como compostos majoritários o timol e o carvacrol.

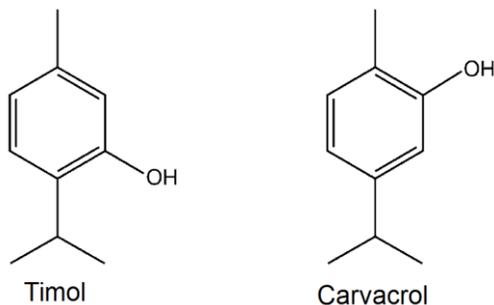
3.2 TIMOL

O orégano e o tomilho são plantas muito utilizadas na culinária de diversas culturas. Muito difundidas nos países do mediterrâneo, o seu sabor agradável torna-as de fácil aceitação no paladar da maioria das pessoas. Vários estudos comprovam a atividade biológica dos óleos essenciais dessas plantas. É relatada principalmente atividade antioxidante e antimicrobiana e dessa forma sua aplicação em formulações alimentícias se torna viável (BERTELLI, 2003; BADI et al. 2004; NOSTRO et al., 2004; JORDÁN et al. 2006; OCAÑA-FUENTES et al. 2010; COSTA et al. 2012; KOCIC-TANACKOV et al., 2012).

Os compostos majoritários do orégano e do tomilho são dois fenóis monoterpénóides e isômeros de posição. O timol de nomenclatura química 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol, fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e massa molar de 150,22 g/mol, se apresenta na forma de cristais grandes translúcidos incolores ou brancos. Seu odor aromático e paladar marcante são semelhantes ao tomilho. É uma substância pouco solúvel em água e seu ponto de fusão é de 52 °C, permanecendo líquido em temperaturas consideravelmente mais baixas, enquanto que seu ponto de ebulição é 233 °C. Já o carvacrol é quimicamente denominado 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, massa molar 150,22g/mol, apresenta-se na forma líquida com coloração amarelo claro e densidade de 0,975 g/mL à 20 °C. O carvacrol possui característica pungente e odor aromático, semelhante ao orégano, bem como, pouca solubilidade em água. O seu ponto de fusão é de 2 °C e seu

ponto de ebulição é de 234 – 236 °C (NEVES, 2009). A Figura 1 ilustra a estrutura molecular desses dois compostos (NOSTRO et al, 2004).

Figura 1 - Estrutura molecular do timol e carvacrol.



Fonte: Nostro et al., 2004.

A alta volatilidade e consequente instabilidade química frente a fatores ambientais como luz, oxigênio e temperatura são limitadores do uso e aplicação desses compostos. Dessa forma uma alternativa tecnológica para contornar esses problemas é a microencapsulação.

3.3 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é a técnica em que um ou mais materiais são envolvidos juntamente ou por outro material ou sistema. O material revestido é chamado de ativo ou núcleo e o material de revestimento é chamado de parede, transportador ou encapsulante (MADENE et al., 2005). As partículas podem ser classificadas pelo tamanho em três categorias: macro (>5000 μm), micro (0,2-5000 μm) e nanopartículas (<0,2 μm). Quanto às suas características, as partículas podem ser divididas em dois grupos: aquelas nas quais o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, e aquelas nas quais o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz (AZEREDO, 2005).

Na maioria dos casos, o encapsulamento refere-se a uma tecnologia em que os componentes bioativos (ex: compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas, ácidos graxos, conservantes) são completamente envolvidos, cobertos e protegidos por uma barreira física. Além disso, a encapsulação tem sido definida como uma tecnologia de embalagem de materiais sólidos, líquidos ou gasosos

em pequenas partículas que liberam o seu conteúdo a taxas controladas durante períodos prolongados e em condições específicas (NEDOVIC et al. 2011).

Alguns dos objetivos da encapsulação aplicada aos alimentos são: reduzir as interações do núcleo com fatores do ambiente, reduzindo alterações como perda de aroma, de cor ou do valor nutricional; separar componentes reativos ou incompatíveis; reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo (por exemplo, por evaporação, que é muito rápida no caso de compostos de sabor não encapsulados); evitar reações prematuras de um substrato; mascarar compostos de sabor indesejável; promover melhor solubilidade do núcleo e melhor incorporação em sistemas secos (AZEREDO, 2005).

A seleção do material de parede envolve a avaliação de vários fatores como: eficiência de encapsulação, a estabilidade em diferentes condições de armazenamento, o grau de proteção proporcionado ao material de núcleo, a observação de superfície por microscopia de varredura, objetivos esperados e requisitos do produto, a natureza do material do núcleo, o processo de encapsulação, o custo e aprovação do material de revestimento por órgãos como *Food and Drug Administration* (EUA) ou *European Food Safety Authority* (Europa) (PÉREZ-ALONSO et al. 2003; MADENE et al, 2005). Existe um número limitado de métodos de encapsulação, mas uma enorme variedade de materiais diferentes pode ser usada. Estes materiais incluem proteínas, carboidratos, lipídeos, gomas e celulose. Segundo estes mesmos autores, as proteínas têm excelentes propriedades funcionais, tais como viscosidade, solubilidade, emulsificação e propriedades de formação de filmes, sendo possível sua utilização para encapsulação.

As propriedades funcionais das proteínas possibilitam que sejam usadas como material de revestimento apresentando boas características para a microencapsulação por *spray-drying*. Além disso, as proteínas possuem elevadas propriedades de ligação para os compostos de sabor de interesse (GHARSALLAOUI, 2007).

A microencapsulação por *spray-drying* é muito utilizada na indústria de alimentos e envolve a emulsificação do material do núcleo com uma solução densa de material de parede, atomização e secagem da solução (FUCHS et al., 2006). O processo de emulsificação é uma etapa importante e crítica da microencapsulação de óleos alimentares, características como a estabilidade da emulsão e o tamanho das gotas, têm um papel chave na eficiência da encapsulação durante e depois do

processo e na caracterização morfológica da microcápsula (RODEA-GONZÁLEZ et al., 2012).

O processo de secagem por *spray-dryer* é amplamente utilizado para a produção de alimentos, encapsulando componentes ativos bem como produtos químicos, medicamentos e cosméticos (FUCHS et al., 2006; KHA et al., 2010; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011). O objetivo principal deste processo é criar uma barreira entre o componente da partícula e o meio ambiente. Esta barreira pode proteger contra fatores externos como oxigênio, luz, umidade além de evitar o contato com outros ingredientes, por exemplo, em um produto pronto para o consumo (FUCHS et al. 2006; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011), obtendo boas características reconstitucionais, baixa atividade de água, além de facilitar o transporte e armazenamento desses produtos. Sendo um processo altamente adequado para componentes sensíveis ao calor, como por exemplo, os carotenoides e compostos fenólicos (KHA et al., 2010).

O processo consiste basicamente de quatro etapas: preparação de uma dispersão ou emulsão; homogeneização, atomização e desidratação das partículas atomizadas (LAOHASONGKRAM; MAHAMAKTUDSANEE; CHAIWANICHSIRI, 2011). A secagem *spray-drying* tradicional é geralmente utilizada para transformar as substâncias líquidas em pó de forma rápida e eficiente. A velocidade do processo e, conseqüentemente, o curto tempo de secagem permitem que até mesmo produtos sensíveis à temperatura sejam submetidos ao método sem degradação. Este processo de secagem por pulverização é particularmente usado para melhorar a conservação do produto na forma de sólido seco (LI et al., 2010). Esses mesmos autores, relatam que o pó assim gerado é um sistema de matriz na forma de micropartículas apresentando uma morfologia esférica oca ou dependendo da natureza do material da parede usado e das condições operacionais de secagem, tais como a temperatura de admissão, a concentração de sólidos, a taxa de fluxo de gás, ou taxa de alimentação. As amostras em pó são em sua maioria heterogêneas e amorfas. Em geral os rendimentos de secagem por atomização em escala de laboratório são limitados, atingindo cerca de 50% a 70%.

Em estudos realizados em 2011 (LAOHASONGKRAM; MAHAMAKTUDSANEE; CHAIWANICHSIRI), as condições ótimas encontradas para microencapsulação de óleo de macadâmia por *spray-dryer* foram de 1,1 kg/h e 167 °C para taxa de alimentação e temperatura de entrada, respectivamente, obtendo um tamanho médio de partícula de $9,75 \pm 0,03 \mu\text{m}$. Os autores também relatam micropartículas

esféricas com alguma rugosidade ou ondulações na superfície, atribuídas à temperatura e rápida evaporação da água superficial, apresentando núcleo simples e múltiplo.

Segundo Matsuno e Adachi (1993), a encapsulação de lipídeos pode ser útil para retardar a auto-oxidação lipídica além de poder servir de transporte de substâncias como aromatizantes e compostos amargos. Gharsallaoui e colaboradores (2011) conseguiram um aumento na retenção de compostos de sabor em matrizes de proteína isolada de ervilha e pectina, a retenção durante a secagem por pulverização aumentou com a diminuição da volatilidade do composto encapsulado e variou de 28% a 40%. A estabilidade da partícula e a capacidade de reter o composto de aroma, segundo os autores podem ser atribuídas tanto a presença de pectina como no efeito protetor da estrutura molecular da proteína. As condições de secagem utilizadas foram de 180 °C de temperatura de entrada e 90 °C de saída com uma taxa de alimentação de 1 L/h.

A influência da temperatura de entrada e de saída de ar sobre a microencapsulação de óleo essencial de limão por *spray-dryer* foi avaliada por Bringas-Lantigua, Valde´s e Pino (2012), visando otimizar os parâmetros para retenção do óleo volátil, eficiência da microencapsulação e taxa de evaporação na secagem que foram tidos como variáveis de resposta. Ao passo que, as temperaturas de 220 °C e 85 °C foram encontradas para proporcionar uma máxima taxa de evaporação (7,7 kg/h), retenção de óleo (95,7%) e eficiência de microencapsulação (99,9%).

É desejável que a temperatura do ar de entrada seja elevada o suficiente para permitir a rápida formação de uma membrana semipermeável sobre a superfície da gota, mas não tão elevada a ponto de formar bolhas e perturbação da superfície, o que aumenta as perdas durante a secagem (BRINGAS-LANTIGUA; VALDE´S; PINO, 2012).

Em relação à temperatura de saída em estudos com óleo essencial de limão, um aumento da temperatura representou uma elevação dos teores de óleo superficial (HUYNH et al., 2008).

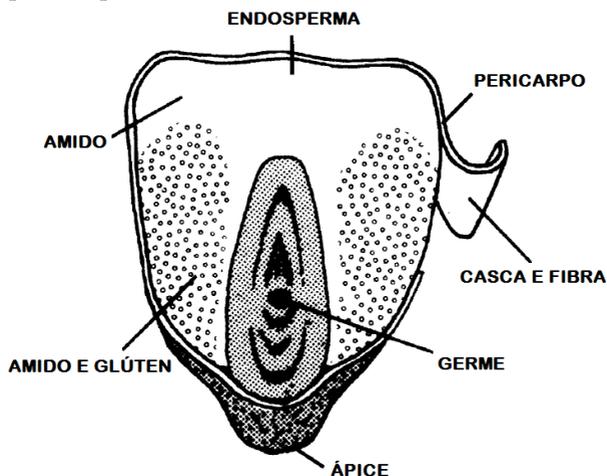
A taxa de fluxo de ar da atomização é um fator que pode influenciar no tamanho da partícula. Isto pode estar relacionado com o fato de que o aumento do fluxo de ar pode fornecer mais energia para a atomização do líquido e ajudar produzir finas gotículas e posteriormente partículas menores (RAMEZANI et al., 2013). O uso das proteínas como agentes encapsulantes é muito comum além de ser uma fonte de baixo custo comparada a alguns polímeros. A proteína do milho é uma alternativa para a microencapsulação de compostos ativos.

3.4 ZEÍNA

Os grãos de milho contêm em torno de 11 a 14% de proteínas sendo que a maior parte localiza-se no endosperma. À exemplo dos demais cereais, as proteínas do milho se distribuem entre albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (SGARBIERI, 1996).

As proteínas são polímeros biológicos compostos por aminoácidos que apresentam uma variedade de diferentes estruturas gerais. A estrutura molecular de uma proteína em particular depende da sua sequência de aminoácidos, condições ambientais prevalentes e história ambiental, por exemplo, a exposição a diferentes temperaturas, pressões, solventes, valores de pH, e composições iônicas (MATALANIS; JONES; McCLEMENTS, 2011). Na Figura 2 observa-se a secção transversal de um grão de milho e seus principais componentes (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

Figura 2 - Secção transversal da semente de milho mostrando a localização dos principais componentes.



Fonte: Shukla e Cheryan (2001).

A zeína é a prolamina do milho e representa cerca de 50% da proteína total dos grãos. Junto com as glutelinas constituem as proteínas de reserva para a germinação das sementes além de fazer parte da estrutura do endosperma formando ligações de hidrogênio e ligações dissulfeto intramoleculares. Depois do 23º dia após a polinização a zeína é produzida no grão e tem um rápido aumento na velocidade de

síntese à medida que o grão amadurece. Estudos eletroforéticos mostraram um grau moderado de heterogeneidade da zeína sendo composta de frações polipeptídicas com massa molar na faixa de 19.000 a 25.000 Daltons. Essa prolamina quando de origem comercial é normalmente separada da farinha do glúten de milho como um co-produto da moagem úmida do milho e é uma mistura de pelo menos quatro frações de proteínas: α -, β -, γ - e δ -zeína, cada uma com uma seqüência de aminoácidos diferente, massa molar e solubilidade. É uma proteína insolúvel em água e solúvel em álcool, como toda prolamina (SGARBIERI, 1996; ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012).

Desde meados do século 20 o foco principal na utilização da zeína é como um polímero industrial (SHUKLA; CHERYAN, 2001). Sua ampla aplicabilidade pode ser atribuída à sua relativamente baixa hidrofiliçidade, boa elasticidade e excelente capacidade formadora de filme, além da vantagem de ser obtida de fonte natural e renovável, a zeína apresenta boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. Sendo assim o uso da zeína como carreadora de compostos ativos tanto em filmes como em micro e nanopartículas vem sendo relatado por vários autores nos últimos anos (SHUKLA; CHERYAN, 2001; XU et al., 2008; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011).

Quispe-Condori e colaboradores (2011) investigaram o uso da zeína como material de revestimento para microencapsulação de óleo de linhaça por *spray dryer* e *freeze dryer* e obtiveram bons resultados para eficiência de microencapsulação, rendimento e morfologia das partículas. Um estudo da formação de nanopartículas de zeína pelo processo de atomização elétrica foi realizado por Gomez-Estaca e colaboradores (2012) para encapsular o composto ativo curcumina. Nesse estudo com um aumento da concentração do polímero (entre 2,5 e 15% massa/massa) houve um aumento no tamanho das partículas (175 a 900 nm), em relação à taxa de fluxo, uma diminuição dos tamanhos foi observada com taxas de fluxo menores. A eficiência de encapsulação foi de 85 a 90%, com nanopartículas na forma de sistemas de matriz com a curcumina homoganeamente distribuída na matriz de zeína e após três meses de armazenamento ao abrigo da luz a 23 °C e 43% de umidade relativa, o tamanho ou a morfologia das nanopartículas não tinha sofrido alterações significativas, o mesmo foi evidenciado para o conteúdo de curcumina. A curcumina encapsulada apresentou boa dispersão em uma matriz aquosa de alimentos: leite semi-desnatado (GOMEZ-ESTACA et al., 2012).

3.5 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DO COMPOSTO ATIVO

O composto ativo uma vez incorporado em uma matriz polimérica deve apresentar capacidade de difusão através da rede polimérica para o meio onde estiver presente. Essa liberação pode ser obtida pelo contato direto do alimento com o ativo ou difusão através do material da embalagem, por exemplo. Nos sistemas de liberação controlada os compostos químicos são adicionados em alguns tipos de materiais, principalmente materiais poliméricos, e sua taxa de liberação é controlada durante um determinado período de tempo (CHANDRA; RUSTGI, 1998; MASTROMATTEO et al. 2010).

A taxa de liberação a partir de um sistema de reservatório depende da espessura, da área e da permeabilidade da barreira (material de parede). Em um reservatório contendo um excesso de agente ativo, a taxa de liberação segue a cinética de ordem zero (isto é, a taxa de liberação é constante) (MASTROMATTEO et al. 2010). Segundo Pothakamury e Barbosa-Cánovas (1995) os principais passos na liberação de um ativo a partir de um sistema de matriz são os seguintes:

- Difusão do agente ativo no interior do reservatório;
- Dissolução do agente ativo entre o fluido de transporte do reservatório e a barreira;
- A difusão através da barreira e entre a barreira e o meio de eluição (isto é, o alimento);
- Transporte da superfície da barreira para o alimento.

Para as micropartículas de zeína a liberação do composto ativo se dá pelo intumescimento da matriz proteica. Nesse sistema o agente ativo, disperso na matriz, é incapaz de se difundir em qualquer extensão significativa no interior da matriz devido à seu menor coeficiente de difusão. Quando a micropartícula é colocada em um meio termodinamicamente compatível, o polímero intumescer devido à absorção de fluidos do meio. O coeficiente de difusão do agente ativo na parte intumescida da matriz aumenta e então o mesmo difunde-se para fora. A taxa de liberação é determinada pelo processo de transição do estado *vitreo* (antes do intumescimento) para o estado elástico (após o intumescimento). No caso da geometria plana, a quantidade de agente ativo, M_t , libertada no tempo t pode ser modelada pela Equação 2.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_a t^n \quad (2)$$

Onde M_{∞} é a carga inicial do ativo e k_a e n são parâmetros do sistema, onde n indica o tipo de transporte (MASTROMATTEO et al., 2010). Geralmente, a liberação de um composto ativo pelo intumescimento da rede polimérica ocorre em duas etapas. Primeiro as moléculas do solvente penetram na matriz conduzindo à sua expansão. À medida que o solvente se difunde, a cadeia polimérica se torna cada vez mais expandida, permitindo que o composto ativo seja liberado para o exterior até que o equilíbrio termodinâmico entre as duas fases seja atingido. Dessa forma a cinética de liberação do timol, utilizado no presente estudo, depende dos seguintes fenômenos: difusão do solvente (aquoso), cinética de relaxamento da matriz macromolecular e a difusão do composto ativo através da rede polimérica intumescida (DEL NOBILE et al., 2008; MASTROMATTEO et al., 2010).

3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS

3.6.1 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação é definida pela razão do composto ativo presente na superfície da partícula seca e do teor total do ativo. Assim para esse cálculo é necessário primeiramente obter esse dois resultados (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011).

Para a determinação do teor total do ativo nas micropartículas, as mesmas são rompidas com o uso de solvente para liberar o ativo presente. Já para a determinação do ativo na superfície, as micropartículas são lavadas com um solvente no qual a micropartícula não é solúvel, mas onde o composto ativo encontra afinidade e é arrastado. As quantificações do teor total e superficial do ativo são realizadas por espectrometria (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011).

3.6.2 Morfologia e distribuição de tamanho

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é muito utilizada para obter informações relativas a forma e tamanho das micropartículas (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; TONON; GROSSO; HUBINGER, 2011; GALLARDO et al., 2013;).

Imagens obtidas por MEV para partículas de zeína carregadas com óleo de linhaça mostraram uma heterogenicidade nos tamanhos e superfície esférica com algumas rugosidades (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011). Essas características foram encontradas por diversos pesquisadores que atribuem o fato à rápida evaporação da água no processo de secagem formando deformidades na superfície da

partícula (NIJDAM; LANGRISH, 2006; TONON; GROSSO; HUBINGER, 2011; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; GALLARDO et al., 2013).

Uma forma comum de obter a distribuição de tamanho de partículas sólidas é por difração de feixe de *laser* (LEUSCHNER; WEAVER; LILLFORD, 1999). Nessa técnica pequenas quantidades da amostra são dispersas em um veículo que normalmente é um solvente no qual a partícula não é solúvel. A difração de feixe de *laser* calcula o volume relativo das partículas e outros parâmetros a partir dos dados de dispersão do feixe assumindo que as partículas possuem forma esférica (MOUGHAL; MUNRO; SINGH, 2000). Com essas análises são obtidas conclusões a respeito da morfologia e tamanho médio de partículas bem como sua distribuição.

3.6.3 Isoterma de sorção de água

O controle do teor de umidade dos alimentos durante o processamento e armazenamento é de vital importância, pois a água desempenha diversas funções nas reações químicas dos mesmos e interfere na qualidade e vida de prateleira podendo potencializar sua deterioração. Neste contexto, a isoterma de sorção de água é uma ferramenta extremamente importante na ciência de alimentos, porque pode ser usada para prever as mudanças na estabilidade de alimentos e assim ajudar na seleção de materiais e ingredientes de embalagens apropriadas (AYRANCI; DUMAN, 2005).

Para a realização dessa análise é aplicado o método de determinação da isoterma por gravimetria estática. Onde as amostras são acondicionadas em recipientes com diferentes umidades relativas e mantidas até peso constante (AYRANCI; DUMAN, 2005). Diversos trabalhos avaliam a isoterma de sorção de água como parâmetro de estabilidade do material. Esses dados normalmente são tratados por modelos matemáticos e o mais comum para esse fim é o modelo de GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer), que fornece parâmetros como, o conteúdo de umidade de equilíbrio em base seca, teor de umidade na monocamada entre outros (TUNÇ; DUMAN, 2007; SHIRAI et al., 2013; SOARES et al., 2014).

3.6.4 Isoterma de adsorção de nitrogênio

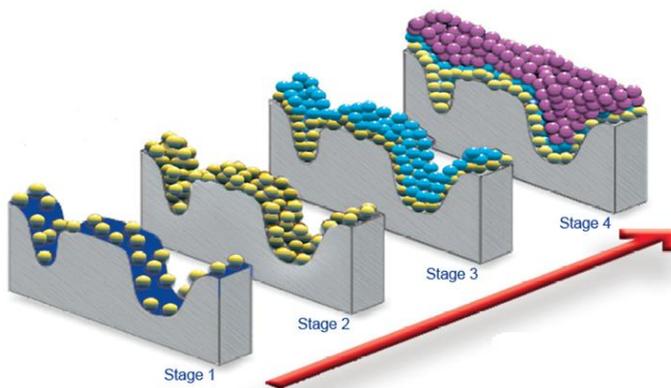
A distribuição de tamanhos ou de volumes de poro em função do diâmetro de poro pode ser calculada a partir da pressão relativa na qual os poros são preenchidos com um líquido proveniente da condensação de um gás. O processo inverso, ou seja, a evaporação do líquido contido

no poro, também pode ser utilizada (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

Quando este sólido é exposto a um gás ou vapor em um sistema fechado à temperatura constante, ele passa a adsorver o gás aumentando a massa do sólido e diminuindo a pressão do gás. Essa massa e pressão assumem então um valor constante. A quantidade de gás adsorvida pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido. A quantidade de gás adsorvida é função da interação entre o gás e o sólido, sendo, portanto, dependente da natureza dessas espécies. O processo de adsorção pode ser classificado como um processo físico ou químico, dependendo do tipo de força envolvido (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

O recobrimento da superfície do sólido pelo gás e a formação da monocamada e multicamadas são ilustradas na Figura 3.

Figura 3 - Recobrimento da superfície do sólido pelo gás adsorvente em quatro estágios.



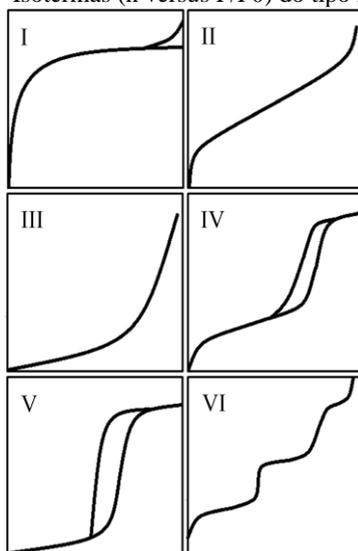
Fonte: Micromeritics (2013).

Onde sob o aumento gradativo da pressão do gás, no 1º estágio os locais isolados da superfície começam adsorver moléculas do gás à baixa pressão. No 2º estágio as moléculas adsorvidas formam uma monocamada e no 3º estágio é formada a multicamada e os poros menores são preenchidos primeiro. Já no 4º estágio a amostra é completamente coberta e todos os poros são preenchidos (MICROMERITICS, 2013).

Segundo Teixeira, Coutinho e Gomes (2001), quando o estudo do fenômeno de adsorção é feito com o objetivo de se obter informações

sobre a área específica e a estrutura porosa de um sólido, a construção de uma isoterma de adsorção é de fundamental importância, pois sua forma revela muitos detalhes sobre as características do material. O formato da isoterma é função do tipo de porosidade do sólido. Os seis tipos mais conhecidos são mostrados na Figura 4.

Figura 4 - Isotermas (n versus P/P_0) do tipo I ao tipo VI.



Fonte: Teixeira, Coutinho e Gomes (2001).

3.7 RETICULAÇÃO POLIMÉRICA

Os biopolímeros, tais como proteínas e polissacarídeos, são geralmente uma alternativa ecologicamente importante para substituição de polímeros sintéticos. Porém, sua aplicação pode ser limitada pela solubilidade em água o que pode ser uma desvantagem. Dessa forma a reticulação pode ser uma alternativa para melhorar as propriedades físicas e de barreira em baixa e alta umidade. A formação das ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas podem contornar esses problemas além de ser uma forma de alterar a resistência química, as propriedades adesivas, a estabilidade térmica e mecânica e a taxa de degradação do material (SELLING; SESSA, 2007; FAYAD, 2010).

A reticulação forma ligações covalentes estáveis entre segmentos de cadeias polipeptídicas dentro da proteína (ligações intramoleculares) ou entre cadeias poliméricas vizinhas (ligações intermoleculares) formando

uma estrutura em rede tridimensional, normalmente mais rígida que o material não reticulado (GERRARD, 2002). Alguns agentes são bem utilizados para a reticulação de proteínas como a zeína, entre eles estão o formaldeído, glutaraldeído, epícloridrina, ácido cítrico entre outros. As carbodiimidias também podem ser utilizadas como agentes reticulantes e o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) apresenta vantagem por não ser incorporado à estrutura da proteína e apresentar como subproduto da reação somente um derivado de uréia solúvel em água, que pode ser removido por sucessivas lavagens. Além disso, é menos tóxico, quando comparado a reticulantes como formaldeído e glutaraldeído (TOMIHATA et al., 1993; KIM; SESSA; LAWTON, 2004).

O genipin ((1*R*,2*R*,6*S*)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo [4.3.0] nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metila) é um agente reticulante extraído do geniposídio que é encontrado na fruta da Gardênia que é um gênero de cerca de 250 espécies de plantas da família do café, *Rubiaceae*, nativa das regiões tropicais e subtropicais (BUTLER; YIU-FAI; PUDNEY, 2003). É uma molécula biodegradável com baixa citotoxicidade. Sung e colaboradores (2000) testaram o genipin como agente de reticulação do colágeno. Neste trabalho, verificaram que o genipin era 10.000 vezes menos citotóxico que glutaraldeído, o que justifica seu uso em biomateriais (SUNG, et al., 2000; JIN; SONG; HOURSTON, 2004). Desta forma o EDC e o genipin foram os reagentes utilizados para as reticulações realizadas no presente trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A zeína de milho, o timol, os agentes reticulantes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e o genipin, usados neste trabalho foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental para a definição da concentração de timol nas amostras bem como temperatura de secagem foi realizado com o *software STATISTICA* (versão 7.0, 2004 StatSoft, Inc., EUA). Para isso foi aplicado o delineamento composto central rotacional (planejamento estrela) 2^2 , com dois fatores (temperatura e concentração de timol), dois níveis principais (-1 e +1), dois níveis axiais ($\pm \alpha$) e triplicata no ponto central totalizando 11 experimentos. Os níveis das variáveis foram codificados e são apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 - Níveis codificados para realização do experimento de microencapsulação de timol em matriz de zeína no *spray-dryer*

Fatores	-1,41 (- α)	-1	0	+1	+1,41 (+ α)
Timol (g de timol/ 100 g de zeína)	3,85	10	25	40	46,15
Temperatura (° C)	108	115	130	145	151

Todos os experimentos foram realizados de forma aleatória em dois dias para minimizar chances de erros sistemáticos. Para definir os parâmetros ideais foi aplicada a metodologia de superfície de resposta. E a eficiência de encapsulação do timol na matriz de zeína foi tomada como resposta.

4.2.2 Microencapsulação por Spray-drying

A zeína de milho foi pesada e solubilizada em solução aquosa de etanol 85% (v/v) mantendo sempre uma concentração de 10g/100mL, como descrito por Quispe-Condori, Saldaña e Temelli (2011) com

modificações. A solução alcoólica contendo a zeína foi mantida sob agitação magnética por 24 horas até a total solubilização da mesma. Em seguida a massa correspondente de timol foi adicionada e solubilizada. Essa solução foi homogeneizada em um aparelho Ultra-Turrax[®] (T25 digital IKA[®]) equipado com um rotor S 25N-18G a 5000 RPM por 4 minutos (definidos em estudos preliminares). Logo em seguida, as soluções foram submetidas ao processo de secagem no *spray-dryer* (modelo mini *spray-dryer* B-290 - Büchi, Suíça). Após o procedimento de secagem as amostras foram acondicionadas em dessecadores com sílica para futuras análises.

4.2.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) foi obtida através da relação entre a quantidade de timol na superfície das partículas com o conteúdo total de timol nas partículas após a secagem em *spray-dryer* dividido pelo timol total teórico (adicionado inicialmente, antes da secagem) e é expressa em percentagem de timol encapsulado, calculada utilizando a Equação 3 (QUISPE-CONDORI; SLDAÑA; TEMELLI, 2011).

$$EE\% = \frac{\text{timol total} - \text{timol superficial}}{\text{timol total teórico}} \times 100 \quad (3)$$

4.2.4 Determinação do total de timol

O timol total nas micropartículas de zeína (MP-Zeína) foi determinado através da solubilização de 0,5 g de micropartículas em 5 mL de etanol 85% (v/v) em um tubo de ensaio com o auxílio de um aparelho de ultrassom por 15 minutos a temperatura ambiente para abertura da partícula. Logo após, foram adicionados 5 mL de éter de petróleo. A mistura foi levemente agitada e em seguida permaneceu em repouso por 1 hora. Após o período de repouso observou-se a separação de fases. A fase sobrenadante foi retirada com auxílio de uma pipeta e transferida para um copo Becker. Em seguida, mais 5 mL de éter de petróleo foram adicionados ao tubo repetindo-se o procedimento acima descrito. Todo o procedimento foi repetido por 5 vezes totalizando 25 mL de éter de petróleo para extração do timol (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011). A concentração do timol total foi obtida através da leitura do sobrenadante, em um aparelho espectrofotômetro HITACHI, U-1800 (Tokyo, Japão), em um comprimento de onda $\lambda = 275$ nm e relacionada com uma curva de calibração previamente obtida, onde a concentração de timol foi linear em uma faixa de 0,01-3,2

mmol/L e a equação de regressão da curva de calibração média (n=3) foi a seguinte; $y = 0,219x + 0,0383$ ($R^2 = 0,9983$).

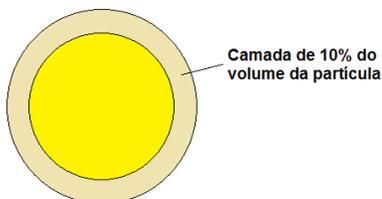
4.2.5 Determinação do timol superficial

Para a quantificação do timol superficial foram pesadas 0,5 g de micropartículas e acondicionadas sobre um filtro de papel. As micropartículas foram percoladas com 2 mL éter de petróleo até total escoamento do mesmo para um béquer. O procedimento de percolação foi repetido por 5 vezes de acordo com o descrito pelos mesmos autores (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011) com modificações. A quantificação do timol superficial se deu pela leitura obtida em espectrofotômetro. Todas as amostras foram feitas no mínimo em triplicata.

4.3 RETICULAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

Para a reticulação das micropartículas uma proporção de 1 mol de agente reticulante para 10 moles de unidade de repetição de zeína foi utilizada. A massa de zeína utilizada para o cálculo de reticulação foi obtida através da determinação da massa hipotética de uma partícula. Com base no diâmetro médio da partícula obtido por difração de feixe de *laser* (14,3 μm) foi determinado o raio (7,15 μm). Esses dados juntamente com a densidade da zeína (1,226g/mL) possibilitou calcular o volume e a massa de uma partícula, chegando ao valor de $1,88 \times 10^{-9}$ g. A seguir calculou-se a massa de uma suposta partícula com 90% do diâmetro da partícula original. A diferença entre esses dois volumes e massas correspondem a uma camada externa de 10% da partícula original, como mostra o exemplo da Figura 5.

Figura 5 - Representação da partícula destacando uma camada superficial de 10% do volume.



Fonte: o autor (2014)

A massa dessa camada foi utilizada para os cálculos da quantidade do agente reticulante utilizado, o qual foi solubilizado em uma solução tampão de TRIS pH 10 (LINS, 2012). Em seguida a massa correspondente de micropartículas foi adicionada à solução tampão e mantida em agitação por 6 horas. Após esse período a amostra reticulada foi lavada com água destilada para retirar o excesso de reticulante e produtos secundários da reação.

A reação das aminas primárias com o genipin conduz a uma pigmentação azul quando formam ligações covalentes na presença de oxigênio mudando desta forma a cor das partículas quando reticuladas com genipin.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS

4.4.1 Morfologia

A morfologia da micropartículas foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura através de um microscópio modelo JEOL JSM-6390LV do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina. As partículas foram metalizadas com ouro (Au) e amplificadas de 500 a 3000 vezes.

4.4.2 Distribuição de Tamanho

A distribuição de tamanho foi obtida por análise das micrografias com auxílio do *software Quantikov Image Analyzer* e através da análise por difração de feixe de laser em um equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) onde as amostras foram dispersas em água destilada com auxílio de um Vortex por 1 minuto e em seguida submetidas a leitura no equipamento.

4.4.3 Isoterma de Sorção de Água

As isotermas de sorção de água foram obtidas por método gravimétrico estático segundo descrito por Shirai e colaboradores (2013), onde uma massa conhecida de micropartículas foi pesada em cadinhos de porcelana e acondicionada em dessecadores com umidades relativas. Os dessecadores foram preparados contendo soluções salinas saturadas para criar as diferentes umidades relativas que variaram de 5,5 a 97%. Os sais utilizados e suas respectivas umidades relativas foram os seguintes, Cloreto de Zinco ($ZnCl_2$) 5,5%, Hidróxido de Sódio (NaOH) 8,2%, Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 33%, Brometo de Sódio (NaBr) 58%, Cloreto de Potássio (KCl) 85% e Sulfato de Potássio (K_2SO_4)

97%. O modelo de GAB (Guggenheim–Anderson–de Boer (Equação 4)) foi utilizado para ajustar os dados experimentais.

$$X_w = m_o C k a_w / (1 - k a_w) (1 - k a_w + C k a_w) \quad (4)$$

Nesta equação, o parâmetro X_w é o teor de umidade de equilíbrio (g de H_2O/g de sólido seco) a uma atividade de água (a_w), m_o é o teor de água na monocamada, C é a constante de Guggenheim que representa a absorção de calor na primeira camada, e k é a absorção de calor na multicamada. Os parâmetros do modelo de GAB foram determinados por meio de regressão não-linear pelo programa Statistica 7.0 (Stat-Soft, Tulsa, OK, EUA).

4.4.4 Isoterma de adsorção de nitrogênio

A isoterma de adsorção de nitrogênio, a porosidade e a área superficial foram obtidas utilizando o equipamento TriStar II 3020 (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA, EUA) a uma temperatura de 77,3 K. As amostras sólidas foram pré-tratadas pela aplicação de uma combinação de calor, vácuo, e/ou fluxo de gás para remover os contaminantes adsorvidos que são adquiridos pela exposição à atmosfera (tipicamente água e dióxido de carbono). Em seguida o material sólido é arrefecido sob vácuo, normalmente a temperatura criogênica (77 K, $-195^\circ C$). O nitrogênio é dosado na amostra controladamente. A pressão é deixada equilibrar e a quantidade adsorvida é calculada em cada pressão e temperatura para definir a isoterma de adsorção.

4.4.5 Ângulo de contato

Para a determinação do ângulo de contato fez-se necessária a produção de comprimidos das micropartículas com o objetivo de obter-se uma superfície plana para a deposição dos solventes líquidos testados. Para isso uma massa de aproximadamente 200 mg de amostra foi submetida a uma prensa a uma pressão de 1 ton. por 1 minuto. Os solventes utilizados para determinar os ângulos de contato foram água destilada, formamida e diiodometano. As medições foram realizadas em um goniômetro modelo OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), acoplado a um sistema processador de imagem de alta resolução Data Physics Instruments. Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente e o volume dos líquidos depositados sobre a superfície das partículas foi de 5 μL , 4 μL e 0,8 μL para água deionizada, formamida e diiodometano, respectivamente.

4.4.6 Determinação da energia livre superficial

A energia livre superficial foi determinada utilizando o método de Owens-Wendt o qual também dá os componentes, polar e dispersivo. O método de Owens-Wendt é geralmente utilizado para polímeros. Os pesquisadores provaram que a energia livre superficial total de um sólido (γ_S) pode ser expressa como a soma do componente dispersivo (γ_S^d) e polar (γ_S^p) (Equação 5). A equação de Owens-Wendt (Equação 6) aplica os dados dos líquidos polares e não polares, com componentes dispersivos (γ_L^d) e polares (γ_L^p) conhecidos, da energia livre superficial total e do ângulo de contacto (θ) (JAMSHIDIAN et al., 2012).

$$\gamma_S^T = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad (5)$$

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \right) \quad (6)$$

onde γ_L é a tensão superficial do líquido.

Para esta medida, três diferentes líquidos foram utilizados, sendo eles, água deionizada ($\gamma^T = 72.8$ mN/m, $\gamma^d = 21.8$ mN/m, $\gamma^p = 51.0$ mN/m), diiodometano ($\gamma^T = 50.8$ mN/m, $\gamma^d = 50.8$ mN/m, $\gamma^p = 0$ mN/m) e formamida ($\gamma^T = 58.0$ mN/m, $\gamma^d = 39.0$ mN/m, $\gamma^p = 19.0$ mN/m).

4.4.7 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IR) foi realizada para observar as interações estruturais das micropartículas de zeína carregadas com timol (MP-Zeína) bem como as micropartículas reticuladas com EDC e genipin. Os espectros no infravermelho foram obtidos na região entre 4000 e 650 cm^{-1} com resolução de 1 cm^{-1} utilizando um instrumento Frontier FT-IR/NIR (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Todas as leituras foram realizadas a temperatura ambiente.

4.4.8 Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas das MP-Zeína, MP-Vazia, MP-EDC, MP-genipin e timol puro, foram realizadas em um equipamento STA 449 F3 Jupiter[®] da NETZSCH para avaliar a estabilidade térmica e a degradação das amostras. As amostras (aprox. 10 mg) foram aquecidas

a uma taxa de 10 °C/minuto de 35 a 700 °C em atmosfera de nitrogênio e fluxo de 50 mL/min.

4.4.9 Determinação da densidade aparente e densidade compactada

A densidade aparente (d_{ap}) foi determinada como descrito por Chinta et al. (2009) onde três gramas da amostra (m_0) foram adicionadas em uma proveta graduada através de um funil. O volume (V_0) foi lido diretamente na proveta e utilizado para o cálculo através da seguinte equação $d_a = m_0 / V_0$.

A determinação da densidade compactada (d_{cp}) foi realizada através da compactação de uma massa (m_0) conhecida de amostra em pó por 1200 vezes em um compactador automático (Densímetro, Copley®) obtendo volume constante (V_c) e calculada utilizando a equação, $d_{cp} = m_0 / V_c$.

Com a determinação da densidade aparente e densidade compactada pode-se calcular o índice de Carr e índice de Hauser que dá o parâmetro de compressibilidade/compactabilidade do pó e fluxo. Para o cálculo do índice de Carr (I_{Carr}) é utilizada a Equação 7.

$$I_{Carr} (\%) = \left(\frac{d_{cp} - d_{ap}}{d_{cp}} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

Já para o índice de Hauser (I_{Hauser}) utiliza-se a Equação 8.

$$I_{Hauser} = \frac{d_{cp}}{d_{ap}} \quad (8)$$

4.5 ENSAIOS DE DPPH

A capacidade das micropartículas carregadas com timol de inibir radicais livres foi testada através dos ensaios com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) de acordo com Mensor et al. (2001) com adaptações. As amostras foram preparadas em cinco concentrações diferentes (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 mg de partículas/mL de solução de metanol). Os valores de EC_{50} foram calculados por regressão linear onde o eixo X representa concentração de micropartículas testadas e o eixo Y a percentagem média de atividade antioxidante realizada em triplicata. O valor obtido para o EC_{50} representa a concentração eficiente para inibir 50% do

radical livre (CHEN, BERTIN E FROLDI, 2013). Inicialmente uma solução com concentração de 10 mg de partículas/mL de solução de etanol 85% (v/v) foi preparada e submetida ao sonicador por 15 minutos a temperatura ambiente e deixada em repouso por aproximadamente 24 horas ao abrigo da luz, esta solução foi utilizada para as diluições das amostras testadas de micropartículas.

Para os testes foi utilizada uma alíquota 2,5 mL da amostra com 1 mL de solução DPPH. Um branco foi preparado substituindo a solução de DPPH por 1 mL de metanol (para cada amostra foi preparado um branco). Para o controle negativo a amostra foi substituída por 2,5 mL do mesmo solvente utilizado nas etapas anteriores. Em seguida as amostras foram deixadas ao abrigo da luz por 30 minutos e a absorbância medida em espectrofotômetro HITACHI, U-1800 (Tokyo, Japan), a 518 nm e convertida em porcentagem da atividade antioxidante (AA%) utilizando a Equação 9.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (9)$$

Onde, AA(%) representa atividade antioxidante, $Abs_{amostra}$, absorbância da amostra, Abs_{branco} , absorbância do controle em branco e $Abs_{controle}$, absorbância do controle negativo.

4.6 TESTES DE LIBERAÇÃO

Os testes de liberação foram realizados utilizando sacos de diálise (*Cut-off* de peso molecular de 12.000 – 16.000 e porosidade de 25 Angstroms) onde, 10 mg das partículas foram pesadas e acondicionadas juntamente com 10 mL de solução tampão pH 7,4 baseado nos estudos de Xu, Khan e Burgess (2012) com modificações. Os sacos de diálise foram mergulhados em um frasco âmbar fechado contendo 100mL da mesma solução tampão de pH 7,4 e mantidas sobre leve agitação magnética. As alíquotas da fase externa ao saco de diálise foram retiradas em intervalos de tempo inicialmente de hora em hora para avaliar a quantidade de timol liberado para o meio. A quantificação se deu por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography*, HPLC) por meio de uma curva padrão com timol com equação de regressão média (n = 3), $y=20000000x+4342,9$ (mg/mL) ($R^2 = 0,9995$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os parâmetros correspondentes à concentração de timol nas amostras e a temperatura de secagem no *spray-dryer* foram avaliados e a distribuição dos experimentos de acordo com o *software* STATISTICA 7.0 é mostrada na Tabela 2;

Tabela 2 - Distribuição dos experimentos para secagem de micropartículas de zeína carregadas com timol no *spray-dryer*

Experimento	Temperatura de secagem (°C)	Timol (g de timol/ 100 g de zeína)
1	115	10
2	115	40
3	145	10
4	145	40
5	108	25
6	151	25
7	130	3,85
8	130	46,15
9	130	25
10	130	25
11	130	25

Seguindo a Tabela 2, os experimentos foram realizados de forma aleatória e a eficiência de encapsulação foi obtida para cada um dos onze experimentos. Os resultados da extração superficial, extração total e eficiência de encapsulação são demonstrados na Tabela 3.

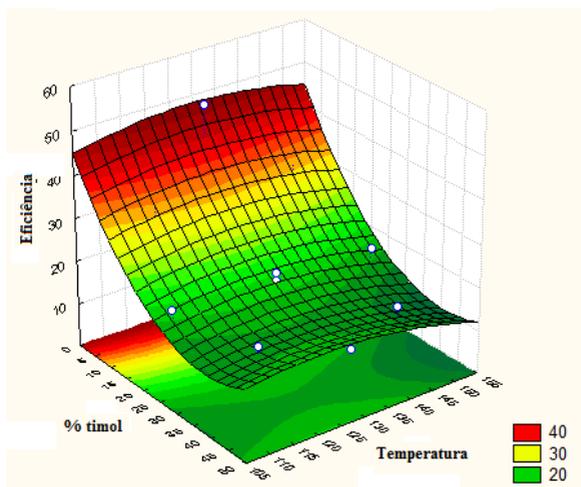
Tabela 3 - Resultados da extração superficial, extração total e eficiência de encapsulação do timol nas MP-Zeína

Amostra	Timol superficial (mg de timol/ 0,5 g de amostra) ^a	Timol Total (mg de timol/ 0,5 g de amostra) ^a	Timol total teórico (mg)	EE(%)
1	0,290 ± 0,085	12,581 ± 0,127	45,552	27
2	0,303 ± 0,151	24,527 ± 0,940	143,933	16,9
3	0,188 ± 0,046	12,240 ± 0,780	45,573	26,4
4	0,138 ± 0,010	21,131 ± 0,105	143,429	14,6
5	0,872 ± 0,060	21,280 ± 0,490	100,840	20,2
6	0,357 ± 0,056	19,054 ± 0,560	101,067	18,5
7	0,110 ± 0,014	9,360 ± 0,851	18,695	49,5
8	0,180 ± 0,017	21,691 ± 0,114	159,138	13,5
9	0,505 ± 0,045	21,211 ± 0,420	100,553	20,6
10	0,090 ± 0,023	18,848 ± 0,441	100,700	18,6
11	0,325 ± 0,027	20,870 ± 0,250	100,567	20,4

^a Média ± desvio padrão com base na triplicata dos resultados.

Com os resultados obtidos da Tabela 3, foi possível construir a superfície de resposta representada na Figura 6.

Figura 6 - Superfície de resposta para micropartículas de zeína contendo timol. Eficiência de encapsulação em função da % de timol e da temperatura.



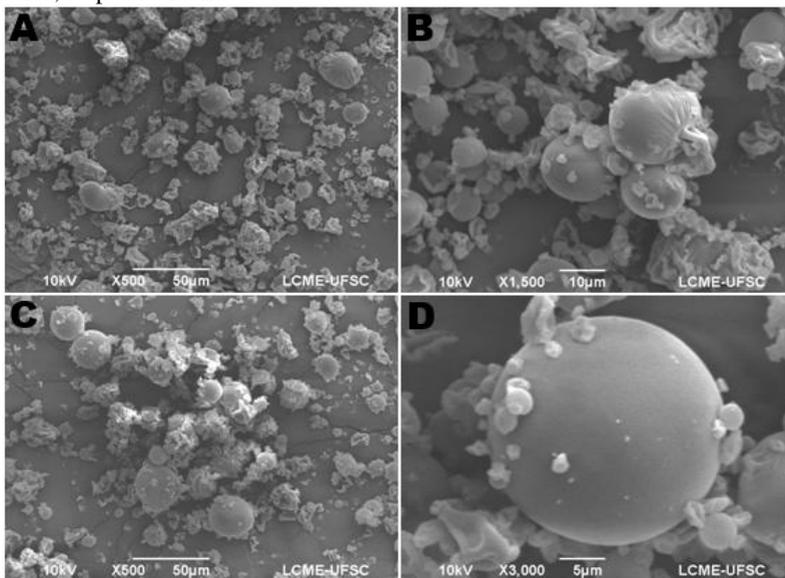
Observando a superfície de resposta (Figura 6) pode-se observar que apenas a variável porcentagem de timol foi significativa a um nível de 5% de significância. Ou seja, a eficiência de encapsulação do timol diminuiu em média quando se passa do nível baixo para o nível alto da variável concentração de timol, independente do nível da variável temperatura. Esse resultado confirma Quispe-Condori, Saldaña e Temelli (2011) onde a concentração do material encapsulado foi mais significativa (95% de confiança) na encapsulação de óleo de linhaça com zeína utilizando *spray-dryer* com uma temperatura de entrada de 135 °C. Logo, a maior resposta para a eficiência de encapsulação foi encontrada no experimento 7 (49,5 EE%), ou seja, a condição contendo o nível mais baixo de timol (ponto axial inferior ($-\alpha$)) e o ponto central para a variável temperatura (130 °C). Avaliando a ANOVA do modelo, pode-se observar que não existe falta de ajuste para o intervalo de 98% de confiança, pois o p-valor foi maior do que 0.02 (p-valor igual a 0.024631). Dessa forma mantendo o nível da variável timol abaixo de 5%, para qualquer nível da variável temperatura, a eficiência será maior ou aproximadamente igual a 45%. Então, o experimento 7 foi o selecionado para prosseguir com os estudos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.2.1 Morfologia

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para a amostra selecionada foram avaliadas e a morfologia das micropartículas foi observada como mostra a Figura 7.

Figura 7 - Micrografias das micropartículas de zeína carregadas com timol. Onde A e C estão em uma magnificação de 500 vezes e B e D 1500 e 3000 vezes, respectivamente.



As micropartículas em sua grande maioria apresentaram forma esférica, de superfície lisa com leve rugosidade (Figura 7b), sem porosidade ou fissuras (Figura 7d). Essas características são importantes para proporcionar menor permeabilidade de gases, maior proteção e retenção do núcleo e condizem com o encontrado por Tonon, Grosso e Hubinger (2011) na produção de micropartículas de goma arábica carregadas com óleo de linhaça. Características semelhantes foram encontradas por Quispe-Condori, Saldaña e Temelli (2011) quando a razão zeína/óleo de linhaça foi de 28:1, mostrando grande variedade de tamanho de partícula. Esses mesmos autores relataram apresentação de rugosidade na superfície das partículas em uma razão de 4:1 (zeína:óleo de linhaça) fato que também pode ser observado no presente trabalho

(Figura 7b). Essa característica também foi relatada por Gallardo et al.(2013) e Tonon, Grosso e Hubinger (2011), que atribuem o fato a uma característica comum para microcristalinas produzidas por *spray-dryer*. Segundo Nijdam e Langrish (2006) este fato pode ser explicado pela formação de “vacúolos” dentro da estrutura da partícula no momento da formação da parede. Nas imagens são observadas outras estruturas que também estão presentes nas microcristalinas sem timol, dessa forma podemos afirmar que são estruturas proteicas da zeína.

As microcristalinas reticuladas com EDC (Figura 8) e Genipin (Figura 9) também foram observadas por MEV.

Figura 8 - Micrografias das MP-EDC em magnificação de 500 vezes (A) e 30 vezes (B).

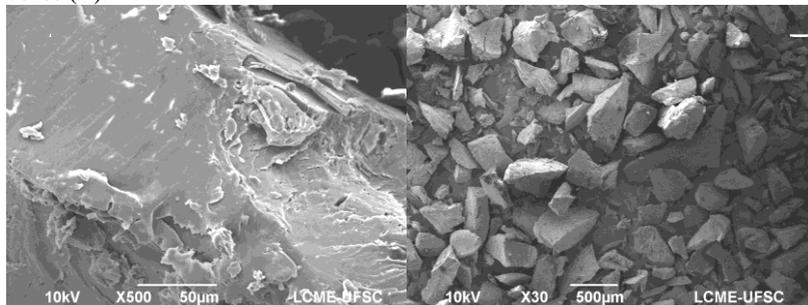
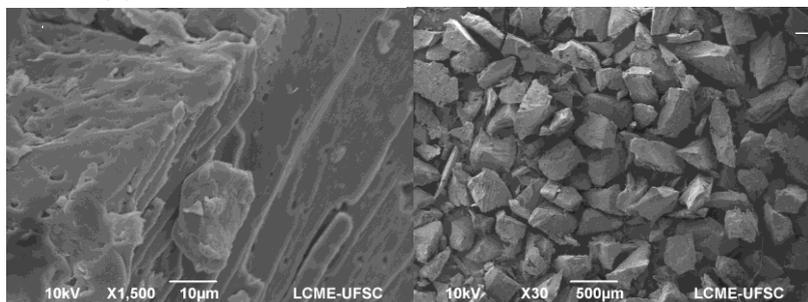


Figura 9 - Micrografias das MP-Genipin em magnificação de 1500 vezes (A) e 30 vezes (B).



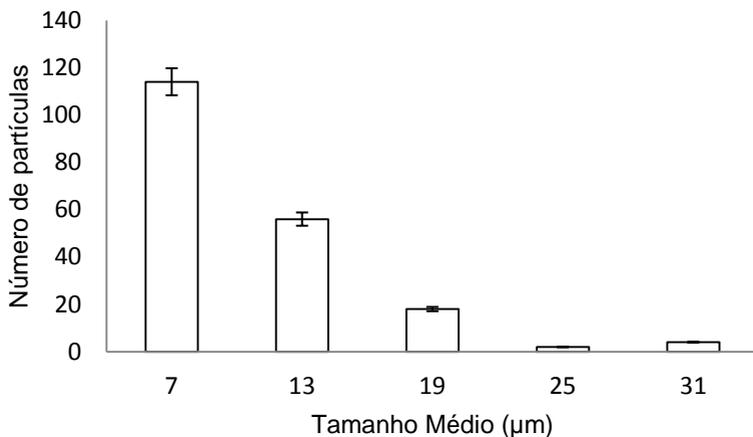
A característica de partícula esférica obtida nas MP-Zeína foi perdida nas microcristalinas reticuladas com EDC e Genipin. É observada uma estrutura rígida onde a ligação entre as moléculas de zeína formam uma rede compacta. Isso pode ser atribuído a união das microcristalinas

formando ligações pelo agente reticulante. Essa união ocasionou a formação de uma estrutura macro.

5.2.2 Distribuição de tamanho

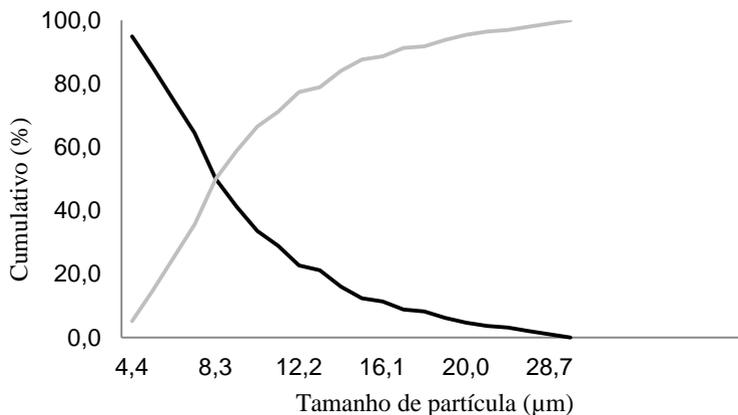
A distribuição do tamanho das partículas determinada por MEV e por difração de feixe de *laser* demonstrou que as mesmas se encontram em escala micrométrica, não sendo aplicadas as partículas reticuladas. Para as micrografias a distribuição de tamanho média obtida pela medição de 194 partículas de diferentes micrografias e é mostrada na Figura 10.

Figura 10 - Distribuição de tamanho médio de partículas de zeína carregadas com timol. Dados obtidos por MEV.



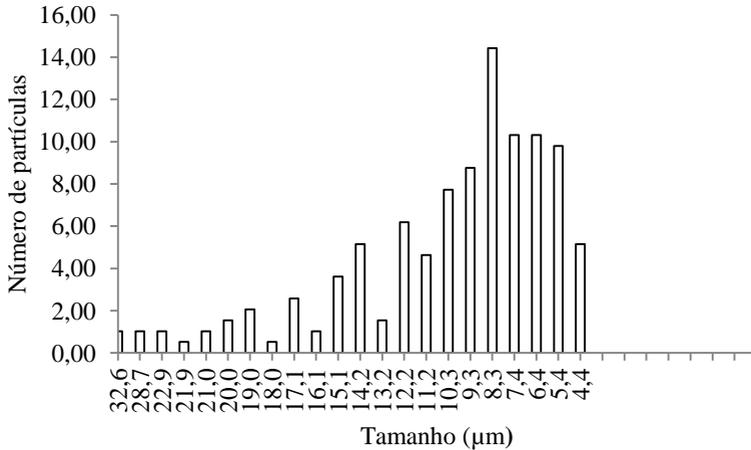
As colunas da Figura 6 representam médias de uma faixa de tamanho de partículas onde a maior frequência é observada em uma faixa de 4 – 10 µm, que é representada pela média de 7 µm. Os resultados obtidos por MEV também foram submetidos à análise cumulativa como mostra a Figura 11.

Figura 11 - Análise cumulativa dos dados obtidos por análise das micrografias das micropartículas de zeína carregadas com timol.



Pela análise cumulativa, a qual é obtida pela adição, consecutivamente, dos incrementos individuais, começando com aquele que contém as partículas de menores dimensões e traçando as somas acumuladas contra o diâmetro máximo das partículas, podendo ser crescente ou decrescente. A intersecção entre as linhas se dá no ponto de 8,3 μm o que coincide com a moda encontrada na distribuição de tamanho simples que é exposta na Figura 12.

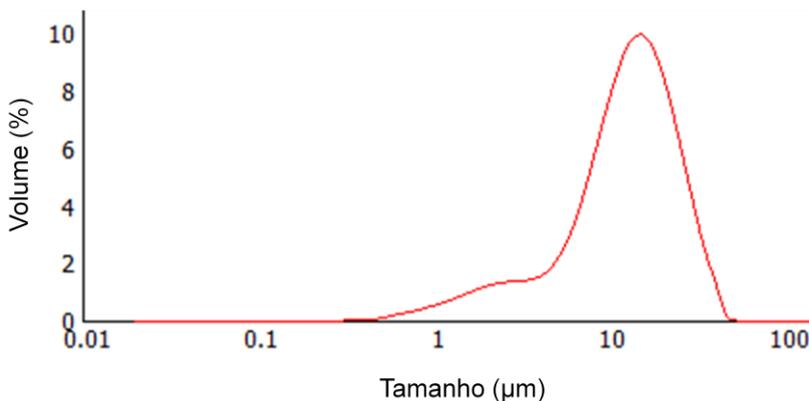
Figura 12 - Distribuição de tamanho das MP-Zeína. Dados obtidos por MEV.



Logo, calculou-se a média das medições obtendo o tamanho médio de partícula equivalente a $15,2 \pm 7,4 \mu\text{m}$ para a análise das micrografias.

Os resultados obtidos por difração de feixe de *laser* são representados na Figura 13, onde observa-se uma distribuição unimodal dos dados.

Figura 13 - Distribuição de tamanho das MP-Zeína por análise no Mastersizer 2000.



A análise no Mastersizer 2000 nos oferece dados como o span que mostra a variabilidade dos tamanhos das partículas e é calculado pela Equação 10.

$$Span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (10)$$

Onde, d_{10} , d_{50} e d_{90} são os diâmetros em 10, 50 e 90% de volumes cumulativos, respectivamente. Menores valores encontrados para o span mostram uma estreita faixa de distribuição do tamanho das partículas, indicando uniformidade para esse parâmetro. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos no Mastersizer 2000 bem como as análises por MEV. O valor de span, calculado tanto por difração como pela análise de imagem, está dentro da mesma ordem de grandeza, indicando uma estreita distribuição de tamanho das micropartículas carregadas com timol, não reticuladas.

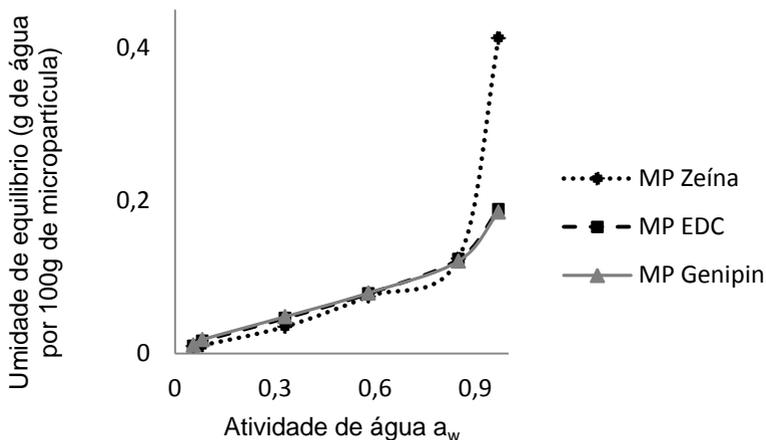
Tabela 4 - Distribuição de tamanho das MP-Zeína por difração de feixe de *laser* e MEV

Método	d_{10} (µm)	d_{50} (µm)	d_{90} (µm)	Diâmetro médio	Span
Difração	3,4	13,1	26,4	14,3	1,754
MEV	4,4	8,3	16,1	15,2	1,410

5.2.3 Isoterma de sorção de água

A Figura 14 mostra a isoterma de sorção de água obtida à 25 °C para as MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin. A forma sigmóide encontrada é característica de alimentos e amostras hidrofílicas. O aumento acentuado no ponto de 0,97 a_w para a MP-Zeína pode ser atribuído a uma desestruturação da cadeia proteica devido ao longo período (15 dias) de exposição a essa condição, dessa forma uma alta absorção foi observada. As curvas de isoterma para as partículas reticuladas ficaram sobrepostas, conforme pode ser percebido na Figura 10. Nesse caso as três partículas testadas apresentaram isotermas semelhantes, porém, pode ser observado uma menor absorção de água em atividade de 0,97 a_w nas micropartículas reticuladas o que mostra maior proteção proporcionada pela reticulação, pois, os sítios de ligação com a água são diminuídos e assim há uma menor absorção. Resultados semelhantes foram encontrados por Ayranci e Duman (2005) para isoterma de proteína isolada de feijão de corda.

Figura 14 - Isoterma de sorção de água para MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.



O modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) foi utilizado para obter os valores referentes a teor de umidade na monocamada (m_0), constante de Guggenheim (C) e o fator de correção da atividade de água da multicamada (K). Esses resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de GAB para isoterma de sorção de água das MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.

Amostra	m_0	C	K	R^2
MP-Zeína	0,070	0,23	0,91	0,99
MP-EDC	0,045	8,05	0,79	0,99
MP-Genipin	0,044	9,44	0,78	0,99

m_0 = umidade na monocamada, C = constante de Guggenheim, K = fator de correção da atividade de água da multicamada e R^2 = Regressão linear.

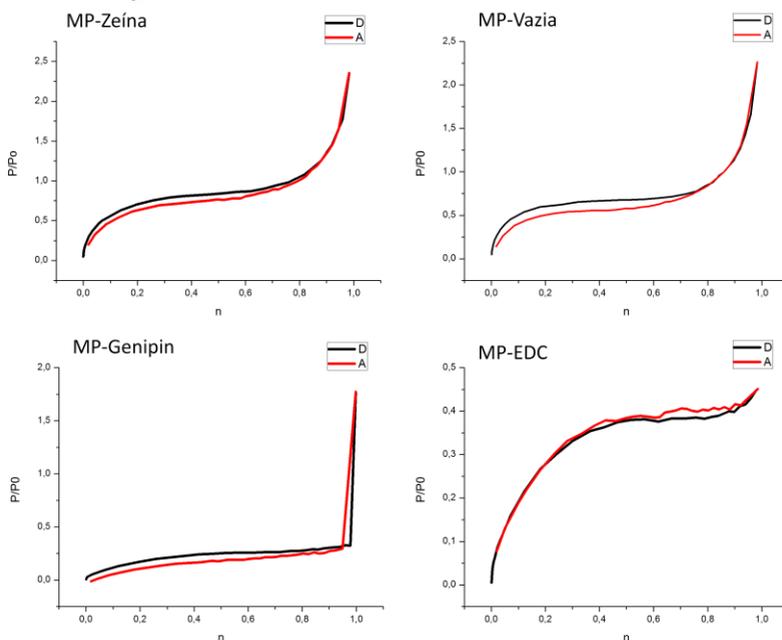
O baixo valor encontrado para m_0 (0,07g de água/g de sólido) para a MP-Zeína pode ser atribuído a característica hidrofóbica da zeína. Esse parâmetro nas partículas reticuladas foi ainda menor (0,045 e 0,044 para MP-EDC e MP-Genipin, respectivamente) o que indica maior estabilidade para essas amostras devido a redução dos sítios de ligação com a água e conseqüente maior hidrofobicidade. Segundo Ayranci e Duman (2005) o m_0 é um parâmetro muito importante para avaliar a deterioração de alimentos, pois, uma alta quantidade de água na monocamada faz com que o alimento seja mais susceptível a essa

deterioração. O modelo de GAB mostrou um bom ajuste dos dados ($R^2 = 0,99$).

5.2.4 Isoterma de adsorção de nitrogênio

Utilizando o equipamento TriStar II 3020 (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA, EUA) a uma temperatura de 77,3 K foram obtidas as isotermas de adsorção de nitrogênio que são mostradas na Figura 15.

Figura 15 - Isoterma de adsorção (A) e dessorção (D) de nitrogênio para MP-Zeína, MP-Vazia, MP-EDC e MP-Genipin onde P/P_0 é a pressão relativa e n é a quantidade de gás adsorvida/dessorvida.



As isotermas obtidas para as MP-Zeína e MP-Vazia mostraram ser do Tipo II segundo Teixeira, Coutinho e Gomes (2001), que é característica de sólidos não porosos. As mesmas características encontradas nas duas isotermas mostram que o timol presente neste caso não teve influência. Para a amostra reticulada com EDC (MP-EDC), a isoterma resultante foi do Tipo I. Para sólidos microporosos, a isoterma do Tipo I mostra um ramo quase vertical na primeira região da curva. Isto se deve à grande facilidade de adsorção em poros com diâmetros menores que 20 Å. Após o preenchimento dos microporos, que acontece

em ordem crescente de tamanho, praticamente não há outras regiões onde a adsorção seja significativa. A curva, portanto, mostra uma região quase constante que volta a crescer quando o fenômeno de condensação começa a ocorrer. Na partícula reticulada com Genipin (MP-Genipin) a curva se assemelha com o Tipo III onde a interação do adsorvato entre si é maior do que com o sólido. Com isso foi determinada a área superficial (A_{BET}) (método de Brunauer, Emmet e Teller (BET)), volume do poro (V_{BJH}) e diâmetro médio (D_{BJH}) (BJH), área do microporo ($A_{m-t-Plot}$), área da superfície externa ($S_{e-t-Plot}$) e volume do microporo ($V_{m-t-Plot}$) (t-Plot), volume ($V_{C_{MP}}$) e área cumulativa ($A_{C_{MP}}$) e raio hidráulico (Rh_{MP}) (MP-Método) e os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados para caracterização das MP-Zeína, MP-Vazia, MP-EDC e MP-Genipin quanto ao volume e área da superfície e poros.

Amostra	Área (m ² /g)				
	A_{BET}^*	$A_{m-t-Plot}^*$	$S_{e-t-Plot}^*$	$A_{C_{MP}}^*$	$Rh_{MP} \text{ (nm)}^*$
MP-Zeína	2,4777	0,0728	2,4049	1,1418	0,46585
MP-Vazia	2,0022	0,5593	1,4430	1,5507	0,44788
MP-EDC	1,1708	-	1,6924	-	-
MP-Genipin	0,7489	-	1,1400	-	-
	Volume do poro (cm ³ /g)				
	$V_{m-t-Plot}^{\#}$	$V_{BJH}^{\#}$	$V_{C_{MP}}^{\#}$	$D_{BJH} \text{ (Å)}^{\#}$	
MP-Zeína	0,000032	0,002821	0,0005	13,2531	
MP-Vazia	0,000289	0,002848	0,0007	16,4201	
MP-EDC	-	0,000315	0,0000	3,1805	
MP-Genipin	-	0,002591	0,0000	28,1610	

* A_{BET} , área superficial, $A_{m-t-Plot}$, área do microporo, $S_{e-t-Plot}$, superfície externa, $A_{C_{MP}}$, área cumulativa e Rh_{MP} , raio hidráulico, respectivamente.

[#] $V_{m-t-Plot}$, volume do poro (t-Plot), V_{BJH} , volume do poro (BJH), $V_{C_{MP}}$, volume cumulativo, D_{BJH} , diâmetro médio.

De acordo com Gregg e Sing (1982) os poros podem ser classificados em função de seu diâmetro (Tabela 7) já que esse é o principal parâmetro dimensional.

Tabela 7 - Classificação dos poros segundo seu diâmetro.

Classificação	Diâmetro (Å)
Microporo	$\phi < 20$
Mesoporo	$20 < \phi < 500$
Macroporo	$\phi > 500$

Fonte: Gregg e Sing (1982).

Dessa forma as amostras MP-Zeína, MP-Vazia e MP-EDC podem ser classificadas como microporosas por apresentarem poros com diâmetro médio (D_{BJH}) de 13,2531, 16,4201 e 3,1805 Å ($\phi < 20$ Å), respectivamente. O que confirma a característica de isoterma do Tipo II para as duas primeiras e Tipo I para a última. Já para a amostra MP-Genipin, de acordo com a tabela a classificação seria de mesoporos por apresentar diâmetro médio de 28,1610 Å. Exceto pela amostra reticulada com genipin, os resultados também confirmam a morfologia observada por MEV, que apresentou superfície lisa com pouca ou ausência de rugosidade e fissuras.

5.2.5 Ângulo de contato e energia livre superficial

Para medir a energia superficial livre das partículas foram realizadas leituras em um aparelho goniômetro OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), com sistema processador de imagem de alta resolução *Data Physics Instruments*, utilizando água, formamida e diiodometano à temperatura ambiente. Por meio de uma prensa foram obtidas pastilhas da amostra MP-Zeína e zeína pura. Não se aplicando às reticuladas pela impossibilidade de obtenção da pastilha. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos.

Tabela 8 - Resultados para o ângulo de contato, energia livre superficial total (γ^T (mN/m)), dispersiva (γ^d (mN/m)) e polar (γ^p (mN/m)) utilizando o modelo de Owens & Wendt.

Amostra	Ângulo de contato			Modelo de Owens & Wendt		
	H ₂ O	Fomamida	Diiodometano	γ^T (mN/m)	γ^d (mN/m)	γ^p (mN/m)
MP-Zeína	90,91±1,26	63,87±4,92	43,54±4,85	38,11	37,10	1,01
Zeína Pura	93,71±3,38	79,97±3,51	45,79±1,94	32,41	31,68	0,73

γ^T : energia livre superficial total; γ^d : componente dispersivo; γ^p : componente polar. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

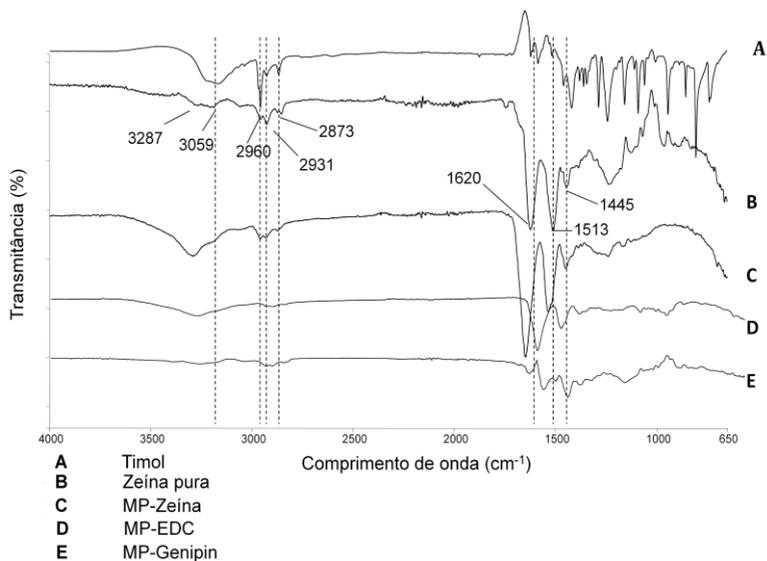
A medida do ângulo de contato com líquidos de diferentes polaridades e a superfície da amostra podem indicar a hidrofiliicidade ou hidrofobicidade do material. Segundo Feng et al.(2003), medidas de ângulo com a água menores que 90° são indicativas de hidrofiliicidade, sendo que, quando maiores que 90° mostram a hidrofobicidade do material. Dessa forma observando os resultados da Tabela 8 as duas amostras podem ser consideradas hidrofóbicas por apresentarem ângulos de contato para a água iguais a 90,91±1,26 e 93,71±3,38 para MP-Zeína e zeína pura, respectivamente. Estes resultados também nos mostram que a presença do timol na micropartícula e o processo de secagem em *spray-dryer* pouco influenciam nas medidas de ângulo de contato, mantendo a característica hidrofóbica apresentada pela zeína.

Os ângulos de contato obtidos para a fomamida e para o diiodometano se mostraram coerentes com as características hidrofóbicas do material. O mesmo ocorre nos valores encontrados para a energia livre superficial que apresentam valores maiores para o componente dispersivo (apolar) (37,10 e 31,68 mN/m para MP-Zeína e zeína pura, respectivamente).

5.2.6 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada para caracterizar as interações intermoleculares nas micropartículas através do método de FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*). Como pode ser observado na Figura 16, as bandas características da zeína estão presentes em 3287 e 3059 cm^{-1} e representam o grupo hidroxila da zeína que nas MP-Zeína é sobreposto ao grupo fenólico hidroxilado do timol. Os picos em 2960, 2931 e 2873 cm^{-1} representam o estiramento do C-H dos grupos funcionais CH_3 e CH_2 da zeína e se fundem com os picos do timol. Nesse caso os grupos funcionais responsáveis pelo estiramento do C-H são os grupos metil e isopropil e o anel fenólico do timol (WU; LUO; WANG, 2012; CHEN; ZHONG, 2014). Os picos característicos do anel fenólico do timol, que aparecem entre 1600 e 1400 cm^{-1} são sobrepostos nas micropartículas por apresentar posição semelhante aos picos da amida I e II da zeína (1620 e 1513 cm^{-1} , respectivamente) (WU; LUO; WANG, 2012).

Figura 16 - Espectro de FTIR para timol (A), zeína pura (B), MP-Zeína (C), MP-EDC (D) e MP-Genipin (E).

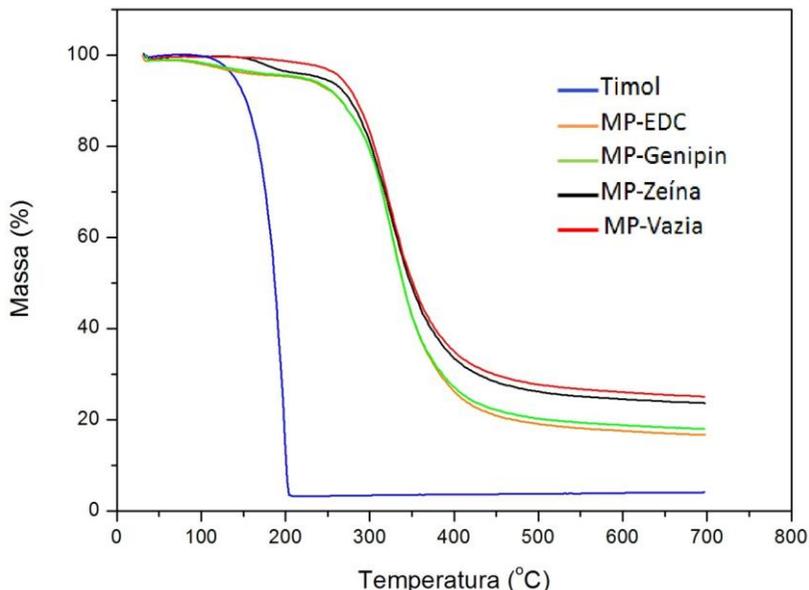


As informações mostram que novos picos não apareceram nas MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin, não havendo assim reações químicas que pudessem alterar a estrutura do timol. Sendo assim provavelmente as suas características antioxidante e antimicrobiana foram mantidas.

5.2.7 Análise termogravimétrica

A análise térmica estuda a perda de massa da amostra em função da temperatura podendo assim avaliar a estabilidade térmica da mesma. Foram submetidas à análise a zeína pura, o timol e as micropartículas de zeína carregadas com timol (MP-Zeína) bem como as reticuladas (MP-EDC e MP-Genipin). As curvas termogravimétricas são apresentadas na Figura 17.

Figura 17 - Curva termogravimétrica do timol, MP-vazia, MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.



Comparando as curvas termogravimétricas pode ser observado que em aproximadamente 200 °C o timol é totalmente degradado tendo ao final uma massa residual de 3,71% (698 °C). Ramos e colaboradores (2012) relatam perda de massa em 115 °C nos filmes de polipropileno carregados com timol e associam à degradação do ativo, essa pequena perda é observada entre 110 – 125 °C no timol puro. Entretanto, não ocorre na amostra MP-Zeína. A perda de massa que ocorre entre 200 - 300 °C pode ser atribuída a ruptura de ligações covalentes da zeína (CHEN et al., 2013). Porém, com a presença do ativo, parte dessa massa pode ser atribuída a sua degradação. A curva da MP-Zeína apresentou pouca variação em relação a MP-vazia mostrando pouca influência, neste caso, da presença do ativo. Quando as curvas obtidas para MP-EDC e MP-Genipin são comparadas, observa-se as duas praticamente sobrepostas. Nas duas é observada uma perda de massa mais acentuada na faixa de 200 °C o que pode ser atribuído à degradação do ativo. Dessa forma ainda pode ser afirmado que a microencapsulação apresentou proteção ao ativo em

altas temperaturas, porém a reticulação não apresentou maior proteção para essa condição.

5.2.8 Determinação da densidade, índice de Carr´s e índice de Hauser

Em geral a eficiência de encapsulação é utilizada como parâmetro de qualidade de micropartículas secas. No entanto a densidade, índice de Carr´s e índice de Hauser também podem ser utilizados (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011). A densidade de um produto em pó seco pode dar informações úteis para o armazenamento, pois produtos com densidade elevada podem ocupar menor espaço e requerem menores recipientes. Além disso, parâmetros como o índice de Carr´s e de Hauser fornecem informações sobre a fluidez do pó (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011). A Tabela 9 mostra os resultados para densidade aparente, densidade compactada, índice de Carr´s e índice de Hauser.

Tabela 9 - Resultados das características de fluidez da Zeína e da MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.

Amostra	d_{ap} (mg/mL)	d_{cp} (mg/mL)	I_{Carr}	I_{Hauser}
Zeína	0,255±0,011	0,283±0,008	9,894	1,110
MP-Zeína	0,132±0,001	0,149±0,001	11,472	1,130
MP-EDC	0,583±0,031	0,670±0,003	13,062	1,150
MP-Genipin	0,505±0,016	0,815±0,002	38,056	1,614

d_{ap} densidade aparente, d_{cp} densidade compactada, I_{Carr} índice de Carr´s e I_{Hauser} índice de Hauser.

De acordo com a classificação proposta por Turchiuli et al. (2005) (Tabela 10), a MP-Zeína e MP-EDC apresentam boa fluidez (entre 11 e 15) para o índice de Carr´s e de Hauser (1.12 e 1.18). Para a MP-Genipin os resultados mostram péssima fluidez. Diferente disso foram os resultados da zeína pura que apresentou excelente propriedade de fluidez. A densidade aparente e compactada da MP-Zeína teve um decréscimo no seu valor quando comparadas com a zeína pura. Isso pode ser atribuído ao processo de microencapsulação, onde o tamanho da partícula é reduzido e assim sua compactação torna-se mais fácil. Para as partículas reticuladas (MP-EDC e MP-Genipin) esses valores foram maiores, porém quando calculado o Índice de Carr´s e o Índice de Hauser a amostra de MP-EDC é classificada da mesma forma que a MP-Zeína. Já a MP-Genipin apresenta um valor elevado de densidade compactada e uma péssima fluidez. Podendo ocupar menor espaço no

armazenamento, porém, tendo possibilidade de dificuldades na manipulação do pó. As partículas preparadas no *spray-dryer* para o presente trabalho apresentaram maior compressibilidade. Um alto valor para o índice de Hauser indica que o pó apresenta maior coesão e dessa forma menor capacidade de fluir livremente. E são típicas de micropartículas secas em *spray-dryer*.

Tabela 10 - Classificação da fluidez de pós.

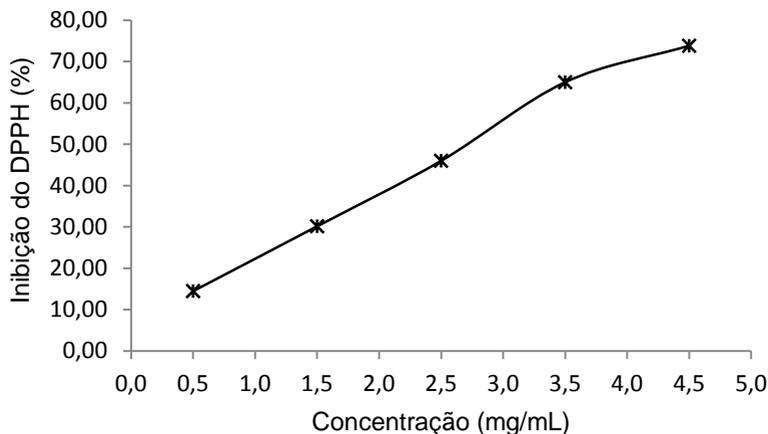
Índice de Carr's	Fluidez	Índice de Hauser
< 10	Excelente	1.00-1.11
11 – 15	Boa	1.12-1.18
16 – 20	Satisfatória	1.19-1.25
21 – 25	Razoável	1.26-1.34
26 – 31	Ruim	1.35-1.45
32 – 37	Muito Ruim	1.46-1.59
>38	Péssima	>1.60

Fonte: Turchiuli et al. (2005)

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O radical DPPH é muito utilizado para testar a capacidade de compostos ativos em desativar radicais livres e assim avaliar a atividade antioxidante do mesmo. Os resultados obtidos nos testes em 5 concentrações diferentes das micropartículas (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 mg de partículas por mL) foram usados para calcular o EC₅₀ que é a concentração necessária para inibir 50 % do radical DPPH. Uma curva das leituras foi obtida (Figura 18).

Figura 18 - Curva obtida para as leituras de inibição de DPPH em diferentes concentrações de MP-Zeína.

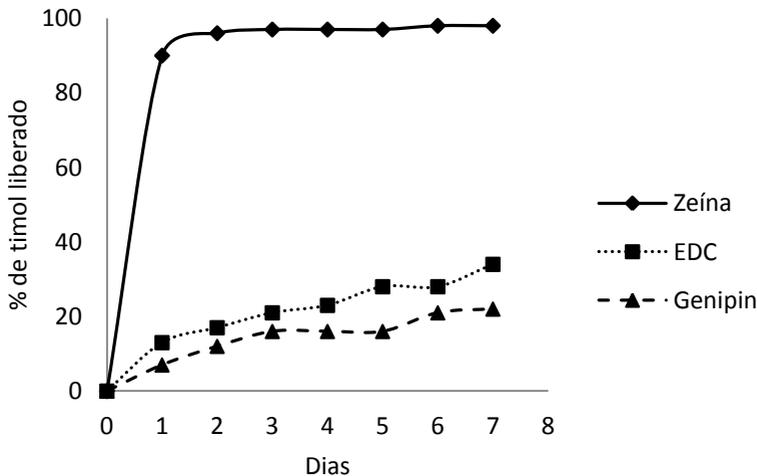


O valor para o EC_{50} dos resultados expostos na Figura 18 foi $2,30 \pm 0,15$ mg/mL. Esse resultado mostra que o processo de microencapsulação do timol na matriz de zeína não afetou sua característica antioxidante na amostra MP-Zeína. Para as partículas reticuladas a atividade antioxidante foi encontrada, porém, de uma forma não regular. Não sendo possível contruir uma curva e conseqüentemente não sendo calculado o valor de EC_{50} . Para a MP-EDC pode-se encontrar um valor de atividade antioxidante de 22% para uma concentração de 4,5 mg de partículas/mL e a MP-Genipin chegou a apresentar cerca de 90% de atividade antioxidante com uma concentração de aproximadamente 3 mg/mL. Porém, a não linearidade dos valores não permite apontar um valor exato dessa atividade, o que também pode ser atribuído ao forte aprisionamento do timol pela rede polimérica bem como eventual perda do ativo no processo de reticulação. Amiri et al. (2011), relataram que cerca de 0,1 mg/mL de timol e 0,3 mg/mL de carvacrol foram necessários para inativar 50 % do radical DPPH. Wu, Luo e Wang (2012) relataram inibição de 50% do DPPH em uma concentração de 0,67 mg/mL usando o método de dispersão líquido-líquido e liofilização. Levando em consideração o baixo teor de timol na formulação inicial das micropartículas (3,85% da massa de zeína) o resultado do EC_{50} $2,30 \pm 0,15$ mg/mL foi considerado satisfatório para o presente trabalho.

5.4 TESTE DE LIBERAÇÃO

A liberação do timol através da matriz de zeína para um meio externo foi avaliada. O teste foi realizado em meio tamponado de pH 7,4 utilizando sacos de diálise (XU; KHAN; BURGESS, 2012). Geralmente o processo de liberação do composto ativo ocorre pelo intumescimento da rede polimérica onde o meio aquoso penetra a rede polimérica levando a mesma a uma expansão, essa rede torna-se cada vez mais ampla permitindo a liberação do ativo para a fase externa até o equilíbrio termodinâmico. Com a descrição anterior a cinética de liberação do timol dependerá dos seguintes fenômenos, 1º Difusão em meio aquoso, 2º Cinética de relaxamento da macromolécula, 3º difusão do composto ativo através da rede polimérica entumescida (DEL NOBILE et al., 2008; MASTROMATTEO et al., 2009). A liberação foi testada para as amostras; MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin. A Figura 19 apresenta a liberação do timol em intervalos 0 a 7 dias.

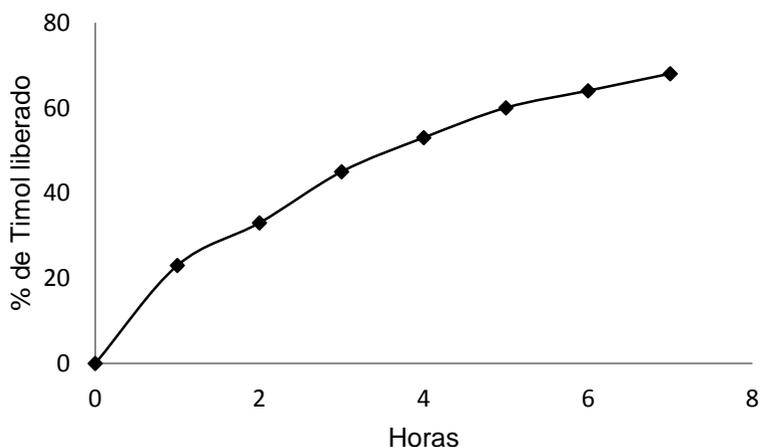
Figura 19 - Liberação do timol em intervalo de 0 a 7 dias para as amostras; MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.



Observa-se na Figura 19 que a liberação do timol na MP-Zeína é muito mais acentuada do que nas partículas reticuladas (MP-EDC e MP-Genipin) no primeiro dia ocorre uma fase inicial de liberação rápida seguida de uma fase mais lenta até o equilíbrio. Essa fase inicial de liberação mais rápida pode ser atribuída ao timol presente na superfície

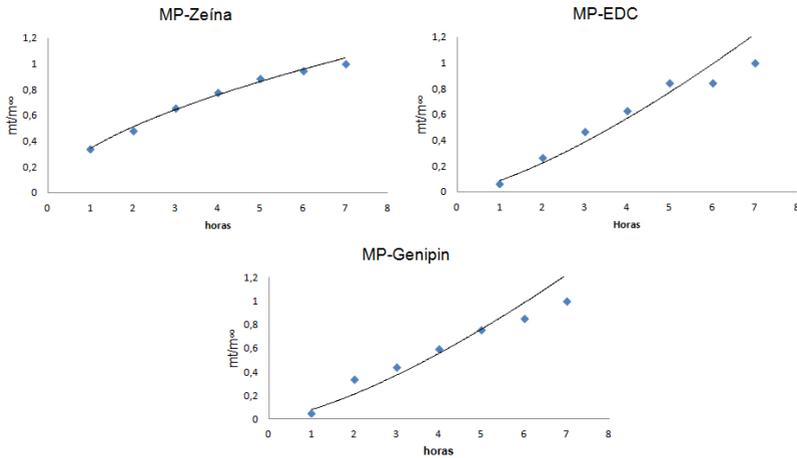
e mais próximo a superfície da micropartícula. Esse efeito pode ser denominado efeito *burst*. Nesse caso a liberação de cerca de 90% do timol presente na amostra MP-Zeína para o meio aconteceu no primeiro dia, seguido de um pequeno aumento nessa percentagem no segundo dia e posterior equilíbrio no decorrer dos outros dias. Para as partículas reticuladas essa liberação ocorreu em menor volume. Chegando a 34 % do timol liberado para o meio na MP-EDC e 22 % na MP-Genipin ao final do sétimo dia. A Figura 20 mostra a liberação para a MP-Zeína em um faixa de 0 a 7 horas. Nesse caso verifica-se que a liberação inicial não é tão acentuada e o efeito *burst* é atenuado. Isso pode ser atribuído ao baixo índice de timol superficial na amostra, ou seja, a liberação se dá pela difusão do timol do interior da matriz de zeína através do intumescimento da mesma.

Figura 20 - Percentagem de liberação do timol em função do tempo (horas) para as MP-Zeína.



A liberação ocorrida no presente trabalho pode ser descrita na segunda lei de Fick. A Figura 21 mostra o gráfico de difusão que expressa na razão entre o timol liberado em um determinado tempo em relação ao momento de equilíbrio (M_t/M_∞), de acordo com a segunda lei de Fick para as três amostras.

Figura 21 - Liberação do timol pela razão M_t/M_∞ em função do tempo para as MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.



Os dados de liberação foram tratados de acordo com a Equação 11 para cada uma das amostras;

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_a t^n \quad (11)$$

Onde, k_a e n são parâmetros do sistema e dependem tanto da natureza das interações entre o polímero, ativo e meio de liberação e da geometria do dispositivo de liberação, M_t é quantidade de ativo liberado em um tempo t e M_∞ é a quantidade de ativo liberado no ponto de equilíbrio (MASTROMATTEO et al., 2010). A Tabela 11 mostra os parâmetros para cada uma das amostras.

Tabela 11 - Parâmetros obtidos para a equação $M_t/M_\infty = k_a t^n$ para as amostras, MP-Zeína, MP-EDC e MP-Genipin.

Amostra	k_a	N	R^2
MP-Zeína	0,3421	0,573	0,9914
MP-EDC	0,0858	1,3641	0,9592
MP-Genipin	0,0792	1,4066	0,9186

O parâmetro n pode tomar uma série de valores que indicam o tipo de transporte envolvido na liberação. Quando o $n = 0,5$, o composto ativo é liberado por difusão Fickiana simples enquanto que se $n = 1,0$ é descrita como “Caso II difusão”. Neste último caso a absorção de solvente pelo polímero é em grande parte determinada pela taxa de expansão e relaxamento das cadeias do polímero. E o caso de “super transporte caso II” ocorre quando $n > 1,0$. Na região entre 0,5 e 1,0 o processo de difusão é uma combinação de difusão Fickiana e não-Fickiana e é conhecido como “difusão anômala”. Observando a Tabela 11 a liberação do timol pode ser classificada como “difusão anômala” para a MP-Zeína. As micropartículas reticuladas (MP-EDC e MP-Genipin) são classificadas como não-Fickiana. Dessa forma pode ser afirmado que a concentração do timol liberado para o meio aumenta em função do tempo pela difusão e com alguma influência da expansão da cadeia da zeína na MP-Zeína, sendo que, para a MP-EDC e MP-Genipin isso se dá com maior influência da expansão das cadeias do polímero apresentando maior resistência e menor taxa de liberação.

De Nobile e colaboradores (2008), encontraram resultados semelhantes para liberação do timol através de filmes de zeína, nesse estudo os autores relatam que tanto a difusão quanto o intumescimento da rede polimérica ocorrem mais rápido que a difusão do timol pela mesma. Os mesmos resultados são encontrados por Mastromatteo e colaboradores (2009) no estudo da liberação controlada do timol em filmes de zeína. Li et al., (2013) mostraram que o efeito *burst* aumenta significativamente quando a concentração do timol nas nanopartículas de zeína e caseinato de sódio, e classificaram a liberação em duas etapas, a primeira com uma rápida liberação, seguido por uma segunda etapa de liberação lenta.

6 CONCLUSÃO

Micropartículas de zeína carregadas com timol (MP-Zeína) foram obtidas e caracterizadas neste trabalho. Através da superfície de resposta pode-se concluir que a eficiência de encapsulação do composto ativo (timol) foi maior em níveis mais baixos de concentração do mesmo na formulação (3,85% de timol sobre a massa de zeína). Dessa forma com a redução da variável percentagem de timol obtém-se um aumento da eficiência a qualquer nível da variável temperatura. A morfologia revelou que as MP-Zeína apresentam formato esférico com pouca ou nenhuma presença de rugosidade ou fissuras o que é confirmado pela adsorção de nitrogênio que apresentou uma isoterma do Tipo II característico para sólidos não porosos. O tamanho médio dessas partículas ficou em 15,2 e 14,3 μm para as análises realizadas por MEV e por difração de feixe de *laser*, respectivamente. As análises termogravimétricas demonstraram que a matriz polimérica de zeína apresentou proteção ao composto ativo acima de sua temperatura de degradação (aproximadamente 200 °C) o que não apresentou diferença na micropartículas reticuladas. As interações zeína/timol não alteraram suas características, mantendo suas propriedades antioxidantes que foram testadas por inibição do radical DPPH, onde, 2,3 mg/mL de MP-Zeína foram suficientes para inibir 50% do radical. As amostras de MP-Zeína e MP-EDC apresentaram boa fluidez segundo a classificação do índice de Carr's e Hauser, já a amostra de MP-Genipin apresentou péssima fluidez, o que pode dificultar nos processos industriais dessa amostra. Os testes de liberação mostraram que a amostra não reticulada (MP-Zeína) apresenta uma “difusão anômala” sendo uma combinação da difusão Fickiana (onde a concentração do ativo aumenta em função do tempo) e não-Fickiana, já as reticuladas são classificadas como não-Fickianas e dependem mais da taxa de relaxamento das cadeias do polímero para a difusão do ativo para o meio. Esses resultados mostram que as micropartículas de zeína carregadas com timol podem ser otimizadas para uso em determinadas aplicações alimentícias e que apesar da reticulação não apresentar resultados satisfatórios para alguns aspectos, mostrou-se influente na taxa de liberação e na proteção contra a umidade reduzindo os sítios de ligação disponíveis para a água, diminuindo sua absorção. Dessa forma estudos devem ser prosseguidos para aprimorar esses aspectos.

REFERÊNCIAS

- AMIRI, H.; YAZDI, H. L.; DEHSHIRI, M.; EGHBALI, D.; MOHAMMADI, A.; ZAREI, A. Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. **Planta Medica**, v.77, pp.1294-1294, 2011.
- AYRANCI, E.; DUMAN, O. Moisture sorption isotherms of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and its protein isolate at 10, 20 and 30 °C. **Journal of Food Engineering**, v.70, p.83–91, 2005.
- AZEREDO, H.M.C. Encapsulation: applications to food technology. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.
- BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, v.19, p. 231–236, 2004.
- BERTELLI, D.; PLESSI, M.; MIGLIETTA, F. Effect of microwaves on volatile compounds in origanum. **LWT - Food Science and Technology**, v.36, p. 555-560, 2003.
- BRINGAS-LANTIGUA, M.; VALDE'S, D.; PINO, J. A. Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated lime essential oil. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1511–1517, 2012.
- BUTLER, M. F.; YIU-FAI, N. G.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups. **Journal of Polymer Science**. p.3941–3953, 2003.
- CADENAS, E.; PACKER, L. Handbook of Antioxidants. Edição 2° - revisada e expandida. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2002. 704 p.
- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273-335, 1998.

CHEN, H.; ZHONG, Q. Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, v.35, p.358-366, 2014.

CHEN, Y.; Y, R.; LI, X.; WANG, J. Preparation and characterization of extruded thermoplastic zein-poly(propylene carbonate) film. **Industrial Crops and Products**, v.49, p.81- 87, 2013.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v.138, p.414-420, 2013.

CHINTA, D. D.; GRAVES, R. A.; PAMUJULA, S.; PRAETORIUS, N.; BOSTANIAN, L. A.; MANDAL, T. K. Spray-dried chitosan as a direct compression tableting excipient. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, p.43-48, 2009.

COSTA, S. B. da.; DUARTE, C.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; SERRA, A. T.; MARTINS, M. M.; JANUÁRIO, M. I. N.; VICENTE, A. A.; DELGADILLO, I.; DUARTE, C.; COSTA, M. L. B. da. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated oregano essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 110 p. 190-199, 2012.

DEL NOBILE, M.A.; CONTE, A.; INCORONATO, A.L.; PANZA, O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. **Journal of Food Engineering**, v.89, p.57-63, 2008.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p.1361-1394, 2005.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.161 p.38-49, 2012.

FAYAD, S.J. **Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. 2010. 106 f. Dissertação. (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FENG, L., SONG, Y., ZHAI, J., LIU, B., XU, J., JIANG, L., ZHU, D. Creation of a superhydrophobic surface from an amphiphilic polymer. **Angewandte Chemie**, v. 115, n. 7, p. 824-826, 2003.

FUCHS, M.; TURCHIULI, C.; BOHIN, M.; CUVELIER, M.E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M.N.; DUMOULIN, E. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 27 – 35, 2006.

GALLARDO, G.; GUIDA, L.; MARTINEZ, V.; LÓPEZ, M.C.; BERNHARDT, D.; BLASCO, R.; PEDROZA-ISLAS, R.; HERMIDA, L.G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. **Food Research International**, v.52, p.473–482, 2013.

GARGIULO, N.; ATTIANESE, I.; BUONOCORE, G.G.; CAPUTO, D.; LAVORGNA, M.; MENSITIERI, G.; LAVORGNA, M. α -Tocopherol release from active polymer films loaded with functionalized SBA-15 mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 167, p. 10-15, 2013.

GERRARD, J. A. Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p.391–399, 2002.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; BENEY, L.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1713 – 1720, 2011.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v. 40 p. 1107–1121, 2007.

GOMEZ-ESTACA, J.; BALAGUER, M. P.; GAVARA, R.; HERNANDEZ-MUNOZ, P. Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 28 p.82 – 91, 2012.

GREGG, S.J.; SING, K.S.W.; Adsorption, Surface Area and Porosity. Academic Press; London, p 41, 1982.

HAN, J.H. New technologies in food packaging: overview. In: HAN, J.H. **Innovations in Food Packaging**. USA: Elsevier Science & Technology Books, 2005. Cap. 1, p. 03-11.

HUYNH, T.V.; CAFFIN, N.; DYKES, G.A.; BHANDARI, B. Lemon myrtle oil using response surface methodology. **Drying Technology**, v. 26, p.357–368, 2008.

JIN, J.; SONG, M.; HOURSTON, D. J. Novel Chitosan-Based Films Cross-Linked by Genipin with Improved Physical Properties. **Biomacromolecules**. p.162-168, 2004.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E.A.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.J.; CLEYMAND, F.; DESOBRY, S. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 380-389, 2012.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 449-458, 2008.

JORDÁN, M.J.; MARTÍNEZ, R.M.; GOODNER, K.L.; BALDWIN, E.A.; SOTOMAYOR, J.A. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. **Industrial Crops and Products**, v.24, p.253–263, 2006.

KHA, T. C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98 p. 385 – 392, 2010.

KIM, S.; SESSA, D.J.; LAWTON, J.W. Characterization of zein modified with a mild cross-linking agent. **Industrial Crops and Products**, v.20 p.291–300, 2004.

KOCIC-TANACKOV, S.; DIMIC, G.; TANACKOV, I.; PEJIN, D.; MOJOVIC, L.; PEJIN, J. The inhibitory effect of oregano extract on the

growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p.14-20, 2012.

LEUSCHNER, R.G.K.; WEAVER, A.C.; LILLFORD, P.J. Rapid particle size distribution analysis of *Bacillus* spore suspensions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.13, p.47–57, 1999.

LAOHASONGKRAM, K.; MAHAMAKTUDSANEE, T.; CHAIWANICHSIRI, S. Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. **Procedia – Food Science**, v. 1, p. 1660 – 1665, 2011.

LI, K.K.; YIN, S.W.; YIN, Y.C.; TANG, C.H.; YANG, X.Q.; WEN, X.H. Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. **Journal of Food Engineering**, v.119, p.343–352, 2013.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAU, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 304 – 310, 2010.

LINS, L. C. V. **Micropartículas Compostas de PHB/Cetoprofeno Recobertas com Quitosana Reticulada: Obtenção e Estudo da Liberação Controlada do Fármaco**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina 2012. Disponível em: <<http://www.tese.ufsc.br/teses/PCEM0290-D.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2013.

LIN, Y.; JAIN, R.; YAN, Y. Microbial production of antioxidant food ingredients via metabolic engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v.26, p.71–78, 2014.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1–21, 2006.

MASTROMATTEO, M.; BARBUZZI, G.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M.A. Controlled release of thymol from zein based film. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p. 222–227, 2009.

MASTROMATTEO, M.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M.A. Advances in controlled release devices for food packaging applications – Review. **Trends in Food Science & Technology** v.21, p.591-598, 2010.

MATALANIS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1865-1880, 2011.

MATSUNO, R.; ADACHI, S. Lipid encapsulation technology – techniques and applications to food. **Trends in Food Science & Technology**, v.4 p. 256–261, 1993.

MICROMERITICS. **TriStar II 3020 Technique Overview** - utilizes the static adsorption technique. Disponível em: <<http://www.micromeritics.com/Product-Showcase/TriStar-II-Series/TriStar-II-3020-Technique-Overview.aspx>> acesso em: 27/12/2013 as 19h28min.

MOUGHAL, K.I.; MUNRO, P.A.; SINGH, H. Suspension stability and size distribution of particles in reconstituted, commercial calcium caseinates. **International Dairy Journal**, v.10 p.683-690, 2000.

MOZAFARI, M.R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; SUNTRES, Z.E.; SINGH, H.J. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 86, p. 2038-2045, 2006.

MÜLLER, P. S. Microencapsulação do óleo essencial de laranja. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 99 f. Curitiba, 2011.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; dos SANTOS T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15 p.127-130, 2001.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, F.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1 p. 1806 – 1815, 2011.

NEVES, D. P. Estudo farmacológico do timol e carvacrol sobre a contratilidade da aorta isolada de rato. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará. 94 f. Fortaleza, Ceará, 2009.

NIJDAM, J.J.; LANGRISH, T.A.J. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v.77, p.919–925, 2006.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230 p.191–195, 2004.

OCAÑA-FUENTES, A.; ARRANZ-GUTIÉRREZ, E.; SEÑORANS, F.J.; REGLERO, G. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.1568–1575, 2010.

PARRIS, N.; COOKE, P.H.; HICKS, K.B. Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4788–4792, 2005.

PÉREZ-ALONSO, C.; BÁEZ-GONZÁLEZ, J.G.; BERISTAIN, C.I.; VERNON-CARTER, E.J.; VIZCARRA-MENDOZA, M.G. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 53 p. 197–203, 2003.

POTHAKAMURY, U. R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p.397–406, 1995.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M.D.A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1880 – 1887, 2011.

RAMEZANI, V.; VATANARA, A.; NAJAFABADI, A.R.; GILANI, K.; NABI-MEYBODI, M. Screening and evaluation of variables in the formation of antibody particles by spray drying. **Powder Technology**, v. 233, p. 341-346, 2013.

RAMOS, M.; JIMENEZ, A.; PELTZER, M.; GARRIGOS, M.C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v.109 p.513–519, 2012.

RODEA-GONZÁLEZ, D. A.; CRUZ-OLIVARES, J.; ROMÁN-GUERRERO, A.; RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; VERNON-CARTER, E. J.; PÉREZ-ALONSO, C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica L.*) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 111 p.102-109, 2012.

SELLING, G.; SESSA, D.J. Multivalent carboxylic acids to modify the properties of zein. **Industrial Crops and Products**, v.25, p.63–69, 2007.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 112, p. 930-940, 2010.

SHIRAI, M.A.; OLIVATO, J.B.; GARCIA, P.S.; MÜLLER, C.M.O.; GROSSMANN, M.V.E.; YAMASHITA, F. Thermoplastic starch/polyester films: Effects of extrusion process and poly (lactic acid) addition. **Materials Science and Engineering C**, v.33, p.4112–4117, 2013.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v.13 p.171–192, 2001.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo – SP. Varela, 1996. P. 187 - 203.

SOARES, F.C.; YAMASHITA, F.; MÜLLER, C.M.O.; PIRES, A.T.N. Effect of cooling and coating on thermoplastic starch/poly (lactic acid) blend sheets. **Polymer Testing**, v.33, p.34–39, 2014.

SUNG, W. H.; CHANG, Y.; LIANG, I. L.; CHANG, W. H.; CHEN, Y. C. Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration. **Journal Biomedical Materials Research**. p.77-87, 2000.

TEIXEIRA, V.G.; COUTINHO, F.M.B.; GOMES, A.S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química. Nova**, v. 24, n° 6, p.808-818, 2001.

TOMIHATA, K.; BURCZAK, K.; SHIRAKI, K.; IKADA, Y. Cross-linking and biodegradation of native and denatured collagen. **Polymers of Biological and Biomedical Significance**, v.24, p.275-286, 1993.

TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUBINGER, M.D. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. **Food Research International**, v.44 p.282–289, 2011.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Thermodynamic properties and moisture adsorption isotherms of cotton seed protein isolate and different forms of cotton seed samples. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.133–143, 2007.

TURCHIULI, C.; FUCHS, M.; BOHIN, M.; CUVELIER, M.E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M.N.; DUMOULIN, E. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6 p.29– 35, 2005.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. Critical reviews. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquidliquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v.48, p.283-290, 2012.

XU, W.; KARST, D.; YANG, W.; YANG, Y. Novel zein-based electrospun fibers with the water stability and strength necessary for various applications. **Polymer International**, v.57 p. 1110 – 1117, 2008.

XU, X.; KHAN, M.A.; BURGESS, D.J. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v.426, p. 211– 218, 2012.

YEN, M-T.; YANG, J-H.; MAU, J-L. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 840-844, 2008.