

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MICROENCAPSULAÇÃO DO CORANTE NATURAL ANTOCIANINA
EM MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA E
QUITOSANA/ALGINATO ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE
IMPREGNAÇÃO, COACERVAÇÃO E SPRAY DRYING**

BETHÂNIA LUIZA HORST

Florianópolis – SC

2009

BETHÂNIA LUIZA HORST

**MICROENCAPSULAÇÃO DO CORANTE NATURAL ANTOCIANINA
EM MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA E
QUITOSANA/ALGINATO ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE
IMPREGNAÇÃO, COACERVAÇÃO E SPRAY DRYING**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Florianópolis – SC

2009

BETHÂNIA LUIZA HORST

**MICROENCAPSULAÇÃO DO CORANTE NATURAL ANTOCIANINA EM MATRIZ
POLIMÉRICA DE QUITOSANA E QUITOSANA/ALGINATO ATRAVÉS DAS
TÉCNICAS DE IMPREGNAÇÃO, COACERVAÇÃO E SPRAY DRYING**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de
**Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em
Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
QMC – UFSC

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Tereza C. R. de Souza
Orientadora
QMC – UFSC

Prof^a. Dra. Vera L. A. Frescura
QMC - UFSC

Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira
QMC – UFSC

Prof^a. Dra. Maria Marta de S. Sierra
QMC - UFSC

Dedico este trabalho à minha “pequena-grande” menina, à minha princesa, **à minha filha Júlia**, que torna os meus dias mais cheios de sol e alegria e que faz tudo, **absolutamente tudo**, valer à pena!!

Agradecimentos

À Deus.

À minha filha Júlia Karolina por ser minha parceira, amiga, o motivo da minha luta, a pessoa que mais me cuida e sem dúvida o maior e mais sincero amor da minha vida!

À toda minha família, em especial minha mãe Leontina e minha irmã Lenir, pelo carinho, amor, apoio nos momentos em que estive distante e por me darem forças para continuar mesmo nos momentos mais difíceis.

À todos os colegas do laboratório QUITTECH, em especial, Carol, Fran, Elaine, Denice, Loreana, Georgia, Alexandre C., Rogério, Luciano e Alexandre por todo o apoio, amizade e compreensão.

Em especial ao Xande por todo o auxílio, amizade, apoio e paciência tanto dentro do laboratório quanto e principalmente fora dele.

À professora Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza pela orientação e apoio.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Aos(as) professores(as), Dra. Maria M. S. Sierra, Dr. Mauro C. M. Laranjeira e Dra. Vera L. A. Frescura, por aceitar gentilmente o convite para participar da banca examinadora.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE EQUAÇÕES.....	xv
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS e ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 CORANTE NATURAL ANTOCIANINA.....	22
2.2 MICROENCAPSULAÇÃO.....	26
2.3 QUITOSANA.....	31
2.4 ALGINATO DE SÓDIO.....	32
2.5 LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAIS e MÉTODOS.....	38
4.1 MATERIAIS.....	38
4.2 METODOLOGIA.....	38
4.2.1 Espectro eletrônico UV-Visível para o corante antocianina.....	38
4.2.2 Preparação das microesferas de quitosana.....	38
4.2.3 Impregnação das microesferas de quitosana com antocianina.....	39
4.2.4 Preparação das microesferas de quitosana/alginato.....	39

4.2.5	Efeito do pH na adsorção do corante antocianina em microesferas de quitosana/alginato.....	39
4.2.6	Cinética de adsorção do corante antocianina em microesferas de quitosana/alginato.....	40
4.2.7	Isotermas de adsorção do corante antocianina em microesferas de quitosana/alginato.....	41
4.2.8	Impregnação das microesferas de quitosana/alginato com antocianina.....	41
4.2.9	Microencapsulação do corante antocianina pelo método de coacervação.....	41
4.2.10	Microencapsulação do corante antocianina pela técnica de spray drying.....	42
4.2.11	Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	43
4.2.12	Morfologia das microesferas.....	43
4.2.13	Análise Termogravimétrica (TGA).....	43
4.2.14	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	43
4.2.15	Estudos de liberação do corante em função do pH.....	44
4.2.16	Determinação do grau de intumescimento (%GI).....	44
4.2.17	Determinação da quantidade de corante encapsulado.....	45
4.2.18	Dissolução das micropartículas de quitosana e quitosana/alginato obtidas através da técnica de spray drying.....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Espectro UV-Visível para o corante antocianina.....	47
5.2	Microencapsulação do corante natural antocianina.....	48
5.2.1	Impregnação do corante antocianina em matriz polimérica de quitosana.....	48
5.2.1.1	Análise da morfologia das microesferas de quitosana impregnadas utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49

5.2.1.2	Caracterização das microesferas de quitosana impregnadas por Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	51
5.2.1.3	Análise Termogravimétrica (TGA) das microesferas de quitosana impregnadas.....	53
5.2.1.4	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das microesferas de quitosana impregnadas.....	55
5.2.1.5	Determinação do grau de intumescimento (%GI) das microesferas de quitosana impregnadas.....	56
5.2.1.6	Estudos de liberação do corante natural antocianina a partir de microesferas de quitosana.....	57
5.2.1.7	Análise do mecanismo de liberação para o corante antocianina a partir das microesferas de quitosana.....	59
5.2.2	Estudos de adsorção do corante natural antocianina em microesferas de quitosana/alginato.....	61
5.2.2.1	Dependência do pH na adsorção do corante.....	61
5.2.2.2	Cinética de adsorção do corante antocianina.....	62
5.2.2.3	Isoterma de adsorção do corante antocianina.....	64
5.2.3	Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana/alginato por meio das técnicas de impregnação e coacervação.....	66
5.2.3.1	Caracterização das microesferas de quitosana/alginato com e sem corante por Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	66
5.2.3.2	Análise da morfologia das microesferas de quitosana/alginato com e sem corante utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	68
5.2.3.3	Análise Termogravimétrica (TGA) de microesferas de quitosana/alginato contendo o corante antocianina.....	70
5.2.3.4	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) de microesferas de quitosana/alginato contendo o corante antocianina.....	72

5.2.3.5	Determinação do grau de intumescimento (%GI) das microesferas de quitosana/alginato contendo o corante antocianina	74
5.2.3.6	Estudos de liberação do corante natural antocianina a partir de microesferas de quitosana/alginato.....	75
5.2.3.7	Análise do mecanismo de liberação para o corante antocianina a partir das microesferas de quitosana/alginato.....	78
5.2.4	Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginato através da técnica de spray drying.....	79
5.2.4.1	Otimização da temperatura de secagem na atomização das microesferas de quitosana e de quitosana/alginato.....	80
5.2.4.2	Caracterização das microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas através da técnica de spray drying por Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	82
5.2.4.3	Análise da morfologia das microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas por spray drying utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	84
5.2.4.4	Análise Termogravimétrica (TGA) de microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas por spray drying.....	85
5.2.4.5	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) de microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas por spray drying.....	88
5.2.4.6	Estudos de dissolução das microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas através da técnica de spray drying.....	89
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do íon flavílio característico das antocianinas. Onde R1 e R2 são H, OH, ou OCH ₃ ; R3 é um glicosil ou H; e R4 é OH ou um glicosil	23
Figura 2.	Formas químicas de antocianinas dependendo do pH da solução e reação de degradação para antocianinas, onde: R1 = H ou sacarídeo, R2 e R3 = H ou metil.....	25
Figura 3.	Estruturas químicas da quitina (a) e quitosana (b)	32
Figura 4.	Estrutura química do alginato de sódio	33
Figura 5.	Mecanismos de liberação controlada de ingredientes encapsulados.....	34
Figura 6.	Espectro eletrônico UV-Visível para o corante antocianina obtido em solução aquosa, pH 2,0.....	47
Figura 7.	Microscopia eletrônica de varredura: a) microesfera de quitosana impregnada em ácido sulfúrico, b) microesfera de quitosana impregnada em ácido sulfúrico - corte, c) microesfera de quitosana impregnada em sulfato de sódio e d) microesfera de quitosana impregnada em sulfato de sódio – corte.....	49
Figura 8.	Microscopia eletrônica de varredura: a) microesfera de quitosana, b) microesfera de quitosana – corte, c) microesfera de quitosana – superfície, d) microesfera de quitosana impregnada, e) microesfera de quitosana impregnada – corte, f) microesfera de quitosana impregnada – superfície.....	50
Figura 9.	Espectro de infravermelho: a) quitosana, b) microesferas de quitosana impregnadas e c) corante natural antocianina.....	52
Figura 10.	Análise termogravimétrica (TGA): a) quitosana, b) corante natural antocianina, c) microesfera de quitosana impregnada.....	54
Figura 11.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC): a) quitosana, b) microesfera de quitosana impregnada e c) corante natural antocianina.....	55

- Figura 12. Perfil de liberação do corante antocianina para as microesferas de quitosana impregnadas em pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0, a 25°C..... 58
- Figura 13. Dependência do pH para a adsorção do corante antocianina, utilizando microesferas de quitosana/alginato, $T = 25 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $C_o = 400 \text{ mg L}^{-1}$, tempo de contato = 2 horas..... 62
- Figura 14. Cinética de adsorção do corante antocianina: (■) pH 2,0; $T = 25 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $C_o = 1200 \text{ mg.L}^{-1}$, tempo de contato = 24 horas..... 63
- Figura 15. Isoterma de adsorção do corante natural antocianina a $T = 25 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$, pH = 2,0 e tempo de contato de 6h..... 65
- Figura 16. Espectro de infravermelho: a) quitosana, b) alginato de sódio, c) microesfera de quitosana/alginato, d) microesfera de quitosana/alginato impregnada, e) microesfera de quitosana/alginato coacervada e f) corante natural antocianina..... 67
- Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura: a) microesfera de quitosana/alginato, b) microesfera de quitosana/alginato – corte, c) microesfera de quitosana/alginato – superfície, d) microesfera de quitosana/alginato impregnada, e) microesfera de quitosana/alginato impregnada – corte, f) microesfera de quitosana/alginato impregnada – superfície, g) microesfera de quitosana/alginato coacervada, h) microesfera de quitosana/alginato coacervada – corte e i) microesfera de quitosana/alginato coacervada – superfície..... 69
- Figura 18. Análise termogravimétrica (TGA): a) quitosana, b) alginato de sódio, c) corante natural antocianina, d) microesfera de quitosana/alginato impregnada, e) microesfera de quitosana/alginato coacervada e f) microesfera de quitosana/alginato..... 71
- Figura 19. Calorimetria diferencial de varredura (DSC): a) quitosana, b) microesfera de quitosana/alginato, c) alginato de sódio, d) microesfera de quitosana/alginato impregnada com corante antocianina, e) microesfera de quitosana/alginato coacervada e f) 73

	corante natural antocianina.....	
Figura 20.	Perfil de liberação do corante antocianina para as microesferas de quitosana/alginato impregnadas, a 25°C, em pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0.....	76
Figura 21.	Perfil de liberação do corante antocianina para as microesferas de quitosana/alginato coacervadas, a 25°C, em pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0.....	77
Figura 22.	Microscopia eletrônica de varredura: microesferas de quitosana atomizadas à temperatura de a) 120 °C, b) 140 °C, c) 160 °C e d) 180 °C e microesferas de quitosana/alginato atomiza das à temperatura de e) 120 °C, f) 140 °C, g) 160 °C e h) 180 °C.....	81
Figura 23.	Espectro de infravermelho: a) quitosana, b) alginato de sódio, c) microesfera de quitosana contendo o corante, d) microesfera de quitosana/alginato contendo o corante e e) corante natural antocianina.....	83
Figura 24.	Microscopia eletrônica de varredura: a) microesferas de quitosana contendo corante atomizadas e b) microesferas de quitosana/alginato contendo corante atomizadas.....	85
Figura 25.	Análise termogravimétrica (TGA): a) quitosana, b) alginato de sódio, c) corante natural antocianina, d) microesfera de quitosana e e) microesfera de quitosana/alginato.....	86
Figura 26.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC): a) quitosana, b) alginato de sódio, c) microesfera de quitosana, d) microesfera de quitosana/alginato e e) corante natural antocianina.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estágios de perda de massa obtidos através de análise termogravimétrica (TGA) da quitosana, do corante antocianina e das microesferas de quitosana impregnadas.....	54
Tabela 2.	Grau de intumescimento das microesferas de quitosana impregnadas	57
Tabela 3.	Tempo necessário para liberação de 50% do corante a partir de microesferas de quitosana impregnadas.....	59
Tabela 4.	Coeficiente difusional n para a liberação do corante antocianina a partir de microesferas de quitosana impregnadas.....	60
Tabela 5.	Estágios de perda de massa obtidos através de análise termogravimétrica (TGA) da quitosana, do alginato de sódio, do corante antocianina, das microesferas de quitosana/alginato impregnadas e das microesferas de quitosana/alginato coacervadas.....	72
Tabela 6.	Grau de intumescimento das microesferas de quitosana/alginato impregnadas e das microesferas de quitosana/alginato coacervadas.....	75
Tabela 7.	Tempo necessário para liberação de 50% do corante a partir de microesferas de quitosana/alginato impregnadas e coacervadas.....	78
Tabela 8.	Coeficiente difusional n para a liberação do corante antocianina a partir de microesferas de quitosana/alginato impregnadas e microesferas de quitosana/alginato coacervadas.....	79
Tabela 9.	Quantidade de corante antocianina incorporado nas microesferas de quitosana e quitosana/alginato preparadas através do método de spray drying.....	82
Tabela 10.	Estágios de perda de massa obtidos através de análise termogravimétrica (TGA) da quitosana, do alginato de sódio, do	

corante antocianina, das microesferas de quitosana e das microesferas de quitosana/alginato preparadas através da técnica de spray drying.....	87
--	----

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.	Determinação da quantidade de corante adsorvido nas microesferas.....	40
Equação 2.	Determinação do Grau de Intumescimento (%GI).....	45
Equação 3.	Equação para analisar o processo de liberação de solutos a partir de matriz polimérica.....	59
Equação 4.	Equação da cinética de pseudo-primeira ordem.....	63
Equação 5.	Equação da cinética de pseudo-segunda ordem.....	63
Equação 6.	Equação do modelo cinético de difusão intrapartícula.....	64
Equação 7.	Isoterma de Langmuir.....	65
Equação 8.	Linearização da isoterma de Langmuir.....	65

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS e ABREVIATURAS

%GI	Grau de intumescimento
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo de absorção (nm)
ALG	Alginato de sódio
C_e	Concentração de corante em equilíbrio na solução (mg L^{-1})
C_o	Concentração inicial de corante na solução (mg L^{-1})
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
IV	Espectroscopia de infravermelho
K_{ads}	Constante de Langmuir (L mg^{-1})
k'	Constante relatada para as propriedades do sistema de liberação
k	Constante de velocidade do modelo de difusão intrapartícula
k_1	Constante de velocidade de adsorção de pseudo-primeira ordem (min^{-1})
k_2	Constante de velocidade de adsorção de pseudo-segunda ordem ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)
M	Unidade de concentração: Molaridade (mol L^{-1})
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M_t	Quantidade de corante liberado no tempo t (mg L^{-1})
M_f	Quantidade de corante total liberado (mg L^{-1})
n	Coeficiente utilizado para propor o mecanismo de liberação de solutos a partir de matriz polimérica
NL/h	Unidade de fluxo do spray (normlitros/hora)
q	Quantidade de corante adsorvido no polímero (mg g^{-1})
q_e	Quantidade de corante adsorvida no equilíbrio (mg g^{-1})
q_t	Quantidade de corante adsorvido com o tempo (mg g^{-1})
q_m	Capacidade máxima de adsorção (mg g^{-1})

QTS	Quitosana
QTS/ALG	Quitosana/alginato
T	Temperatura (°C)
TGA	Análise termogravimétrica
V	Volume (L)
W	Massa de microesferas (mg)
W ₀	Massa das microesferas no tempo zero (estado seco) no estudo do grau de intumescimento
W _t	Massa das microesferas no tempo t no estudo do grau de intumescimento

RESUMO

Este estudo investiga o potencial das matrizes poliméricas de quitosana e quitosana/alginato como agentes encapsulantes para o corante natural antocianina. O corante foi microencapsulado em matriz polimérica de quitosana através das técnicas de impregnação e spray drying e em matriz polimérica de quitosana/alginato através das técnicas de impregnação, coacervação e spray drying. Os produtos resultantes da microencapsulação do corante foram caracterizados por: IV, TGA, DSC e MEV sendo que, tais técnicas comprovaram a eficiência dos métodos empregados no preparo das amostras. As análises de IV e DSC para as amostras de quitosana e quitosana/alginato contendo antocianina sugerem a presença de interações entre corante e matriz polimérica. Análises de MEV revelam que as amostras microencapsuladas apresentaram-se sem poros ou fissuras aparentes, garantindo desta forma, a preservação das características do corante. No estudo de microencapsulação, pela técnica de spray drying, observou-se a influência da temperatura de secagem na produção das amostras, sendo escolhida a temperatura de 160 °C para a produção das partículas. As amostras produzidas por spray drying consistem em pós coloridos e bastante solúveis em água sendo observado o tempo de dissolução total em torno de dez (10) minutos. Após análise morfológica das partículas produzidas através desta técnica, foram determinados os parâmetros de atomização. Para a impregnação do corante em microesferas de quitosana/alginato foi feito inicialmente um estudo de adsorção do corante o qual revelou o pH 2,0, como o melhor pH para a adsorção. Observou-se através deste estudo, que o equilíbrio de adsorção foi atingido em torno de seis horas, sendo a isoterma obtida interpretada pela isoterma de Langmuir ($q_m = 123,61 \text{ mg g}^{-1}$). Por meio do estudo de liberação do corante na faixa de pH 1,0 a 5,0, pode-se observar que a amostra de quitosana impregnada liberou mais rapidamente o corante em pH 1,0, sendo o mecanismo de liberação do tipo não-Fickiano ou anômalo. Para as microesferas de quitosana/alginato impregnadas e coacervadas a liberação foi mais rápida em pH 5,0 e o mecanismo de liberação foi dependente do pH. Para as microesferas impregnadas o mecanismo determinado foi do tipo não-Fickiano ou anômalo em pH 1,0 e 2,0 e do tipo Fickiano ou “Caso I” em pH 3,0, 4,0 e 5,0. Para as microesferas coacervadas o mecanismo foi do tipo não-Fickiano ou anômalo em pH 1,0, 2,0 e 4,0 e do tipo Super Caso II de transporte em pH 3,0 e 5,0.

ABSTRACT

This study investigates the potential of the polymeric matrices of chitosan and chitosan/alginate as encapsulating agents for the natural anthocyanin dye. The dye was microencapsulated in polymeric matrix of chitosan through the impregnation and spray drying techniques and in polymeric matrix of chitosan/alginate through the impregnation, coacervation and spray drying techniques. The resultant products of the microencapsulation of the dye were characterized by: IR, TGA, DSC and SEM being that, such techniques had proven the efficiency of the methods used in the microencapsulation procedures. The DSC and IR analyses for the samples of chitosan and chitosan/alginate containing anthocyanin suggest the presence of interactions between dye and polymeric matrix. Analyses of SEM disclose that the microencapsulated samples had not presented pores or apparent cracks, guaranteeing in such a way, the preservation of the characteristics of the dye. In the microencapsulation study, using spray drying technique, it was observed the influence of the temperature of drying in the production of the samples, being chosen the temperature of 160 °C for the production of particles. The samples produced for spray-drying consist of coloured powder and sufficiently soluble in water being observed the time of total dissolution around ten (10) minutes. For the impregnation of the dye in microspheres of chitosan/alginate a study of adsorption of the dye was made initially which disclosed pH 2.0, as optimum pH for the adsorption. It was observed through this study, that the adsorption balance was reached around six hours, having been the obtained isotherm interpreted by the isotherm of Langmuir ($q_m = 123.61 \text{ mg g}^{-1}$). Through controlled release of the dye in acid medium, with the pH range of 1.0 for 5.0, it can be observed that the sample of impregnated chitosan more quickly liberated the dye in pH 1.0, being the release mechanism of the non-Fickian or anomalous type. For the microspheres of chitosan/alginate impregnated and coacervated the release she was faster in pH 5.0 and the release mechanism was dependent of pH. For the impregnated microspheres the definitive mechanism was of the non-Fickian or anomalous type in pH 1.0 and 2.0 and of the Fickian type or "Case I" in pH 3.0, 4.0 and 5.0. For the coacervated microspheres the mechanism was of the non-Fickian or anomalous type in pH 1.0, 2.0 and 4.0 and of Super Case II of transport in pH 3.0 and 5.0.

1. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A cor, possivelmente mais que qualquer outro fator, influencia significativamente a aceitabilidade do produto. Geralmente, ela afeta o julgamento, sendo utilizada como forte indicador de qualidade; portanto, o desenvolvimento de produtos de aparência atrativa é importante para a indústria de alimentos. Entretanto, recentemente, os corantes artificiais têm sido questionados por certos segmentos da população, e esta tendência, aliada à publicidade contínua e adversa, tem aumentado o interesse pelos corantes de origem natural. A adição de corantes naturais para dar cor a alimentos processados pode ser desejável, por não apresentar efeitos tóxicos e por eventuais efeitos terapêuticos.

Com a finalidade de tornar os corantes naturais mais competitivos, observa-se nas últimas décadas, que as pesquisas estão direcionadas desde à descoberta de novos pigmentos até ao estudo da estabilidade e aplicabilidade destes pigmentos em alimentos industrializados. A utilização dos corantes naturais requer o conhecimento químico de suas moléculas para adaptá-las às condições de uso em processos, embalagens e distribuição.

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

Dentre os corantes naturais conhecidos, as antocianinas apresentam grande destaque, sendo utilizadas na coloração de alimentos e bebidas. As antocianinas têm um alto potencial para uso como corante natural devido as suas cores atrativas. São não-tóxicas e não mutagênicas, com propriedades farmacológicas bem conhecidas e que contribuem para seu uso terapêutico.

Entretanto, o uso deste corante torna-se limitado devido a sua estabilidade, que é afetada frente a fatores como concentração e estrutura química, pH, luz, temperatura durante o processamento e estocagem, presença de oxigênio, degradação enzimática, e interação com outros componentes presentes em alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos.

Assim, a fim de aumentar as fontes de corantes naturais aplicáveis em alimentos industrializados, este trabalho tem como objetivo a microencapsulação do corante natural antocianina, obtido da casca da uva, utilizando os biopolímeros quitosana e alginato de sódio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CORANTE NATURAL ANTOCIANINA

As antocianinas (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) compreendem um vasto grupo de pigmentos naturais, intensamente coloridos, responsáveis pelas cores laranja, vermelho, roxo e azul de muitas frutas, vegetais, flores, folhas, raízes e outras partes das plantas. São solúveis em água, o que facilita sua incorporação em sistemas alimentícios aquosos, e em misturas de água e álcool, porém insolúveis em óleos e gorduras ^[1] e têm sido consumidas por séculos sem efeitos adversos ^[2].

Além dos atributos de cor, o interesse pelas antocianinas se intensificou por causa de seus possíveis benefícios à saúde. Os benefícios associados ao consumo de extratos de antocianina incluem a capacidade antioxidante ^[3-6], o tratamento de várias desordens da circulação sanguínea resultantes da fragilidade capilar ^[3], as propriedades vaso-protetoras e anti-inflamatórias ^[3,7], a inibição da agregação de plaquetas ^[3], o controle de diabetes, o uso como agente antineoplásico e quimioprotetores ^[8] e possivelmente outros, devido a sua ação diversa nas várias enzimas e nos processos metabólicos ^[3]. Estas propriedades fazem das antocianinas uma alternativa atrativa ao uso dos corantes sintéticos.

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonóides e são derivados poliídros e/ou polimetóxi glicosilados do cátion 2-fenilbenzopirílio, conhecido como cátion flavílio, que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio. A molécula de antocianina (Figura 1) é constituída por duas ou três porções: uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, freqüentemente, um grupo de ácidos orgânicos ^[9,10]. As antocianinas diferem de outros flavonóides naturais pela variação de cores que podem apresentar e pela habilidade de formar estruturas de ressonância por variação de pH ^[11].

O núcleo flavílio da antocianina é deficiente em elétrons e, portanto, altamente reativo. A sua reação geralmente envolve descoloração do pigmento, sendo, portanto, indesejável no processamento de frutas e vegetais ^[1].

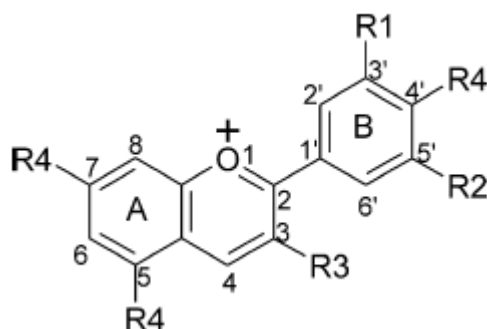


Figura 1 – Estrutura do íon flavílio característico das antocianinas. Onde R1 e R2 são H, OH, ou OCH₃; R3 é um glicosil ou H; e R4 é OH ou um glicosil.

Antocianidinas livres são raramente encontradas em plantas, ocorrendo comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula ^[12]. A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior freqüência na posição 3. O segundo açúcar quando presente na molécula encontra-se na posição 5, porém podem ocorrer glicosilações nas posições 7, 3', 4' e 5' ^[13,14] e os açúcares mais encontrados nas substituições são D-glicose, L-ramnose, D-galactose, D-xilose e arabinose. Muitas vezes, os açúcares das antocianinas podem se encontrar acilados com ácidos aromáticos incluindo os ácidos p-cumárico, cafeico, ferrúlico, sinápico, gálico ou p-hidroxibenzóico, e/ou com ácidos alifáticos tais como ácido malônico, acético, málico, succínico ou oxálico. Os substituintes acila encontram-se usualmente ligados a hidroxila do açúcar na posição 3 e com menor freqüência nas posições 4 e 6. A metoxilação é mais freqüente nas posições 3' e 5' e menos comum na 5 e na 7 ^[2].

As diferenças entre as diversas antocianinas existentes relacionam-se ao número de grupos hidroxil e metoxil na estrutura, a natureza e o número de açúcares ligados à molécula, a posição destas ligações e a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares na molécula ^[3]. Em geral, um aumento no número de açúcares substituintes é acompanhado por um incremento na absorvidade molar visível do cátion flavílio, quando comparado com moléculas mono e diglicosiladas ^[2], sendo observado também que a estabilidade das antocianinas aumenta com o número de grupos metoxil presentes no anel B e diminui como o aumento do número de grupos hidroxil ^[15].

Em relação à estabilidade, as antocianinas são compostos que podem sofrer reações que alteram sua estrutura sobre a ação de diferentes agentes devido à

deficiência eletrônica de seu núcleo flavílio ^[15].

O pH é um fator de grande importância na coloração e na estabilidade das antocianinas. Sua utilização é restrita pela baixa estabilidade em meio aquoso e pH acima de 2,0, condições bastante comuns durante o processamento e estocagem dos alimentos. Em soluções ácidas, a antocianina é vermelha, mas com o aumento do pH a intensidade da cor diminui. Em solução alcalina, a cor azul é obtida, sendo, porém instável. Além do pH, existem outros fatores de grande importância na estabilidade das antocianinas como a estrutura química e concentração, a temperatura, a luz, a presença de oxigênio, a degradação enzimática e as interações com outros componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos ^[9].

As antocianinas são rapidamente destruídas pelo aquecimento durante o processamento e estocagem de alimentos ^[16]. A degradação térmica leva a formação de produtos marrons, especialmente na presença de oxigênio. O oxigênio ou agentes oxidantes encontrados em alimentos e plantas podem acelerar a degradação das antocianinas ^[17].

A luz é essencial para a biosíntese das antocianinas, mas também acelera sua degradação ^[14], elas são geralmente instáveis quando expostas à luz ultravioleta e visível, ou outras fontes de radiação ionizante ^[15].

As antocianinas podem ser encontradas em diferentes formas químicas que dependem do pH da solução (Figura 2) ^[2, 7, 16, 18]. Em pH 1, o cátion flavílio (coloração vermelha) é a espécie predominante e contribui para as cores vermelha e roxa (Figura 2A). Em valores de pH entre 2 e 4, as espécies quinoidais azuis são predominantes (Figura 2B-D). Em valores de pH entre 5 e 6 duas espécies incolores predominam, que são a pseudobase carbinol (Figura 2E) e a chalcona (Figura 2F), respectivamente. Em valores de pH maiores que 7, as antocianinas são degradadas dependendo de seus grupos substituintes (Figura 2, reação de degradação) ^[11].

O pH típico do tecido vegetal varia entre 3,5 e 5,5, entretanto, as antocianinas retêm a sua coloração original, não se transformando em estruturas incolores (como em solução), por se auto associarem em forma de hélice (por meio de atrações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) com o núcleo flavílio de outra, protegendo os grupos cromóforos da reação de hidratação ^[1]. Outro mecanismo de proteção é a copigmentação, provavelmente por intermédio de ligações de hidrogênio dos grupos fenólicos, entre a antocianina e moléculas como flavonóides não antociânicos,

antocianinas, alcalóides, aminoácidos, ácidos orgânicos e nucleosídeos, entre outros [18-22]

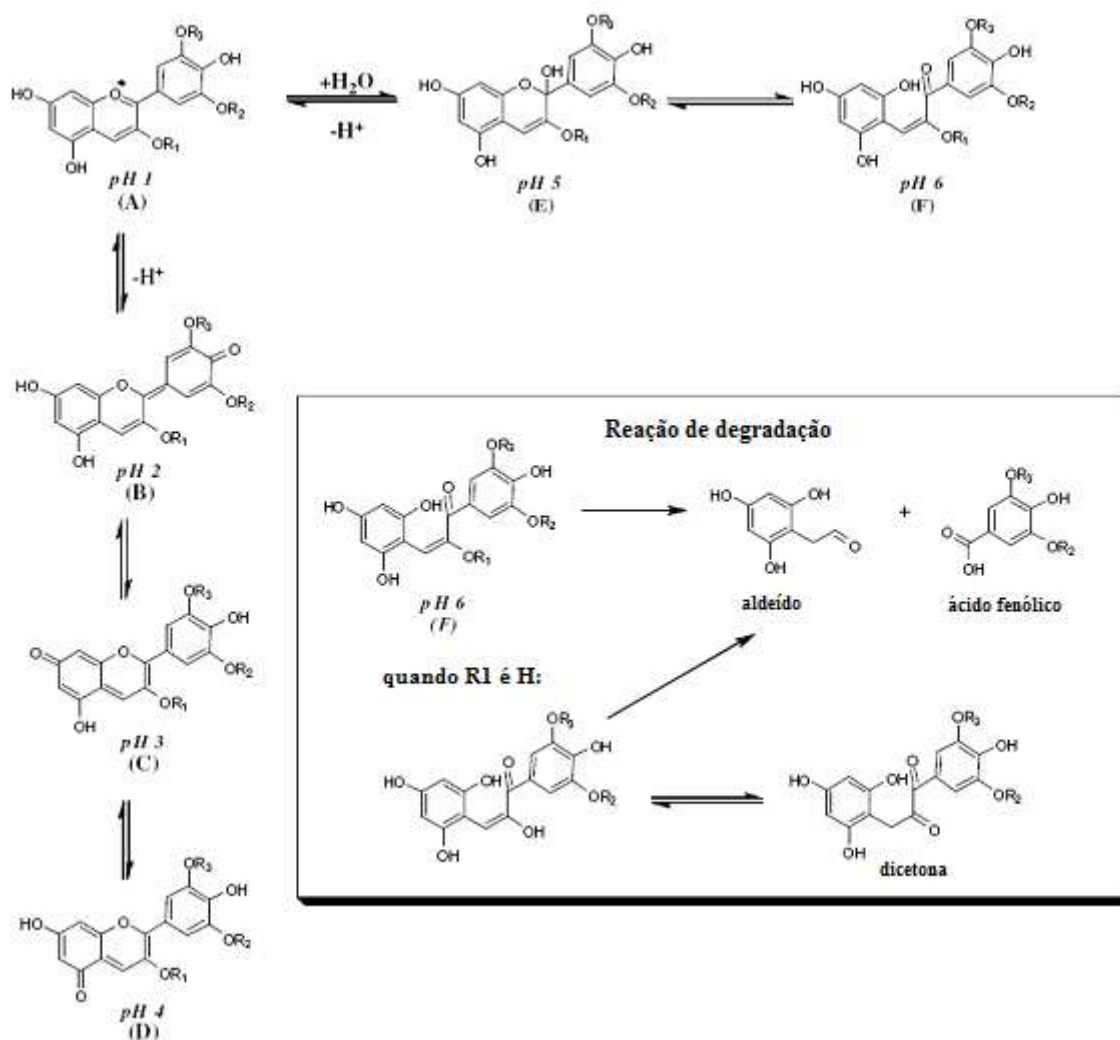


Figura 2 – Formas químicas de antocianinas dependendo do pH da solução e reação de degradação para antocianinas, onde: R1 = H ou sacarídeo, R2 e R3 = H ou metil [11].

A copigmentação é uma interação molecular que acontece, neste caso, entre as antocianinas e o copigmento proporcionando eficiente proteção aos cromóforos de antocianinas contra o ataque nucleofílico e, especialmente, a hidratação e perda da cor [9]. A associação de antocianinas com copigmentos ocorre por meio de ligações hidrogênio ou de processos de empilhamento das moléculas mediante interações hidrofóbicas [23]. Esse efeito ocorre somente em sistemas aquosos e é sensível ao pH, temperatura e composição da solução [18].

O aumento da estabilidade ocorre porque o copigmento compete com a água e interage com as antocianinas, complexando as formas coloridas e modificando a natureza do copigmento ^[11]. Certos copigmentos provocam aumento nos valores de absorvância (efeito hiperacrômico) e deslocamento batocrômico (geralmente entre 5 e 20 nm ou mais no comprimento de onda de máxima absorção) ^[11, 14, 18, 19], evidenciando a reação de copigmentação.

Devido à instabilidade das antocianinas frente a diversos fatores e ao seu potencial uso como corante natural e suas propriedades terapêuticas, se faz necessário o estudo e o desenvolvimento de técnicas que promovam um aumento na estabilidade destes pigmentos, permitindo sua aplicação principalmente na indústria alimentícia.

2.2. MICROENCAPSULAÇÃO

Muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito melhorar a solubilidade, facilitar o manuseio e aumentar a estabilidade dos corantes naturais ^[24-26]. Para dar proteção e aumentar a estabilidade do corante, este pode ser incorporado ou microencapsulado em materiais poliméricos em condições tais, que forneçam essa proteção, mas que permitam a sua liberação em situações pré-determinadas.

A microencapsulação é um processo no qual ocorre a formação de micropartículas, onde um ingrediente ativo (sólido, líquido ou gás) é recoberto por uma fina camada de outro material ^[27]; ela possibilita o isolamento e a manutenção de substâncias ativas no interior de uma microestrutura, fornecendo proteção ao ingrediente encapsulado contra condições adversas do meio, tais como: luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada do encapsulado em condições pré-estabelecidas ^[28].

O material a ser encapsulado é designado por uma série de nomes, entre os quais: núcleo, ingrediente ativo ou fase interna. O material que forma o revestimento das microesferas é chamado de material de parede, carreador, membrana, casca ou revestimento ^[27].

As microcápsulas podem ter diâmetros variando entre unidades de micrômetros até milímetros e podem apresentar diversas formas, dependendo dos

materiais e métodos usados para sua obtenção [27-29]. Quanto à forma, as microcápsulas são idealmente esféricas, embora seu formato seja influenciado pela estrutura original do ingrediente encapsulado. A retenção de materiais ativos no interior de micropartículas é governada por fatores tais como: sua natureza química, incluindo a funcionalidade química, a relativa volatilidade e polaridade [30].

A técnica de microencapsulação tem sido utilizada em diversos setores como reprodução de imagem (impressão térmica e toners para fotocópias), produtos agroquímicos (herbicidas, repelentes e pesticidas), produtos farmacêuticos para consumo oral ou injetável, cosméticos, ingredientes alimentícios, adesivos, agentes de cura e encapsulação de células vivas (incluindo enzimas e microorganismos) [28, 29, 31]. Na indústria de alimentos, microcápsulas que contém compostos voláteis responsáveis pelo implemento do aroma e sabor, corantes, acidulantes, enzimas, microorganismos pró-bióticos e agentes antifúngicos têm sido cada vez mais estudadas e empregadas [27, 32, 33].

Em relação ao encapsulante, ele deve possuir idealmente baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo, ter baixa higroscopicidade, transformar líquidos em sólidos para uso em sistemas secos, deve ter habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o ingrediente encapsulado, não ser reativo com o material a ser encapsulado, ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula e liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação. Deve, ainda, proporcionar máxima proteção ao ingrediente encapsulado contra condições adversas (luz, pH, oxigênio e ingredientes ativos), possuir as propriedades desejadas de liberação do ingrediente encapsulado, não possuir sabor desagradável (no caso de consumo oral) e, finalmente, ser econômico [27, 34]. Nos estudos de microencapsulação, os encapsulantes geralmente empregados são hidrocolóides de gomas vegetais, gelatina, amido modificado, dextrinas, lipídeos, emulsificantes, quitosana, alginato, entre outros [27, 33]. Novos procedimentos para preparar materiais híbridos, com a mistura de polímeros naturais ou sintéticos, também têm sido muito investigados [35-37].

Teoricamente, qualquer material que necessite ser protegido, isolado ou lentamente liberado pode ser encapsulado. Atualmente, existem diversos métodos para preparação ou obtenção de micropartículas, os quais podem ser classificados em:

- a) Métodos Físicos: Spray drying, spray chilling, spray cooling, leite fluidizado, co-cristalização e liofilização,
- b) Métodos Químicos: Inclusão molecular e polimerização interfacial,
- c) Métodos Físico-químicos: Coacervação, separação de fase orgânica e formação de lipossomas ^[25, 27, 28].

Neste trabalho utilizamos a técnica de microencapsulação empregando os métodos de impregnação, coacervação e spray drying.

A técnica de spray drying, é uma tecnologia muito utilizada em diversos segmentos industriais incluindo o farmacêutico, alimentício, cosmético, entre outros. Embora freqüentemente considerado um processo de desidratação, pode ser usado para encapsulação quando o composto ativo é envolvido por uma matriz protetora, normalmente um polímero ou material fundido ^[27]. A encapsulação por spray drying tem sido usada na indústria alimentícia desde 1950, para proporcionar aos ingredientes encapsulados proteção contra a degradação/oxidação e para converter ingredientes líquidos em pós ^[25, 32].

A formulação do material a ser atomizado e os parâmetros do processo determinam as propriedades das partículas produzidas. O primeiro passo para efetuar tal processo é selecionar o agente encapsulante adequado. Uma vez escolhido o agente encapsulante, este deve ser hidratado ^[38]. A encapsulação conduzida em um spray drying envolve três etapas básicas: a primeira, relativa à preparação da dispersão ou emulsão a ser processada; a segunda, homogeneização da dispersão; e, finalmente, a atomização da massa dentro da câmara de secagem. A solução formada é atomizada na câmara de secagem, onde entra em contato com uma corrente de ar quente. A água é evaporada, produzindo partículas secas de formato esférico ^[27].

Dentre as vantagens do emprego do spray drying estão incluídas o fato de o processo ser econômico e flexível, usar equipamento já disponível e produzir partículas de boa qualidade ^[38]. A rápida evaporação da água da matriz encapsulante durante a secagem faz com que o núcleo permaneça a uma temperatura abaixo de 100 °C, o que permite que o processo seja empregado até mesmo para substâncias termossensíveis. Uma limitação da técnica de spray drying é o número limitado de materiais de parede disponíveis. Uma vez que quase todos os processos de secagem por atomização na indústria alimentícia são realizados a partir de formulações aquosas, o material usado para a microencapsulação deve ser solúvel

em água em um nível aceitável ^[32]. A produção de pó com fina granulometria pode ser outra limitação do processo, pois poderá tornar necessária uma nova manipulação, como a aglomeração para aumentar o tamanho das partículas ^[38]. Em comparação com as outras técnicas de microencapsulação, a secagem por atomização oferece a vantagem de ser um processo de etapa única. Essas características fazem com que a avaliação das suas potencialidades como um método de encapsulação tenha se tornado uma área de pesquisa de interesse crescente ^[39-42].

A coacervação é uma original e promissora técnica de microencapsulação, conhecida desde a década de 60. O conceito envolvido na microencapsulação por coacervação é a separação de um ou mais hidrocolóides a partir de uma solução inicial e a subsequente deposição da fase coacervada em torno de um ingrediente ativo suspenso ou emulsificado no meio reacional ^[25]. Geralmente, o material a ser encapsulado usado na coacervação deve ser compatível com o polímero encapsulante e ser insolúvel (ou pouco solúvel) no meio de coacervação ^[43].

A coacervação geralmente envolve três etapas básicas: 1) formação de três fases químicas imiscíveis – uma fase líquida que atua como veículo, uma fase do material a ser encapsulado e uma fase do material encapsulante; 2) deposição do material encapsulante em volta do material a ser encapsulado; e 3) solidificação do encapsulante por meio de técnicas adequadas ^[32, 44].

No primeiro passo da técnica, o material a ser encapsulado, o núcleo, é adicionado diretamente à fase líquida, veículo. Já a fase do material encapsulante é formada por diferentes métodos: adição direta - o encapsulante pode ser adicionado diretamente ao sistema, desde que seja imiscível às outras duas fases e que tenha capacidade para ser liquefeito; produção "in-situ" - um monômero pode ser adicionado ao sistema e, subsequentemente, ser polimerizado na interface; separação de fase - inicialmente o polímero pode se dissolver no sistema, mas mudanças de ordem química ou física na solução polimérica podem provocar a separação de fases e a coacervação do polímero; gotículas irão se formar e coalescer a partir da solução concentrada do polímero produzindo um sistema líquido-líquido ^[27]. A solidificação das microcápsulas formadas é feita por técnicas de aquecimento, reticulação ou desolvatização. As microcápsulas são usualmente coletadas por filtração ou centrifugação, lavadas com um solvente adequado e secas através de técnica apropriada ^[32]. Tamanhos de partículas de poucos micrômetros até um

centímetro são obtidos. Fatores como pH, temperatura e composição são importantes na produção das microesferas ^[28].

A técnica de coacervação pode ser simples ou complexa. No processo de coacervação simples o polímero é solubilizado e então é adicionado o material a ser encapsulado. Um não solvente para o polímero é adicionado à solução polimérica que contém o ingrediente ativo disperso para induzir a formação de microesferas. O processo de coacervação usa o fenômeno de desolvatação parcial dos polímeros e sua agregação em resposta as trocas químicas ou físicas no meio ^[45].

A coacervação complexa ocorre quando dois polímeros de cargas opostas formam um complexo solúvel; as micropartículas são formadas pela interação interiônica entre os polímeros ^[29]. O ingrediente a ser encapsulado pode estar presente na mistura de polímeros que vai ser coacervada, em uma das fases poliméricas ou pode ser adicionada durante ou depois da separação de fases. Em todos os casos, deve ser mantida a agitação continuamente ^[43]. Diversos parâmetros influenciam na formação e propriedades das partículas formadas, como massa molar dos polímeros, pH, força iônica, concentração de ambos polieletrólitos e o tempo de reação que podem ser manipuladas simultaneamente para controlar as propriedades mecânicas e estruturais.

A agregação das micropartículas preparadas durante a coacervação é um problema importuno comumente encontrado na coacervação simples e complexa. O rápido aumento na viscosidade aparente da região rica em polímero causa essa indesejável coesão e agregação de micropartículas ^[45].

A coacervação é muito eficiente, mas é um processo de custo elevado. Por esta razão, não é normalmente empregada na indústria de alimentos. É considerada uma tecnologia potencial na encapsulação de flavorizantes. No entanto, em decorrência do alto custo e das dificuldades associadas à quantidade de núcleo que poderia ser incorporado, ela ainda não foi usada comercialmente ^[27].

A técnica de microencapsulação por adsorção ou impregnação consiste em microencapsular o ingrediente de interesse pelo contato de uma solução do mesmo com microesferas previamente preparadas. A adsorção é um processo que envolve o contato de uma fase aquosa contendo o soluto livre com uma fase particulada rígida que esteja propensa a remover ou estocar, seletivamente, um ou mais solutos presentes na solução ^[46]. As condições de dessorção do material impregnado

também devem ser favoráveis para ou possibilitar a reutilização do adsorvente ou para permitir a liberação do mesmo quando necessário.

O estudo do processo de adsorção é importante para entender vários processos físico-químicos, entre os quais fenômenos de coloração de têxteis, clarificação e despoluição de efluentes industriais. Atualmente os vários estudos da área focam-se na adsorção de íons metálicos e na adsorção de corantes resultantes do processo de tingimento de tecidos ou fibras em efluentes [47-49].

Biopolímeros como quitosana e alginato têm sido empregados como adsorventes de metais e corantes [50, 51], por possuírem em sua cadeia polimérica grupos tais como: amino, hidroxila e carboxilato.

2.3. QUITOSANA

A quitosana (Figura 3-b) é um copolímero catiônico formado por unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glicosamina e 2-desoxi-D-glicosamina unidos por ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4, obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina (poli-N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose) [52]. A quitina (Figura 3-a) é o principal componente da estrutura do exoesqueleto de crustáceos, insetos e moluscos e também está presente na parede celular de fungos [53]. A quitina é extensivamente acetilada, enquanto que a quitosana corresponde à sua forma desacetilada. Desta forma, qualquer polímero quitina que possua um grau de desacetilação maior do que 40% pode ser considerado quitosana [54].

A quitosana possui em sua cadeia polimérica três grupos funcionais reativos: o grupo amino na posição C-2, o grupo hidroxila primário na posição C-6 e o grupo hidroxila secundário na posição C-3 [26, 55] e a modificação química destes grupos permite a obtenção de numerosos materiais com diferentes possibilidades de aplicação. Os grupos amino presentes em toda a extensão da cadeia polimérica, dão a quitosana um caráter de polieletrólito catiônico ($pK_a \geq 6,5$), fazendo com que o polímero seja solúvel em soluções com o $pH < 6,5$ [56, 57] e possa reagir com muitas superfícies/polímeros negativamente carregados, fazendo também quelação com íons metálicos. Quitosana é uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos, porém é solúvel na maior parte dos ácidos orgânicos, como por exemplo, o ácido acético e fórmico e também em ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico.

Precipita em soluções alcalinas ou com poliânions e forma um gel em pH baixo ^[58].

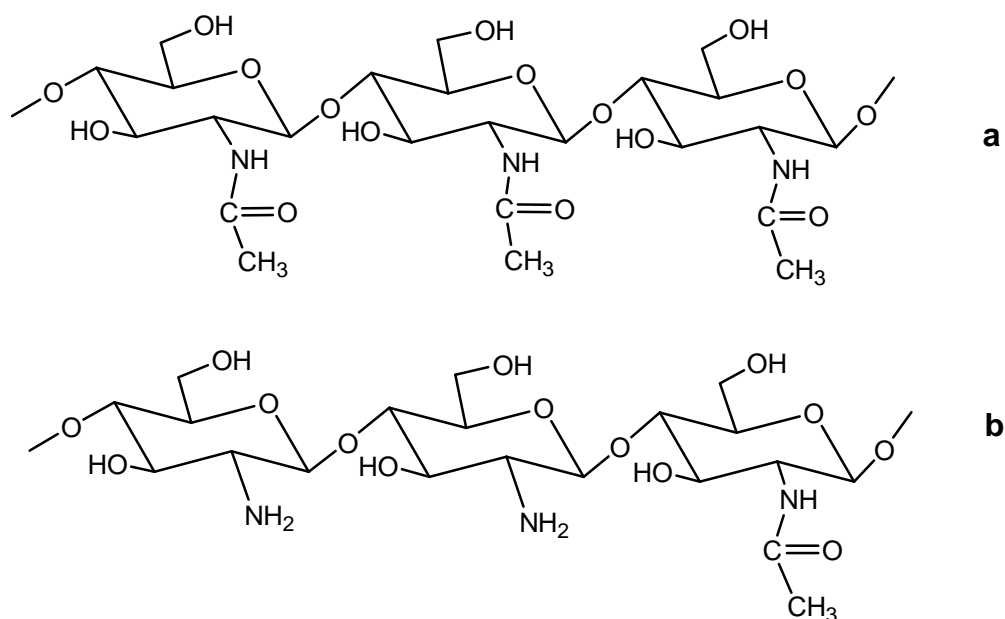


Figura 3 – Estruturas químicas da quitina (a) e da quitosana (b).

Devido à natureza de sua configuração química e as suas propriedades, tais como: sua abundância, não toxicidade, hidroflicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades antibacterianas ^[59], a quitosana tem sido empregada na preparação de filmes, géis e esferas, para os mais diversos fins ^[56] e pode ser utilizada em diversas áreas tecnológicas, como biotecnologia, cosméticos, processamento de alimentos, produtos biomédicos (pele artificial, adesivos cutâneos ou curativos, lentes de contato, etc.) e sistemas de liberação controlada de fármacos (na forma de comprimidos, microcápsulas e adesivos transdérmicos) ^[60-63].

2.4. ALGINATO DE SÓDIO

Os alginatos pertencem a uma extensa classe de polímeros polissacarídeos que formam suspensões hidrocolóides em água ^[64, 65]. Alginato de sódio (Figura 4) é um sal de sódio de ácido algínico e é um polímero aniônico solúvel em água. O ácido algínico é um conhecido polissacarídeo natural, extraído de algas marinhas pardas, que é formado de resíduos de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico unidos por ligação (1 \rightarrow 4), de composição e seqüência variada ^[66].

Uma das excelentes propriedades de alginatos é sua habilidade em formar hidrogéis irreversíveis e estáveis ao calor quando processados com cátions divalentes ^[67-69]. Eles também são biocompatíveis, hidrofílicos e biodegradáveis em condições fisiológicas normais ^[70]. Por isso, alginato de sódio tem sido usado em diversas áreas tecnológicas como indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola e para a formação de materiais híbridos combinado com polímeros catiônicos, tal como a quitosana, por meio de polimerização ou interação iônica.

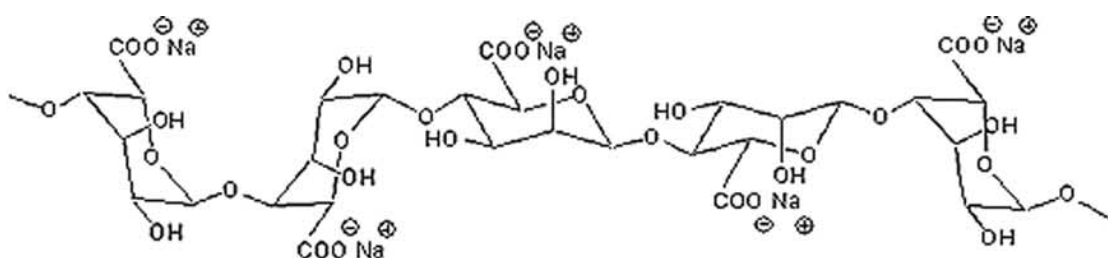


Figura 4. Estrutura química do alginato de sódio.

Vários têm sido os estudos que mostram a viabilidade de se complexar quitosana e alginatos para dar estabilidade a complexos hidrogéis ^[59, 71-76]. A complexação de quitosana com alginato reduz a porosidade das microesferas de alginato e a quitosana adquire um nível maior de força mecânica.

2.5. LIBERAÇÃO CONTROLADA

A liberação controlada pode ser definida como um método pelo qual um ou mais agentes ativos ou ingredientes podem ser disponibilizados em um determinado meio ou sistema, com tempo e velocidade específicos. Com o avanço da tecnologia de liberação controlada, aditivos sensíveis a fatores como pH, temperatura, luz, entre outros, podem ser convenientemente utilizados em sistemas alimentícios. Tais aditivos são introduzidos no sistema alimentício comumente na forma de microcápsulas ^[77].

As vantagens da liberação controlada são: os ingredientes ativos são liberados com uma velocidade controlada durante períodos de tempo prolongados; a perda de ingredientes durante o processamento e estocagem pode ser evitada ou reduzida e ingredientes reativos ou incompatíveis podem ser separados ^[77].

A liberação pode ser sítio específica, estágio específica ou iniciada por mudanças de pH, temperatura, irradiação ou pressão osmótica. Na indústria alimentícia, o método mais comum é a liberação ativada por solvente. A adição de água a bebidas secas ou a misturas de bolo são exemplos.

Uma variedade de mecanismos de liberação controlada de ingredientes encapsulados tem sido proposta para microcápsulas (Figura 5).

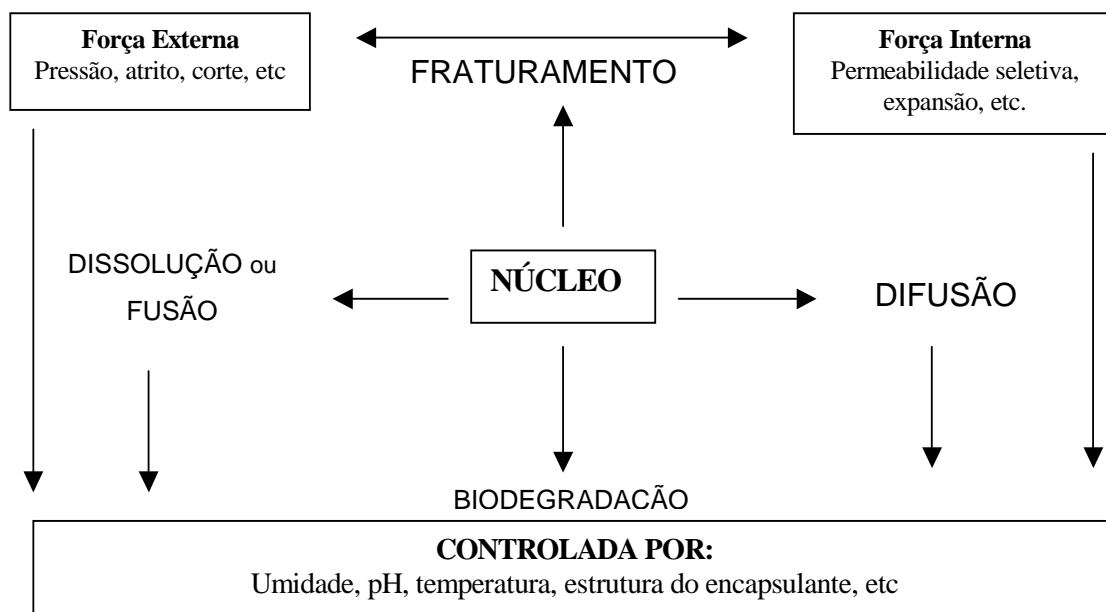


Figura 5. Mecanismos de liberação controlada de ingredientes encapsulados.

Na liberação controlada por difusão, o ingrediente ativo é liberado pela difusão através do polímero ou através de poros existentes na matriz polimérica [77]. Na ausência de fraturas e falhas na parede da microcápsula, a liberação do ingrediente ativo se dá principalmente pelo processo de difusão dirigido por gradientes de concentração e forças atrativas. A difusão pela parede depende além do gradiente de concentração, do tamanho, forma e polaridade do ingrediente ativo, assim como a interação deste com a membrana [27].

Além do processo de difusão, o ingrediente ativo pode ser liberado pelo rompimento da parede encapsulante devido a forças externas como pressão mecânica ou ondas tipo ultrassom. Além disso, a integridade da parede encapsulante pode ser destruída pela dissolução da microcápsula em um solvente apropriado ou por aquecimento e posterior fusão da parede [27].

A liberação por solvente é baseada na solubilização do agente encapsulante

(tipicamente com água) seguido por subsequente liberação do ingrediente encapsulado. Neste caso, ela pode ser ocasionada por uma ruptura repentina ou uma liberação lenta através do controle da razão de solubilização da parede e do intumescimento do agente encapsulante, cujos responsáveis, são os efeitos do pH ou as mudanças na força iônica do meio ^[78].

Em sistemas onde o mecanismo de liberação é influenciado pelo intumescimento, o polímero inicialmente intumesce através da absorção de líquido do meio, sofrendo uma transição do estado vítreo para o estado gelatinoso através da interação com o solvente. As cadeias do polímero no estado gelatinoso são mais móveis do que no estado vítreo, permitindo que o ingrediente encapsulado se difunda rapidamente pela matriz polimérica ^[77].

Assim, a liberação do ingrediente ativo a partir da matriz polimérica pode ser governada pelos diferentes mecanismos de liberação como: difusão, erosão, intumescimento ou pela combinação destes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo encapsular o corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginato por meio das técnicas de impregnação, coacervação e spray drying, avaliando a eficiência de cada um dos processos de encapsulação e seu efeito na estabilidade do corante encapsulado, em relação ao pH.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar o corante natural antocianina e os biopolímeros quitosana e alginato de sódio por espectroscopia de infravermelho (IV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- ✓ Preparar microesferas de quitosana e quitosana/alginato através da técnica de separação de fases ou coacervação;
- ✓ Avaliar parâmetros de adsorção como efeito de pH, tempo necessário para atingir o equilíbrio e capacidade máxima de adsorção do corante natural antocianina em microesferas de quitosana/alginato;
- ✓ Encapsular o corante natural antocianina em microesferas de quitosana e quitosana/alginato por meio das técnicas de impregnação, coacervação e spray drying;
- ✓ Caracterizar as microesferas de quitosana e quitosana/alginato com e sem corante, preparadas pelos diferentes métodos, por de espectroscopia de infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- ✓ Determinar o grau de intumescimento (%GI) das microesferas de quitosana e quitosana/alginato preparadas por impregnação e coacervação;
- ✓ Analisar as cinéticas de liberação do corante natural antocianina encapsulado em microesferas de quitosana e quitosana/alginato em diferentes valores de pH;

- ✓ Avaliar o mecanismo de liberação do corante a partir de microesferas de quitosana e de quitosana/alginato;
- ✓ Avaliar o tempo de dissolução e a quantidade de corante encapsulado em microesferas de quitosana e quitosana/alginato preparadas através da técnica de spray drying.

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

O biopolímero quitosana, com grau de desacetilação 90%, foi adquirido da Purifarma, São Paulo/SP – Brasil. O biopolímero alginato de sódio foi adquirido da empresa Sigma. O corante natural antocianina (padrão AC-12r-WSP) foi fornecido pela Christen – Hansen Ind. & Com. Ltda. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Espectro eletrônico UV-Visível para o corante antocianina

O comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) do corante antocianina foi determinado a partir do espectro de absorção da solução do corante, obtido em um espectrofotômetro UV-Vis T80+, marca PG Instruments Ltda, onde se mediu a absorvância numa faixa do espectro de 350 a 750 nm.

4.2.2. Preparação das microesferas de quitosana

As microesferas de quitosana foram preparadas pelo método de coacervação simples ou separação de fases ^[26]. Dissolveu-se 3,0 g de quitosana em 100 mL de ácido acético 5%, sob agitação constante, até completa homogeneização da solução. A solução ficou viscosa com aproximadamente 3,0% (m/v) de quitosana. Esta solução foi gotejada com o auxílio de uma bomba peristáltica, Ismatec Reglo modelo 78016-30, em um banho de precipitação contendo solução de NaOH 2,0 mol L⁻¹, ocorrendo a precipitação das microesferas. Em seguida, as microesferas foram filtradas, lavadas com água destilada até alcançarem a neutralidade e secas a temperatura ambiente.

4.2.3. Impregnação das microesferas de quitosana com antocianina

Adicionou-se 10 mg de ácido ferrúlico em 25 mL de água destilada. A mistura foi aquecida até dissolução total do ácido ferrúlico (pH 3,6), sendo em seguida deixada em repouso até temperatura ambiente. Em seguida, 150 mg de microesferas de quitosana foram deixadas em contato com esta solução, sob agitação, por trinta minutos. Após os 30 minutos de contato das microesferas com a solução de ácido ferrúlico, foram adicionados 150 mg do corante, mantendo-se a solução resultante sob agitação durante 30 minutos. Após o contato, as microesferas impregnadas foram filtradas, lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e secas a temperatura ambiente.

4.2.4. Preparação das microesferas de quitosana/alginato

Microesferas de quitosana/alginato foram preparadas pelo método de separação de fases ou coacervação complexa [36]. Dissolveu-se o alginato de sódio em água obtendo-se uma solução viscosa 1% (m/v) que foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica, Ismatec Reglo modelo 78016-30, sobre uma solução de quitosana 1,5% (m/v) e CaCl_2 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. As microesferas formadas foram mantidas em contato com a solução de quitosana por aproximadamente trinta minutos e posteriormente lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

4.2.5. Efeito do pH na adsorção do corante antocianina em microesferas de quitosana/alginato

Microesferas de quitosana/alginato (150 mg) foram colocadas em contato com soluções individuais do corante antocianina na concentração inicial de 400 mg L^{-1} (C_0). O estudo foi realizado na faixa de pH 1 a 6, já que acima de pH 7,0 o corante sofre degradação. As soluções do corante foram preparadas nas soluções tampão pH 1,0 (HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 2,0 (HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$), 3,0 (CH_3COOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 4,0 (CH_3COOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 5,0 (CH_3COOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 6,0 (NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), tendo sido o pH

destas soluções ajustado com a adição de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Após o contato com as microesferas, as soluções foram transferidas para uma encubadora Mini Shaker da marca Marconi, modelo MA 832 e agitadas durante 2 horas, a 150 rpm. O sobrenadante de cada frasco foi separado por filtração; uma alíquota foi analisada no comprimento de onda máximo do corante (521 nm) por espectroscopia de UV-Vis, sendo a concentração do corante no sobrenadante determinada pela utilização de uma curva de calibração do corante. A quantidade de corante adsorvido foi determinada empregando a Equação 1:

$$q = \frac{(C_o - C_e) \cdot V}{W} \quad \text{Equação 1}$$

onde, q é a quantidade de corante adsorvido no polímero (mg g⁻¹), V é o volume da solução (L), W é a massa de microesferas de quitosana/alginato utilizada (g), C_o é a concentração inicial da solução de corante (mg L⁻¹) e C_e é a concentração de corante em equilíbrio na solução (mg L⁻¹).

4.2.6. Cinética de adsorção do corante antocianina em microesferas de quitosana/alginato

O tempo necessário para o sistema adsorvato/adsorvente atingir o equilíbrio foi determinado colocando-se 25 mL de solução de corante (C_o = 1200 mg L⁻¹) em contato com 150 mg de microesferas de quitosana/alginato em pH 2,0 (pH previamente selecionado no estudo do efeito de pH). O frasco permaneceu sob agitação (150 rpm), a 25,0 ± 0,1 °C, até alcançar o equilíbrio de adsorção. Alíquotas de 3,0 mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, e a concentração do corante foi determinada por espectroscopia de UV-Vis, utilizando-se curvas de calibração obtidas nos pH de estudo.

4.2.7. Isotermas de adsorção do corante antocianina em microesferas de quitosana/alginato

As isotermas de adsorção foram obtidas pelo método de batelada. Foram utilizados 150 mg de microesferas de quitosana/alginato em pH 2,0. A essas amostras foram adicionadas soluções com concentrações iniciais de corante variando de 200 - 2000 mg L⁻¹, preparadas a partir de diluição de uma solução estoque do corante com concentração de 2000 mg L⁻¹. O sistema foi mantido sob agitação (150 rpm), a 25,0 ± 0,1 °C, até alcançar o equilíbrio de adsorção (6 horas). O material foi separado por filtração e a concentração do corante em solução foi determinada por espectroscopia de UV-Vis, utilizando-se uma curva de calibração do corante.

4.2.8. Impregnação das microesferas de quitosana/alginato com antocianina

Após os estudos de adsorção, as microesferas de quitosana/alginato foram impregnadas com o corante antocianina, dissolvendo-se 100 mg do corante em 100 mL de solução tampão pH 2,0 (HCl 0,01 mol L⁻¹) e em seguida a solução resultante foi colocada em contato com 150 mg de microesferas de quitosana/alginato durante 2 horas, sob agitação e a temperatura ambiente. Após o contato, as microesferas impregnadas foram filtradas, lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e secas a temperatura ambiente.

4.2.9. Microencapsulação do corante antocianina pelo método de coacervação

Para a preparação das microesferas de quitosana/alginato contendo corante por separação de fases ou coacervação complexa, adicionou-se 300 mg do corante em 100 mL de solução de alginato de sódio 1% (m/v). Esta solução foi então gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica, Ismatec Reglo modelo 78016-30, sobre uma solução de quitosana 1,5% (m/v) e CaCl₂ 0,05 mol L⁻¹. As microesferas formadas foram mantidas em

contato com a solução de quitosana por aproximadamente trinta minutos e posteriormente lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente.

4.2.10. Microencapsulação do corante antocianina pela técnica de spray drying

Por meio desta técnica foram obtidas micropartículas de quitosana e de quitosana/alginato contendo o corante antocianina. Para a preparação das micropartículas de quitosana, 300 mg de corante foram adicionadas a uma solução de quitosana 3% (m/v) dissolvida em ácido acético 5% (v/v). Já para a preparação de micropartículas de quitosana/alginato, 300 mg do corante foram adicionadas a uma solução de quitosana/alginato preparada a partir de adaptações do método de Smitha (2005) ^[71]. Baseado neste método, foram misturadas soluções de quitosana 3% (m/v) e de alginato 2% (m/v), na proporção de 3:1, respectivamente e a essa solução foi adicionado HCl concentrado na quantidade de 1% do volume da solução. Após agitação vigorosa da solução por trinta minutos a parte sólida remanescente foi filtrada.

As soluções foram atomizadas em um mini spray drier Buchi 191, contendo um atomizador de 0,5 mm, dentro de uma câmara de 44 cm de altura e 10,5 cm de diâmetro. Para avaliar o efeito da temperatura de secagem no preparo das amostras, os parâmetros utilizados na atomização foram: temperatura de entrada do ar na câmara de secagem em 120 ± 3 °C, 140 ± 3 °C, 160 ± 3 °C e 180 ± 3 °C e temperatura de saída do ar em 75 ± 3 °C, 88 ± 3 °C, 98 ± 3 °C e 104 ± 3 °C, com pressão manométrica positiva de 5 bar e fluxo de ar de 500 NL/h. Após a avaliação do efeito da temperatura de secagem, as soluções foram atomizadas utilizando-se os seguintes parâmetros: temperatura de entrada do ar 160 ± 3 °C e temperatura de saída do ar 90 ± 5 °C, com pressão manométrica positiva de 5 bar e fluxo de ar de 500 NL/h. Para todas as amostras utilizou-se uma velocidade de atomização de 7% e taxa de aspiração de 100%. Sob estas condições o aparelho pode secar 150 mL da solução resultante por hora.

4.2.11. Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho da quitosana, do alginato de sódio, do corante antocianina e de todas as diferentes formulações de microesferas, foram obtidos na região de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, com um espectrofotômetro FT Perkin Elmer, modelo 16 PC, utilizando-se pastilhas de KBr. As microesferas foram trituradas antes das análises de infravermelho.

4.2.12. Morfologia das microesferas

A morfologia interna e externa, porosidade e tamanho médio das amostras foram determinados utilizando-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram colocadas sobre estaves e recobertas com uma camada de ouro, usando um Cool Sputter Coater da Bal-tec, SDC 005, sendo em seguida micrografadas utilizando-se de um microscópio eletrônico de varredura (Philips, Model XL 30) em uma intensidade de 10kv, com várias magnificações. O diâmetro médio de cada amostra foi obtido a partir da média de uma população de microesferas, utilizando-se medidas dos diâmetros dos eixos vertical e horizontal. Para todas as amostras, foram analisados cortes transversais, para avaliar as características internas da amostra.

4.2.13. Análise Termogravimétrica (TGA)

Análises termogravimétricas foram realizadas com o objetivo de avaliar as variações de massa em função da temperatura dos materiais formados. As análises foram efetuadas em um analisador termogravimétrico (Shimadzu - TGA50) sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de $50,0\text{ mL min}^{-1}$ e taxa de aquecimento de 10°C/min , numa faixa de temperatura de 25 a 600°C .

4.2.14. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Termogramas do corante, da quitosana, do alginato de sódio e das amostras preparadas pelos diferentes métodos ($\sim 10\text{ mg}$) foram obtidos

com um calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu - DSC50). As análises de DSC foram realizadas com o objetivo de avaliar possíveis interações entre os polímeros e o corante. As amostras foram analisadas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}), com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ na faixa de temperatura de 25 a $300 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.15. Estudos de liberação do corante em função do pH

Amostras (25,0 mg) de microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas por meio dos métodos de impregnação e coacervação, foram suspensas em 25,0 mL de solução tampão pH 1,0 (HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 2,0 (HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$), 3,0 ($\text{CH}_3\text{COOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 4,0 ($\text{CH}_3\text{COOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 5,0 ($\text{CH}_3\text{COOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), tendo sido o pH destas soluções ajustado com a adição de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram mantidas sob agitação constante (150 rpm) em banho termostaticado a $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Após intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas de 3,0 mL da amostra foram retiradas e analisadas no comprimento de onda máximo do corante (521 nm). Após as leituras, as alíquotas eram devolvidas ao erlenmeyer. A porcentagem de corante liberada foi determinada usando-se uma curva de calibração que relaciona a absorvância com a concentração conhecida do corante puro (mg L^{-1}) no mesmo tampão em que a cinética foi conduzida, sendo o experimento realizado em triplicata para todos os pH.

4.2.16. Determinação do grau de intumescimento (%GI)

A determinação do grau de intumescimento foi realizada em soluções tampão pH 1,0 (HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 2,0 (HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$), 3,0 ($\text{CH}_3\text{COOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 4,0 ($\text{CH}_3\text{COOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 5,0 ($\text{CH}_3\text{COOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), tendo sido o pH destas soluções ajustado com a adição de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas por impregnação e coacervação, secas em estufa, foram inicialmente pesadas (25 mg) e mantidas nos diferentes tampões (25 mL), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação de 150 rpm. Em intervalos de tempo pré-determinados as microesferas eram

retiradas das soluções tampão, secas em papel absorvente para retirar o excesso de solução e pesadas novamente até o momento em que não houve mais variação de massa. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t , foi calculado pela Equação 2:

$$\%GI = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

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

4.2.17. Determinação da quantidade de corante encapsulado

Foram utilizados para este estudo 25 mg de cada uma das amostras encapsuladas, como descrito no item 4.2.3, 4.2.8, 4.2.9 e 4.2.10. As amostras foram deixadas em contato com solução tampão HCl 0,01 mol L⁻¹, pH 2,0, por uma hora, para promover a liberação do corante. Após o contato, uma alíquota foi retirada da solução e analisada no comprimento de onda máximo do corante (521 nm). Para a quantificação dos resultados, utilizou-se uma curva de calibração do corante antocianina em solução aquosa, pH = 2,0, sendo a análise realizada em triplicata.

4.2.18. Dissolução das micropartículas de quitosana e quitosana/alginate obtidas através da técnica de spray drying

Amostras (25,0 mg) de microesferas de quitosana e quitosana/alginate obtidas através da técnica de spray drying, foram suspensas em 25,0 mL de solução tampão pH 1,0 (HCl 0,1 mol L⁻¹), 2,0 (HCl 0,01 mol L⁻¹), 3,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹), 4,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹) e 5,0 (CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹), tendo sido o pH destas soluções ajustado com a adição de NaOH 0,1 mol L⁻¹. As soluções foram mantidas sob agitação constante (150 rpm) em banho termostatizado a 25,0 ± 0,1 °C, até a completa dissolução das amostras. A porcentagem de corante

liberada após a dissolução, foi determinada usando-se uma curva de calibração que relaciona a absorvância com a concentração conhecida do corante puro (mg L^{-1}) no mesmo tampão em que o experimento foi conduzido. Todo o estudo foi realizado em triplicata para todos os pH.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Espectro UV-Visível para o corante antocianina

A Figura 6 ilustra o espectro de UV-Visível do corante antocianina em solução aquosa, pH 2,0. O valor de $\lambda_{\text{máx}}$ foi determinado em 521 nm. Os espectros apresentaram uma pequena diferença de comportamento na faixa de pH estudado, variando o comprimento de onda máximo entre 521 a 525 nm. Essas mudanças no valor do comprimento de onda máximo estão relacionadas às mudanças estruturais que ocorrem na antocianina, apresentadas anteriormente na Figura 2.

Foram realizadas também para o corante, análises de espectroscopia no infravermelho, calorimetria de varredura diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA). Estas análises serão discutidas simultaneamente com as análises dos produtos resultantes da microencapsulação do corante.

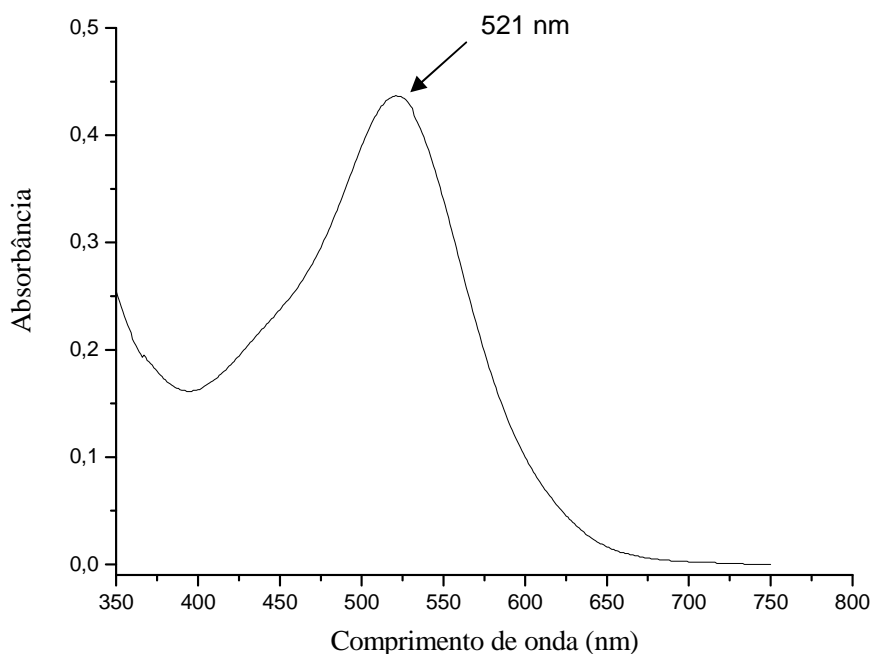


Figura 6. Espectro eletrônico UV-Visível para o corante antocianina obtido em solução aquosa, pH 2,0.

5.2. Microencapsulação do corante natural antocianina

5.2.1. Impregnação do corante antocianina em matriz polimérica de quitosana

Devido à degradação do corante antocianina em valores de pH elevados e à solubilidade das microesferas de quitosana em meios ácidos, não foram realizados estudos de adsorção do corante nas microesferas de quitosana como foi feito para as microesferas de quitosana/alginato, porém, vários meios de impregnação foram testados.

Dentre eles podemos citar: solução de ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), solução de sulfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), solução tampão KCl/HCl (pH 1,0), água, solução de dimetilsulfóxido de sódio e etanol (0,05:1, v/v), solução de ácido ferrúlico (pH 3,6), solução de citrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5 e 8,3) e solução de tartarato de sódio e potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5 e 8,6).

As impregnações com soluções de ácido sulfúrico e sulfato de sódio levaram à microesferas com uma grande quantidade de fissuras e quebras (Figura 7). A presença de fissuras ou rachaduras é indesejável na tecnologia de microencapsulação, pois pode comprometer a proteção oferecida ao ingrediente encapsulado frente a condições adversas do meio, além de promover a liberação acelerada do material encapsulado ^[79]. As impregnações com solução tampão KCl/HCl, água, solução de dimetilsulfóxido de sódio e etanol ou não foram eficientes ou promoveram a dissolução das microesferas, não permitindo seu uso.

As metodologias mais eficientes de impregnação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana, que não promoveram fissuras nas microesferas e permitiram a microencapsulação do corante, foram as utilizando solução de ácido ferrúlico (pH 3,6), solução de citrato de sódio (pH 2,5 e pH 8,3) e solução de tartarato de sódio e potássio (pH 2,5 e 8,6). Sendo que no desenvolvimento deste trabalho serão estudadas as microesferas impregnadas em solução de ácido ferrúlico.

Registros na literatura mostram que ácidos orgânicos, tais como ácido ferrúlico, podem atuar como copigmentos de antocianinas ^[19, 21-23, 80-85] protegendo-as contra a degradação, por meio de interações intermoleculares.

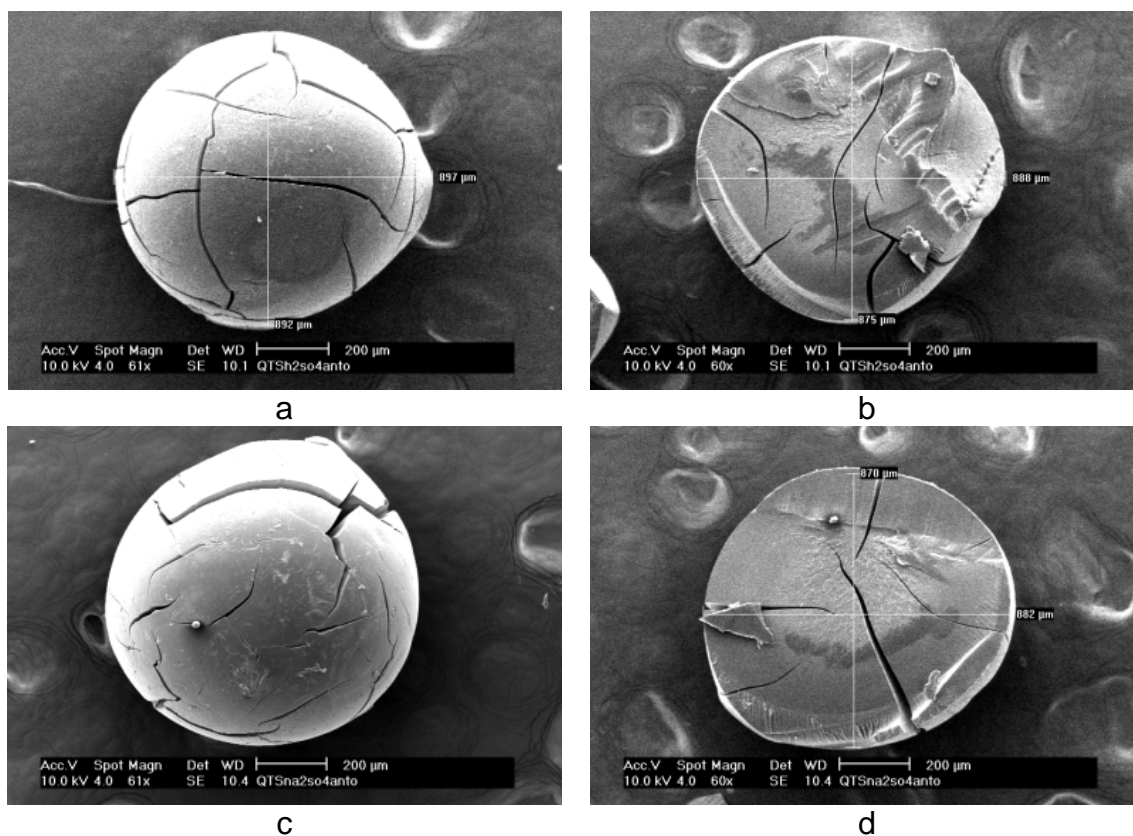


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura: a) microesfera de quitosana impregnada em ácido sulfúrico, b) microesfera de quitosana impregnada em ácido sulfúrico - corte, c) microesfera de quitosana impregnada em sulfato de sódio e d) microesfera de quitosana impregnada em sulfato de sódio – corte.

As microesferas impregnadas com corante em matriz polimérica de quitosana produzidas em ácido ferrúlico foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica, calorimetria diferencial de varredura.

5.2.1.1. Análise da morfologia das microesferas de quitosana impregnadas utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com o objetivo de avaliar a morfologia e o tamanho de distribuição de partícula do material formado durante a microencapsulação. A microscopia eletrônica de varredura fornece informações

sobre as características morfológicas das microesferas como a presença de fissuras e poros, permitindo uma análise rápida e direta da eficiência do processo de encapsulação.

A Figura 8 apresenta as imagens obtidas com a microscopia eletrônica de varredura das microesferas impregnadas, as quais foram reveladas a partir de populações mistas de microesferas.

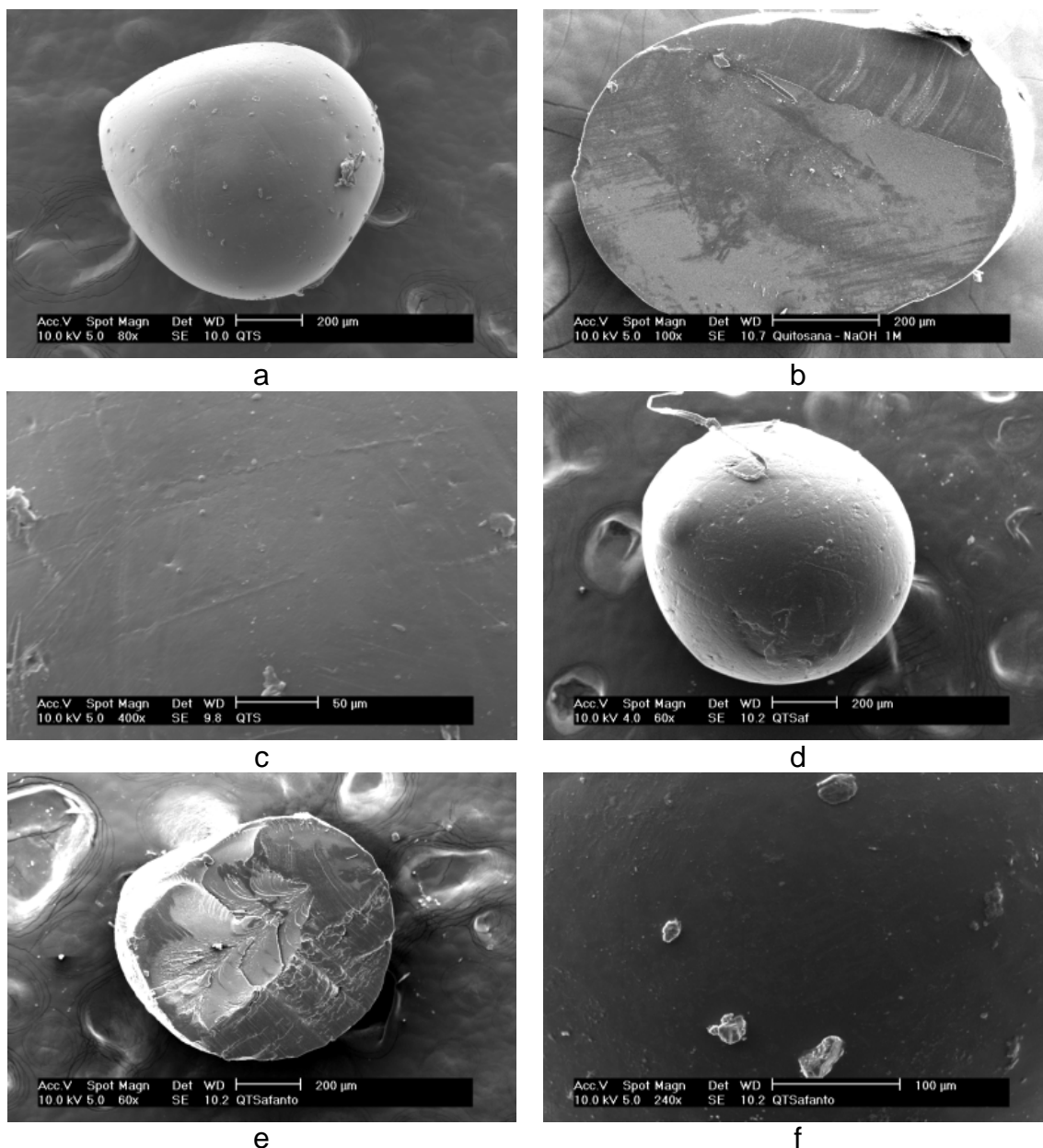


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura: a) microesfera de quitosana, b) microesfera de quitosana – corte, c) microesfera de quitosana – superfície, d) microesfera de quitosana impregnada, e) microesfera de quitosana impregnada – corte, f) microesfera de quitosana impregnada – superfície.

De um modo geral, as microesferas de quitosana (Figura 8-a e 8-c) e quitosana impregnada (Figura 8-d e 8-f) apresentaram-se com boa esfericidade. A estrutura externa das microesferas com e sem corante mostrou-se compacta, lisa e sem fissura ou porosidade aparente, indicando a formação de um filme contínuo na parede. A análise das secções transversais das microesferas (Figuras 8-b e 8-e) mostrou ausência de poros ou fissuras no interior das mesmas.

O diâmetro médio das microesferas ficou em 852 μm para as microesferas de quitosana e 890 μm para as microesferas de quitosana impregnadas com corante antocianina.

As análises de microscopia eletrônica de varredura das microesferas contendo corante indicam que o corante está dissolvido por toda a matriz polimérica, sugerindo uma microencapsulação eficiente.

5.2.1.2. Caracterização das microesferas de quitosana impregnadas por Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A Figura 9 apresenta os espectros de infravermelho da quitosana, das microesferas impregnadas com o corante e do corante antocianina.

No espectro de infravermelho da quitosana (Figura 9-a) observam-se bandas características dos grupos presentes na estrutura do polímero: 3445 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações OH; 2918 e 2879 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações C–H; 1655 cm^{-1} atribuída a absorção da carbonila do grupo —N—C=O; 1601 cm^{-1} referente a deformação do grupo NH_2 ; 1423 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação —CN de amida; 1381 cm^{-1} correspondente a pequena vibração do C–H do grupo CH_3 referente ao grupo acetoamido presente em pequena proporção na cadeia polimérica e 1322 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação —CN de grupos amino. As bandas em 1155 cm^{-1} (estiramento assimétrico da ligação C–O–C), 1080 e 1030 cm^{-1} (vibrações envolvendo as ligações C–O de álcool primário) são características da estrutura sacarídica da quitosana^[71].

O espectro de infravermelho do corante natural antocianina (Figura 9-c) mostra banda em 3389 cm^{-1} referente à vibração de estiramento das ligações OH; 2929 cm^{-1} referente aos estiramentos de ligações C–H; 1751 cm^{-1} referente à carbonila de éster; 1616 cm^{-1} referente ao estiramento C–C de aromáticos; 1512

cm^{-1} correspondente à deformação axial C=C de aromáticos; 1441 cm^{-1} referente à deformação das ligações C-H e banda em 1026 cm^{-1} correspondente ao estiramento das ligações C-O de álcool.

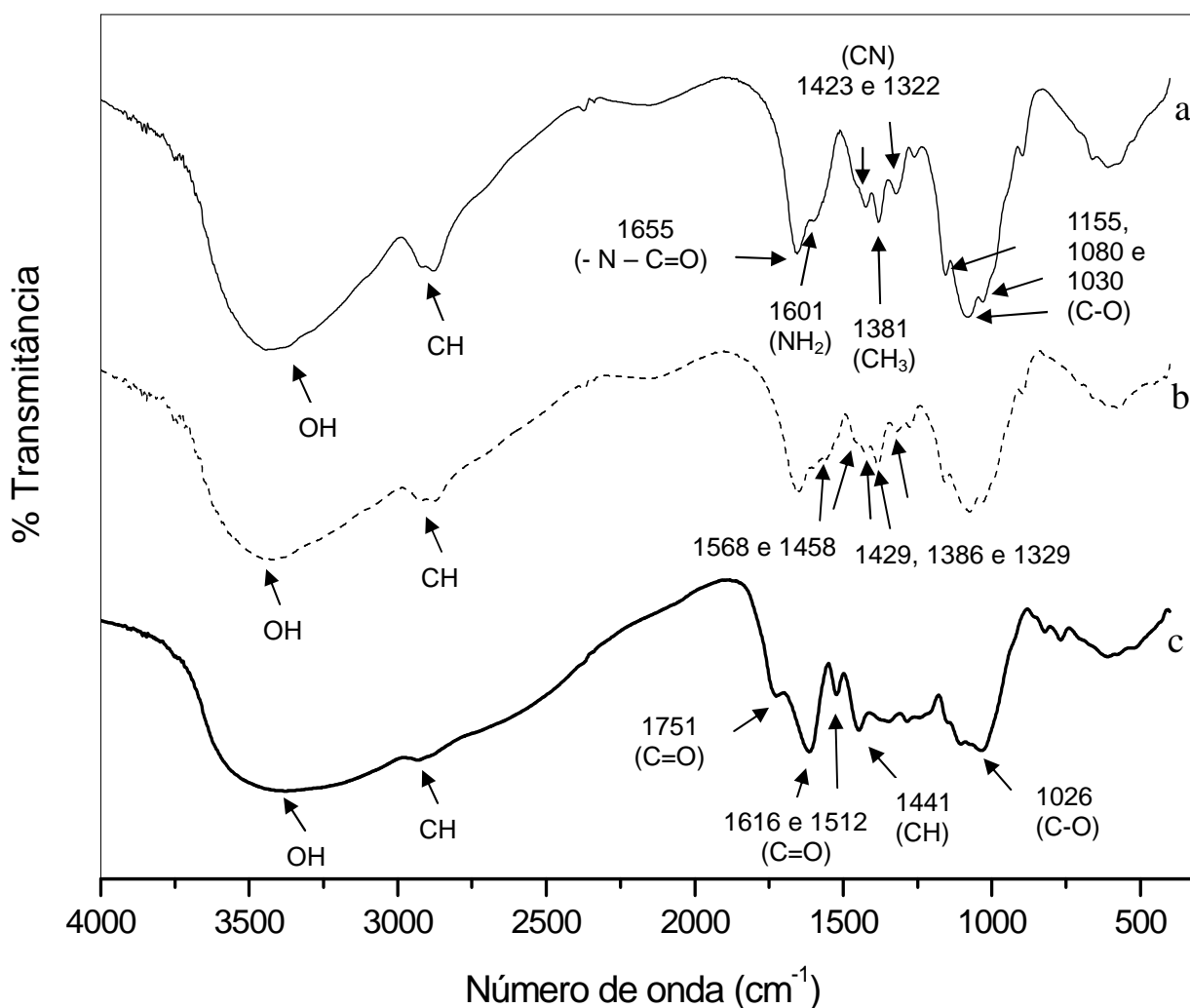


Figura 9. Espectro de infravermelho: a) quitosana, b) microesferas de quitosana impregnadas e c) corante natural antocianina.

No espectro de infravermelho das microesferas de quitosana impregnadas (Figura 9-b) observam-se bandas em: 3440 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações OH; 2927 e 2880 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações C-H, sendo que para a banda em 2927 cm^{-1} observa-se um aumento de intensidade em relação ao espectro da quitosana que pode ser atribuído aos grupos CH_3 presentes na estrutura do corante e que está presente na microesfera; 1655 cm^{-1} atribuída à absorção da carbonila do grupo $-\text{N}-\text{C}=\text{O}$ e 1602 cm^{-1} referente à deformação do

grupo NH_2 . Observa-se também o surgimento de dois ombros em 1562 e 1458 cm^{-1} os quais podem ser atribuídos a presença do corante na microesfera e os deslocamentos das bandas em: 1429 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação $-\text{CN}$ de amida; 1386 cm^{-1} correspondente a pequena vibração do $\text{C}-\text{H}$ do grupo CH_3 e 1324 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação $-\text{CN}$ de grupos amino, além do aumento de intensidade e deslocamento de 20 cm^{-1} na banda em 1280 cm^{-1} .

As mudanças de intensidade das bandas de absorção no espectro bem como os deslocamentos de bandas observados sugerem a existência de interações físicas entre o biopolímero quitosana e o corante antocianina.

5.2.1.3. Análise Termogravimétrica (TGA) das microesferas de quitosana impregnadas

Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica dos produtos formados a partir da microencapsulação do corante antocianina em matriz polimérica de quitosana, foram realizadas análises termogravimétricas (Figura 10) para a quitosana, a antocianina e para as microesferas de quitosana impregnadas.

A Tabela 1 fornece os estágios de perda de massa para a quitosana, o corante antocianina e para as microesferas impregnadas com corante.

Na Figura 10 e na Tabela 1 é possível observar que o biopolímero quitosana e o corante antocianina apresentaram um estágio inicial de perda de massa em aproximadamente 53 e $77 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente, referente à perda de umidade presente na amostra, com uma redução de aproximadamente 10% para a quitosana e $5,5\%$ para a antocianina.

A curva da análise termogravimétrica para a quitosana (Figura 10-a) apresenta além do primeiro estágio referente à desidratação, um segundo estágio de perda de massa em torno de $330 \text{ }^\circ\text{C}$, com uma redução de aproximadamente 56% de massa, referente à degradação do polímero. O corante antocianina (Figura 10-b) apresenta um segundo estágio de perda de massa em $332 \text{ }^\circ\text{C}$, com redução de aproximadamente 57% de massa, referente à sua degradação térmica.

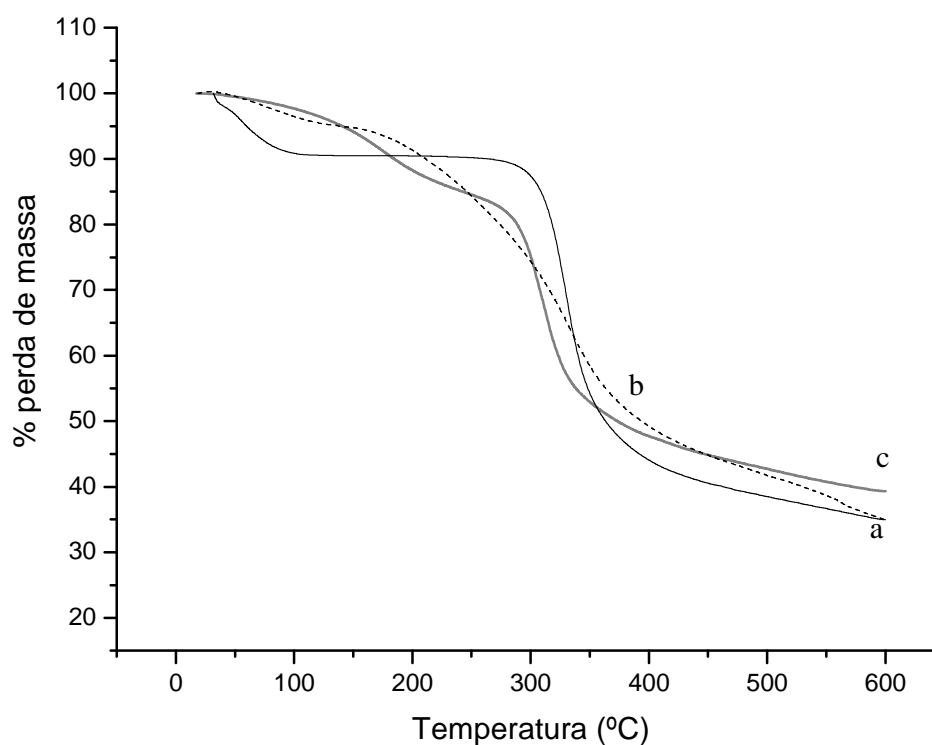


Figura 10. Análise termogravimétrica (TGA): a) quitosana, b) corante natural antocianina e c) microesfera de quitosana impregnada.

As microesferas impregnadas com o corante antocianina (Figura 10-c) apresentaram dois estágios de perda de massa em aproximadamente 176 e 310 °C, com redução de aproximadamente 12 e 45% da massa. O primeiro estágio pode estar relacionado ao solvente presente na amostra e o segundo estágio refere-se ao polímero, sendo observada menor estabilidade térmica da microesfera impregnada em relação ao polímero puro.

Tabela 1. Estágios de perda de massa obtidos através de análise termogravimétrica (TGA) da quitosana, do corante antocianina e das microesferas de quitosana impregnadas.

	1°Estágio	2°Estágio
Quitosana	53,33°C	330,15°C
Corante natural antocianina	77,71°C	332,70°C
Microesfera de quitosana impregnada	176,33°C	309,96°C

5.2.1.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das microesferas de quitosana impregnadas

Com o objetivo de avaliar possíveis interações entre o biopolímero quitosana e o corante antocianina, foram realizadas análises de calorimetria diferencial de varredura (Figura 11) para a quitosana, microesferas de quitosana impregnadas e corante antocianina.

A curva de calorimetria diferencial de varredura para a quitosana (Figura 11-a) apresenta um pico endotérmico em aproximadamente 89 °C relacionado à umidade presente na amostra e um pico exotérmico em aproximadamente 306 °C, referente à degradação do polímero. A curva de DSC para o corante antocianina (Figura 11-c) mostra um pico endotérmico intenso de fusão em aproximadamente 187 °C.

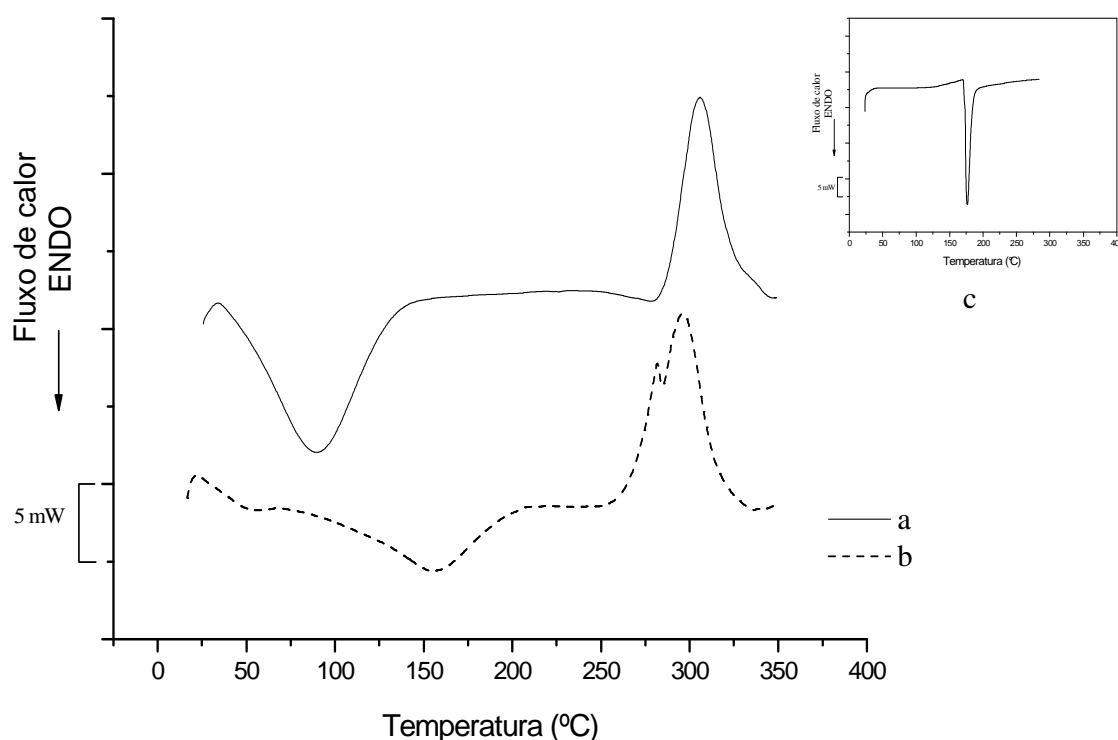


Figura 11. Calorimetria diferencial de varredura (DSC): a) quitosana, b) microesfera de quitosana impregnada e c) corante natural antocianina.

A amostra das microesferas impregnadas (Figura 11-b) apresentou um pico endotérmico em aproximadamente 155 °C atribuído à fusão do corante e dois picos exotérmicos em aproximadamente 281 e 296 °C, sendo que o primeiro pode ser

atribuído a degradação do corante antocianina e o segundo referente à degradação térmica da quitosana. Mourtzinos et al. (2008) ^[86] ao estudarem a estabilidade térmica de antocianinas, observaram um pico exotérmico em torno de 220 °C relacionado à oxidação do corante antocianina ^[86].

Os resultados de calorimetria diferencial de varredura para as microesferas de quitosana impregnadas com o corante antocianina sugerem que ocorre interação física entre a quitosana e o corante antocianina, pois não foram observados novos picos de transição e sim o deslocamento dos picos já existentes para temperaturas menores. Os dados de DSC estão de acordo com os dados de TGA indicando menor estabilidade térmica das microesferas contendo o corante em relação ao polímero puro.

5.2.1.5. Determinação do grau de intumescimento (%GI) das microesferas de quitosana impregnadas

A literatura tem mostrado que a liberação de solutos a partir de matrizes hidrofílicas é uma interação complexa entre intumescimento, difusão, erosão e relaxação ^[87]. A penetração gradual de água produz intumescimento e relaxação das cadeias do polímero para formar um gel hidratado, permitindo a passagem do soluto por meio da dissolução e difusão para o meio aquoso ^[88].

Assim, a determinação do grau de intumescimento das microesferas é um fator importante, pois pode ajudar a entender o mecanismo de liberação dos ingredientes ativos.

Geralmente, este fenômeno pode ser gerado devido alguns fatores do meio externo tais como: pH, força iônica, composição do solvente, composição do tampão, temperatura e pressão ^[88, 89]. Fatores como grau de reticulação, hidrofiliabilidade e hidrofobicidade do polímero influenciam no grau de intumescimento ^[90, 91].

A Tabela 2 apresenta o grau de intumescimento para as microesferas de quitosana impregnadas com o corante antocianina e o tempo necessário para alcançar o intumescimento máximo. Durante o intumescimento, os grupos amino, da superfície da quitosana, são inicialmente ionizados. A superfície intumesce devido à repulsão eletrostática entre grupos amino adjacentes, facilitando a penetração do

solvente ^[92].

Tabela 2. Grau de intumescimento das microesferas de quitosana impregnadas.

<i>Grau de intumescimento (%GI)</i>		
Microesferas de quitosana impregnadas		
pH	Tempo* (minutos)	GI%
1	10	239,54
2	34	363,26
3	20	1592,52
4	18	1390,40
5	50	1460,83

* Tempo para obtenção das microesferas com massa constante

A partir dos dados apresentados é possível observar que o grau de intumescimento das microesferas impregnadas aumenta com o aumento de pH até o pH 3,0, onde alcança seu grau máximo. A partir do pH 3,0, ocorre um pequeno decréscimo no grau de intumescimento, porém mantendo ainda um valor bastante significativo, sendo que em pH 5,0 as microesferas demoram mais para intumescer.

5.2.1.6. Estudos de liberação do corante natural antocianina a partir de microesferas de quitosana

O estudo da liberação controlada de um ingrediente ativo, sob condições específicas, é interessante e necessário para entender o comportamento de liberação e o mecanismo através do qual essa liberação ocorre. As técnicas de microencapsulação e liberação controlada fornecem proteção e permitem a utilização de ingredientes ativos em condições específicas desejadas.

A quantidade de corante liberada com o tempo (M_t) foi determinada através de um espectrofotômetro UV-Visível, no comprimento de onda de 521 nm. A quantidade de corante total liberado (M_f) foi alcançada depois de manter as microesferas algumas horas em solução, sob agitação.

O aspecto geral da curva de liberação do corante antocianina a partir de

microesferas de quitosana impregnadas está representado na Figura 12.

Observa-se que a liberação do corante começa imediatamente após o contato das microesferas com a solução tampão em todos os valores de pH e que todo o corante é liberado a partir da matriz polimérica de quitosana impregnada com corante em menos de duas horas considerando-se os pH 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 e em aproximadamente três horas para o pH 5,0.

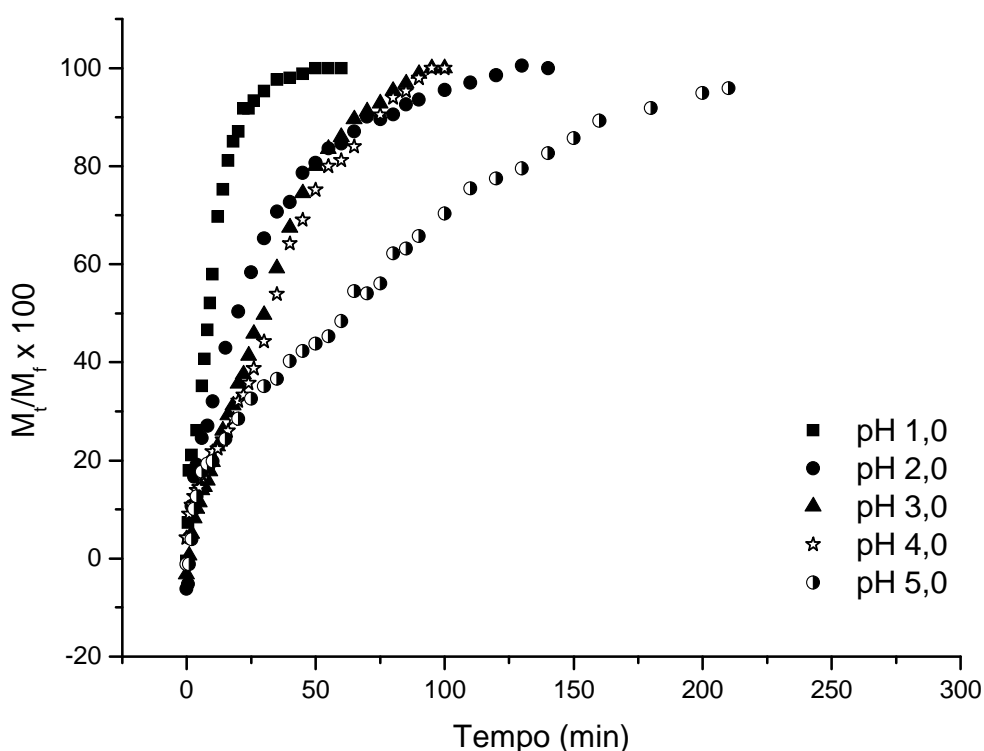


Figura 12. Perfil de liberação do corante antocianina para as microesferas de quitosana impregnadas em pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0, a 25°C.

O tempo necessário para liberação de 50% do corante nos valores de pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 é apresentado na Tabela 3.

Observa-se, na Figura 13 e na Tabela 3, que conforme aumenta o pH a liberação torna-se mais lenta, ou seja, a liberação do corante antocianina a partir da matriz de quitosana impregnada foi mais rápida em pH 1,0 e mais lenta em pH 5,0. A quantidade de corante incorporado nas microesferas de quitosana impregnadas com corante foi de 113,2 mg g⁻¹.

Tabela 3. Tempo necessário para liberação de 50% do corante a partir de microesferas de quitosana impregnadas.

<i>Liberação controlada do corante antocianina</i>	
Microesferas de quitosana impregnadas	
pH	Liberação de 50% do corante (min)
1	8
2	20
3	28
4	32
5	63

A liberação mais rápida em pH 1,0 pode ser atribuída ao fato de que em valores de pH baixos os grupos amino da cadeia polimérica encontram-se mais protonados o que facilita a dissolução e o intumescimento da cadeia, permitindo que o corante difunda mais rapidamente através da matriz para a solução de liberação.

5.2.1.7. Análise do mecanismo de liberação para o corante antocianina a partir das microesferas de quitosana

Recentemente, muitos são os esforços para elucidar o mecanismo de liberação de ingredientes ativos a partir de matrizes hidrofílicas^[93-96].

O processo de liberação de solutos a partir de matrizes hidrofílicas normalmente é analisado utilizando a Equação 3, a fim de caracterizar o mecanismo predominante durante a liberação^[97].

$$M_t/M_f = k' \cdot t^n \quad \text{Equação 3}$$

onde M_t/M_f é a fração do corante liberado no tempo t , k' é uma constante que incorpora características da matriz polimérica e n é o coeficiente difusional, cujo valor fornece informações sobre o mecanismo de liberação de ingredientes a partir da matriz polimérica.

De acordo com os critérios para cinética de liberação de solutos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, um valor de $n \leq 0,43$ indica que o mecanismo de liberação observado é de difusão do soluto através de camadas da matriz, conhecido como mecanismo de liberação Fickiano ou “Caso I”. Um valor de $n = 0,85$ indica que a liberação do soluto é controlada apenas pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica, ou seja, independente do tempo, conhecido como “Caso II” de transporte. Quando $0,43 < n < 0,85$ se obtém um transporte não-Fickiano, onde ocorre a superposição dos dois fenômenos, sendo a liberação controlada pela difusão e pelo intumescimento. Para valores de $n > 0,85$ tem-se um Super Caso II de transporte, ocorrendo a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica [98, 99].

A partir da linearização da Equação 3, constrói-se gráfico de $\ln M_t/M_f$ em função de $\ln t$, obtendo-se o expoente difusional n . Os dados de liberação do corante antocianina foram avaliados para $M_t/M_f < 0,60$. A Tabela 4, apresenta o coeficiente difusional das microesferas de quitosana impregnadas com o corante antocianina para os valores de pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0.

Tabela 4. Coeficiente difusional n para a liberação do corante antocianina a partir de microesferas de quitosana impregnadas.

<i>Microesferas quitosana impregnadas</i>		
pH	n	r
1	0,66	0,9928
2	0,63	0,9951
3	0,82	0,9979
4	0,54	0,9808
5	0,61	0,9700

Para as microesferas de quitosana impregnadas com o corante antocianina o valor do coeficiente difusional ficou entre 0,54 e 0,82 para todos os valores de pH, indicando um transporte não-Fickiano ou anômalo, onde a liberação ocorre por meio da superposição dos mecanismos de difusão e intumescimento.

Como visto anteriormente, as microesferas de quitosana impregnadas com o corante antocianina apresentaram um valor significativo de grau de intumescimento (Tabela 3). A partir destes dados e da análise do mecanismo de liberação pode-se concluir que as microesferas intumescem em solução e, através do processo de difusão liberam o corante.

5.2.2. Estudos de adsorção do corante natural antocianina em microesferas de quitosana/alginato

A fim de verificar a eficiência da matriz polimérica quitosana/alginato como agente encapsulante do corante antocianina foram realizados inicialmente estudos de adsorção do corante em microesferas de quitosana/alginato, na faixa de pH 1,0 a 6,0.

5.2.2.1. Dependência do pH na adsorção do corante

O efeito do pH na adsorção do corante natural antocianina em microesferas de quitosana/alginato está representado na Figura 13. A análise dos dados permite observar baixa adsorção do corante em pH 1,0 e máxima em pH 2,0, sendo observada uma diminuição na capacidade de adsorção com o aumento do pH, a partir do pH 3,0.

O cátion flavílio presente na estrutura de antocianinas tem boa estabilidade somente em baixos valores de pH, em pH em torno de 4 ~ 5 o cátion transforma-se em uma pseudo base ou carbinol incolor, em pH 6 ~ 7 transforma-se em uma base quinoidal azul e em pH acima de 8 em uma chalcona incolor, todos com baixa estabilidade. A alta capacidade de adsorção em pH 2,0 pode ser causada pela complexação do cátion flavílio das antocianinas com a matriz polimérica de quitosana/alginato de sódio, prevenindo sua transformação em suas formas menos estáveis.

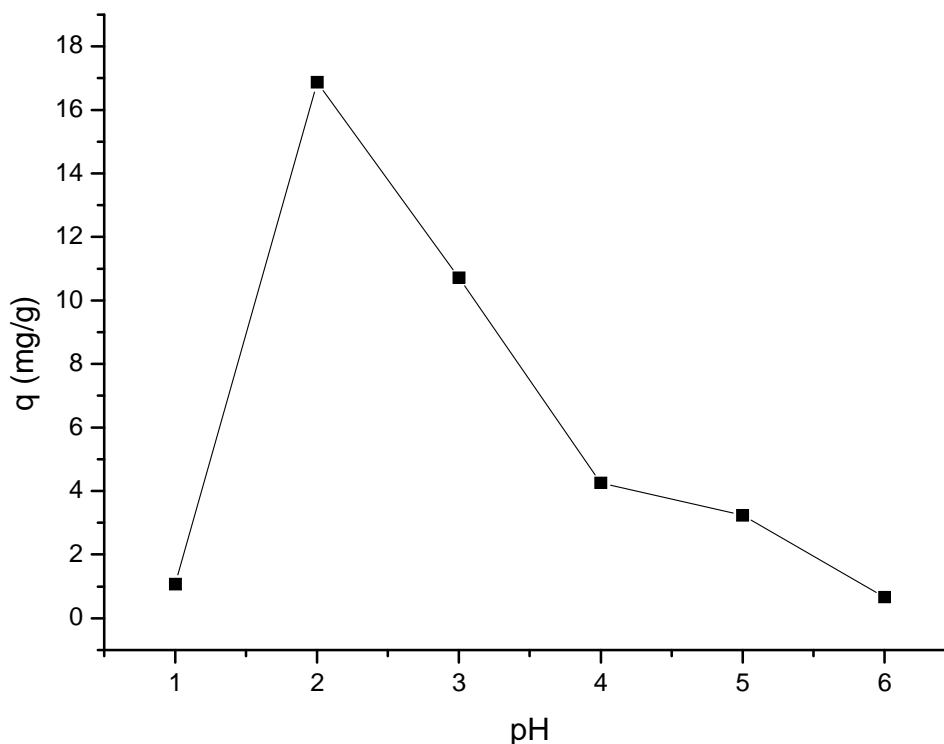


Figura 13. Dependência do pH para a adsorção do corante antocianina, utilizando microesferas de quitosana/alginato, $T = 25 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $C_0 = 400 \text{ mg L}^{-1}$, tempo de contato = 2 horas.

5.2.2.2. Cinética de adsorção do corante antocianina

Utilizando o pH ótimo de adsorção ($\text{pH} = 2$) foi realizada a cinética de adsorção a fim de se determinar o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio. A Figura 14 apresenta o decaimento da concentração do corante em função do tempo, sendo ilustrada a variação das concentrações de corante na fase líquida em função do tempo de contato com o adsorvente. Foi observado para a cinética de adsorção, um decaimento rápido da concentração nas primeiras horas sendo o equilíbrio atingido em torno de 6 horas.

Para avaliar o mecanismo cinético que controla o processo de adsorção, os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e difusão intrapartícula foram testados, sendo que a validade dos modelos pode ser verificada pela análise das equações lineares: $\log(q_e - q_t)$ vs. t , (t/q_t) vs. t e q_t vs. $t^{0,5}$, respectivamente. Uma boa correlação dos dados cinéticos justifica a escolha do mecanismo de adsorção do corante na fase sólida [100-102].

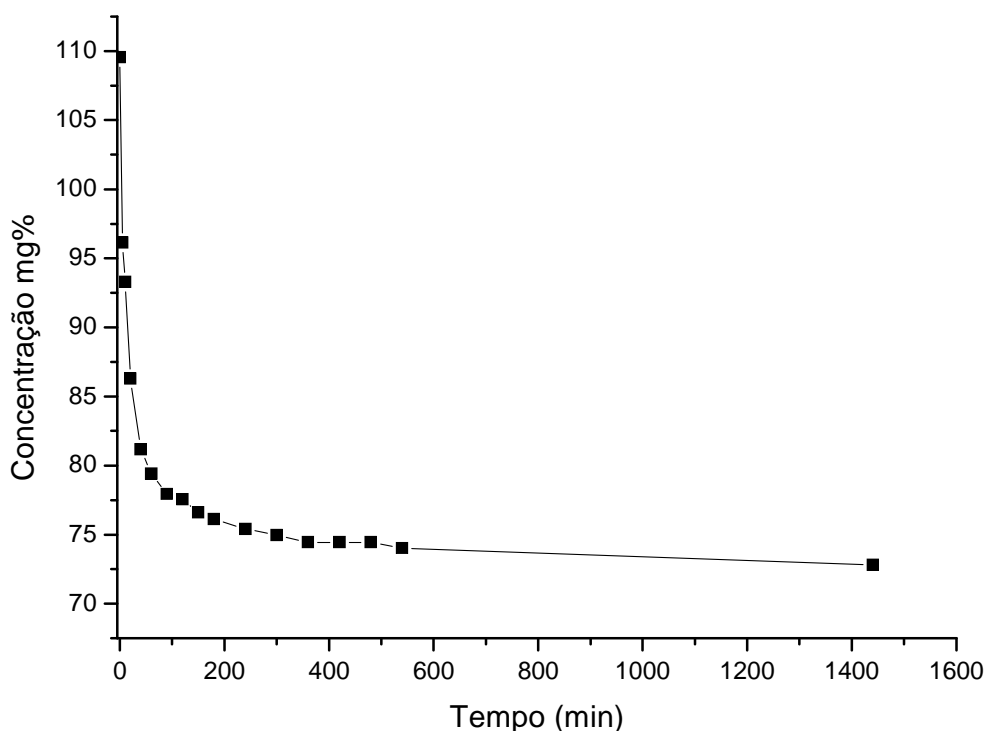


Figura 14. Cinética de adsorção do corante antocianina: (■) pH 2,0; T = 25 ± 0,1°C, C_o = 1200 mg L⁻¹, tempo de contato = 24 horas.

Um processo de pseudo-primeira ordem pode ser avaliado pela Equação 4 ^[100]:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,03} \cdot t \quad \text{Equação 4}$$

onde k_1 (min⁻¹) é a constante de velocidade da adsorção de pseudo-primeira ordem; q_t é a quantidade adsorvida no tempo t (min) e q_e denota a quantidade adsorvida no equilíbrio, ambas em mg g⁻¹. O gráfico de $\log(q_e - q_t)$ em função de t fornece os valores de k_1 e q_e . O coeficiente de correlação obtido ($R = 0,9210$) não reflete uma boa linearidade. Quando q_e experimental e o q_e calculado foram comparados, o valor experimental teve um desvio de 59 %.

Um processo de pseudo-segunda ordem baseado na capacidade de adsorção no equilíbrio, pode ser expresso pela Equação 5 ^[100-101]:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} \cdot t \quad \text{Equação 5}$$

onde k_2 (g mg⁻¹ min⁻¹) é a constante de velocidade de adsorção de pseudo-segunda ordem. A partir do intercepto e da inclinação da reta do gráfico (t/q_t) em função de t , os valores de k_2 e q_e podem ser obtidos. O gráfico mostrou uma excelente

linearidade ($R = 0,9999$) com uma constante de velocidade (k_2) igual a $9,7319 \times 10^{-4} \text{ g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Uma comparação entre o valor de q_e experimental ($q_e = 61,248 \text{ mg g}^{-1}$) e o obtido a partir do coeficiente angular da reta ($q_e = 61,614 \text{ mg g}^{-1}$) mostrou uma boa concordância com um desvio de 0,59 %.

O modelo cinético de difusão intrapartícula proposto por Weber & Morris ^[102], consiste em um modelo simples no qual a velocidade de difusão intrapartícula pode ser obtida a partir da Equação 6 ^[102]:

$$q_t = k \cdot t^{0,5} \quad \text{Equação 6}$$

Quando a difusão intrapartícula controla o processo cinético de adsorção, o gráfico de q_t versus $t^{0,5}$ fornece uma reta passando pela origem e o coeficiente angular fornece a constante de velocidade k . O gráfico de q_t versus $t^{0,5}$ forneceu um coeficiente de correlação pobre ($R = 0,7583$) e a reta não passa pela origem como proposto pela equação, indicando que a difusão intrapartícula não é o fator determinante no processo cinético.

Com base na análise dos modelos cinéticos testados, pode-se verificar que o mecanismo de adsorção do corante antocianina em microesferas de quitosana/alginate segue uma cinética de pseudo-segunda ordem, evidenciando uma quimiossorção como etapa determinante do mecanismo de adsorção e não uma transferência de massa em solução. Sendo, desta forma, a velocidade de adsorção dependente dos sítios de adsorção livres na superfície do adsorvente e da quantidade de corante adsorvido no equilíbrio.

5.2.2.3. Isoterma de adsorção do corante antocianina

A razão entre a concentração do adsorvato na fase sólida e a concentração de equilíbrio na fase aquosa, a temperatura constante, é denominada de isoterma de adsorção ou de equilíbrio ^[103].

A Figura 15 mostra a curva da quantidade adsorvida de corante em função da concentração do corante em equilíbrio. Esta relação mostrou que a capacidade de adsorção aumenta com a concentração de equilíbrio do corante na solução, alcançando progressivamente a saturação do adsorvente.

A isoterma de Langmuir é o modelo mais conhecido e empregado para determinar os parâmetros de adsorção. Esta isoterma considera a superfície do adsorvente como homogênea com sítios idênticos de energia ^[104]. O modelo matemático que a interpreta é representado pela Equação 7:

$$q = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad \text{Equação 7}$$

onde, q é a quantidade adsorvida (mg g^{-1}), K_L é a constante de equilíbrio de adsorção (constante de Langmuir); C_e é a concentração de corante no equilíbrio (mg L^{-1}) e q_m é a capacidade máxima de adsorção (mg g^{-1}).

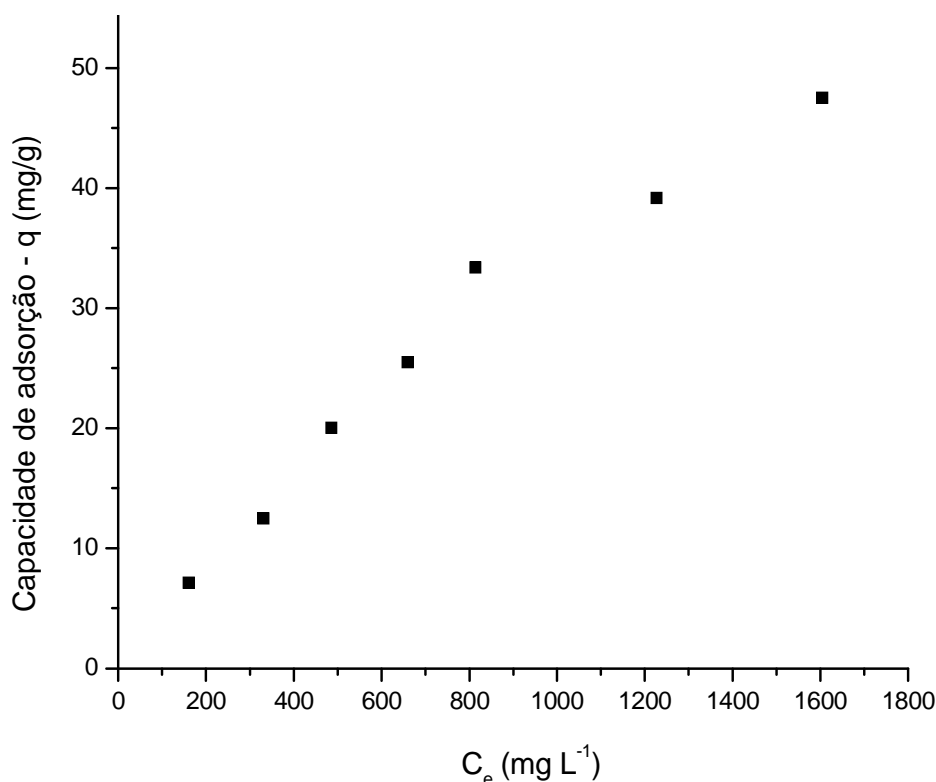


Figura 15. Isoterma de adsorção do corante natural antocianina a $T = 25 \pm 0,2$ °C, $\text{pH} = 2,0$ e tempo de contato de 6h.

Os parâmetros de adsorção podem ser determinados transformando a equação de Langmuir para a forma linear (Equação 8).

$$\frac{C_e}{q} = \frac{1}{K_L \cdot q_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad \text{Equação 8}$$

A partir dela pode-se obter os dois parâmetros de adsorção da isoterma de Langmuir, K_L constante de Langmuir ($3,867 \times 10^{-4} \text{ L mg}^{-1}$) e a capacidade máxima de adsorção do corante antocianina em microesferas de quitosana/alginato, q_m . O valor determinado da capacidade máxima de saturação da monocamada do adsorvente foi 123,61 mg de corante por grama de adsorvente. A equação da reta obtida ($y = 8,09 \cdot 10^{-3}x + 20,92$), apresentou um coeficiente de correlação de 0,9942, mostrando uma boa adequação ao modelo de Langmuir.

5.2.3. Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana/alginato por meio das técnicas de impregnação e coacervação

Após os estudos de adsorção do corante natural antocianina, o mesmo foi microencapsulado em matriz polimérica de quitosana/alginato por meio das técnicas de impregnação e coacervação. As análises da morfologia, de espectroscopia de infravermelho, de estabilidade térmica dos produtos formados e estudos de liberação serão discutidas a seguir.

5.2.3.1. Caracterização das microesferas de quitosana/alginato com e sem corante por Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A Figura 16 apresenta os espectros de infravermelho dos biopolímeros quitosana e alginato de sódio, das microesferas de quitosana/alginato, das microesferas de quitosana/alginato impregnadas, das microesferas de quitosana/alginato coacervadas e do corante antocianina. As análises dos espectros da quitosana (Figura 16-a) e do corante (Figura 16-f) já foram discutidas no item 5.2.1.1, portanto neste item serão analisados somente os espectros do alginato de sódio, das microesferas de quitosana/alginato e das microesferas de quitosana/alginato impregnadas e coacervadas.

O espectro de infravermelho do alginato de sódio (Figura 16-b) mostra uma banda em torno de 3446 cm^{-1} referente ao estiramento dos grupos OH, banda em

2931 cm^{-1} referente aos estiramentos de ligações C–H, duas bandas em 1610 cm^{-1} e 1418 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo COO^- , respectivamente [66], um pico fino em torno de 1032 cm^{-1} referente ao grupo C–O–C e a banda em 818 cm^{-1} referente ao estiramento C–O.

No espectro de infravermelho das microesferas de quitosana/alginato (Figura 16-c) observa-se um alargamento da banda em aproximadamente em 3445 cm^{-1} que pode estar relacionado a interações do tipo ligações de hidrogênio entre a quitosana e o alginato de sódio [71] e o desaparecimento da banda em aproximadamente 1601 cm^{-1} referente ao grupo NH_2 da quitosana, indicando que ocorrem interações entre o grupo amino da quitosana e carboxilato do alginato de sódio.

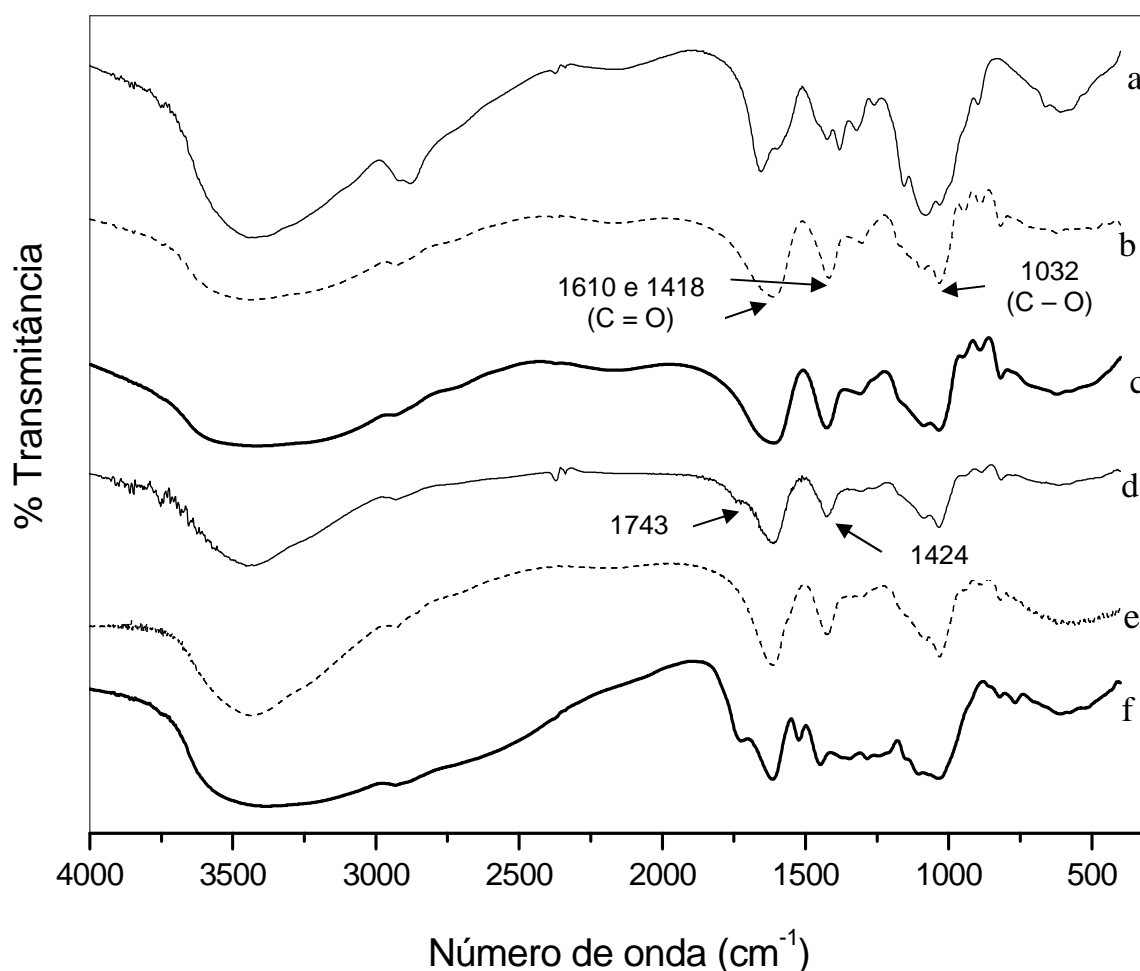


Figura 16. Espectro de infravermelho: a) quitosana, b) alginato de sódio, c) microesfera de quitosana/alginato, d) microesfera de quitosana/alginato impregnada com corante, e) microesfera de quitosana/alginato coacervada e f) corante natural antocianina.

O espectro de infravermelho das microesferas de quitosana/alginato impregnadas com corante antocianina (Figura 16-d) apresenta bandas características de grupos da matriz polimérica e do corante como em 3425 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações OH; em 2929 cm^{-1} referente aos estiramentos de ligações C–H; em 1743 cm^{-1} referente à carbonila de éster do corante; em 1609 cm^{-1} relacionada ao estiramento do grupo carbonila; em 1424 cm^{-1} deslocada em 6 cm^{-1} em relação ao espectro do alginato de sódio e uma pequena banda em 1310 cm^{-1} que não existe no espectro do alginato de sódio, mas está presente no espectro da quitosana (1322 cm^{-1}) e pode estar relacionada aos estiramentos do grupos NH_2 da quitosana.

A análise do espectro de infravermelho das microesferas de quitosana/alginato coacervadas (Figura 16-e) mostra bandas características de grupos da matriz polimérica e do corante.

As observações dos espectros das microesferas de quitosana/alginato com e sem corante sugerem uma possível interação entre os biopolímeros quitosana e alginato de sódio e entre a matriz polimérica e o corante.

5.2.3.2. Análise da morfologia das microesferas de quitosana/alginato com e sem corante utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com o objetivo de avaliar a morfologia e o tamanho de distribuição de partícula do material formado durante a microencapsulação do corante antocianina em matriz polimérica de quitosana/alginato.

A Figura 17 apresenta as imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura, as quais foram reveladas a partir de populações mistas de microesferas.

De um modo geral, as microesferas de quitosana/alginato (Figura 17-a), quitosana/alginato impregnadas (Figura 17-d) e quitosana/alginato coacervadas (Figura 17-g) apresentaram-se com boa esfericidade. A estrutura externa das microesferas com e sem corante mostrou-se bastante rugosa e sem fissura ou porosidade aparente, indicando a formação de um filme contínuo na parede.

A incorporação do corante nas microesferas tornou a superfície das microesferas impregnadas (Figura 17-f) e das microesferas coacervadas (Figura 17-i) mais rugosa quando comparadas com a superfície das microesferas sem corante (Figura 17-c).

A análise das secções transversais das microesferas (Figuras 17-b, 17-e e 17-h) permite observar a ausência de poros ou fissuras no interior das microesferas.

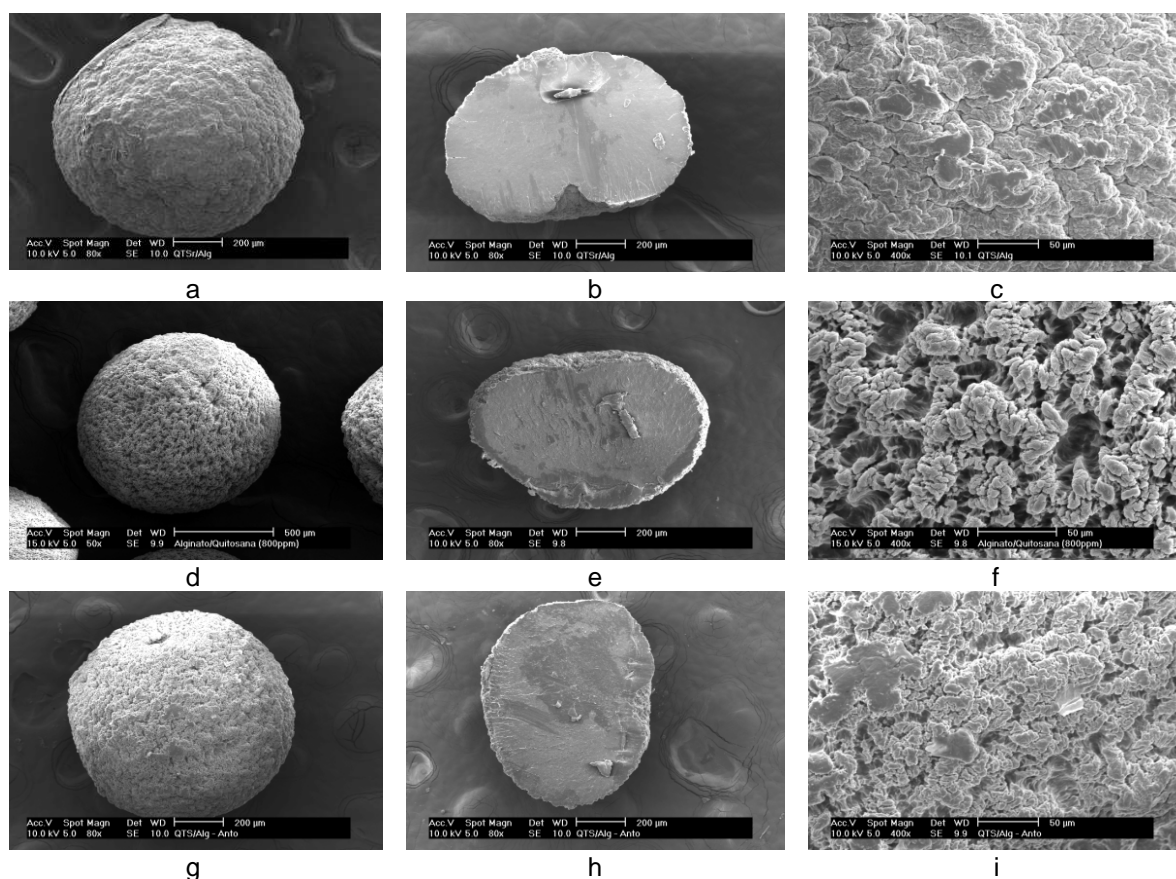


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura: a) microesfera de quitosana/alginate, b) microesfera de quitosana/alginate – corte, c) microesfera de quitosana/alginate – superfície, d) microesfera de quitosana/alginate impregnada, e) microesfera de quitosana/alginate impregnada – corte, f) microesfera de quitosana/alginate impregnada – superfície, g) microesfera de quitosana/alginate coacervada, h) microesfera de quitosana/alginate coacervada – corte e i) microesfera de quitosana/alginate coacervada – superfície.

O diâmetro médio das microesferas ficou em 973 μm para as microesferas de quitosana/alginate, 1026 μm para as microesferas de quitosana/alginate

impregnadas e 982 μm para as microesferas de quitosana/alginato coacervadas.

As análises de microscopia eletrônica de varredura das microesferas contendo corante indicam que o corante está dissolvido por toda a matriz polimérica, sugerindo uma microencapsulação eficiente do corante antocianina, tanto através da impregnação como da coacervação.

5.2.3.3. Análise Termogravimétrica (TGA) de microesferas de quitosana/alginato

Foram realizadas análises termogravimétricas (Figura 18) para a quitosana, o alginato de sódio, a antocianina, as microesferas de quitosana/alginato, as microesferas de quitosana/alginato impregnadas e as microesferas de quitosana/alginato coacervadas. A Tabela 5 fornece os estágios de perda de massa das amostras que foram analisadas.

Os dados de análise termogravimétrica para a quitosana (Figura 18-a) e para o corante natural antocianina (Figura 18-c) já foram discutidos no item 5.2.1.3, portanto neste item serão analisadas somente as curvas do alginato de sódio, das microesferas de quitosana/alginato e das microesferas de quitosana/alginato impregnadas e das microesferas de quitosana/alginato coacervadas.

A partir da Tabela 5 e da Figura 18, é possível observar que todas as amostras analisadas apresentaram um estágio inicial de perda de massa entre aproximadamente 60 e 110 $^{\circ}\text{C}$, referente à perda de umidade presente na amostra, com redução de aproximadamente 5,5 a 18% de massa. Esse estágio inicial está relacionado com o fato de os biopolímeros e o corante terem natureza hidrofílica, retendo em sua estrutura moléculas de água, que são liberadas com o aquecimento das amostras ^[72, 105].

O alginato de sódio (Figura 18-b) apresenta mais dois estágios de perda de massa além do estágio de desidratação, sendo um em torno de 273 $^{\circ}\text{C}$, com redução de aproximadamente 34% de massa, que é o estágio principal de degradação do polímero e o outro em torno de 431 $^{\circ}\text{C}$, com redução de aproximadamente 12% de massa, que representa a redução do material remanescente em resíduos de carbono ^[106].

As microesferas de quitosana/alginato (Figura 18-f) apresentam três estágios

de perda de massa, além do estágio inicial de desidratação, em aproximadamente 238 (relativo ao alginato de sódio), 324 (relativo à quitosana) e 461 °C, com redução de aproximadamente 17, 16 e 10% de massa, respectivamente.

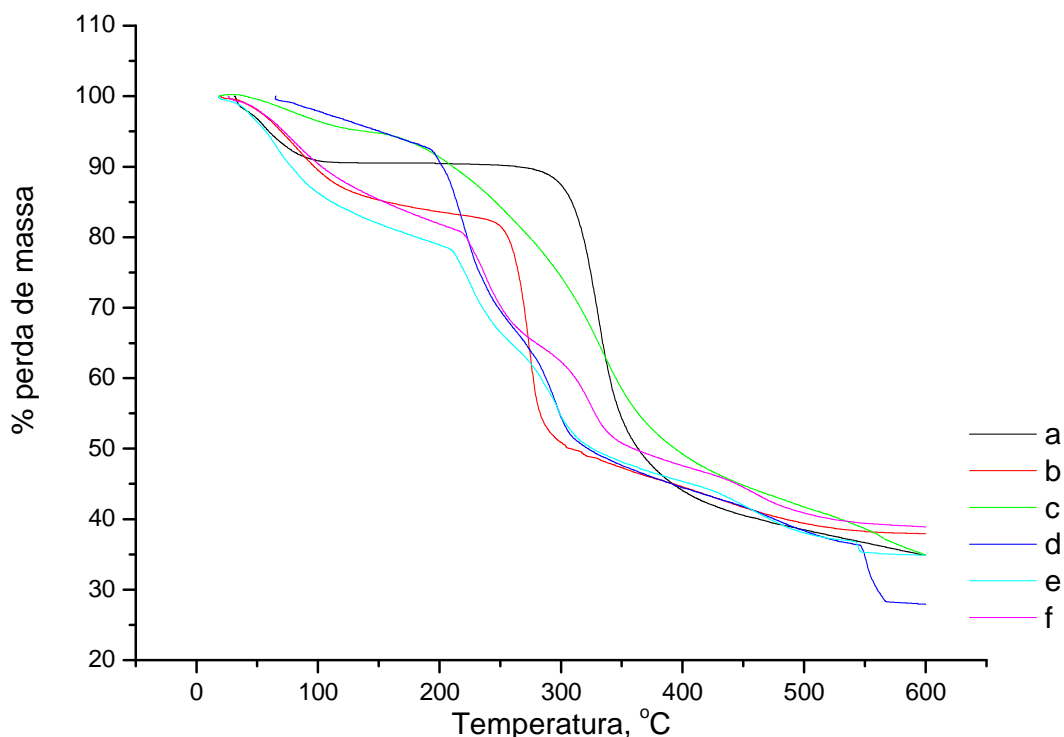


Figura 18. Análise termogravimétrica (TGA): a) quitosana, b) alginato de sódio, c) corante natural antocianina, d) microesfera de quitosana/alginato impregnada, e) microesfera de quitosana/alginato coacervada e f) microesfera de quitosana/alginato.

As microesferas de quitosana/alginato impregnadas (Figura 18-d) apresentaram quatro estágios de perda de massa, além do estágio de desidratação, em aproximadamente 220, 293, 469 e 553 °C, com redução de aproximadamente 26, 30, 6 e 8% de massa, respectivamente, correspondentes a processos complexos incluindo, a desidratação dos anéis sacarídicos, despolimerização e decomposição do alginato de sódio e das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana ^[107].

As microesferas de quitosana/alginato coacervadas (Figura 18-e) apresentaram também quatro estágios de perda de massa, além do estágio de desidratação, em aproximadamente 224, 295, 457, 545 °C, com redução de aproximadamente 16, 19, 6 e 8% de massa, respectivamente.

Tabela 5. Estágios de perda de massa obtidos através de análise termogravimétrica (TGA) da quitosana, do alginato de sódio, do corante antocianina, das microesferas de quitosana/alginato, das microesferas de quitosana/alginato impregnadas e das microesferas de quitosana/alginato coacervadas.

	1° <i>Estágio</i>	2° <i>Estágio</i>	3° <i>Estágio</i>	4° <i>Estágio</i>	5° <i>Estágio</i>
Quitosana	53,33°C	330,15°C			
Alginato de sódio	79,04°C	273,22°C	431,34°C		
Microesfera de quitosana/alginato	79,82°C	237,87°C	323,67°C	461,32°C	
Corante antocianina	77,71°C	332,70°C			
Microesfera impregnada	72,21°C	219,75°C	293,62°C	469,01°C	553,67°C
Microesfera coacervada	62,38°C	224,42°C	294,92°C	457,16°C	544,93°C

A partir dos resultados obtidos nas análises termogravimétricas é possível concluir que as microesferas de quitosana/alginato impregnadas e coacervadas apresentaram menor estabilidade térmica em relação aos materiais de partida.

5.2.3.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) de microesferas de quitosana/alginato

Foram realizadas análises de calorimetria diferencial de varredura (Figura 19) para a quitosana, o alginato de sódio, o corante natural antocianina, as microesferas de quitosana/alginato, as microesferas de quitosana/alginato impregnadas e as microesferas de quitosana/alginato coacervadas.

Os dados de calorimetria diferencial de varredura para a quitosana (Figura 19-a) e para o corante natural antocianina (Figura 19-f) já foram discutidos no item 5.2.1.4, portanto neste item serão analisadas somente as curvas do alginato de sódio, das microesferas de quitosana/alginato e das microesferas de quitosana/alginato impregnadas e coacervadas.

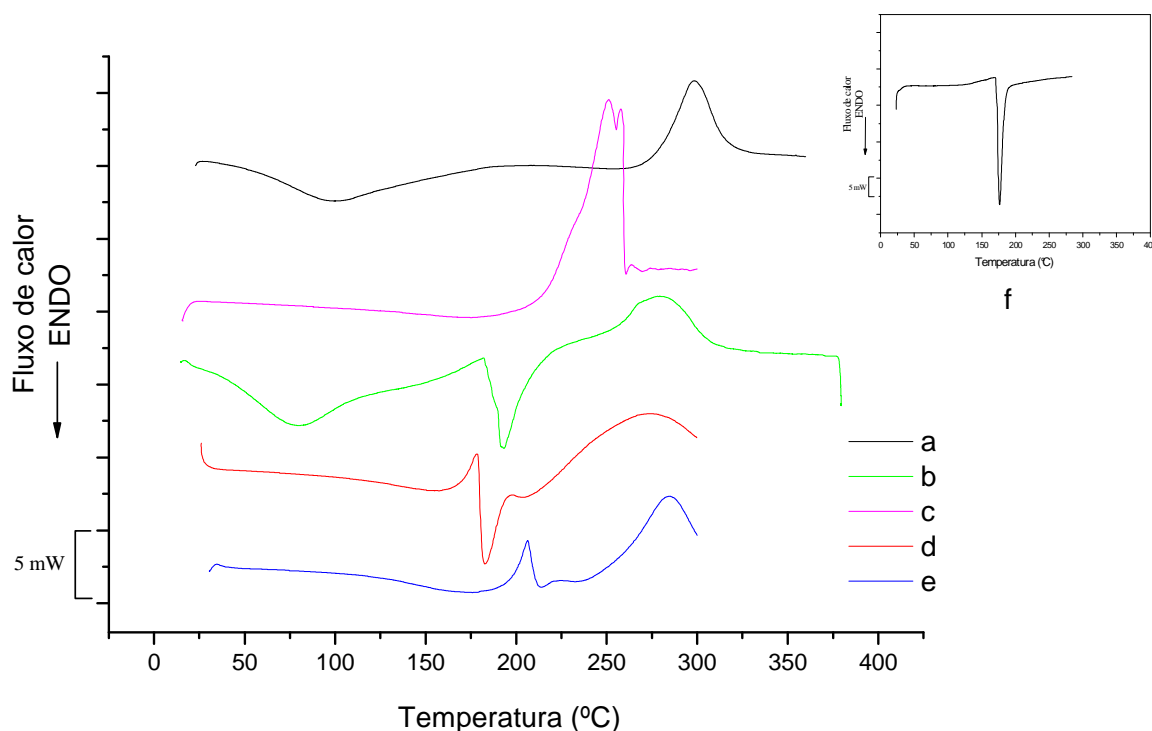


Figura 19. Calorimetria diferencial de varredura (DSC): a) quitosana, b) microesfera de quitosana/alginato, c) alginato de sódio, d) microesfera de quitosana/alginato impregnada, e) microesfera de quitosana/alginato coacervada e f) corante natural antocianina.

O termograma do alginato de sódio (Figura 19-c) apresenta dois picos exotérmicos em aproximadamente 250 e 259 °C, referentes à degradação do polímero.

A curva de calorimetria diferencial de varredura para as microesferas de quitosana/alginato (Figura 19-b) mostra dois picos endotérmicos em aproximadamente 70 e 193 °C, sendo que o primeiro está relacionado à eliminação de umidade presente na amostra e o segundo pode estar relacionado a interações eletrostáticas entre o grupo amino da quitosana e o grupo carboxilato do alginato de sódio [71]. Pode-se observar também, a presença de um pico exotérmico largo, intermediário aos picos de degradação da quitosana e do alginato de sódio, por volta de 278°C, que pode ser atribuído à degradação dos polímeros. A análise dos dados de calorimetria diferencial de varredura para as microesferas de quitosana/alginato indica uma possível formação de complexo entre a quitosana e o alginato de sódio, através de interações entre os grupos amino da quitosana e carboxilato do alginato

de sódio.

A curva de calorimetria diferencial de varredura para as microesferas de quitosana/alginato impregnadas (Figura 19-d) apresenta um pico exotérmico em aproximadamente 179 °C que pode estar relacionado à presença do corante na amostra, um pico endotérmico em aproximadamente 183 °C que pode estar relacionado às interações entre a quitosana e o alginato de sódio e um pico exotérmico em aproximadamente 275 °C que pode ser atribuído à degradação dos polímeros. A análise dos dados de calorimetria diferencial de varredura para as microesferas de quitosana/alginato impregnadas com corante sugere que ocorrem interações entre a matriz polimérica de quitosana/alginato e o corante antocianina.

O termograma para as microesferas de quitosana/alginato coacervadas (Figura 19-e) apresenta um pico exotérmico em aproximadamente 206 °C que pode estar relacionado à presença do corante na amostra e um pico exotérmico, intermediário aos picos de degradação da quitosana e do alginato de sódio, em aproximadamente 285 °C que pode ser atribuído à degradação dos polímeros. A análise dos dados de calorimetria diferencial de varredura para as microesferas de quitosana/alginato coacervadas com corante também indica a possibilidade de ocorrência de interações entre a matriz polimérica de quitosana/alginato e o corante antocianina.

Os dados de DSC estão concordantes com os dados de infravermelho, indicando que a interação entre os biopolímeros na formação das microesferas se dá, possivelmente, através de interações entre os grupos carboxilato do alginato de sódio e amino da quitosana e que o corante antocianina está presente nas amostras através de interação com a matriz polimérica quitosana/alginato.

5.2.3.5. Determinação do grau de intumescimento (GI%) das microesferas de quitosana/alginato

A Tabela 6 apresenta o grau de intumescimento e o tempo necessário para as microesferas de quitosana/alginato impregnadas e coacervadas com o corante antocianina atingirem o grau de intumescimento máximo.

A análise dos dados apresentados permite observar que o intumescimento das microesferas impregnadas e coacervadas aumenta com o aumento do pH,

sendo que o intumescimento máximo é alcançado em pH 5,0. O tempo para se atingir o grau máximo de intumescimento também aumenta com o valor do pH, sendo mais alto em pH 4,0. As microesferas coacervadas apresentaram um maior grau de intumescimento em relação às microesferas impregnadas e o tempo necessário para atingir o grau máximo de intumescimento também foi maior para estas microesferas.

Tabela 6. Grau de intumescimento das microesferas de quitosana/alginate impregnadas e das microesferas de quitosana/alginate coacervadas.

<i>Grau de intumescimento (GI%)</i>				
	Microesferas impregnadas		Microesferas coacervadas	
pH	Tempo* (minutos)	GI%	Tempo* (minutos)	GI%
1	5	66,95	25	94,73
2	60	64,76	40	189,39
3	120	168,43	230	1046,52
4	470	496,24	480	2137,47
5	330	1039,81	400	2278,17

* Tempo para obtenção das microesferas com massa constante

Segundo Mi et al. (2002) ^[108] e Xu et al. (2007) ^[109] o intumescimento de microesferas de quitosana/alginate em baixos valores de pH é devido a protonação dos grupos amino primários da quitosana, com o aumento do pH ocorre um aumento no intumescimento das microesferas pois os grupos carboxilatos do alginate que não estão reticulados com Ca^{2+} ou interagindo com a quitosana, são ionizados e também absorvem água, o que resulta em um alto grau de intumescimento.

5.2.3.6. Estudos de liberação do corante natural antocianina a partir de microesferas de quitosana/alginate

A curva de liberação do corante a partir de microesferas de quitosana/alginate impregnadas (Figura 20) apresenta um gráfico da fração de corante liberado ($M_t/M_f \times 100$) em função do tempo, sendo M_t a quantidade de corante liberado no tempo t e

M_f a quantidade de corante liberado no tempo final ou infinito.

Observa-se na Figura 20 que a liberação do corante começa imediatamente após o contato das microesferas com a solução tampão e que todo o corante é liberado a partir da matriz polimérica de quitosana/alginate impregnada em menos de três horas para todos os valores de pH.

O tempo necessário para liberação de 50% do corante nos valores de pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 é apresentado na Tabela 7. Observa-se, na Figura 20 e na Tabela 7, que com o aumento do pH a liberação torna-se mais rápida.

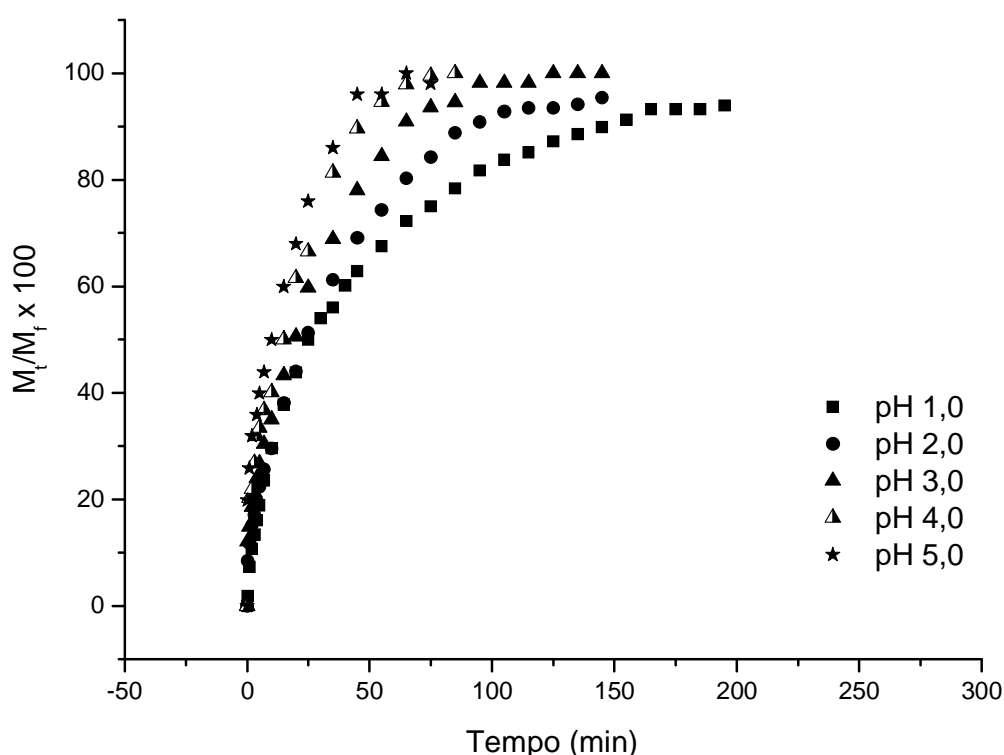


Figura 20. Perfil de liberação do corante antocianina para as microesferas de quitosana/alginate impregnadas, à 25°C, em pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0.

Em relação às microesferas de quitosana/alginate coacervadas as microesferas de quitosana/alginate impregnadas tiveram uma velocidade de liberação maior. O aspecto geral da curva de liberação do corante antocianina a partir de microesferas de quitosana/alginate coacervadas está representado na Figura 21.

Observa-se na Figura 21 que a liberação do corante em todos os valores de pH, começa imediatamente após o contato das microesferas com a solução tampão e que todo o corante é liberado a partir da matriz polimérica de quitosana/alginate

coacervada em menos de três horas, independente do valor do pH.

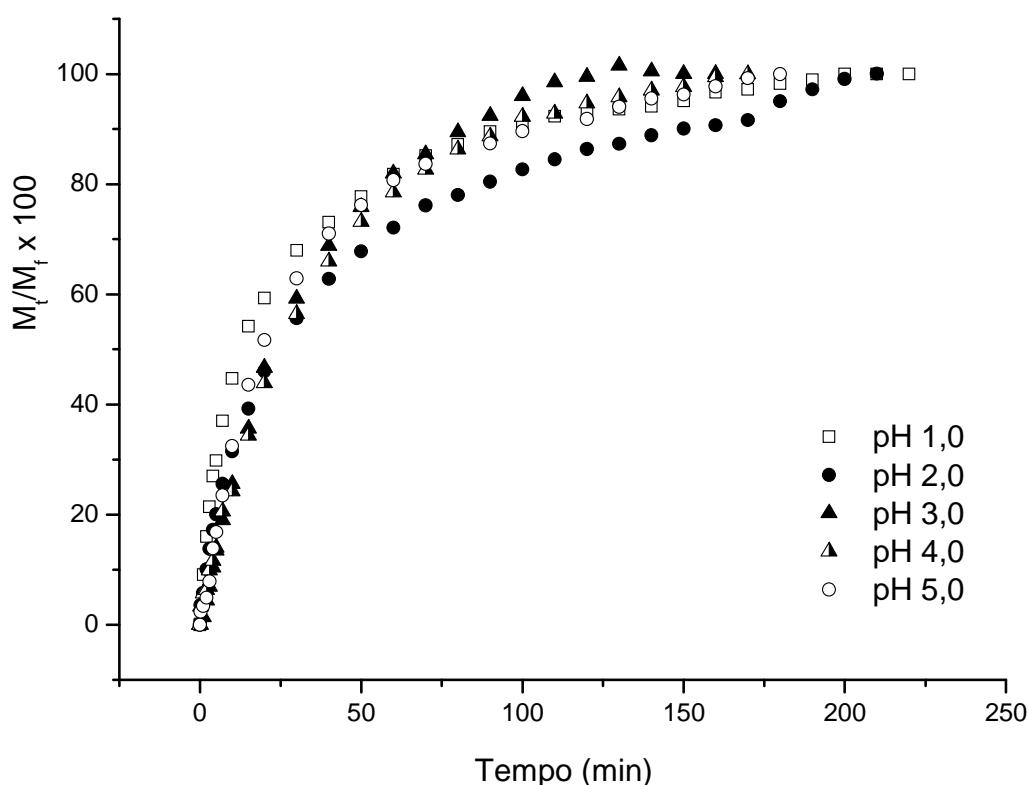


Figura 21. Perfil de liberação do corante antocianina para as microesferas de quitosana/alginate coacervadas, a 25°C, em pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0.

O tempo necessário para liberação de 50% do corante nos valores de pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 é apresentado na Tabela 7. Observa-se, na Figura 21 e na Tabela 7, que com o aumento do pH a liberação torna-se mais rápida. A quantidade de corante incorporado nas microesferas de quitosana/alginate coacervadas foi de 96,75 mg g⁻¹.

A liberação do corante antocianina a partir de microesferas de quitosana/alginate ocorre mais rapidamente em pH 5,0. Isso pode ser atribuído ao fato de que em valores de pH mais elevados os grupos carboxilatos da cadeia polimérica do alginate encontram-se mais desprotonados o que facilita a dissolução e o intumescimento da cadeia, permitindo que o corante difunda mais rapidamente através da matriz para o meio de liberação.

Tabela 7. Tempo necessário para liberação de 50% do corante a partir de microesferas de quitosana/alginato impregnadas e coacervadas.

<i>Liberação controlada do corante antocianina</i>		
	Microesferas impregnadas	Microesferas coacervadas
pH	Liberação de 50% do corante (min)	Liberação de 50% do corante (min)
1	25	15
2	25	25
3	20	25
4	15	25
5	10	20

5.2.3.7. Análise do mecanismo de liberação para o corante antocianina a partir das microesferas de quitosana/alginato

A partir da linearização da Equação 3, obtida através do gráfico de $\ln M_t/M_f$ em função de $\ln t$, obtém-se o expoente difusional n . Os dados de liberação do corante antocianina foram avaliados para $M_t/M_f < 0,60$. A Tabela 8, apresenta o coeficiente difusional das microesferas de quitosana/alginato impregnadas com corante antocianina e das microesferas de quitosana/alginato coacervadas para os valores de pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0.

As microesferas de quitosana/alginato impregnadas apresentaram mecanismos de liberação que foram dependentes do valor do pH. Para pH 1,0 e 2,0 o mecanismo de liberação foi do tipo não-Fickiano, onde a liberação se dá através da superposição dos mecanismos de difusão e intumescimento. Para os valores de pH 3,0, 4,0 e 5,0 o mecanismo de liberação foi do tipo Fickiano ou “Caso I”, indicando que a liberação do corante ocorre pelo mecanismo de difusão através das camadas da matriz. Apesar de as microesferas de quitosana/alginato impregnadas terem apresentado um alto grau de intumescimento (Tabela 6) nos valores de pH 3,0, 4,0 e 5,0, a análise do mecanismo de liberação indica que o intumescimento não é um fator determinante para a liberação do corante nestes valores de pH e sim o processo de difusão através da matriz polimérica.

Tabela 8. Coeficiente difusional n para a liberação do corante antocianina a partir de microesferas de quitosana/alginate impregnadas e microesferas de quitosana/alginate coacervadas.

<i>Microesferas impregnadas</i>			<i>Microesferas coacervadas</i>		
pH	n	r	pH	n	r
1	0,59	0,9986	1	0,62	0,9912
2	0,47	0,9950	2	0,64	0,9940
3	0,43	0,9940	3	1,07	0,9866
4	0,37	0,9838	4	0,74	0,9899
5	0,30	0,9898	5	0,93	0,9879

Para as microesferas de quitosana/alginate coacervadas os mecanismos de liberação também foram dependentes do valor do pH. Para os valores de pH 1,0, 2,0 e 4,0 o valor do coeficiente difusional ficou entre 0,62 e 0,74 e o mecanismo de liberação foi do tipo não-Fickiano ou anômalo, onde a liberação se dá através da superposição dos mecanismos de difusão e intumescimento. Para pH 3,0 e 5,0 o mecanismo de liberação foi do tipo Super Caso II de transporte, ocorrendo a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica.

5.2.4. Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginate através da técnica de spray drying

Com a técnica de spray drying foram preparadas micropartículas atomizadas de quitosana e quitosana/alginate contendo o corante antocianina. Análises morfológicas e determinação da quantidade de corante encapsulado foram realizadas para avaliar o efeito da temperatura de secagem no processo de atomização.

Após a determinação dos parâmetros de atomização foram realizadas análises da morfologia das micropartículas, de espectroscopia de infravermelho, de estabilidade térmica e tempo de dissolução do material produzido.

As micropartículas obtidas por este método apresentaram-se na forma de pós extremamente finos, coloridos e bastante solúveis em água.

5.2.4.1. Otimização da temperatura de secagem na atomização das microesferas de quitosana e de quitosana/alginato

Com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura de secagem na atomização das microesferas de quitosana e de quitosana/alginato, as amostras foram atomizadas nas temperaturas de 120, 140, 160 e 180 °C.

A avaliação do efeito da temperatura de secagem na morfologia das micropartículas foi feita por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo determinada também a quantidade de corante encapsulado em cada uma das diferentes temperaturas.

A Figura 22 mostra as imagens obtidas por MEV para as micropartículas de quitosana e de quitosana/alginato atomizadas nas diferentes temperaturas.

Observa-se a partir da Figura 22 que o processo de encapsulação do corante antocianina com a técnica de spray drying foi eficiente, obtendo-se partículas idealmente esféricas, sem fissuras ou quebras aparentes.

As microesferas de quitosana/alginato foram mais influenciadas, quanto à sua morfologia, com relação às mudanças de temperatura do que as microesferas de quitosana apresentando-se mais aglutinadas, rugosas e com concavidades.

A Tabela 9 apresenta a quantidade de corante incorporado nas microesferas de quitosana e de quitosana/alginato em cada uma das temperaturas de atomização.

Observa-se na Tabela 9 que a quantidade de corante incorporado nas microesferas de quitosana aumenta com o aumento da temperatura, enquanto que para as microesferas de quitosana/alginato ocorreu uma variação muito pequena na quantidade de corante incorporado em função da temperatura. Para as temperaturas de 160 e 180 °C não houve mudanças significativas na quantidade de corante incorporado nas amostras.

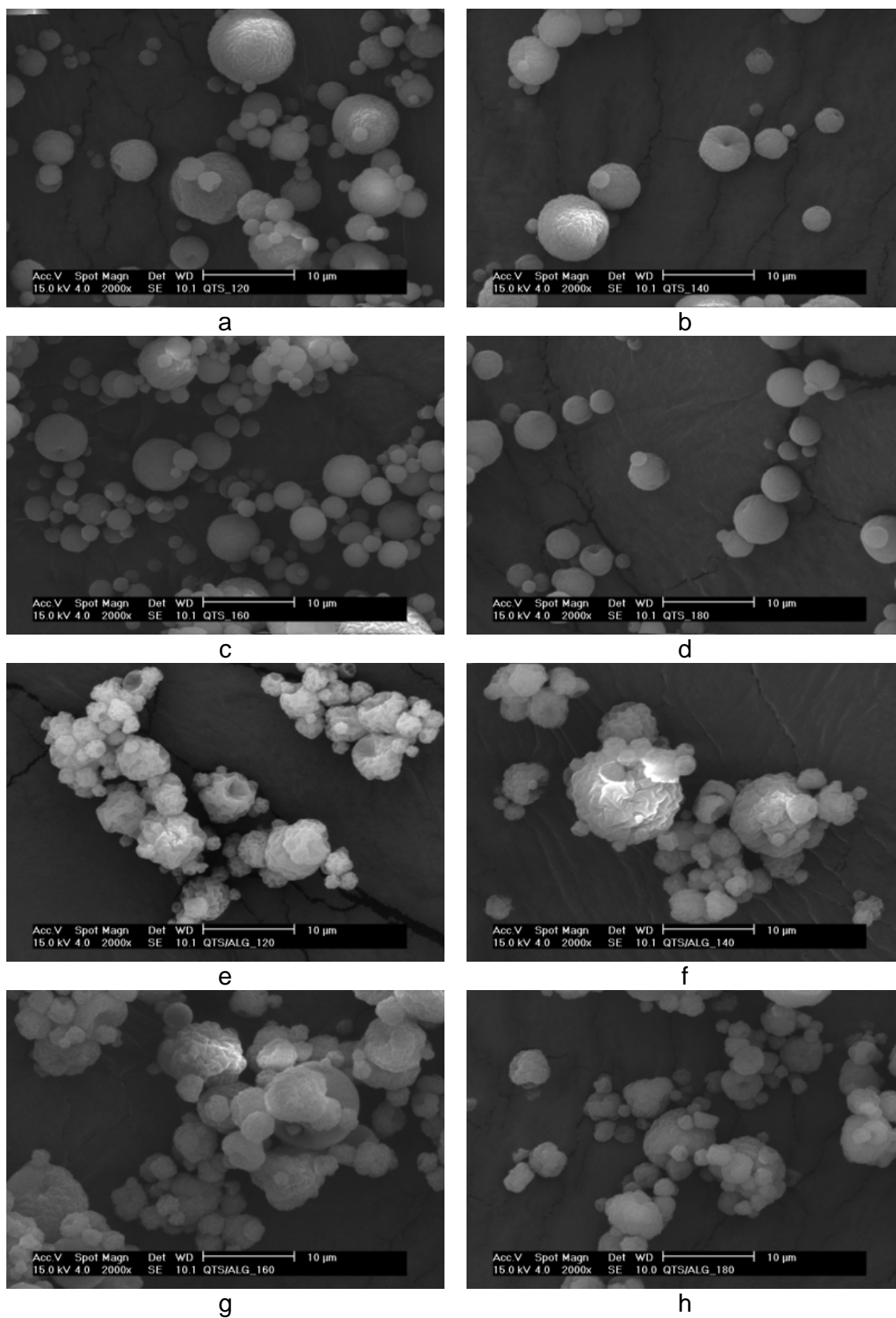


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura: microesferas de quitosana atomizadas à temperatura de a) 120 °C, b) 140 °C, c) 160 °C e d) 180 °C e microesferas de quitosana/alginato atomizadas à temperatura de e) 120 °C, f) 140

°C, g) 160 °C e h) 180 °C.

Tabela 9. Quantidade de corante antocianina incorporado nas microesferas de quitosana e quitosana/alginato preparadas através do método de spray drying.

<i>Quantidade de corante antocianina incorporado</i>		
<i>(mg / g do polímero)</i>		
Temperatura de atomização	Microesferas de quitosana	Microesferas de quitosana/alginato
120 °C	105,4	125,6
140 °C	109,4	125,0
160 °C	110,9	123,0
180 °C	113,3	123,1

Assim, baseado nos resultados de microscopia eletrônica de varredura, na quantidade de corante incorporado nas microesferas e na sensibilidade do corante frente a temperaturas elevadas, optou-se pela temperatura de 160 °C para a produção de micropartículas de quitosana e quitosana/alginato contendo o corante natural antocianina por spray drying.

Ersus e Yurdagel (2007) avaliaram o efeito da temperatura (160, 180 e 200 °C) na microencapsulação de antocianinas extraídas de black carrots com maltodextrina por meio da técnica de spray drying e chegaram a conclusão que temperaturas elevadas causavam a perda de antocianinas durante o processo de atomização. Após a avaliação da quantidade de antocianina incorporada nas amostras eles verificaram que a temperatura de 160 °C era a ideal para a atomização ^[110].

5.2.4.2. Caracterização das microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas através da técnica de spray drying por Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A Figura 23 apresenta os espectros de infravermelho dos biopolímeros

quitosana e alginato de sódio, das microesferas de quitosana e de quitosana/alginato contendo o corante e do corante antocianina. A análise dos espectros da quitosana (Figura 23-a), do alginato de sódio (Figura 23-b) e do corante (Figura 23-e) já foi feita nos itens 5.2.1.1 e 5.2.3.1, portanto aqui serão analisados somente os espectros das microesferas atomizadas.

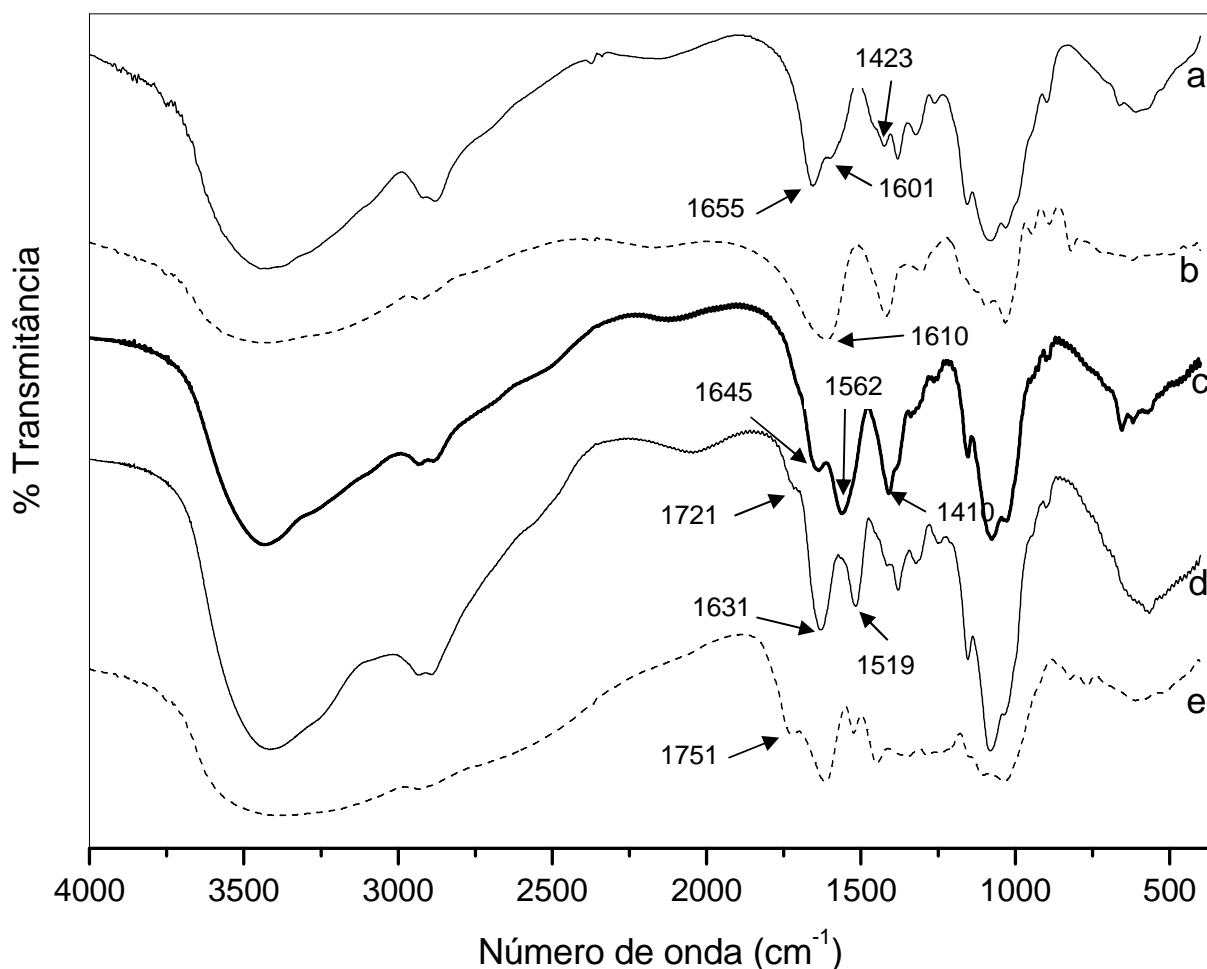


Figura 23. Espectro de infravermelho: a) quitosana, b) alginato de sódio, c) microesfera de quitosana contendo o corante, d) microesfera de quitosana/alginato contendo o corante e e) corante natural antocianina.

A Figura 23-c apresenta o espectro de infravermelho das microesferas de quitosana contendo corante preparadas por spray drying. Observa-se através do espectro que as bandas referentes aos grupamentos OH em 3426 cm⁻¹, C–O em 1158, 1077 e 1032 cm⁻¹ e CH em 2931, 2880 e 1385 cm⁻¹ não sofrem mudanças significativas quando comparadas ao espectro da quitosana pura. O pico referente

ao grupo NH_2 da quitosana, em torno de 1601 cm^{-1} , é substituído por dois outros picos referentes à NH_3^+ , em torno de 1562 e 1645 cm^{-1} . Um grande deslocamento das vibrações, comparado com os valores originais dos grupos amino, comprova a interação entre grupos $-\text{COO}^-$ presentes no solvente utilizado e o grupo NH_3^+ da quitosana na amostra [111-114].

No espectro de infravermelho das microesferas de quitosana/alginato contendo corante (Figura 23-d) é possível observar o deslocamento de 1616 cm^{-1} para 1631 cm^{-1} da banda referente ao grupo carboxilato do alginato de sódio, o desaparecimento da banda em 1601 cm^{-1} referente ao grupo NH_2 da quitosana e o aparecimento de uma banda em 1519 cm^{-1} referente ao grupo NH_3^+ . Estas alterações sugerem a formação de um complexo entre quitosana e alginato de sódio, através de ligação iônica dos grupos carboxilato do alginato com os grupos amino protonados da quitosana [111-114]. A presença do corante nas microesferas pode ser verificada através do aparecimento de uma banda em aproximadamente 1721 cm^{-1} referente à carbonila de éster do corante, a qual é observada no espectro de infravermelho do corante, Figura 23-e.

5.2.4.3. Análise da morfologia das microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas por spray drying utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 24 mostra as imagens obtidas através do MEV para microesferas de quitosana e microesferas de quitosana/alginato contendo o corante antocianina. As micropartículas de quitosana contendo corante (Figura 24-a) mostraram-se com formato esférico, com superfície rugosa, sem fissura ou porosidade aparente. Para uma população mista de microesferas o tamanho de partícula ficou na faixa de $1 - 10\text{ }\mu\text{m}$. As micropartículas de quitosana/alginato contendo corante (Figura 24-b) apresentaram-se esféricas, com muitas concavidades na superfície, sem fissura ou porosidade aparente e com distribuição do tamanho de partículas na faixa de $1 - 10\text{ }\mu\text{m}$.

A adição de alginato na composição das micropartículas aumenta a rugosidade e a concavidade das amostras em comparação com as amostras de quitosana, Figura 24-b. O aumento de rugosidade e mudança na superfície também

foi observado nas microesferas de quitosana/alginato preparadas pelos métodos de impregnação e coacervação (Figura 17).

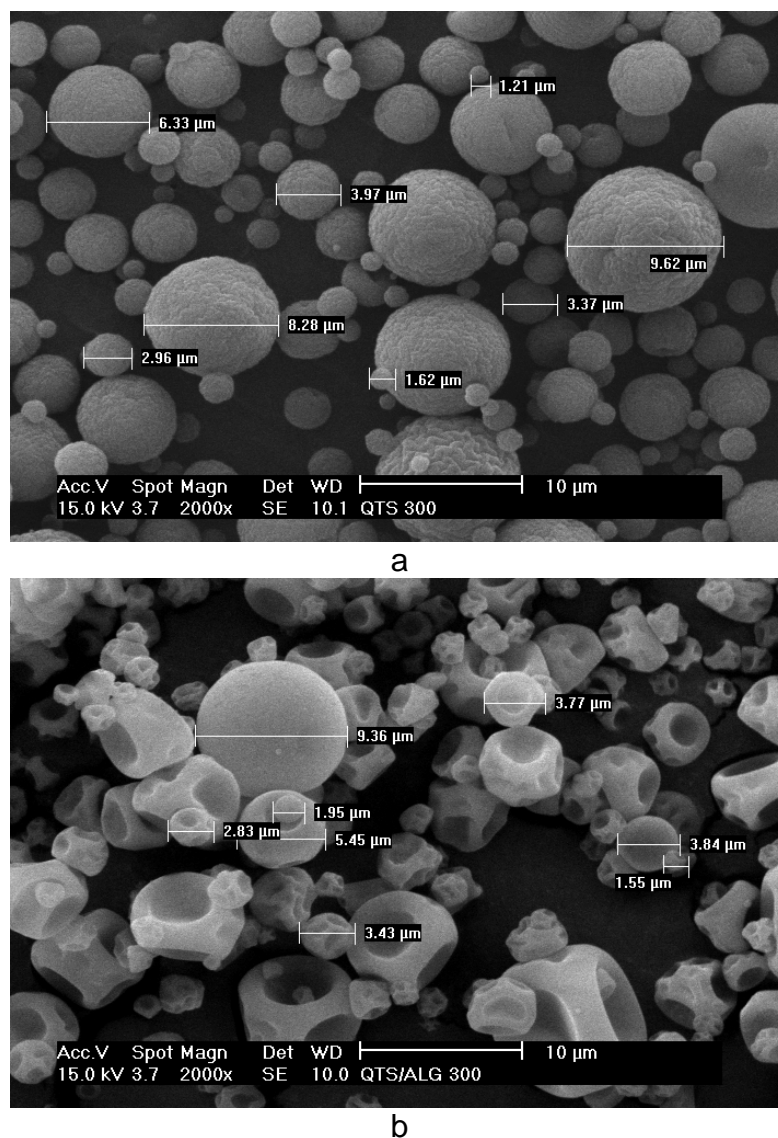


Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura: a) microesferas de quitosana contendo corante atomizadas e b) microesferas de quitosana/alginato contendo corante atomizadas.

5.2.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA) de microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas por spray drying

Foram realizadas análises termogravimétricas (Figura 25) para a quitosana, o alginato de sódio, a antocianina, as microesferas de quitosana e as microesferas de

quitosana/alginate contendo corante.

Os dados de análise termogravimétrica para a quitosana (Figura 25-a), alginato de sódio (Figura 25-b) e para o corante natural antocianina (Figura 25-c) já foram discutidos nos item 5.2.1.3 e 5.2.3.3, portanto neste item serão analisadas somente as curvas das microesferas de quitosana e das microesferas de quitosana/alginate contendo corante.

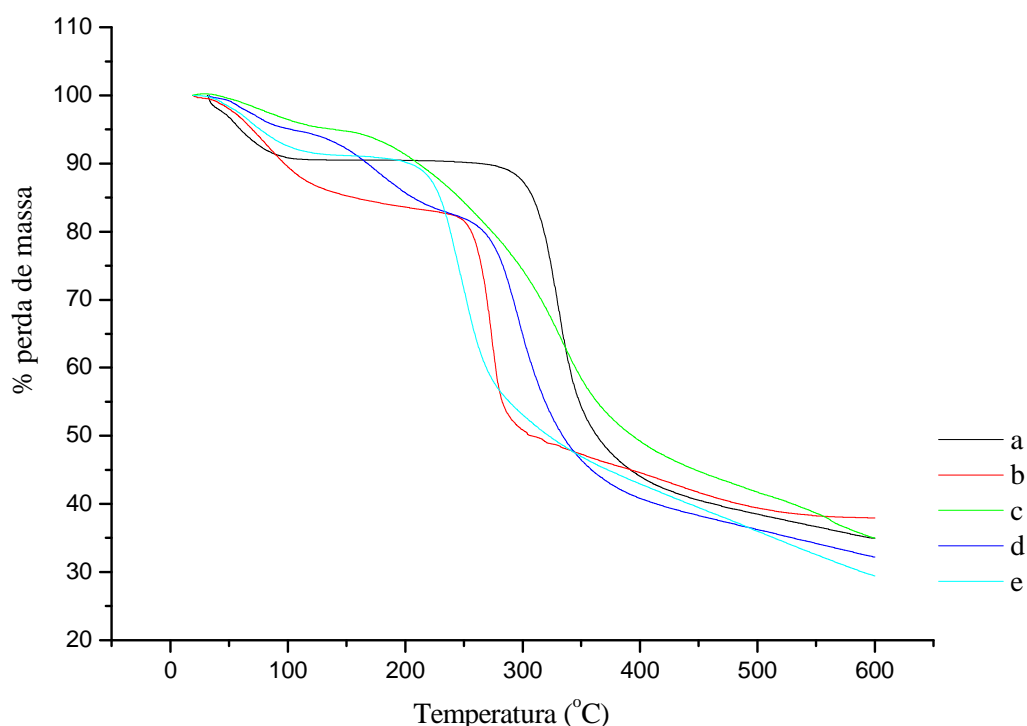


Figura 25. Análise termogravimétrica (TGA): a) quitosana, b) alginato de sódio, c) corante natural antocianina, d) microesfera de quitosana e e) microesfera de quitosana/alginate contendo corante.

A Tabela 10 fornece os estágios de perda de massa das amostras analisadas. Através da Tabela 10 e da Figura 25 é possível observar que todas as amostras analisadas apresentaram um estágio inicial de perda de massa entre aproximadamente 50 e 80 °C, referente à perda de umidade presente na amostra, com perdas de massa em torno de 5,5 a 17%.

As microesferas de quitosana contendo corante (Figura 25-d) apresentam além do estágio inicial de desidratação mais dois estágios de perda de massa, sendo que o segundo estágio ocorre em aproximadamente 176 °C, com perda de

aproximadamente 12% de massa, que pode ser atribuído à perda de moléculas de água quimicamente ligadas à estrutura da microesfera ^[111] e o terceiro estágio ocorre em aproximadamente 296 °C, com perda de massa de aproximadamente 50%, referente à degradação térmica da quitosana, ocorrendo em temperatura mais baixa que a do polímero puro, indicando uma menor estabilidade térmica desta amostra.

Tabela 10. Estágios de perda de massa obtidos através de análise termogravimétrica (TGA) da quitosana, do alginato de sódio, do corante antocianina, das microesferas de quitosana e das microesferas de quitosana/alginato contendo corante preparadas através da técnica de spray drying.

<i>AMOSTRAS</i>	<i>1° Estágio</i>	<i>2° Estágio</i>	<i>3° Estágio</i>
Quitosana	53,33°C	330,15°C	
Alginato de sódio	79,04°C	273,22°C	431,34°C
Corante natural antocianina	77,71°C	332,70°C	
Microesfera de quitosana contendo corante	72,12°C	176,10°C	295,78°C
Microesfera de quitosana/alginato contendo corante	65,17°C	247,88°C	

As microesferas de quitosana/alginato contendo corante (Figura 25-e) apresentaram um único estágio de perda de massa, além do estágio inicial de desidratação, em aproximadamente 248 °C, com perda de aproximadamente 61% de massa. Esse estágio pode estar relacionado à degradação térmica do complexo formado entre alginato de sódio e quitosana ^[71].

A partir dos resultados obtidos nas análises termogravimétricas é possível concluir que as microesferas de quitosana e de quitosana/alginato atomizadas apresentaram menor estabilidade térmica em relação aos materiais de partida. Também é possível sugerir que ocorre interação entre os biopolímeros e o corante natural antocianina, devido ao aparecimento de novos estágios de decomposição.

5.2.4.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) de microesferas de quitosana e quitosana/alginato obtidas por spray drying

A Figura 26 apresenta as análises de calorimetria diferencial de varredura para a quitosana, o alginato de sódio, o corante natural antocianina, as microesferas de quitosana e as microesferas de quitosana/alginato contendo corante atomizadas.

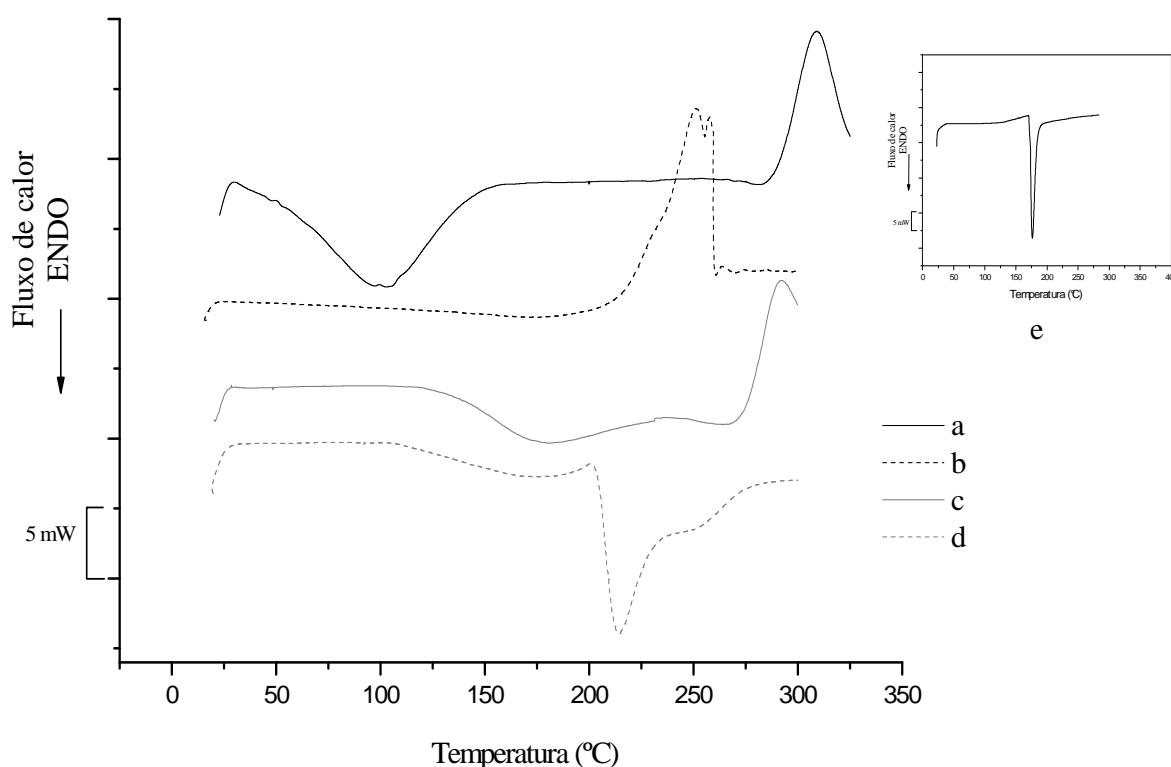


Figura 26. Calorimetria diferencial de varredura (DSC): a) quitosana, b) alginato de sódio, c) microesfera de quitosana, d) microesfera de quitosana/alginato e e) corante natural antocianina.

Os dados de dados de calorimetria diferencial de varredura para a quitosana (Figura 26-a), alginato de sódio (Figura 26-b) e para o corante natural antocianina (Figura 26-e) já foram discutidos nos item 5.2.1.4 e 5.2.3.4, portanto neste item serão analisadas somente as curvas das microesferas de quitosana e de quitosana/alginato contendo corante.

É possível observar, para as microesferas de quitosana atomizadas (Figura 26-c) um único pico exotérmico em aproximadamente 292 °C, referente a

degradação da quitosana. A mudança da temperatura de transição da quitosana para valores mais baixos sugere que estão ocorrendo interações físicas entre o polímero e o corante antocianina.

Para as microesferas de quitosana/alginate atomizadas contendo corante (Figura 26-d) é observado apenas um pico endotérmico em torno de 214 °C, que pode ser atribuído à fusão do material formado entre a matriz polimérica de quitosana/alginate e o corante antocianina. Não são observados no termograma picos referentes aos biopolímeros e sim novos picos de transição, o que pode indicar que estão ocorrendo interações entre os grupos amino protonados (NH_3^+) da quitosana e os grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) do alginate de sódio [71, 112]. A análise dos dados de calorimetria diferencial de varredura para as microesferas de quitosana/alginate atomizadas indica a formação de um complexo entre a quitosana e o alginate de sódio e também indica uma interação física entre a matriz polimérica e o corante antocianina.

Os dados de DSC para as microesferas de quitosana/alginate contendo corante estão de acordo com os dados de infravermelho, indicando que a interação entre os biopolímeros na formação das microesferas se dá, possivelmente, por meio de ligações iônicas entre os grupos carboxilato do alginate de sódio e amino da quitosana e que o corante antocianina está presente nas amostras devido à interação física com a matriz polimérica.

5.2.4.6. Estudos de dissolução das microesferas de quitosana e quitosana/alginate obtidas através da técnica de spray drying

A quantidade de corante incorporado nas micropartículas de quitosana foi de 75,69 mg g⁻¹ e nas micropartículas de quitosana/alginate foi de 104,62 mg g⁻¹.

As micropartículas de quitosana e de quitosana/alginate contendo o corante antocianina obtidas por spray drying mostraram-se extremamente solúveis em soluções tampão pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 e em água.

As microesferas de quitosana se dissolveram e liberaram todo seu conteúdo em menos de 10 minutos, independente do valor do pH da solução. As microesferas de quitosana/alginate se dissolveram e liberaram todo seu conteúdo em aproximadamente 10 minutos para os valores de pH 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 e, em

aproximadamente, 15 minutos em solução tampão de pH 5,0. O tempo para a dissolução total das amostras e conseqüentemente de liberação do corante foi considerado bom, pois segundo Meyer (1995) “os encapsulados apresentam um bom desempenho quando liberam cerca de 60 a 70% do recheio dentro de 15 minutos, sob agitação”^[115].

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após os estudos de microencapsulação e liberação controlada do corante antocianina utilizando microesferas de quitosana e quitosana/alginato pode-se considerar que:

- ✓ através dos métodos de impregnação, coacervação e spray drying, foram obtidas microesferas de quitosana e quitosana/alginato, sendo que as mesmas apresentaram-se sem porosidade ou fissura aparente;
- ✓ os estudos de calorimetria diferencial de varredura e infravermelho para as microesferas de quitosana contendo corante, preparadas com as técnicas de impregnação e spray drying, indicam que ocorre interação física entre a matriz polimérica e o corante;
- ✓ os estudos de calorimetria diferencial de varredura e infravermelho para as microesferas de quitosana/alginato contendo corante, preparadas por meio das técnicas de impregnação, coacervação e spray drying, indicam que ocorre interação iônica ou eletrostática entre os biopolímeros quitosana e alginato de sódio e que ocorre interação física entre a matriz polimérica e o corante antocianina;
- ✓ as análises termogravimétricas para as microesferas de quitosana e quitosana/alginato indicam que ocorre uma diminuição na estabilidade térmica das amostras, independentemente do método de preparação;
- ✓ pelo estudo de adsorção, observa-se que o melhor pH para adsorção do corante antocianina por microesferas de quitosana/alginato é o pH 2,0, sendo que o equilíbrio de adsorção é alcançado em torno de seis horas;
- ✓ os estudos de adsorção do corante antocianina pelas microesferas de quitosana/alginato indicam um comportamento típico da isoterma de Langmuir;
- ✓ a liberação do corante é mais rápida em pH 1,0 para as microesferas de quitosana e em pH 5,0 para as microesferas de quitosana/alginato;
- ✓ o mecanismo de liberação do corante a partir de microesferas de quitosana foi do tipo não-Fickiano ou anômalo, indicando que a liberação ocorre com a

superposição dos mecanismos de difusão e intumescimento;

- ✓ o mecanismo de liberação do corante a partir de microesferas de quitosana/alginato foi dependente do pH, sendo que para as microesferas impregnadas o mecanismo determinado foi do tipo não-Fickiano ou anômalo em pH 1,0 e 2,0, e do tipo Fickiano ou “Caso I” em pH 3,0, 4,0 e 5,0, indicando que a liberação do corante ocorre pelo mecanismo de difusão através das camadas da matriz, e para as microesferas coacervadas o mecanismo foi do tipo não-Fickiano ou anômalo em pH 1,0, 2,0 e 4,0 e do tipo Super Caso II de transporte em pH 3,0 e 5,0, ocorrendo a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica;
- ✓ no método de microencapsulação por spray drying, foram obtidas partículas com tamanho na faixa de 1 – 10 μm , sem poros e fissuras e na forma de pós coloridos e bastante solúveis em água, sendo observado o tempo de dissolução total em torno de dez (10) minutos.
- ✓ o tempo para a dissolução total das amostras e conseqüentemente de liberação do corante foi considerado bom, pois segundo Meyer (1995) “os encapsulados apresentam um bom desempenho quando liberam cerca de 60 a 70% do recheio dentro de 15 minutos, sob agitação” [115].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BROUILLARD, R., **Chemical structure of anthocyanin**. In: MARKAKIS, P., Anthocyanin as Food Colors. London: Academic Press, p. 1-40, 1982.
2. GIUSTI, M. M, WROLSTAD, R. E., **Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems**, Biochemical Engineering Journal, v 14, 217–225, 2003.
3. KONG, J., CHIA, L., GOH, N., CHIA, T., BROUILLARD, R., **Analysis and biological activities of anthocyanins**, Phytochemistry, v. 64, 923–933, 2003.
4. HU, C., CAI, Y., LI, W., CORKE, H., KITTS, D. D., **Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract**, Food Chemistry, 2007.
5. DUAN, X., JIANG, Y., SU, X., ZHANG, Z., SHI, J., **Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning**, Food Chemistry, v. 101, 1365–1371, 2007.
6. GÜLÇİN, I., BERASHVILI, D., GEPDIREMEN, A., **Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla panksinensis* decne**, Journal of Ethnopharmacology, v. 101, 287–293, 2005.
7. MC DOUGALL, G. J., FYFFE, S., DOBSON, P., STEWART, D., **Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion**, Phytochemistry, v. 68, 1285–1294, 2007.
8. COOKE, D., STEWARD, W. P., GESCHER, A. J., MARCZYLO, T., **Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity?**, European Journal of Cancer, v. 41, 1931–1940, 2005.
9. MALACRIDA, C. R., MOTTA, S., **Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade**, Boletim do CEPPA, v. 24, n. 1, 59-82, 2006.
10. FRANCIS, F. J., MARKAKIS, P. C., **Food Colorants: Anthocyanins**, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 28, n. 4, 273-314, 1989.

11. CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., GALÁN-VIDAL, C. A., **Chemical studies of anthocyanins: A review**, Food Chemistry, v. 113, 859–871, 2009.
12. FRANCIS, F. J. **Colorants**. Minnesota: Eagan Press, 145 p. (Eagan Press Handbook Series), 1999.
13. COSTA, C. T., HORTON, D., MARGOLIS, S. A., **Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis**, Journal of Chromatography A, v. 881, 403–410, 2000.
14. REIN, M. J., **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins** (dissertation), EKT series 1331, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, 1 – 88, 2005.
15. ESCRIBANO-BAILÓN, M. T., SANTOS-BUELGA, RIVAS-GONZALO, C., J. C., **Anthocyanins in cereals**, Journal of Chromatography A, v. 1054, 129–141, 2004.
16. JANNA, O. A., KHAIRUL, A. K., MAZIAH, M., **Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L.**, Food Chemistry, v. 101, 1640–1646, 2007.
17. JACKMAN, R. L., SMITH, J.L., **Anthocyanins and betalains**. In: Natural food colorants, London: Blackie Academic, 183-241, 1992.
18. LEWIS, C. E., WALKER, J. R. L., LANCASTER, J. E., **Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins**, Food Chemistry, v. 54, 315-319, 1995.
19. MAZZARACCHIO, P., PIFFERI, P., KINDT, M., MUNYANEZA, A., BARBIROLI, G., **Interactions between anthocyanins and organic food molecules in model systems**, International Journal of Food Science and Technology, v. 39, 53-59, 2004.
20. JACOB, J. K., PALIYATH, G., **Physico-chemical Characteristics of Nanovesicle-Carbohydrate Complexes in Grape Juice Concentrate**, Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 56, 1305-1315, 2008.
21. GRIS, E.F., FERREIRA, E. A., FALCÃO, L. D., BORDGNON-LUIZ, M., **Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems**, Food Chemistry, v. 100, 1289-1296, 2007a.

22. GRIS, E.F., FERREIRA, E. A., FALCÃO, L. D., BORDGNON-LUIZ, M., **Influence of ferulic acid in stability of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grapes in a model system and a yogurt system**. International Journal of Food Science and Technology, v. 42, 992-998, 2007b.
23. MAZZA, G., BROUILLARD, R., **Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products**, Food Chemistry, v. 25, 207-225, 1987.
24. HIGUERA-CIAPARA, I., FELIX-VALENZUELA, L., GOYCOOLEA, F.M., ARGÜELLES-MONAL, W., **Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix**, Carbohydrate Polymers, v. 56, 41–45, 2004.
25. GOUIN, S., **Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends**, Trends in Food Science & Technology, v. 15, 330–347, 2004.
26. SOUZA, T. C. R., PARIZE, A. L., BRIGHENTE, I. M. C., FÁVERE, V. T., LARANJEIRA, M. C. M., **Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment**, Journal of Microencapsulation, v. 22(5), 511–520, 2005.
27. CONSTANT, P. B. L., STRINGHETA, P. C., **Microencapsulação de ingredientes alimentícios**, Boletim SBCTA, v. 36(1), 12-18, 2002.
28. GIBBS, B. F., KERMASHA, S., ALLI, I., MULLIGAN, C. N., **Encapsulation in the food industry: a review**, International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 50, 213-224, 1999.
29. SCHROOYEN, P. M. M., MEER, R. V. D., KRUIF, C. G., **Microencapsulation: its application in nutrition**, Proceedings of the Nutrition Society, v. 60, 475-479, 2001.
30. GOUBET, I., LEOUERE, J. L., VOILLEY, A. J., **Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and their physical state – a review**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46, 1981–1990, 1998.
31. SANTOS, A. B., FERREIRA, V. P., GROSSO, C. R. F., **Microcápsulas – Uma alternativa viável (Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação: óleo – resina de páprica)**, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v.16, 26 – 30, 2000.
32. DESAI, K. G. H., PARK, H. J., **Recent developments in microencapsulation of food ingredients**, Drying Technology, v. 23, 1361-1394, 2005.

33. SHAHIDI, F., HAN, X. Q., **Encapsulation of Food Ingredients**, *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v. 33(6), 501-547, 1995.
34. GIUNCHEDI, P., GENTA, I., CONTI, B., MUZZARELI, R. A. A., CONTE, U., **Preparation and characterization of ampicilin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres**, *Biomaterials*, v. 19, 157 - 161, 1998.
35. GEORGE, M., ABRAHAM, T. E., **Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review**, *Journal of Controlled Release*, v. 114, 1–14, 2006.
36. BAJPAI, S. K., TANKHIWALE, R., **Investigation of dynamic release of vitamin B2 from calcium alginate/chitosan multilayered beads: Part II**, *Reactive & Functional Polymers*, v. 66, 1565–1574, 2006.
37. SHU, X. Z., ZHU, K. J., **The release behavior of brilliant blue from calcium–alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 53, 193–201, 2002.
38. RISH, S. J., **Encapsulation: overview of uses and techniques**, In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A, *Encapsulation and controlled release of food ingredients*, Washington, DC: p. 8 – 25, 1995.
39. ADAMIEC, J., MODRZEJEWSKA, Z., **Some Structural Properties of Spray-Dried Chitosan Micro granules**, *Drying Technology*, v. 23, 1601–1611, 2005.
40. SANTOS, A. B., FÁVARO-TRINDADE, C. S., GROSSO, C. R. F., **Preparação e caracterização de microcápsulas e oleoresina de páprica obtidas por atomização**, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 16, 322-326, 2005.
41. SHU, B., YU, W., ZHAO, Y., LIU, X., **Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying**, *Journal of Food Engineering*, v. 76, 664–669, 2006.
42. PÍSECKY, J., **Spray drying in the cheese industry**, *International Dairy Journal*, v. 15, 531–536, 2005.
43. MADENE, A., JACQUOT, M., SCHER, J., DESOBRY, S., **Flavour encapsulation and controlled release – a review**, *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1–21, 2006.

44. KING, A. H., **Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing hydrocolloids**. In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A., Encapsulation and controlled release of food ingredients, Washington, DC: 1995, p. 8 – 25.
45. DONG, W., BODMEIER, R., **Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method**, International Journal of Pharmaceutics, v. 326, 128–138, 2006.
46. ATKINS, P. W., **Physical chemistry**, Oxford University Press. 5^a ed., 985-995, 1993.
47. CHIOU, M. S., LI, H.Y., **Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads**, Journal of Hazardous Materials, B93, 233-248, 2002.
48. LOPES, T. J., GONÇALVES, O. H., BARROS, R. B., CAPELLI, F. C. R., MACHADO, R. A. F., QUADRI, M. G. QUADRI, N., M. B., **Adsorption of Natural Dyes on Clay Fixed on Polymers**, Brazilian Archives of Biology and Technology, V. 48, 275-280, 2005.
49. GUIBAL, E., **Interactions of metals ions with Chitosan-based sorbents: a review**, Separation and Purification Technology, v 38, 43-74, 2004.
50. UZUN, I., **Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitosan**, Dyes and Pigments, v. 70, 76-83, 2006.
51. JUSTI, K. C.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M.; NEVES, A.; PERALTA, R. A., **Kinetics and equilibrium adsorption of Cu(II), Cd(II), and Ni(II) ions by chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methyl-6-formylphenol**, Journal of Colloid and Interface Science, v. 291, 369-374, 2005.
52. KITTUR, F.S., THARANATHAN, R.N., **Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great Potential**, Critical Review in Food Science and Nutrition, 43(1), 61-87, 2003.
53. CORRELO, V. M., BOESEL, L. F., BHATTACHARYA, M., MANO, J. F., NEVES, N. M., REIS, R. L., **Properties of melt processed chitosan and aliphatic polyester blends**, Materials Science and Engineering A, 403, 57–68, 2005.
54. TAN, C.S.; KHOR, E.; TAN, T.K.; WONG, S.M., **The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of**

- determination.** Talanta, v. 45, p. 713 – 719, 1998.
55. SHAHIDI, F., ARACHCHI, J.K.V., JEON, Y.J., **Food Applications of Chitin and Chitosans**, Trends in Food Science & Technology, 10, 37- 51, 1999.
56. MUZZARELLI, R.A.A. **Natural chelating polymers**, Pergamon Press, Oxford, 1973.
57. KRAJEWSKA, B., **Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review**, Enzyme and Microbial Technology, v. 35, 126–139, 2004.
58. SINHA, V. R., SINGLA, A. K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., BANSAL, K., DHAWAN, S., **Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs**, International Journal of Pharmaceutics, v. 274, 1-33, 2004.
59. LI Z., RAMAY, H. R., HAUCH, K. D., XIAO, D., ZHANG, M., **Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering**, Biomaterials 26, 3919–3928, 2005.
60. JUNG, B. O., CHUNG, S. J., LEE, S. B., **Preparation and characterization of eugenol-grafted chitosan hydrogels an their antioxidant activities**, Journal of Applied Polymer Science, v. 99, 3500 - 3506, 2006.
61. KAWAMURA, Y., MITSUHASHI, M., TANIBE, H., **Adsorption of metal ions on polyaminated highly porous chitosan chelating resin.**, Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 32, 386 – 391, 1993.
62. LONGHINOTTI, E., POZZA, F., FURLAN, L., KLUG, M. N. M., LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T., **Adsorption of Anionic Dyes on the Biopolymer Chitin**, J. Braz. Chem. Soc., v. 9, 5, 435-440, 1998.
63. KUMAR, M. N. V. R., **A review of chitin and chitosan applications**, Reactive & Functional Polymers, v. 46, 1 – 27, 2000.
64. NARAYANI, R., GITA, V. B., AMARNATHAN, T., **Preparation and evaluation of alginate films for periodontal drug delivery**, Trends in Biomaterials and Artificial Organs, v. 14, 1–4, 2000.
65. TOLSTOGUZOV, V., **Why are polysaccharides necessary?**, Food Hydrocolloids,

v. 18, 873–877, 2004.

66. KADOKAWA J., SAITOU S., SHODA S., **Preparation of alginate-polymethacrylate hybrid material by radical polymerization of cationic methacrylate monomer in the presence of sodium alginate**, Carbohydrate Polymers, v. 60, 253–258, 2005.
67. HAIR, P. R., CHANDY, T., SHARAMA, C. P., **Chitosan/calciumalginate beads for oral delivery of insulin**, Journal of Applied Polymer Science, v. 59, 1795–1801, 1996.
68. KIM, S. J. et al., **Characteristics of electrical responsive alginate/poly (diallyldimethylammonium chloride) IPN hydrogel in HCl solutions**, Sensors and Actuators B, v. 96, 1–5, 2003.
69. WANG, L. et al., **Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering**, Biomaterials, v. 24, 3475–3481, 2003.
70. BECKER T. A., KIPKE D. R., BRANDON T., **Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization**, J Biomed Mater Res., v. 54, 76–86, 2001.
71. SMITHA B., SRIDHAR S., KHAN A. A., **Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes**, European Polymer Journal, v. 41, 1859–1866, 2005.
72. RIBEIRO A. J., SILVA, C., FERREIRA, D., VEIGA, F., **Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique**, European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 25, 31–40, 2005.
73. YE S., WANG, C., LIU, X., TONG, Z., **Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films**, Journal of Controlled Release, 2005.
74. WEN-TAO Q., WEI-TING, Y., YU-BING, X., XIAOJUN, M., **Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate–chitosan–alginate microcapsule**, Biochemical Engineering Journal, v. 25, 151–157, 2005.
75. KANTI, P. SRIGOWRI, K., MADHURI, J., SMITHA, B., SRIDHAR, S., **Dehydration**

- of ethanol through blend membranes of chitosan and sodium alginate by pervaporation**, Separation and Purification Technology, v. 40, 259–266, 2004.
76. WONG, T. W., CHAN, L. W., KHO, S. B., HENG, P. W. S., **Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave**, Journal of Controlled Release, v. 84, 99–114, 2002.
77. POTHAKAMURY, U. R., BARBOSA – CANOVÁS, G. V., **Fundamental aspects of controlled release in foods**, Trends in food Science & technology, 6, 1995.
78. WHORTON, C. **Factors influencing volatile release from encapsulation matrices**. In: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients. Risch, S. J. and Reineccius, G. A. Eds., American Chemical Society, Washington, DC, p. 134-142, 1995.
79. MUZZARELLI, C., STANIC, V., GOBBI, V., TOSI, G., MUZZARELLI, R. A. A., **Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres**, Carbohydrate Polymers, v. 57, 73-82, 2004.
80. BORDIGNON-LUIZ, M. T., GAUCHE, C., GRIS, E.F., FALCÃO, L.D., **Colour stability of anthocyanins from Isabel rapes (Vitis labrusca L.) in model systems**, LWT – Food Science and Technology, 594-599, 2006.
81. BROUILLARD, R., MAZZA, G., SAAD, A. M., GARY, A., CHEMIAT, A., **The copigmentation reaction of anthocyanins: A microprobe for the structural study of aqueous solutions**, Journal American Chemical Society, v.111, 247-2, 1989.
82. HEINS, A., STÖCKMANN, H., SCHWARZ, K., **Designing „Anthocyanin-Tailored“ Food Composition**, In: Biologically-active Phytochemicals in Food: Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function, Eds. Pfannhauser, W., et al, , Royal Soc. Chem., 377-281, 2001.
83. DIMITRIC-MARKOVIC, J.M., PETRANOVIC, N.A., BARANAC, J.M., **The copigmentation effect of sinapic acid on malvin: a spectroscopic investigation on colour enhancement**, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 78, 223–228, 2005.
84. BAKOWSKA, A., KUCHARSKA, A.Z., OSZMIANSKI, J., **The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex**, Food Chemistry, v. 81, 349–355, 2003.

85. BOULTON, R. **The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A Critical Review**. American Journal of Enology and Viticulture, v. 52 (2), 67-80, 2001.
86. MOURTZINOS, I., MAKRIS, D. P., YANNAKOPOULOU, K., KALOGEROPOULOS, N., MICHALI, I., KARATHANOS, V. T., **Thermal Stability of Anthocyanin Extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the Presence of β -Cyclodextrin**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56 (21), 10303-10310, 2008.
87. HARLAND, R.S., GAZZANIGA, A., SANGALLI, M.E., COLOMBO, P., PEPPAS, N.A., **Drug:polymer matrix swelling and dissolution**. Pharm. Res. 5 (8), 488-494, 1988.
88. MUNDAY, D. L., COX, P. L., **Compressed xanthan and karaya gum matrices hydration, erosion and drug release mechanisms**, Int. J. Pharm., 203, 179-192, 2000.
89. KHARE, A. R., PEPPAS, N. A., **Swelling / Deswelling of anionic copolymer gels**, Biomaterials, 16, 559-567, 1995.
90. BRONDSTED, H., KOPECK, J., **pH-Sensitive hidrogels: Characteristics and potencial in drug delivery**. In: HARLAND, R. S. Pyl electrolyte gels: Properties and Applications, 285-303, 1992.
91. THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A., **Cross-linked Chitosan Microspheres preparation and Evalution as Matrix for the Controlled Release of Pharmaceutics**. Journal of Pharmcy and Pharmacology. v. 44, p. 283, 1991.
92. QU, X., WIRSEN, A., ALBERTSON, A. C., **Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water**, Polymer, v. 41, 12, 4589-4598, 2000a.
93. FERRERO, C., MUÑOZ-RUIZ, A., JIMÉNEZ-CASTELLANO, M.R., **Fronts movements as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation**, Int. J. Pharm. 202, 21-28, 2000.
94. ROY, D.S., ROHERA, B.D., **Comparative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and HPC, and study of drug release from their matrices**. Eur. J. Pharm. Sci. 16, 193-199, 2002.

95. LLABOT, J.M, MANZO, R.H., ALLEMANDI, D.A., **Drug release from carbomer:carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system**, International Journal of Pharmaceutics, v. 276, 59-66, 2004.
96. POPA, M.I., AELENEI, N., POPA, V.I., ANDREI, D., **Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan**, Reactive & Functional Polymers, v. 45, 35-43, 2000.
97. KORSMEYER, R.W., GURNY, R., DOELKER, E., BURI, P., PEPPAS, N.A., **Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers**. Int. J. Pharm. 15, 25–35, 1983.
98. RITGER, P. L., PEPPAS, N. A., **A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs**, Journal of Controlled Release, 5, 23-36, 1987a.
99. SIEPMANN, J., PEPPAS, N. A., **Modeling of drug delivery systems based on hydroxypropyl methycellulose (HPMC)**, Advanced Drug Delivery Reviews, v. 48, 139-157, 2001.
100. HO, Y. S.; MCKAY, G. **Pseudo-second order model for sorption processes**. Process Biochemistry Research, v. 34, p. 451- 465, 1999a.
101. HO, Y. S.; MCKAY, G. **The sorption of lead(II) on peat**. Water Research, v. 33, p. 578-584, 1999b.
102. WEBER, W. J.; MORRIS, J. C. J. Sanit. Eng. Div. Am. Chem. Soc. Civ. Eng.1963; 89:31.
103. MCKAY, G. **Use of adsorbents for the removal of pollutants from wastewaters**. Florida: CRC Press, Inc.; 1996.
104. LANGMUIR, L. **Adsorption of gases on plain surfaces of glass mica platinum**. J. Am. Chem. Soc., v. 40, 1361-1403, 1918.
105. ZOHURIAAN, M.J., SHOKROLAHI, F., **Thermal studies on natural and modified gums 3458**. Polym. Test., v. 23, 575–579, 2004.
106. FAHMY, H. M., FOUUDA, M. M..G., **Crosslinking of alginic acid/chitosan**

- matrices using polycarboxylic acids and their utilization for sodium diclofenac release**, *Carbohydrate Polymers*, v. 73, 606–611, 2008.
107. MATHEW, S., ABRAHAM, T. E., **Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films**, *Food Hydrocolloids*.
108. MI, F. L., SUNG, H. W., SHYU, S. S., **Drug release from chitosan–alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent**, *Carbohydrate Polymers*, v. 48, 61, 2002.
109. XU, Y., ZHAN, C., FAN, L., WANG, L., ZHENG, H., **Preparation of dual crosslinked alginate–chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral site-specific drug delivery system**, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 336, 329–337, 2007.
110. ERSUS, S., YURDAGEL, U., **Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier**, *Journal of Food Engineering*, v. 80, 805–812, 2007.
111. PARIZE, A. L., SOUZA, T. C. R., BRIGHENTE, I. M. C., FÁVERE, V. T., LARANJEIRA, M. C. M., SPINELLI, A., LONGO, E., **Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents**, *African Journal of Biotechnology*, v. 7 (17), 3107-3114, 2008.
112. SANKALIA, M. G., MASHRU, R. C., SANKALIA, J. M., SUTARIYA, V. B., **Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, 215–232, 2007.
113. LORENZO-LAMOSA, M. L., REMUÑÁN, C., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J., **Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery**, *J. Control. Release*, 52, 109-118, 1998.
114. ORIENTI, I., CERCHIARA, T., LUPPI, B., BIGUCCI, F., ZUCCARI, G., ZECCHI, V., **Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery**, *International Journal of Pharmaceutics*, 238, 51-59, 2002.
115. MEYER, M., *Agro-Food Industry Hi-Tech.*, v. 6(5), 23, 1995.