

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE  
ASTAXANTINA COM QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientador: Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.**

**RENATA ÁVILA OZÓRIO**

FLORIANÓPOLIS

2007

## TERMO DE APROVAÇÃO

### ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ASTAXANTINA COM QUITOSANA

Autora: **Renata Ávila Ozório**

Orientador: Prof. **Pedro Luiz Manique Barreto**, Dr.

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos no curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, CAL, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, pela Comissão formada por:

---

Presidente: Prof. **Pedro Luiz Manique Barreto**, Dr.

---

Membro: Prof. **Valdir Soldi**, Dr.

---

Membro: Prof<sup>a</sup>. **Renata Dias de Mello Castanho Amboni**, Dr<sup>a</sup>.

---

Membro: Prof. **Luiz Henrique Beirão**, Dr.

---

Coordenadora: Prof<sup>a</sup>. **Marilde T. Bordignon Luiz**, Dr<sup>a</sup>.

Florianópolis, 20 de junho de 2007.

OZÓRIO, Renata Ávila

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ASTAXANTINA COM QUITOSANA. Renata Ávila Ozório. Florianópolis, 2007.

101 p.; il.

Orientador: Pedro Luiz Manique Barreto.

Dissertação/Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007.

Bibliografia.

1. palavras-chave: astaxantina, quitosana, microencapsulação, micropartículas.

*À Lúcia, Dínio e Roberto,  
Mãe, pai e companheiro.*

*À memória de minha querida avó Aíde.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e pela proteção.

Ao professor Pedro Luiz Manique Barreto, por aceitar a orientação deste trabalho e conduzir seu desenvolvimento com muita sabedoria e paciência.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Aos professores Luiz Henrique Beirão, Ernani Sant'Anna e Silvana Ohse pelas valiosas sugestões na banca de qualificação.

A professora Renata Dias de Mello Castanho Amboni por gentilmente ajudar-me a realizar as análises de cor e pela colaboração na discussão dos resultados.

A professora Roseane Fett por ceder o laboratório bem como os seus alunos para que eu pudesse realizar as análises de atividade antioxidante.

Aos colegas Bianca, Ismael, Ana Cristina e Analu pela ajuda na realização das análises de atividade antioxidante.

Ao técnico Luciano Gonzaga pelas dúvidas esclarecidas.

Aos professores e técnicos do Departamento de Química desta Universidade em especial a Marly da Silveira Soldi e Ângelo Ruzza pela realização das análises térmicas deste trabalho.

À doutoranda do Programa de Pós-graduação em Aqüicultura Simone Suhnel pelas sugestões bem como por tornar possível a realização das análises cromatográficas do presente trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação por serem parte fundamental na aquisição de conhecimentos indispensáveis a minha formação.

A todos os colegas de pós-graduação por tornarem mais prazeroso o meu convívio no Departamento, em especial Tatiana, Jefferson, Roberta, Ana Cristina, Bianca, e Janaína.

Às amigas do coração Sabrina, Silvana e Eunice pelo carinho e parceria de longa data.

Ao secretário da Pós-graduação Sérgio, por sua prontidão e disponibilidade para resolver qualquer problema.

Aos meus pais Lúcia e Dino, por serem o alicerce de amor, dignidade e respeito que sustenta a edificação da minha vida.

À minha família, em especial minha irmã Fabiana pelo carinho constante.

À minha sogra Terezinha por me acolher carinhosamente em sua casa, pelo incentivo e pela torcida.

À Luisa, Rafael e Pedro Henrique (Cucurucu), por encherem de graça e de felicidade a minha vida.

Ao meu companheiro Roberto Bianchini Derner, pelas sugestões que certamente abrilhantaram o meu trabalho, por ser o meu porto seguro, meu alento, o lugar para onde eu sempre quero voltar, pelo incentivo, compreensão e amor a mim dedicado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho meus sinceros agradecimentos.

***Andar com fé eu vou que a fé não costuma falhar...***

***(Gilberto Gil)***

OZORIO, R. A. Elaboração e caracterização de micropartículas de astaxantina com quitosana 2007. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – S.C. [2007].

## RESUMO

A astaxantina é uma das importantes substâncias naturais de coloração amplamente utilizada na aqüicultura e na indústria de alimentos. Além disso, este carotenóide tem uma grande importância na saúde humana por estar associado à redução do risco de doenças degenerativas, devido ao seu elevado poder antioxidante. No entanto, pelo alto grau de insaturações, este composto está susceptível aos processos oxidativos. Neste trabalho a microencapsulação da astaxantina foi estudada, utilizando a quitosana como substância encapsulante. A astaxantina é proveniente da biomassa seca da microalga *Haematococcus pluvialis* dissolvida em óleo de soja e foi adicionada a quitosana dissolvida em ácido acético. Para a microencapsulação foi utilizada a técnica de coacervação simples e o processo de secagem por liofilização. As micropartículas foram caracterizadas através das técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TGA), Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Em seguida foram feitos ensaios avaliando a eficiência da microencapsulação com quitosana na manutenção dos parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  e da atividade antioxidante da astaxantina ao longo do tempo. A MEV revelou micropartículas com tamanho e formato não homogêneos variando entre 33  $\mu\text{m}$  e 54  $\mu\text{m}$ , com superfície rugosa. Os resultados das análises de FTIR, DSC, TGA revelaram que houve interação positiva entre a quitosana e a astaxantina resultando na formação de um complexo quitosana-astaxantina com características intermediárias as encontradas nos componentes individualmente. A quitosana mostrou-se hábil para a proteção da astaxantina, mantendo constantes os parâmetros de cor analisados  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  e a atividade antioxidante da astaxantina durante os 120 dias de monitoramento.

Palavras chave: astaxantina, quitosana, microencapsulação, micropartículas.



OZORIO, R. A. Elaboração e caracterização de micropartículas de astaxantina com quitosana 2007. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – S.C. [2007].

## ABSTRACT

The astaxanthin is one of important natural coloration substances widely used in the aquaculture and in the food industry; moreover, this carotenoid has a great importance in the health human for being associated to the reduction of the risk of degenerative illnesses due the high power antioxidant activity. However, due the high degree of insaturations, this compound is susceptible to the oxidation. In this work, the microencapsulation of the astaxantin was studied, using the chitosan as encapsulating substance. The astaxantin is proceeding from the dry biomass of the microalgae *Haematococcus pluvialis* dissolved in soy oil and was added the chitosan dissolved in acetic acid. For the microencapsulation, the simple coacervation technique was used and the drying process was liofilization. The microparticles had been characterized through the techniques of differential scanning calorimetry (DSC), termogravimetric analysis (TGA), FTIR spectra and scanning eletron microscope (SEM). After that the efficiency of the microencapsulation with chitosan in the maintenance of the parameters of color  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  and of the antioxidant activity of the astaxantin throughout the time had been made assays evaluating. The MEV disclosed to microparticles with size and not homogeneous format varying between 33  $\mu\text{m}$  and 54  $\mu\text{m}$  and rugged surface. The results of the analyses of FTIR, DSC, TGA showed that there was a positive interaction between the chitosan and the astaxantin resulting in the formation of a chitosan-astaxantin complex with intermediate characteristics to the found ones in the components. The chitosan revealed skillful for the protection of the astaxantin, keeping constant the parameters of color analyzed  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  and the antioxidant activity of the astaxantin during the 120 days of monitoring.

**Keywords:** astaxantin, chitosan, microencapsulation, microparticles.

## SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
1.1 Produção de compostos de interesse.....	18
1.2 Carotenóides .....	19
1.3. Astaxantina.....	22
1.4 Quitosana .....	24
1.5 Microencapsulação e suas aplicações .....	25
1.6 Propriedades Térmicas .....	27
1.6.1 Termogravimetria (TGA, DTGA).....	27
1.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	28
1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	29
1.9 Espectroscopia no infravermelho (FTIR) .....	31
1.10 Análise instrumental de cor.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
CAPÍTULO 2 .....	43
1. INTRODUÇÃO .....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	47
2.1 Matéria prima.....	47
2.2 Reagentes .....	47
2.3 Preparação das micropartículas .....	47
2.4. Extração, determinação e quantificação da astaxantina.....	48
2.5. Eficiência de microencapsulação e rendimento.....	49
2.6. Avaliação dos Parâmetros de Cor .....	49
2.7. Ensaio de descoloração do radical ABTS.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1. Preparação das Micropartículas .....	51
3.3. Eficiência de microencapsulação e rendimento.....	54
3.4. Avaliação Instrumental dos Parâmetros de Cor.....	55
3.5. Ensaio de Descoloração do Radical ABTS.....	58
4. CONCLUSÕES .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
CAPITULO 3 .....	67
1. INTRODUÇÃO .....	69

2. MATERIAL E MÉTODOS .....	71
2.2. Morfologia das micropartículas .....	71
2.3. Espectroscopia de Infravermelho .....	71
2.4. Calorimetria Exploratória de Varredura.....	72
2.5. Análise Termogravimétrica (TGA, DrTGA) .....	72
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO .....	74
3.1. Morfologia .....	74
3.2. Espectroscopia de infravermelho ( <i>FTIR</i> ) .....	77
3.3. Análise Termogravimétrica .....	80
3.4. Calorimetria Exploratória de Varredura.....	84
4. CONCLUSÕES .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
APÊNDICES.....	94
APÊNDICE A – Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA) – Curitiba/PR – Outubro/2006.....	95
APÊNDICE B – Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA) – Curitiba/PR – Outubro/2006.....	96
APÊNDICE C – Trabalho apresentado no Brazilian MRS Meeting 2006 - V Encontro da SBPMat - Sociedade Brasileira de Pesquisas em Materiais – Florianópolis/SC – Outubro/2006. ....	98
APÊNDICE D – Trabalho apresentado no XI Internacional Macromolecular Colloquium e 6th Internacional Symposium on Natural Polymers and composites Gramado/RS – Abril/2007. ....	99

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos principais carotenóides .....	20
Figura 2 - Células de <i>Haematococcus pluvialis</i> em diferentes estágios: (a) forma livre, (b) forma encistada repleta de astaxantina .....	22
Figura 3 - Estrutura química da quitosana. ....	24
Figura 4 - Tipo de estrutura obtido no processo de encapsulação: a - multinucleada (micropartícula); b - mononucleada (microcápsula). ....	26
Figura 5 - Sistema de coordenadas de cores CIELAB .....	33
Figura 1 a, b, c, d– Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das micropartículas. ....	53
Figura 2 - Microscopia óptica da emulsão formadora das micropartículas.....	55
Figura 3 - Parâmetro de cor L* para as amostras de micropartículas e de microalga ao longo do tempo.....	56
Figura 4 - Parâmetro de cor a* para as amostras de micropartículas e de microalga ao longo do tempo.....	56
Figura 5 - Parâmetro de cor b* para as amostras de micropartículas e de microalga ao longo do tempo.....	57
Figura 6 – Foto ilustrando a diferença entre a cor das micropartículas (a) e da biomassa de microalga (b). ....	57
Figura 7 - Gráfico da atividade antioxidante (mM TEAC) da amostras de micropartículas e de microalga ao longo do tempo. ....	59
Figura 1 – Micrografias por microscopia eletrônica de varredura da superfície de micropartículas, com as respectivas medidas em duas dimensões (a, b, c, d, e). ....	77
Figura 2 – Espectros de infravermelho para astaxantina (a), quitosana (b), micropartícula quitosana/astaxantina (c) e micropartícula quitosana/astaxantina reticulada com glutaraldeído (d). ....	78
Figura 3 – Termograma da quitosana pura .....	81
Figura 4 – Termograma da micropartícula (quitosana/astaxantina). ....	82
Figura 5 – Termograma da micropartícula (quitosana/astaxantina) com glutaraldeído. ....	82
Figura 6 – Região ampliada da perda de água para quitosana pura, micropartícula quitosana/astaxantina e quitosana/astaxantina entrecruzada com glutaraldeído.....	83
Figura 7 – Termograma de astaxantina em óleo de soja (0,04 g/dL) .....	84

Figura 8 – Termograma DSC para solução astaxantina/óleo de soja. ....	85
Figura 9 – Termograma DSC para a quitosana.....	86
Figura 10 – Curvas de DSC para a micropartícula quitosana-astaxantina em óleo. .	87
Figura 11 – Curva de DSC para a micropartícula quitosana – astaxantina em óleo tratado com glutaraldeído.....	88

## INTRODUÇÃO

Os processos de desenvolvimento, de produção e de utilização de compostos naturais com propriedades bioativas são muito importantes, especialmente devido às inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (RICHMOND, 2004).

As algas formam um grupo de plantas não vasculares que são capazes de aproveitar a energia solar e usando o mecanismo de fotossíntese acumular grandes quantidades de biomassa. Elas podem produzir diversos produtos que incluem carboidratos, proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, pigmentos e serem fontes de moléculas bioativas (DUFOSSE et al., 2005).

*Haematococcus pluvialis* é uma microalga verde com habilidade de acumular astaxantina, um produto com elevado valor comercial, com aplicações farmacêuticas, nutracêuticas e na alimentação animal (TODD LORENZ; CYSEWSKY, 2000).

O maior mercado para a astaxantina tem sido a aqüicultura, onde é especialmente empregada para dar a cor avermelhada à carne do salmão cultivado (TRIPATHI et al., 1999). Segundo Cysewski e Lorenz (2004), a astaxantina natural é vendida por aproximadamente US\$ 2.500,00 o quilograma, sendo que 95% do consumo mundial da aqüicultura são abastecidos com astaxantina sintética.

Comparados aos corantes sintéticos, os carotenóides naturais são mais resistentes ao calor, aos processos de congelamento e apresentam eficiência mesmo quando aplicados nos alimentos em pequenas quantidades (SKULBERG, 2004).

O interesse pela produção e comercialização da astaxantina microalgal visando o consumo por humanos também tem aumentado, pela iminência na aprovação pelo *U S Food and Drug Administration* (FDA), para o uso dessa como ingrediente em suplementos dietéticos e por sua aprovação em diversos países europeus (CYSEWSKI; TODD LORENZ, 2004).

A atividade antioxidante da astaxantina já foi demonstrada em diversos estudos. Em alguns casos, a astaxantina demonstrou habilidade maior para combater radicais livres que à realizada pelo  $\beta$ -caroteno e pela vitamina E (SHIMIDZU, 1996). Acredita-se que a atividade antioxidante da astaxantina, esteja

relacionada a outras propriedades, como a proteção contra os raios luminosos ultra violeta (UV), fotoxidação, inflamação, anticarcinogênico, promoção da resposta imune, saúde do coração, olhos e próstata (NAGUIB, 2000).

A astaxantina livre é particularmente sensível à oxidação e por isso, ela é mais comumente encontrada complexada com proteínas (músculo de salmão), com exoesqueleto de quitina, (crustáceos), ou esterificada com um ou dois ácidos graxos para estabilizar sua molécula (OLAIZOLA et al., 2003).

A astaxantina também pode ser microencapsulada com uma combinação de polímeros para formar um pó estável. Dentre os polímeros empregados nos processos industriais de microencapsulação a quitosana mostra-se como uma alternativa eficiente e economicamente viável (CYSEWSKI; TODD LORENZ, 2004).

A quitina e a quitosana têm sido produzidas comercialmente e utilizadas em inúmeras aplicações (MATHUR, 1990). Devido suas características e disponibilidade, podem ser potencialmente usadas em diversas áreas tecnológicas, tais como: tratamento de água e efluentes, agricultura, fotografia, cosméticos, pele artificial, alimentos, oftalmologia, manufatura de papel, liberação controlada de fármacos e biotecnologia (SPINELLI, 2001).

A quitosana apresenta características importantes tais como: biocompatibilidade, hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, propriedades antibacterianas e bioatividade (KAWAMURA, 1993; GRACÉN, 1996; RORRER, 1993). Além disso, a sua utilização não traz toxicidade ao corpo humano (MATHUR, 1990; GRACÉN, 1996).

A microencapsulação é um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver sólidos, líquidos ou gases, isolando-os e protegendo-os das condições ambientais como luz, ar e umidade. Várias técnicas e agentes encapsulantes já foram sugeridas (RÉ, 1998).

Houve na última década um grande progresso no desenvolvimento de compostos microencapsulados (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). Os estudos encontram-se avançados em relação a encapsulação de aroma mas ainda limitados em termos de corantes e antioxidantes.

A microencapsulação é amplamente utilizada para liberação controlada de medicamentos, vacinas e compostos bioativos (FELT; BURI; GURNY, 1998). Na aquicultura é utilizada na alimentação de larvas de peixes, tem ampla utilização na indústria de alimentos estabilizando óleos comestíveis, pigmentos e aromas.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para produzir micropartículas: gelatinização ionotrópica, spray-drying, emulsão de fases separadas, coacervação simples ou complexa (PENICHE et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo principal elaborar micropartículas de quitosana com astaxantina e sua caracterização química e morfológica, para tanto foram usadas análises térmicas, espectrofotométricas, cromatográficas e microscopia eletrônica de varredura. O trabalho também avaliou o desempenho da quitosana na proteção da astaxantina através da análise instrumental de cor pelo método CIELAB (Comissão Internacional de Iluminantes) e atividade antioxidante pelo método ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)).



**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Produção de compostos de interesse

O permanente interesse no estudo de microorganismos como microalgas, fungos, leveduras e bactérias, deve-se a sua notável importância nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial destes em diversas áreas, como a nutrição humana e animal, a produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias de alimentos, química e farmacêutica, dentre outras (SHELEF; SOEDER, 1980; BOROWITZKA, 1988a e b; CERTIK; SHIMIZU, 1999).

As microalgas contêm grandes quantidades de proteínas, enzimas, carboidratos, ácidos graxos, vitaminas e sob determinadas condições de cultivo a síntese destes compostos pode ser inibida ou potencializada (DERNER, 2001). Desta maneira, pode-se obter uma ampla variedade de compostos farmacologicamente ativos, como os inibidores de proteases, ácidos graxos polinsaturados, polissacarídeos mucilaginosos, lipídios com atividade biológica, antibacteriana, atividade antitumoral, atividade cardiotônica, e hipocolesterolêmica e pigmentos com propriedades antioxidantes (FÁBEGAS et al., 1994; FRANKE et al., 1994; VILCHEZ et al., 1997; CERTIK & SHIMIZU, 1999).

Diversas microalgas têm sido estudadas e algumas espécies têm sido amplamente empregadas na aquicultura, na alimentação humana e animal, na agricultura, no tratamento de águas residuais, na redução do dióxido de carbono da atmosfera, em substituição aos combustíveis fósseis e na obtenção de inúmeros compostos (GUILLARD, 1975; GOLDMAN, 1977; BECKER, 1988; BOROWITZKA, 1988a; BOROWITZKA, 1988b; DE PAUWN; PERSOONE, 1988; METTING, 1988; OSWALD, 1988; BOROWITZKA, 1994; MOLINA GRIMA et al., 1995; LOURENÇO, 1996; VÍLCHEZ et al., 1997; ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000; RICHMOND, 2004).

Além da consolidada produção de microalgas para a obtenção de biomassa, as pesquisas relacionadas ao cultivo de microalgas ampliaram as perspectivas para a produção de novos combustíveis, biopolímeros, biofertilizantes, pesticidas, ácidos

graxos e pigmentos, assim como de inúmeros outros compostos bioativos que podem ser empregados em alimentos funcionais (SKULBERG, 2000; SKULBERG, 2004).

Atualmente as microalgas são comercializadas como alimento natural (“health food”) ou suplemento alimentar e são encontradas em pó (“sun dried” ou “spray-dried”), na forma de tabletes, cápsulas ou extratos. Microalgas são também incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas etc., tanto como suplemento nutricional quanto como corante natural (BECKER, 2004; COLLA; BERTOLIN; COSTA, 2004; PULZ; GROSS, 2004).

Cultivos de microalgas para a obtenção de carotenóides especialmente betacaroteno e astaxantina, apresentam-se muito promissores uma vez que estes produtos vêm sendo empregados como corantes e antioxidantes e têm elevado valor comercial (BOROWITZKA, 1994).

Atualmente existe um aumento na demanda por corantes naturais impulsionada pelos efeitos tóxicos causados pelos corantes sintéticos (DUFOSSÉ et al, 2005).

A rígida regulamentação para a aplicação de corantes sintéticos na indústria de alimentos estimula pesquisas e desenvolvimento de produção e uso de carotenóides microalgais como aditivo alimentar (CAMPO et al., 2000). Entre os carotenóides de maior expressão comercial estão o  $\beta$ -caroteno e a astaxantina, que são usados como corantes e antioxidantes na indústria de alimentos, na aquicultura e na avicultura.

## 1.2 Carotenóides

Os carotenóides são terpenóides (Figura 1), geralmente constituídos por 8 unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia de polieno que pode conter de 3 a 15 duplas ligações conjugadas, o que permite muitas configurações *cis* e *trans*. São amplamente distribuídos na natureza, sintetizados exclusivamente em plantas e responsáveis pela coloração de frutas e hortaliças (FRASER; BRAMLEY, 2004).

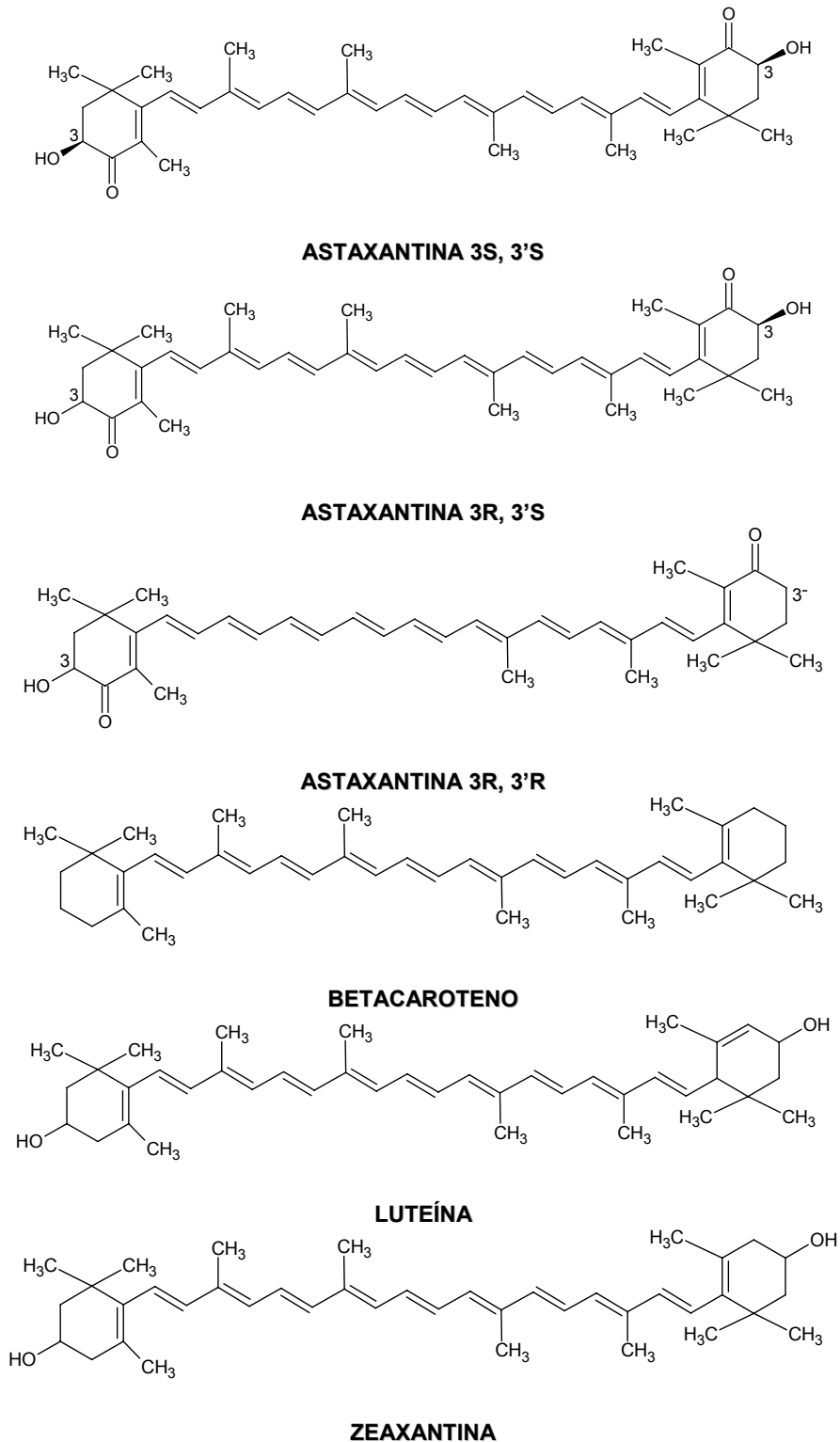


Figura 1 – Estrutura química dos principais carotenóides

Desde a década de 50 a atividade pró-vitamina A de alguns carotenóides é estudada. Já no início dos anos 90 surgiu o interesse no papel antioxidante destes

compostos, que vem sendo relacionado à proteção contra doenças crônico-degenerativas não transmissíveis.

Dos cerca de 600 carotenóides identificados, somente 20 são encontrados em tecidos humanos e são provenientes da dieta. Entre estes, os principais incluem os hidrocarbonetos licopeno e  $\beta$ -caroteno, e as xantofilas, astaxantina, cantaxantina, luteína e zeaxantina. São compostos lipofílicos encontrados em tecido adiposo, lipoproteínas e membranas celulares. A cadeia de polieno e outras características estruturais influenciam suas características químicas, a localização e orientação dos carotenóides no interior da bicamada lipídica em ambientes biológicos (EL-AGAMEY et al., 2004).

As propriedades antioxidantes dos carotenóides fundamentam-se na estrutura destes compostos, principalmente no sistema de duplas ligações conjugadas, tornando possível a captação de radicais livres, principalmente o radical alquilperoxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004).

Além da captação de radicais livres, os carotenóides captam a energia do oxigênio singleto, que volta ao estado basal. O carotenóide excitado (triplete) resultante dissipa a energia incorporada na forma de calor em favor do ambiente retornando ao seu estado original (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989).

Estrutura (tamanho, natureza, posição e números de grupos substituintes), forma física (agregados ou monômeros, configuração *cis* ou *trans*, etc.), localização ou sítio de ação da molécula carotenóide dentro da célula, potencial de interação com outros carotenóides ou antioxidantes (especialmente vitaminas C e E), concentração do carotenóide e pressão parcial de oxigênio são fatores que influenciam a atividade dos carotenóides em sistemas biológicos (YOUNG; LOWE, 2001).

O interesse cada vez maior da indústria por esses compostos naturais pode ser explicado pela capacidade atribuída a eles de prevenir doenças degenerativas, combatendo os radicais livres, funcionando como agentes anticâncer e estimuladores imuno-sistemáticos (BEM-AMOTZ, 2004).

### 1.3. Astaxantina

A microalga *Haematococcus pluvialis* (Figura 2) tem sido cultivada comercialmente devido sua capacidade de acumular astaxantina (carotenóide) sob condições de estresse ambiental (CORDERO et al., 1996).

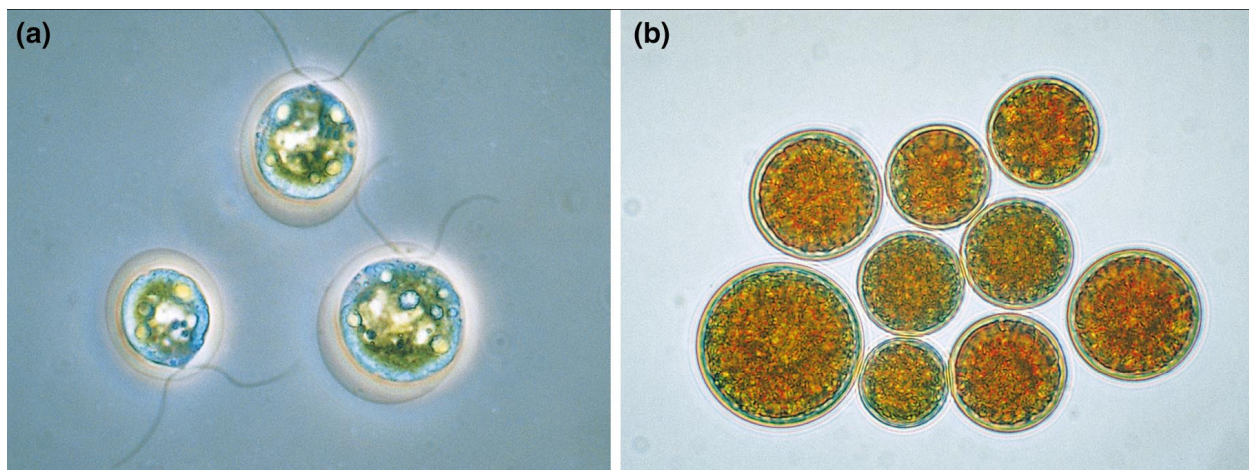


Figura 2 - Células de *Haematococcus pluvialis* em diferentes estágios: (a) forma livre, (b) forma encistada repleta de astaxantina.

Fonte: CYSEWSKI; TODD LORENZ, 2004.

Segundo Cysewski e Lorenz (2004), um mercado potencialmente grande está se desenvolvendo para este composto como um nutracêutico na indústria de suplementos dietéticos.

A astaxantina (3,3' - dihidroxi -  $\beta$  -  $\beta'$  - caroteno - 4 - 4' diona) é o carotenóide responsável pela coloração vermelho-alaranjado dos salmonídeos e crustáceos (GENTLES; HAARD, 1991; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991), é o principal pigmento presente nos animais aquáticos (MEYERS, 1994). Está relacionada com o desenvolvimento gonadal e a maturação, com a fertilização (hormônio de fertilização), com o desenvolvimento embrionário, eclosão e a viabilidade larvária, com a quimio-recepção, foto-proteção (contra a luz UV) e atividade antioxidante (FARÍAS-MOLINA, 2001; LIÑAN-CABELLO, 2002 e CUZON et al., 2004).

A astaxantina se assemelha aos outros carotenóides mais conhecidos como o  $\beta$ -caroteno, a zeaxantina e a luteína porque compartilha muitas das funções metabólicas e fisiológicas atribuídas a estes compostos.

Na alimentação humana este composto é popularmente conhecido por suas propriedades antioxidantes. Jyonouchi et al., (1994) considerou o poder antioxidante da astaxantina 10 vezes maior que o encontrado para o  $\beta$ -caroteno. Chen et al. (2006), estimam um poder antioxidante para a astaxantina 500 vezes mais forte que a vitamina E.

Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, seqüestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos, protegendo organismos aeróbicos do “estresse” oxidativo (RODRIGUES, 2003).

Devido a sua estrutura muito insaturada compostos como a astaxantina são altamente instáveis e são manipulados preferencialmente imobilizados em emulsões ou microcápsulas. A microencapsulação é um processo que consiste na formação de uma matriz polimérica, ou uma cobertura ao redor do composto em particular, a fim de proteger sua atividade biológica dos fatores ambientais e aumentando assim sua estabilidade físico-química (HIGUERA, C. et al, 2004).

Dentre as matizes mais comumente utilizadas estão aquelas que incluem os hidrolisados de amido e as gelatinas (HIGUERA, C et al, 2004), bem como caseinatos, derivados de celulose (hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose), pectina, beta-ciclodextrina e quitosana (BONNET et al., 2005).

## 1.4 Quitosana

A quitosana (Figura 3) é produzida através da desacetilação alcalina da quitina. A quitina é o segundo polímero natural mais abundante depois da celulose (YAO et al., 1995).

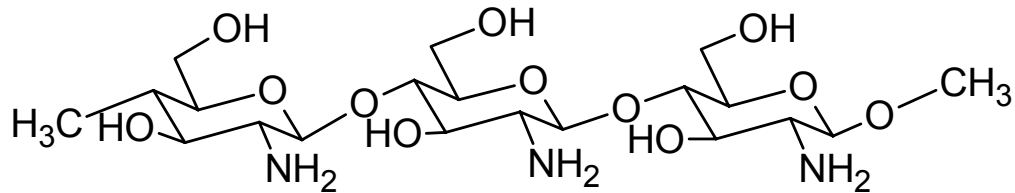


Figura 3 - Estrutura química da quitosana.

A quitosana é um poliaminossacarídeo com muitas propriedades biológicas (biodegradável, biocompatível, bioativo) e propriedades químicas (policatiônico, hidrogel, contém grupos reativos como o OH e NH<sub>2</sub>), possibilitando sua utilização para os mais diversos fins (DENKBAS et al., 2002).

A quitosana é insolúvel em água, porém, solúvel em soluções ácidas diluídas tais como ácido acético, ácido fórmico, ácidos minerais, bem como em alguns solventes orgânicos, produzindo uma solução viscosa (FÁVERE, 1994; KAWAMURA, 1993; MUZZARELLI, 1978; RORRER, 1993).

Devido à natureza da sua configuração química, a cadeia da quitosana tem uma configuração rígida e essa propriedade tem sido usada com sucesso para a preparação de filmes géis e esferas, as quais são freqüentemente usadas nas indústrias biomédica, cosmética e alimentícia. Uma de suas principais aplicações é na produção de microcápsulas com liberação controlada de drogas, nas quais as cadeias de quitosana são polimerizadas com dialdeídos, como glutaraldeído ou ácido tricarbóxico, como ácido cítrico.

Diversos agentes terapêuticos como os anticancerígenos, antibióticos, antiinflamatórios, esteróides, proteínas, aminoácidos, antioxidantes, têm demonstrado bom desempenho em micropartículas de quitosana para liberação controlada (SINHA et al., 2004).



## 1.5 Microencapsulação e suas aplicações

Nos últimos trinta anos estudos sobre as técnicas de microencapsulação, permitiram a ampliação do seu uso para a indústria de alimentos, farmacêutica, aromas e sabores, tintas, química, agrícola, dentre outras (BERGHAUSEN et al., 2002).

O conceito primário e também o modelo mais bem sucedido de microencapsulação, é observado nas células vivas, nas quais uma membrana natural protege os componentes celulares, e exerce função importante no metabolismo, controlando seletivamente a entrada e saída de substâncias das células (FANGER, 1974).

A microencapsulação pode ser definida resumidamente como um procedimento no qual se recobre uma substância de interesse por um material que a isole total ou parcialmente do ambiente, formando cápsulas (HEGER, 2001).

Além da função de proteção, outras vantagens podem ser associadas à encapsulação de substâncias (RÉ, 1998). A conversão de substâncias líquidas ou gasosas em pós, permitindo sua melhor utilização em sistemas desidratados; mascarar propriedades indesejáveis do material encapsulado como sabor, odor, pH, propriedades catalíticas, dentre outras; permitir mecanismos de liberação controlada das substâncias encapsuladas para fins específicos nos produtos onde está veiculada.

As características funcionais das cápsulas produzidas dependem, além do material de parede escolhido, das características do material de recheio, do método empregado na produção das microcápsulas e do meio onde serão utilizadas (HEGER, 2001).

A microencapsulação pode produzir dois tipos básicos de estruturas que recebem nomes diferenciados em função da distribuição do recheio. Quando a estrutura obtida é do tipo “reservatório” tem-se uma partícula mononucleada com uma quantidade de recheio envolvida por uma película de parede (Figura 4b). Essa estrutura recebe o nome de microcápsula. Quando o recheio se distribui ao longo de uma estrutura do tipo “esponja” ou matriz tem-se uma partícula multinucleada que recebe o nome de micropartícula (Figura 4a).

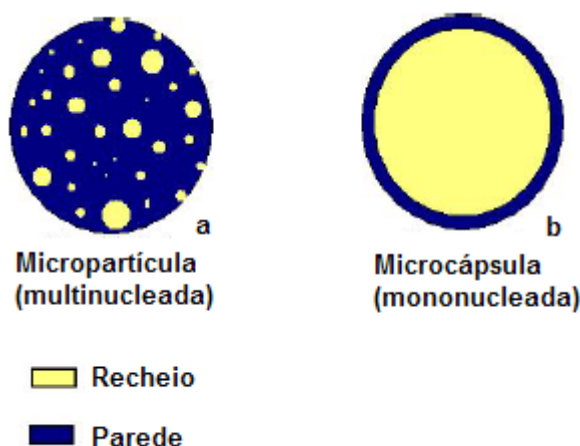


Figura 4 - Tipo de estrutura obtido no processo de encapsulação: a - multinucleada (micropartícula); b - mononucleada (microcápsula).

O material de parede que é usado para cobrir, dar forma à cápsula, reter o recheio e permitir a sua liberação quando desejado, fundamentalmente, não deve reagir com o recheio e nem ser solúvel neste, sendo que os dois muitas vezes têm polaridades opostas, ou seja, recheios de características apolares são microencapsulados por materiais de parede polares e vice-versa (CARDOSO, 2000).

Polímeros diversos como polissacarídeos, carboidratos, celulose e derivados, lipídios, proteínas e alguns materiais inorgânicos (silicatos, argilas, etc.) apresentam as características supracitadas e são muito utilizados na microencapsulação de compostos (CARDOSO, 2000).

Em alguns casos, quando se desejam características especiais de solubilidade, permeabilidade, rigidez, dentre outras, os polímeros podem ser submetidos a alterações pelo uso de plastificantes, reticulantes, enzimas, modificadores químicos, tratamentos na superfície e múltiplas coberturas (KRUIF et al., 2004).

Existem vários métodos para produção de microcápsulas. A escolha do mais adequado é feita dependendo da solubilidade do material do núcleo e do constituinte da casca; do tamanho de cápsula desejado; da espessura e da permeabilidade ideal da membrana, bem como da taxa e forma ideais de liberação (RÉ, 2000). Um dos métodos mais estudados é o da coacervação que pode ser de dois tipos, simples ou complexa. A coacervação simples utiliza apenas um composto polimérico, enquanto que a coacervação complexa é a baseada na formação de um complexo

(coacervado) entre polímeros carregados com cargas opostas, geralmente proteínas e polissacarídeos (WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004).

A microencapsulação por coacervação é uma das mais importantes aplicações industriais das propriedades interfaciais de interação entre proteínas e polissacarídeos e vem sendo utilizada por diversos segmentos como farmacêutico, alimentício, químico, cosmético, etc., para veiculação de diversos tipos de recheio (aromas, enzimas, fármacos, tintas) com aplicações variadas (STRAUSS; GIBSON, 2004).

O processo baseia-se na formação de uma emulsão (líquidos) ou dispersão (sólidos) do recheio na solução da mistura polimérica. Com a alteração das condições do meio para promover a coacervação (pH, força iônica, temperatura) ocorre a deposição do complexo ao redor dessas estruturas, formando um filme ou matriz sólida, responsável pela retenção, proteção e liberação controlada do recheio (SCHMITT et al. 1998).

A eficiência da microencapsulação por coacervação está associada às características dos polímeros envolvidos, do complexo formado e do recheio a ser encapsulado. Em geral, compostos líquidos ou particulados de caráter hidrofóbico ou partículas sólidas de baixa solubilidade, são facilmente encapsulados por esse processo (KRUIF et al., 2004).

A secagem das micropartículas coacervadas pode estender o tempo de estocagem das mesmas, bem como ampliar o seu uso para produtos desidratados (BURGESS; PONSART, 1998).

A liofilização, secagem em estufa, remoção da água por solventes e a secagem em condições ambientes, são empregadas para obtenção de micropartículas coacervadas desidratadas. No entanto, a maioria desses métodos não permite a obtenção das micropartículas como partículas individualizadas, interferindo no tamanho do produto final e, também em propriedades de liberação do recheio (BURGESS; PONSART, 1998).

## 1.6 Propriedades Térmicas

### 1.6.1 Termogravimetria (TGA, DTGA)

A termogravimetria nos permite medir a variação de uma substância e função da temperatura ou do tempo. Sendo assim, é um sistema com vasto campo de aplicação na caracterização do comportamento térmico dos materiais (WENDLANT, 1986).

O instrumental básico da termogravimetria consiste numa balança de precisão acoplada a um forno que permite programar aumento de temperatura de forma linear com o tempo. A amostra é colocada em uma pequena plataforma acoplada à balança. Os dados de massa gerados são captados pela saída serial do microcomputador. Um pequeno forno elétrico envolve a plataforma, de maneira que a temperatura da amostra pode ser controlada variando-se a potência do forno. Os resultados são apresentados sob forma de curva termogravimétrica (TGA), na qual a variação de massa é registrada em função da temperatura ou do tempo; pode-se obter uma curva termogravimétrica derivada (DTGA) onde a primeira derivada da curva TG é plotada em relação à temperatura ou tempo (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

A termogravimetria é útil em determinações complexas e qualquer mudança na velocidade de perda de peso pode ser prontamente identificada pelas inflexões que indicam reações consecutivas; portanto, mudanças de massa que ocorram a temperaturas próximas podem ser perfeitamente identificáveis. Os resultados podem ser afetados de acordo com os seguintes fatores: efeitos instrumentais (velocidade de aquecimento, atmosfera do forno, geometria do cadinho) e efeitos característicos da amostra tais como peso, tamanho, modo de preparação (VOGEL, 2002)

### 1.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica que detecta alterações na temperatura da amostra que são resultado de transições entálpicas exotérmicas ou endotérmicas, ou reações tais como aquelas causadas por mudanças de fase, fusão, inversão de estruturas cristalinas, sublimação e vaporização, reações de desidratação, reações de dissociação ou decomposição, reações de oxidação e redução, desnaturação protéica e outras reações químicas. (WENDLANT, 1986).

A DSC é uma grande ferramenta para a obtenção da Transição vítrea ( $T_g$ ), efeito térmico que pode ser utilizado para a caracterização de plásticos e outros materiais amorfos ou semicristalinos como vidros inorgânicos ou alimentos, onde os componentes nos materiais alimentícios apresentam efeitos similares aos dos polímeros (CANEVAROLO, 2001).

A Transição vítrea é a propriedade do material onde podemos obter a temperatura da passagem do estado vítreo para um estado “maleável”, sem ocorrência de uma mudança estrutural. Este parâmetro é muito relevante nas áreas de processamento, pesquisa e desenvolvimento de materiais, por sua importância com relação às mudanças das propriedades relacionadas a esses materiais, onde se pode estudar o comportamento de processabilidade em função da temperatura. Por ser uma característica específica para cada material a  $T_g$  é uma excelente ferramenta para identificação de compostos (MACHADO, 2004).

### 1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação (GONCALVEZ, 2004).

Na microscopia eletrônica de varredura os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. A medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição (BOZZOLA; RUSSEL, 1992).

O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre o microscópio ótico (MO) e o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). A grande vantagem do MEV em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm ( $20 - 50 \text{ \AA}^\circ$ ) - atualmente existem instrumentos com até 1 nm ( $10 \text{ \AA}^\circ$ ) - enquanto que no ótico é de 0,5  $\mu\text{m}$ . Comparado com o MET a grande vantagem do MEV está na facilidade de preparação das amostras.

Entretanto, não são apenas estas características que fazem do MEV uma ferramenta tão importante e tão usada na análise dos materiais. A elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica. A observação e análise de fratura teve um grande avanço com o uso do microscópio eletrônico de varredura.

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) se tornou um instrumento imprescindível nas mais diversas áreas: eletrônica, geologia, ciência e engenharia dos materiais, ciências da vida, etc. Em particular, o desenvolvimento de novos materiais têm exigido um número de informações bastante detalhado das características microestruturais só possível de ser observado no MEV. (GONCALVEZ, 2004).

#### 1.8 Atividade Antioxidante (Método ABTS)

O método ABTS é um dos mais utilizados entre os testes indiretos de avaliação da atividade antioxidante. Foi primeiramente sugerido por Rice-Evans, Davies, Gopinathan e Milner (1993) para avaliar amostras biológicas e então foi amplamente aplicado no estudo de alimentos, carotenóides e fenólicos naturais solúveis em água. O princípio do método consiste em monitorar o decaimento do radical ABTS produzido pela oxidação do 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), causada pela adição de uma amostra contendo um composto com atividade antioxidante na região do visível (400 – 800 nm). O ABTS absorve luz na faixa de 600 – 750 nm e pode ser facilmente determinado por espectrofotometria. Na ausência de carotenóides, o ABTS é estável, mas ele reage energeticamente com um doador de H, como os carotenóides, sendo então convertido em uma forma incolor de ABTS. Os autores determinaram que a quantidade de ABTS consumida estivesse relacionada à reação com os carotenóides presentes na amostra, a qual é expressa em equivalentes Trolox (unidades de concentração). Este valor foi designado TEAC, sigla em inglês para “capacidade antioxidante equivalente ao Trolox”. Como o TEAC para o Trolox foi definido como sendo 1, o valor TEAC para

um antioxidante individual é o número de radicais ABTS consumidos para cada molécula de antioxidante (CAMPOS e LISSI, 1997).

A vantagem do ensaio ABTS é sua simplicidade, o que permite a aplicação em análises de rotina em qualquer laboratório. Sua principal limitação é geral a todos os métodos indiretos de avaliação da atividade antioxidante: o valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra estudada em reagir com o ABTS, mais do que sua capacidade de inibir o processo oxidativo. A reação com o ABTS ocorre de forma lenta com várias amostras de produtos naturais (CAMPOS, ESCOBAR e LISSI, 1996). Além disso, o resultado da determinação do TEAC depende do tempo de incubação, assim como a razão entre a quantidade de amostra e a concentração do radical. A pequena seletividade do ABTS na reação com doadores de H é mais uma limitação do método (ARTS et al, 2004).

### 1.9 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada para identificação de grupos funcionais. A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho e tem o comprimento de onda entre 2,5 a 15  $\mu$  (4000 a 667  $\text{cm}^{-1}$ ) (Silverstein, 1994; Allinger et al., 1976). É a região onde está localizada a maior parte da energia das vibrações moleculares. As vibrações de átomos ou de grupos funcionais de um dado composto têm frequência característica e através da análise detalhada das bandas vibracionais de absorção, consultas das tabelas e compilações espectrais das literaturas publicadas, obtêm-se informações necessárias para a identificação de estruturas e, conseqüentemente determinar a estrutura da molécula de interesse (Fiori, 1996; Cesteros, 1993; Cesteros, 1990).

Esta técnica é muito importante para obter informações estruturais dos polímeros, bem como suas modificações (Silverstein, 1994; Allinger et al., 1976). Também tem sido empregada para a identificação da ocorrência ou não de interações fracas (dipolares e ligações de hidrogênio) entre os componentes poliméricos de interesse (Fiori, 1996; Cesteros, 1990; Cesteros, 1993).

O espectro no infravermelho da quitosana é avaliado na região espectral entre 4000 - 667  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas de absorção entre 3800 - 2800  $\text{cm}^{-1}$  são muito intensas

e largas, devido às vibrações de estiramento OH e da água. Em  $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a vibração de estiramento C-H de compostos hidrocarbonetos alifáticos. Uma banda em  $1379\text{ cm}^{-1}$  e  $1590\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  têm sido atribuída à deformação assimétrica  $\text{CH}_3$ , e às vibrações de deformação de intensidade média N-H de amina primária, respectivamente. A região do espectro infravermelho entre  $1000$  a  $1100\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento C-O (Fávere, 1994; Domszy, 1985; Moore, 1980). A espectroscopia no infravermelho, pela riqueza em bandas de absorção, na maioria das vezes de boa resolução, é um método apropriado para obter as informações necessárias para o reconhecimento e a identificação de estruturas moleculares.

### 1.10 Análise instrumental de cor

A cor é um atributo de importância fundamental no julgamento da qualidade de um alimento, uma vez que a apreciação visual é o primeiro dos sentidos a ser usado, sendo, portanto, uma característica decisiva na escolha e aceitação do produto. A identificação humana das cores é obtida a partir de uma complexa sensação de brilho, intensidade e claridade, dentre outras. Na percepção das cores primárias e de suas nuances, a definição de uma cor é uma interpretação subjetiva.

Todas as cores podem ser especificadas em termos da contribuição proporcional dos componentes vermelho, verde e azul do espectro visível que equivale à cor da amostra. A combinação das três cores primárias, representadas pelos símbolos R (red, vermelho), G (green, verde) e B (blue, azul) resulta, portanto, na cor da amostra que pode ser caracterizada objetivamente e expressa por meio de valores numéricos e por diferentes sistemas de medida (FRANCIS ; CLYDESDALE , 1975). Com o intuito de obter a caracterização objetiva da cor, a CIE (Commission Internationale de l'Éclairage), em 1976, estabeleceu o sistema CIELAB ( $L^*a^*b^*$ ), em que uma particular cor tem uma única localização, especificada numericamente em um espaço tridimensional esférico (Figura 5), definido por três eixos perpendiculares: o eixo  $L^*$  (luminosidade) varia do preto (0) ao branco (100); o eixo  $a^*$ , do verde ( $-a$ ) ao vermelho ( $+a$ ) e o eixo  $b^*$ , do azul ( $-b$ ) ao amarelo ( $+b$ ) (MCGUIRE, 1992).



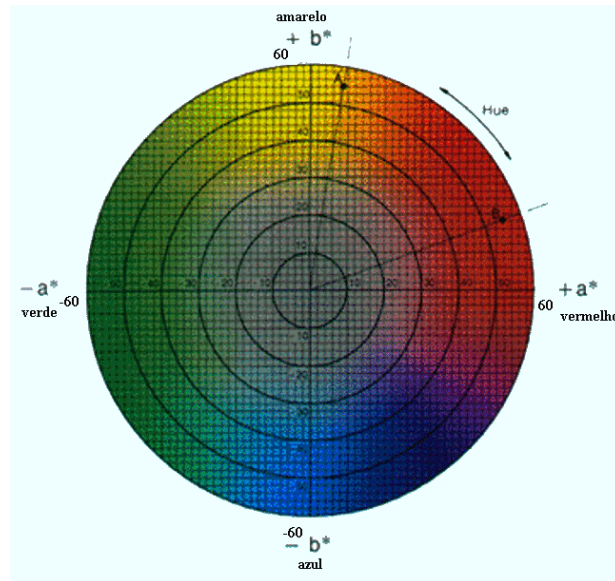


Figura 5 - Sistema de coordenadas de cores CIELAB  
 Fonte: Star Color, 2004.

Para a medição da cor propriamente dita, são utilizados dois principais tipos de aparelhos: os colorímetros e os espectrofotômetros. Utilizando para as suas leituras a fonte de luz e iluminação padrão a fim de evitar as oscilações de iluminação do dia, e com a mesma sensibilidade correspondente à do olho humano, o colorímetro ou espectrofotômetro, percebe e registra as minuciosas diferenças de cores (MORI et al., 2005). Os colorímetros, de acordo com Michot (1994), são equipados com uma série de filtros (azul, amarelo, verde, vermelho) e de fotodetectores, que tratam de reconstituir a resposta de um observador a uma cor. Com relação aos espectrofotômetros, segundo o autor, estes medem a refletância de uma amostra e de um branco padrão nos mesmos comprimentos de onda, o que leva à porcentagem de luz refletida pelo objeto em função de um padrão.

A colorimetria tem sido utilizada para caracterizar a cor de diferentes pigmentos, a exemplo das antocianinas (MONTES et al., 2005), clorofila (SINNECKER et al., 2002) e carotenóides (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al. 2003), bem como para avaliar a cor de alimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limit the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 45 – 49 2004.

BECKER, E. W. Micro-algae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, J.L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. USA: Cambridge University Press, 1988, p. 222 - 254.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A (ed). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p. 312 – 351.

BEDDOW, J. **Particulate science and technology**. New York: Chemical Publishing Co., 1980.

BEN-AMOTZ, A. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: *Dunaliella*. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004, p. 273 – 280.

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. Introduction to the Algae. Prentice Hall, Englewood, Cliffs, 1985 apud ARREDONDO-VEGA, B. O. **Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum***. Santiago de Compostela, 1995. 138p. Tese (Doutorado en Microbiología), Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 1995.

BONNET, C.; CORREDIG, M.; ALEXANDER, M. Stabilization of caseinate-covered oil droplets during acidification with high methoxyl pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8600-8606, 2005

BOROWITZKA, M. A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, J.L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. USA: Cambridge University Press, 1988, p. 153-196. (a)

BOROWITZKA, M. A. Fats, oils and hydrocarbons. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, J.L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. USA: Cambridge University Press, 1988, p. 257-287. (b)

BOROWITZKA, M. A. Products from algae. In: PHANG et al. (eds.). **Algal - Biotechnology in the Asia Region**. University of Malaya, 1994, p. 1-15.

BOZZOLA, John J., RUSSELL, Lonnie D. **Electron Microscopy**. 2. ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston - USA 1992.

CAMPO et al. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.

CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant activity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemist's Society**, v. 7, p. 43 - 49, 1996.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, p. 219 - 224, 1997.

CERTIK, M., SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 1, p. 1 - 14, 1999.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. **Interciência**, p. 523-532, 2000.

COLLA, L. M.; BERTOLINI, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations, **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 59c, p. 55 - 59 2004.

CORDERO, B., OTERO, et al. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 2, p. 213 - 218, 1996.

CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, p. 513-551, 2004.

CYSEWSKI, G. R., TODD LORENZ, R. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and secondary Products - Species of High Potential: *Haematococcus*. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science, UK, 2004, p. 281 - 288.

CHEN, X.; CHEN, R.; GUO, Z.; LI, C.; LI, P. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with  $\beta$  – cyclodextrin. **Food Chemistry**, 2006.

DE PAUW, N., G. PERSOONE. Microalgae for aquaculture. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, J.L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. USA: Cambridge University Press, 1988, p. 197-221.

DERNER, R. B. **Efeito de Distintas Fontes de Carbono no Crescimento e na Composição Bioquímica das Microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis* (classe Bacillariophyceae), com Ênfase no Teor de Ácidos Graxos Polinsaturados**. 2001. 50 p. Projeto de Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

DI MASCIO, P., MURPHY, M. E., SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoids singlet oxygen quencher. **Archive Biochemistry and Biophysical**, v. 274, p. 532 – 538, 1989.

DI MASCIO, P.; KAISER, S; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.274, p. 532, 1989.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.;ARAD, S. M.; BLANC, P.;MURTHY,K. N. C.;RAVISHANKAR, G.A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 389 – 406, 2005.

EDWARDS, M.F., INSTONE, T. Particulate products: their manufacture and use. **Powder Technology**, v. 119, p. 9-13, 2001.

EI-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. G.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, p. 430, 2004.

FABREGAS, J. et al. Decrease of plasma cholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. **Journal General Microbiology**, n. 40, p. 553 – 540, 1994.

FARÍAS-MOLINA, A. Nutrición en moluscos Pectínidos. In: Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: **Ciencia y Acuicultura**. A. N. Maeda-Martinz (ed.), 2001, p. 89 - 104.

FÁVERE, V. T. **Adsorção dos íons Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II) e Zn (II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas**. Tese (Doutorado em Química). Curso de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.

FAYED, M. E., OTTEN, L. **Handbook of powder science and technology**. New York:Chapman & Hall, 1997.

FELIX, V. L. **Extracción supercrítica de astaxantina de biodesechos de jaiba (*Callinectes sapidus*) con CO<sub>2</sub>/etanol y su microencapsulado con quitosano**. Tesis de maestría. Centro de Investigación em Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México, 1999.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. **Drug development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 979 – 993 1998.

FIORI, S. **Remoção seletiva de níquel (II) em cápsulas de quitosana/álcool polivinílico adsorvido com agente quelante dimetilglioxima**. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

FURLAN, L. **Adsorção de corantes reativos e fotossensíveis por aminopolissacarídeos naturais**. Tese (Doutorado em Química) – Curso de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

FRANCIS, F. J.; CLYDESDALE, F. M. **Food colorimetry: theory and applications**. Connecticut: The Avi Publishing Company, Inc., 1975. 477 p.

FRANKE, H. et al. Polyunsaturated fatty acids from microalgae. **International Food Ingredients**, n. 4, p. 46, 1994.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipids Research**, v. 43, p. 228, 2004.

GENTLES, A., & HAARD, N. F. (1991). Pigmentation of rainbow trout with enzyme treated and spray dried *Phaffia rhodozyma*. **The Progressive Fish Culturist**, v. 53, 1–6, 1991.

GOLDMAN, J.C. Biomass production in mass culture of marine phytoplankton at varying temperatures. **Journal Experimental Marine Biological Ecology**, v. 27, p. 156-161, 1977.

GONÇALEZ, J. C.; JANIN, G.; SANTORO, A. C. S.; COSTA, A. F.; VALLE, A. T. Colorimetria quantitativa: uma técnica objetiva de determinar a cor da madeira. **Brasil Florestal**, n. 72, 2001.

GONÇALVES, M. Microscopia eletrônica de varredura. In: **Técnicas de caracterização de polímeros**, São Paulo, 2004, p.165 – 175.

GUERIM, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends in biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210-216, 2003.

GUILLARD, R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.L., CHARLEY, M.H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**, 1975. p. 29-60.

GRACÉN, J.; GRACÉN, I. Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. **Boletín Intexter**, n. 10, p. 67-71, 1996.

HIGUERA, C. et al. Mienencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. **Carbohydrate polymers**, v.56, p.41- 45, 2004.

HUNTER, R. S; HAROLD, R. W. J. Wiley (ed.) **The measurement of appearance**. New York: Hardcover, 1987, ed. 2, 432 p.

ILLMAN, A. M., SCRAGG, A. H., SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631- 635, 2000.

JYONOUCHI, H., SUN, S., GROSS, M. Effect of carotenoids on in vitro immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances in vitro

immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen. **Nutrition and Cancer**, v. 23, p. 171–183, 1994.

KAWAMURA, Y.; MITSUHASHI, M.; TANIBE, H. Adsorption of metal ions on polyaminated highly porous chitosan chelating resin. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 2, p. 386 - 391 1993.

KOWALISKI, P. (ed.) **Vision et mesure de la couleur**. Masson, 1990, 255 p.

LIÑAN-CABELLO, M.A.; PANIAGUA-MICHEL, J. J.; HOPKINS, P.M. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 299 - 309 2002.

LIZARDI, M. J. **Implementacion de tecnologias alternativas para la obtencion de polissacarideos funcionales a partir de biodesechos pesqueros quitinosos**. Tesis de maestria. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México, 1998.

MACHADO, B.D.L. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: **Técnicas de caracterização de polímeros**, São Paulo, 2004, p.229 – 261.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.

MCGUIRE, R. G. **Reporting of objective color measurements**. Hort Science, v. 27, n. 12, p. 1254-1555, 1992.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7266-7270, 2003.

MERA PHARMACEUTICALS Inc. Astaxanthin. Disponível em: <<http://www.astaxanthin.org/>>. Acesso em: 15 /05/ 2007.

METTING, B. Micro-algae in agriculture. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, J.L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. USA: Cambridge University Press, 1988, p. 288 - 304.

MEYERS, S. Developments in world aquaculture, feed formulations, and role of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p.1069–1076, 1994.

MICHOT, S. **Classification subjective des parquets de chêne**: rapport de stage. Epinal: Université de Nancy, 1994. 48 p.

MOLINA GRIMA, E. et al. A. The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: from strain selection to product purification. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 711-719, 1995.

MONTES, C.; VICARIO, I. M.; RAYMUNDO, M.; FEET, R.; HEREDIA, F. J. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from jaboticaba (*Myrcia jaboticaba* Berg). **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 983-988, 2005.

MORI, C. L. S. O.; LIMA, J. T.; MORI, F. A.; TRUGILHO, P. F.; GONCALEZ, J. C. Caracterização da cor da madeira de clones de híbridos de *Eucalyptus* spp. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 137-146, 2005.

MUZZARELLI, R. A (ed) **Chitin**. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1978.

OHSHIMA, T. Recovery and use of nutraceutical products from marine resources. **Food Technology**, v. 52, n. 6, p. 50-54, 1998.

OSWALD, W. J. Micro-algae and waste-water treatment. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, J.L. (eds.) **Microalgal Biotechnology**. USA: Cambridge University Press, 1988, p. 305-328.

PENICHE, C. et al. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. **Macromolecular Bioscience**, v.3, p. 511- 520, 2003.

PORTE, H., COUARAZE, G. Microencapsulation processes for the manufacture of systems providing modified release of the active constituent. In: CHULIA, D. DELAIL, M., POURCELOT, Y. (Eds.). **Powder technology and pharmaceutical processes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. p.513-543.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635 – 648 2004.



RÉ, M. I. Microencapsulação: tecnologia que atribui propriedades inteligentes a materiais ativos. **Ciência Hoje**, p. 24-29, 2000.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195 - 1236, 1998.

RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. UK: Blackwell Science, 2004, 566 p.

RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 315 – 320 2003.

RORRER, G. L., HSIEN, T. Y. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from waste water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, p. 2170 - 2178, 1993.

SHELEF, G., SOEDER, C. J. **Algae Biomass Production and Use**. Amsterdan: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980, 852 p.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. Ed., Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1994.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, R.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, K. B.; DHAWHAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, V. 274, P. 1 – 33, 2004.

SINNECKER, P.; GOMES, M. S. O.; ARÊAS, J. A. G.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3961-3966, 2002.

SKULBERG O. M. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyta research. **Journal of Applied Phycology**, n.12, p. 341 – 348 2000.

SKULBERG, O. M. Bioactive chemicals in microalgae. In: Richmond, A (ed). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 485 – 512.

SPINELLI, V. A. **Quitosana, polieletrólito natural para o tratamento de água potável**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Curso de pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

STAR COLOR. CIE Lab Color System. Disponível em <<http://www.starcolor.co.th/1qc.html>> Acesso em: 15/ 05/ 2007.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 183, 2004.

URICH, K. (ed.) **Comparative animal biochemistry**. Germany: Springer, 1994.

VÍLCHEZ, C. et al. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 20, p. 562 - 572, 1997.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2002, p. 265-271.

WENDLANDT, W. W. (ed.) **Thermal Analysis**. Texas: Willey-Interscience, 1986, 815 p.

YOUNG, A.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 20, p. 385, 2001.

## **CAPÍTULO 2**

**Eficiência da microencapsulação com quitosana na manutenção da cor e da atividade antioxidante da astaxantina.**

Eficiência da microencapsulação com quitosana na manutenção da cor e da atividade antioxidante da astaxantina.

## RESUMO

Micropartículas de astaxantina com quitosana foram preparadas pelo método de coacervação e liofilizadas. A estabilidade do pigmento nas micropartículas foi estudada a temperatura ambiente, quinzenalmente durante 120 dias e foi medida pela atividade antioxidante (método ABTS) e pela cor (método CIELAB). O conteúdo de astaxantina da biomassa seca da microalga *Haematococcus pluvialis* foi utilizada como referência. Observou-se uma estabilidade nos parâmetros de cor e atividade antioxidante ao longo do tempo, característica também observada na biomassa de microalga. Valores equivalentes Trolox (TEAC) maiores para as micropartículas indicam uma maior disponibilidade da astaxantina no meio reacional. Conclui-se que a quitosana tem grande habilidade para proteger a astaxantina de processos degradativos, além de tornar mais fácil sua disponibilidade no meio reacional. Alguns ajustes na formulação das micropartículas são necessários para aperfeiçoar o processo de encapsulação.

Palavras chave: cor, atividade antioxidante, ABTS, TEAC.

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides compõem um grupo de compostos responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha em muitos alimentos de origem vegetal e alguns de origem animal. São também citados como responsáveis pela diminuição dos riscos de doenças como câncer e doenças cardiovasculares (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

Cultivos de microalgas para a obtenção de carotenóides, principalmente betacaroteno e astaxantina (3,3' - dihidroxi -  $\beta$  -  $\beta'$  - caroteno - 4 - 4' diona), apresentam-se muito promissores, uma vez que estes produtos vêm sendo empregados como corantes e antioxidantes e têm elevado valor comercial (BOROWITZKA, 1993). Dentre algumas das aplicações comerciais, esse pigmento é empregado em aquicultura, na alimentação de salmonídeos, vieiras e crustáceos.

Um sistema de duplas ligações conjugadas constitui o cromóforo responsável pelo poder corante dos carotenóides e também pela sua atuação contra doenças degenerativas. No entanto, este mesmo sistema é causa de sua instabilidade e a preservação de carotenóides durante o processamento é um desafio e uma grande preocupação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Devido a sua estrutura altamente insaturada, a astaxantina sofre rapidamente a ação do oxigênio (oxidação) quando exposto ao ar. Portanto, é necessário que seja estabilizada para que se possa empregá-la em produtos comerciais. A degradação térmica ou oxidativa da astaxantina durante o processamento ou armazenamento pode causar a perda de seu valor nutritivo e propriedades biológicas, assim como, a formação de compostos de aroma ou cor indesejáveis. Além disso, a baixa hidro solubilidade da astaxantina limita seu uso como antioxidante de fase aquosa (HIGUERA et al., 2004).

Estudos estão sendo feitos para proteger os pigmentos instáveis por encapsulação, suspensão ou pelo uso de outros antioxidantes naturais (PSZCZOLA, 1998). A encapsulação é desejável para tornar o carotenóide dispersível em água.

Dentre os polímeros empregados nos processos industriais de microencapsulação, a quitosana mostra-se como uma alternativa eficiente e economicamente viável (CYSEWSKI; TODD LORENZ, 2004).

A quitosana é um polímero biocompatível, biodegradável e não tóxico, que exibe uma excelente habilidade para formar filmes e cápsulas (PENICHE et al., 2003). Devido suas características e disponibilidade, pode ser potencialmente usada em diversas áreas tecnológicas, tais como: tratamento de água e efluentes, agricultura, fotografia, cosméticos, pele artificial, alimentos, oftalmologia, manufatura de papel, liberação controlada de fármacos e biotecnologia (SPINELLI, 2001).

Em alimentos, sua ação antimicrobiana (No et al., 2002; Rhoades e Roller, 2000; Yoshihiko et al., 2003) e sua capacidade de formação de filmes (Jiang e Li, 2001) despertam o interesse de pesquisadores para sua utilização como conservante em alimentos e em embalagens inteligentes (ROLLER; COVILL, 2000). Além disso, outra aplicação da quitosana consiste na produção de micropartículas (TOZAKI et al., 2002).

A microencapsulação é um procedimento para revestimento e proteção de substâncias. Nos últimos trinta anos os estudos dessa técnica permitiram a ampliação do seu uso para a indústria de alimentos, farmacêutica, aromas e sabores, tintas, química, agrícola, dentre outras (WIELAND-BERGHAUSEN et al., 2002).

Várias técnicas e agentes encapsulantes vêm sendo sugeridas (RÉ, 1998). Houve na última década um grande progresso no desenvolvimento de ingredientes microencapsulados (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). Os estudos encontram-se avançados em relação a aromas, mas limitados em termos de corantes.

A microencapsulação da astaxantina em uma matriz polimérica de quitosana pode alterar suas propriedades químicas e físicas aumentando sua estabilidade, assim, este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência da microencapsulação na manutenção da cor e atividade antioxidante da astaxantina durante um período de 120 dias e assim verificar sua estabilidade química.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria prima

A astaxantina utilizada é proveniente da biomassa microalgal seca da espécie *Haematococcus pluvialis* comercializada pela empresa CYANOTECH CORPORATION (Havaí, USA) sob o nome comercial de NatuRose. A quitosana é proveniente da quitina obtida da carapaça de camarão (*Pennaeus spp.*) seguindo o protocolo descrito por Lizardi (1998) comercializado pela empresa PHYTOMARE (Santa Catarina, Brasil).

### 2.2 Reagentes

Os reagentes 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) foram adquiridos do Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha). Os demais reagentes usados, todos de qualidade analítica, foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil). Água destilada deionizada foi utilizada em todo o processo.

### 2.3 Preparação das micropartículas

As micropartículas de quitosana foram preparadas através de emulsificação pelo método de coacervação proposto por BUSTUS et al (2003). Foram misturados 8 mL de uma solução de astaxantina 400 ppm, veiculada em óleo de soja com 0,1 mL de tween 20 (emulsificante) e 32 mL de uma solução de quitosana 2% em ácido acético 1%. A mistura foi emulsificada com o auxílio de um agitador mecânico (TE 139 – Tecnal), a uma velocidade de 8000 rpm, conforme Higuera et al. (2004).

A emulsão primária obtida foi lentamente aspergida com a utilização de um vaporizador manual em 10 volumes de uma solução 0,2N de NaOH /etanol (4:1) com uma suave agitação a fim de induzir o endurecimento e a precipitação das paredes

das micropartículas. Em seguida, foram adicionados 6,4 mL de glutaraldeído (solução aquosa 25%) na seguinte proporção, 2 mL de glutaraldeído para cada 10 mL de solução de quitosana utilizada na emulsão primária. A função do glutaraldeído é fazer a ligação cruzada entre as moléculas de quitosana, induzindo a reticulação (MAYYA et al., 2003).

As micropartículas filtradas foram congeladas em um congelador de placas (N 355/97 modelo PF-5) a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente secas em liofilizador (Terroni Favel modelo LT 1000/8) por um período de 24 horas.

Para evitar a fotooxidação, as amostras foram protegidas com papel alumínio durante todo o procedimento.

#### 2.4. Extração, determinação e quantificação da astaxantina

A extração, determinação e quantificação da astaxantina foram realizadas segundo protocolo descrito por Suhnel et al. (2007).

Amostras (50 mg) de micropartículas e microalgas foram transferidas separadamente para copos de Becker (40 mL) envolvidos com papel alumínio e acrescidas de 5 mL da solução extratora. Consoante ao tempo de extração, as amostras permaneceram em agitação (agitador magnético Sisatom), protegidas da luz, em temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C}$ ). Após a extração, as amostras foram filtradas em papel filtro, tendo seu volume final ajustado para 3 mL.

Alíquotas (300  $\mu\text{L}$ ) das amostras foram filtradas (0,22  $\mu\text{m}$ ), seguido da injeção de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna  $\text{C}_{18}$  de fase reversa Vydac (BioRad, 25 cm x 4,6 mm  $\varnothing$ ) e detector UV-visível, operando em leitura de 470 nm. Como fase móvel, utilizou-se acetonitrila: metanol (90: 10, grau HPLC), em fluxo de 0,8 mL/min.

A identificação da astaxantina foi realizada com base no tempo de retenção obtido a partir da análise de amostra padrão (0,461 mg/10 mL Hex, Sigma – MO, USA), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação de astaxantina foi realizada calculando-se a integral da área dos picos correspondentes e através de curva padrão externa ( $y = 7.044,96 x$ ,  $R^2 = 0,994$ ).



## 2.5. Eficiência de microencapsulação e rendimento

Usando como base de cálculo o dado de quantificação da astaxantina nas micropartículas obtido por HPLC, a eficiência de encapsulação (EM) foi calculada através da equação (1) proposta por Velascos et al., (2006):

$$\text{EM} = (\text{óleo encapsulado} / \text{total de óleo}) * 100 \quad (1)$$

O Rendimento em micropartículas foi determinado através da massa de microcápsulas obtida em função da massa total de ingredientes utilizados Mayya et al.,(2003) (equação 2):

$$\text{Rendimento} = (\text{massa micropartículas} / \text{massa total}) * 100 \dots\dots\dots(2)$$

## 2.6. Avaliação dos Parâmetros de Cor

Os parâmetros de cor das amostras foram determinados através de colorímetro Minolta Chromo CR-400 (Minolta, Ozaka, Japão) operando no sistema CIE (L\*, a\* e b\*), utilizando sistema de iluminação D65 e ângulo de observação de 10° e calibração em placa branca.

As micropartículas e a amostra de microalga seca analisadas foram deixadas à temperatura e luz ambiente por um período de 120 dias. As leituras foram realizadas quinzenalmente em temperatura ambiente (25 ± 1°C), concomitantemente ao ensaio de descoloração do radical ABTS.

## 2.7. Ensaio de descoloração do radical ABTS

O ensaio de atividade antioxidante total foi realizado de acordo com o método descrito por Re et al. (1999), modificado por Kuskoski et al (2004). O radical ABTS<sup>+·</sup> (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)) foi gerado através da reação de 7,4 mM ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio após 16 horas no escuro, à temperatura ambiente. A solução de ABTS<sup>+·</sup> foi diluída com etanol até que atingisse uma absorvância de  $0,700 \pm 0,05$  a 754 nm. A solução de ABTS<sup>+·</sup> (980 µL) foi adicionada a 20 µL da amostra e agitada vigorosamente. A mistura permaneceu em temperatura ambiente por 6 min e a absorvância foi imediatamente verificada a 734 nm utilizando o espectrofotômetro Hewlett-Packard 8425. Trolox, o análogo da vitamina E solúvel em água, foi utilizado como padrão de referência. Uma curva padrão foi construída através da redução da absorvância do ABTS com soluções com diferentes concentrações de Trolox por um tempo de 6 min. A absorvância da solução oxidada resultante foi plotada contra a curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em termos de atividade antioxidante equivalente ao Trolox TEAC, µmol de equivalentes trolox /g de micropartículas.

As micropartículas e amostra de microalga seca foram deixadas à temperatura e luz ambiente por um período de 120 dias. As leituras foram realizadas quinzenalmente, concomitantemente às análises de colorimetria.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

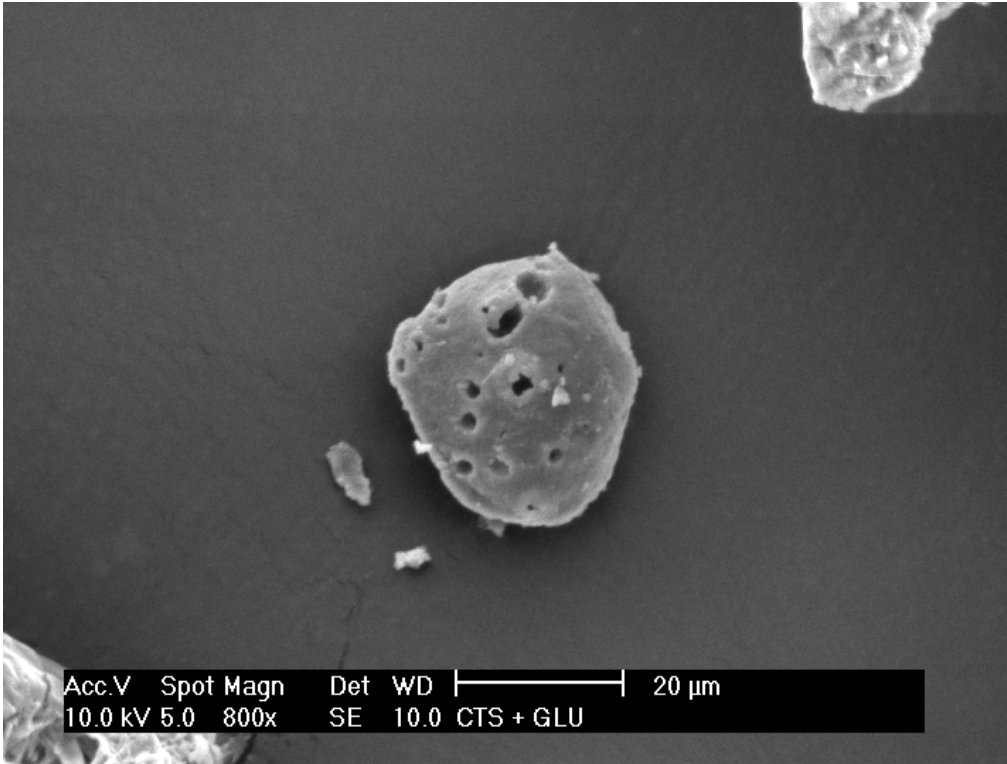
#### 3.1. Preparação das Micropartículas

A metodologia descrita para a confecção das micropartículas mostrou-se efetiva, uma vez que possibilitou a produção de micropartículas com morfologia não-esférica e topografia irregular, com dimensões variando aproximadamente entre 30 e 50  $\mu\text{m}$ , que de acordo com Bustus et al., (2003) são ideais para serem aplicadas na indústria de alimentos e na alimentação de organismos aquáticos (Figura 1 a, b, c, d).

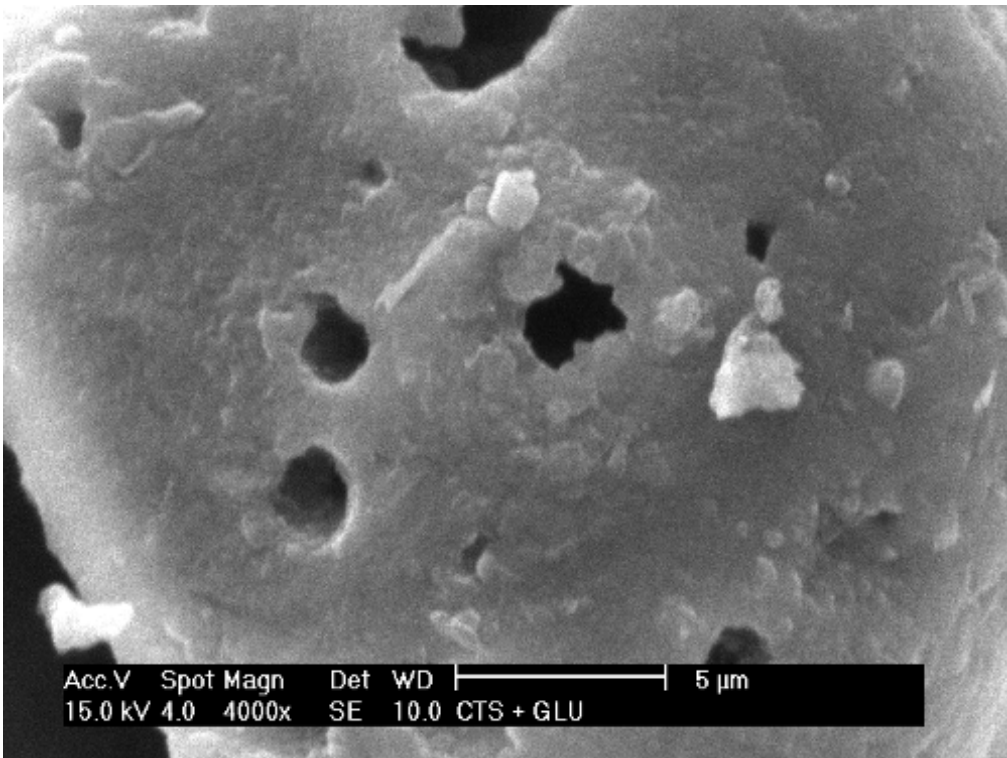
Os mesmos autores estudaram a relação da proporção entre a fase aquosa e a fase oleosa da emulsão primária com o tamanho final das micropartículas e concluíram que quanto maior a quantidade de água em relação ao óleo menor o tamanho das partículas. Por este motivo foi utilizado a proporção 4:1 entre a fase aquosa e a fase oleosa no preparo desta emulsão.

A concentração de 400 ppm de astaxantina no óleo está baseada na concentração deste mesmo pigmento no conteúdo de óleo do microcrustáceo Antártica krill (KOLAKOWSKA et al., 1994). A utilização de uma solução de quitosana a 2% foi relatada como ideal para se obter uma emulsão mais estável de acordo com Genta et al., (1997) e confirmada por Yeo et al., (2005) que observaram que micropartículas preparadas com concentrações altas de polímero são mais resistentes e estáveis.

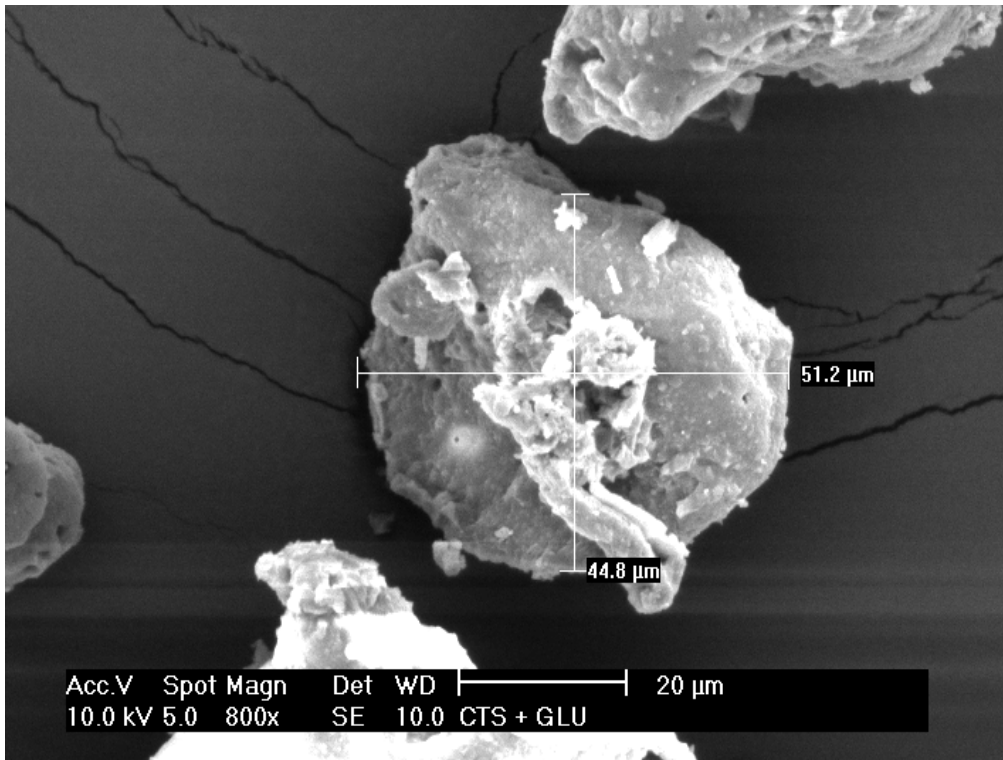
A morfologia, o tamanho e a formação das micropartículas são diretamente afetados pela concentração da solução do polímero encapsulante bem como pelo grau de homogeneização da emulsão (YEO et al., 2005). O processo de secagem por liofilização consiste na saída de água através da sublimação dos cristais de gelo formados durante o processo, proporcionando a característica rugosa das micropartículas. Segundo Molina-Grima et al. (2004), o método e a velocidade de congelamento são críticos para que ocorra a sublimação, quanto mais rápido o congelamento menor serão os cristais de gelo formados e, conseqüentemente menores serão os poros formados.



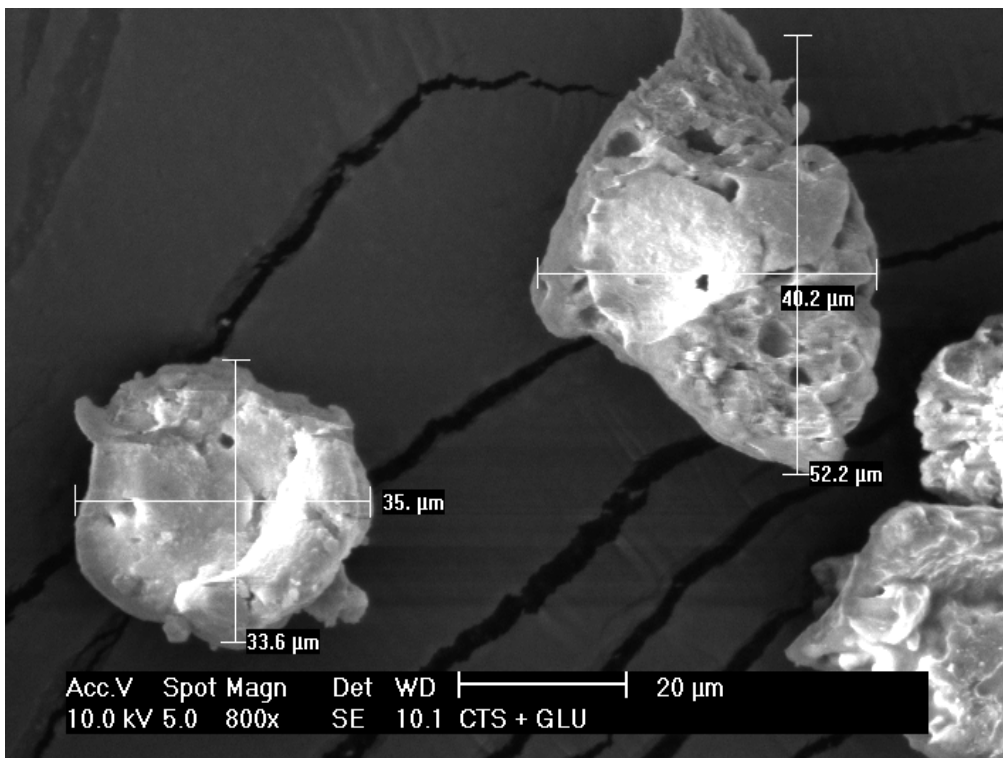
(a)



(b)



©



(d)

Figura 1 a, b, c, d– Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das micropartículas.

### 3.2. Quantificação da astaxantina

Baseados no tempo de retenção da amostra padrão descrita, o pico correspondente a astaxantina foi identificado na amostra de micropartícula e na amostra de microalga (cromatogramas não apresentados).

O cálculo da quantidade de astaxantina foi realizado para ambas as amostras revelando que a parcela de astaxantina presente na amostra de microalga é muito superior àquela que aparece nas micropartículas. A microalga tem um conteúdo de astaxantina de 123,94 µg/mL e a micropartícula apresentou um conteúdo de 5,75 µg/mL. Como a microalga é precursora da micropartícula, ou seja, as micropartículas derivam de uma quantidade conhecida de microalgas (400 ppm), espera-se que as micropartículas tenham uma quantidade de astaxantina proporcional à quantidade de microalga que foi utilizada para a sua confecção. A este fato também se associa o não aparecimento dos outros picos na amostra de micropartícula.

A análise cromatográfica teve por objetivo identificar e quantificar apenas o carotenóide astaxantina, dado essencial para fazer os cálculos de rendimento e eficiência de encapsulação do óleo.

### 3.3. Eficiência de microencapsulação e rendimento

Para a amostra de micropartícula foi encontrada uma eficiência de encapsulação de 14,49 % este dado está de acordo com o encontrado por Higuera et al., (2004) onde relatam à obtenção de uma eficiência de encapsulação em torno de 11,25 %.

A baixa eficiência está relacionada com a concentração de quitosana na solução aquosa da emulsão. Concentrações maiores que 1,6 % aumentam a resistência da membrana polimérica aumentando a estabilidade da emulsão, porém, dificulta a encapsulação do óleo (FÉLIX, 1999).

O rendimento total calculado de micropartículas foi 30,09 %. De acordo com Mayya et al. (2003), a má distribuição dos componentes da emulsão resulta na

formação de glóbulos muito próximos uns dos outros, dificultando a formação das micropartículas devido, principalmente, à ruptura das mesmas. Os autores consideram este fato o principal responsável pelos baixos rendimentos. Em um trabalho com micropartículas de parafina eles obtiveram um rendimento de 41 %.

Mayya et al. (2003) relatam um aumento de 35 % a 70 % com aumento na quantidade de surfactante (emulsificante) na formulação. O surfactante é muito eficiente para estabilizar a emulsão, distribuindo e formando de maneira uniforme os glóbulos, que posteriormente se transformarão em micropartículas (FREITAS et al, 2005).

A microscopia óptica da emulsão corrobora com esta afirmação, uma vez que evidencia a proximidade dos glóbulos na emulsão (Figura 2).

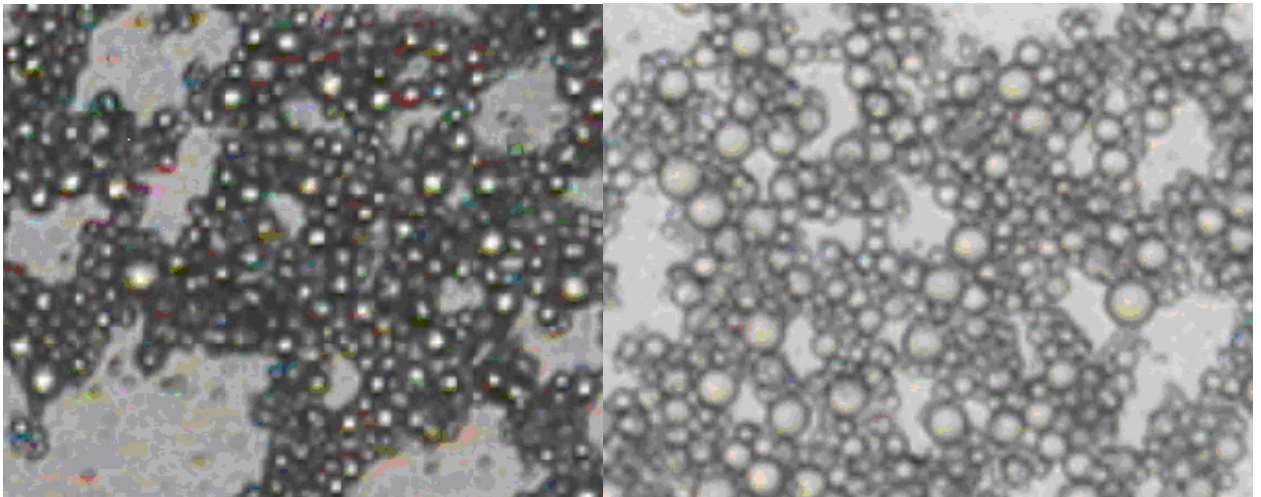


Figura 2 - Microscopia óptica da emulsão formadora das micropartículas

#### 3.4. Avaliação Instrumental dos Parâmetros de Cor

O comportamento dos parâmetros de cor das micropartículas e da microalga foi acompanhado quinzenalmente durante um período de 120 dias e os resultados estão graficamente representados (Figuras 3, 4 e 5). As amostras permaneceram em temperatura e luz ambiente.

A Figura 3 representa o parâmetro  $L^*$  para as amostras de micropartícula e microalga. O parâmetro  $L^*$  mede a luminosidade do objeto, variando de 0 a 100. O valor zero denota absorção de todos os comprimentos de onda do espectro, sendo

totalmente preto e o valor 100 expressa a completa reflexão do feixe de luz (MACDOGALL, 2002).

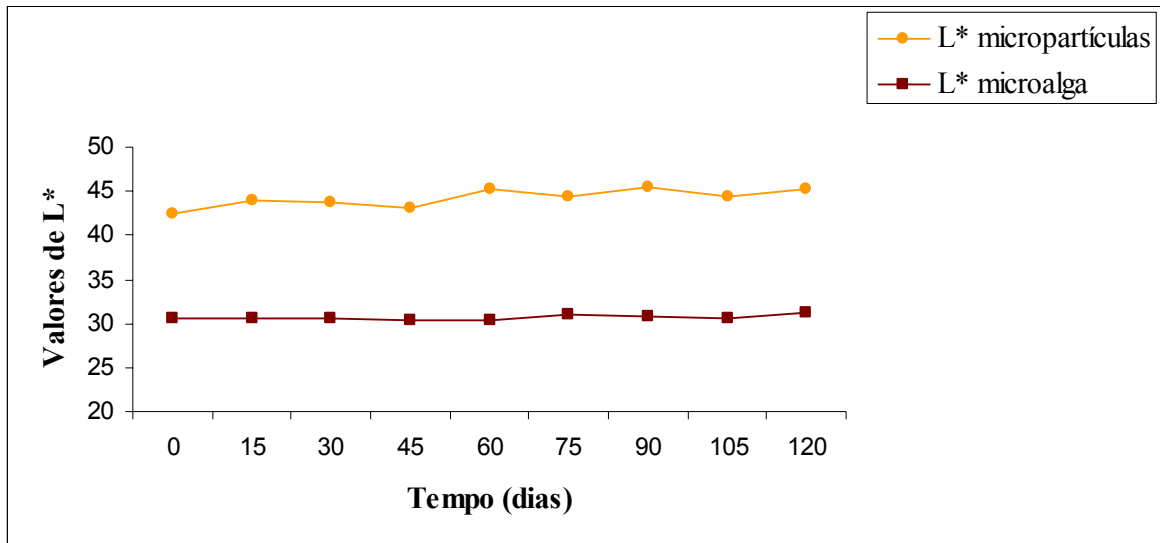


Figura 3 - Parâmetro de cor L\* para as amostras de micropartículas e de microalga ao longo do tempo.

A Figura 4 representa graficamente o parâmetro de cor a\*, que representa a cromaticidade do material e evolui da cor vermelha (valores positivos) a cor verde (valores negativos) (MACDOGALL, 2002).

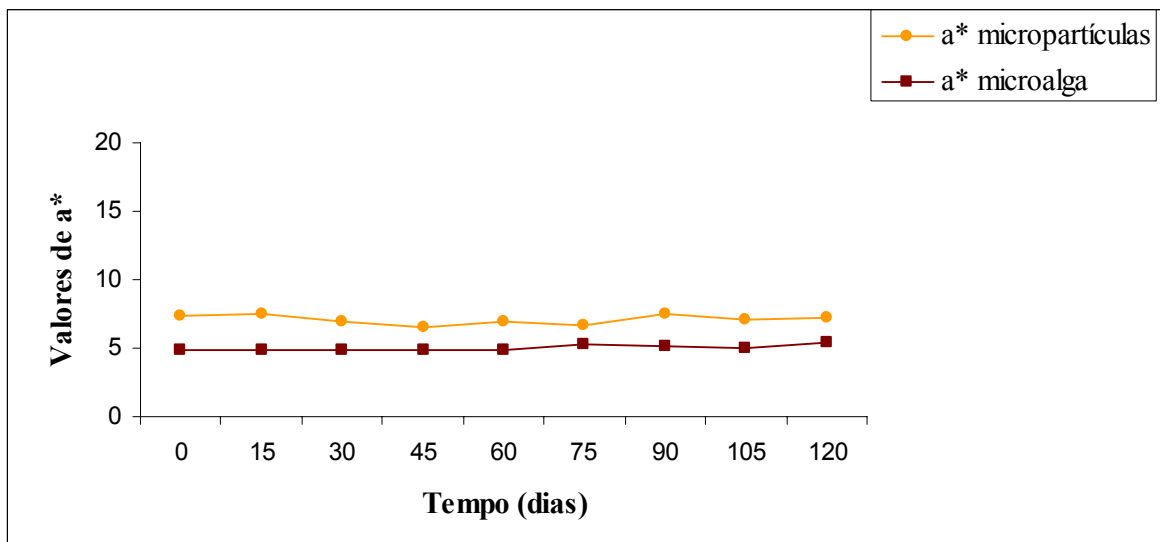


Figura 4 - Parâmetro de cor a\* para as amostras de micropartículas e de microalga ao longo do tempo.



A Figura 5 apresenta o parâmetro  $b^*$ , que mede a cromaticidade do material que progride do azul (valores negativos) para o amarelo (valores positivos)(MACDOGALL, 2002).

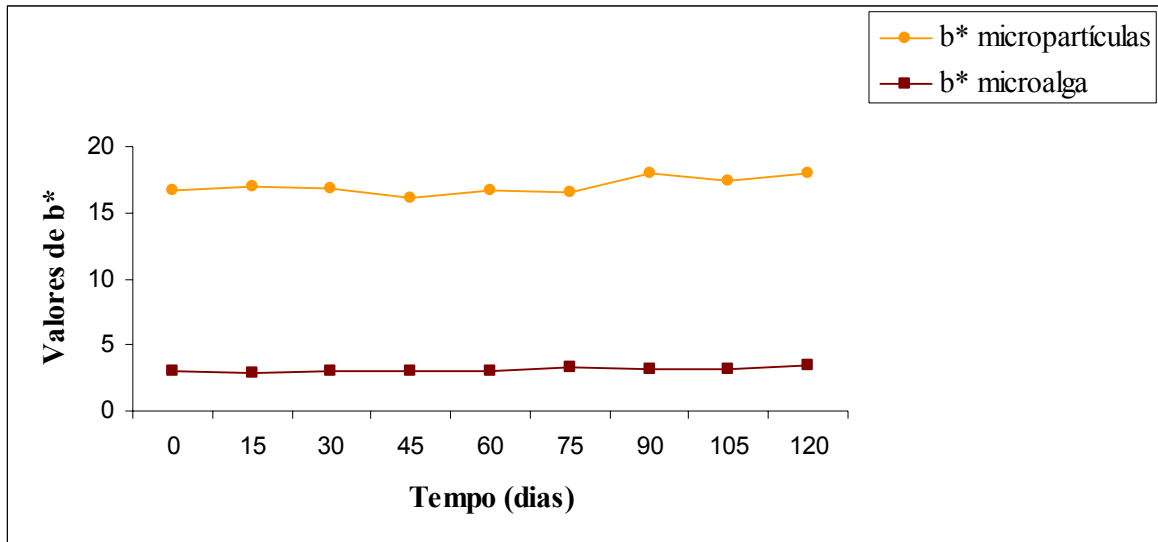


Figura 5 - Parâmetro de cor  $b^*$  para as amostras de micropartículas e de microalga ao longo do tempo.

Desde o tempo zero, as micropartículas apresentam os valores de  $b^*$  e  $L^*$  mais elevados quando comparados com a microalga, fato justificado pela diluição do carotenóide na formação da emulsão. Enquanto a microalga tem uma cor vermelha escura, as micropartículas são alaranjadas (Figura 6 b e a respectivamente).

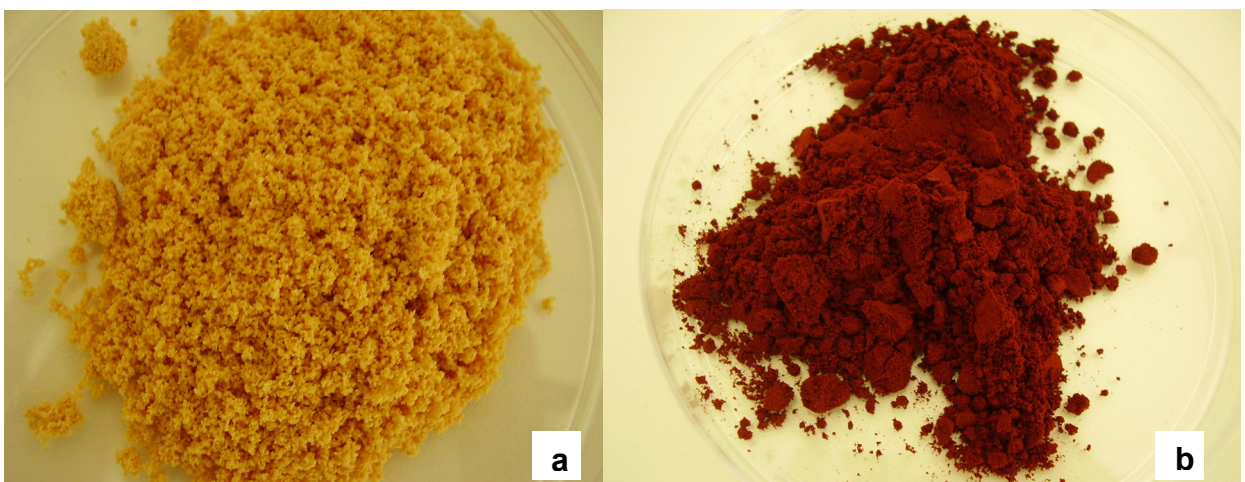


Figura 6 – Foto ilustrando a diferença entre a cor das micropartículas (a) e da biomassa de microalga (b).

Apesar da diferença na cor, tanto a micropartícula quanto a microalga apresentam inexpressiva variação dos parâmetros ao longo do tempo.

A maneira como a cor se degrada ao longo do tempo em ambas às amostras, pode ser relacionada principalmente com a proteção física contra os processos de degradação exercida pela quitosana (micropartículas) e pela parede celular (microalga).

Dong et al (2004), reportam o aumento da qualidade e do tempo de prateleira de frutas recobertas com quitosana. Chien et al (2005) reafirmam o aumento do tempo de prateleira e da estabilidade da cor em pedaços de manga recobertos com quitosana. Eles relatam que a quitosana não altera a cor original e previne o escurecimento da fruta.

Higuera-Ciapara (2004) afirma que a matriz polimérica formada durante o processo de microencapsulação da astaxantina protege o pigmento da oxidação térmica e oxidativa. O autor também afirma que a estabilidade oferecida ao pigmento pela encapsulação depende das condições do processo.

Os dados obtidos com o experimento confirmam a habilidade da quitosana em proteger o carotenóide astaxantina da degradação oxidativa, não alterando a manifestação de cor do carotenóide, concordando com os trabalhos citados e utilizados como referência.

### 3.5. Ensaio de Descoloração do Radical ABTS

A atividade antioxidante das micropartículas foi medida em termos de poder de seqüestro de radicais, de acordo com o método ABTS. Este método mede a habilidade da amostra em seqüestrar o radical  $ABTS^{+}$ , comparada com uma quantidade padrão de Trolox, e é uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de antioxidantes doadores de hidrogênio e de antioxidantes terminadores de cadeias (RE et al, 1999).

A atividade antioxidante das micropartículas e da microalga foi acompanhada quinzenalmente por um período de 120 dias (Figura 7).

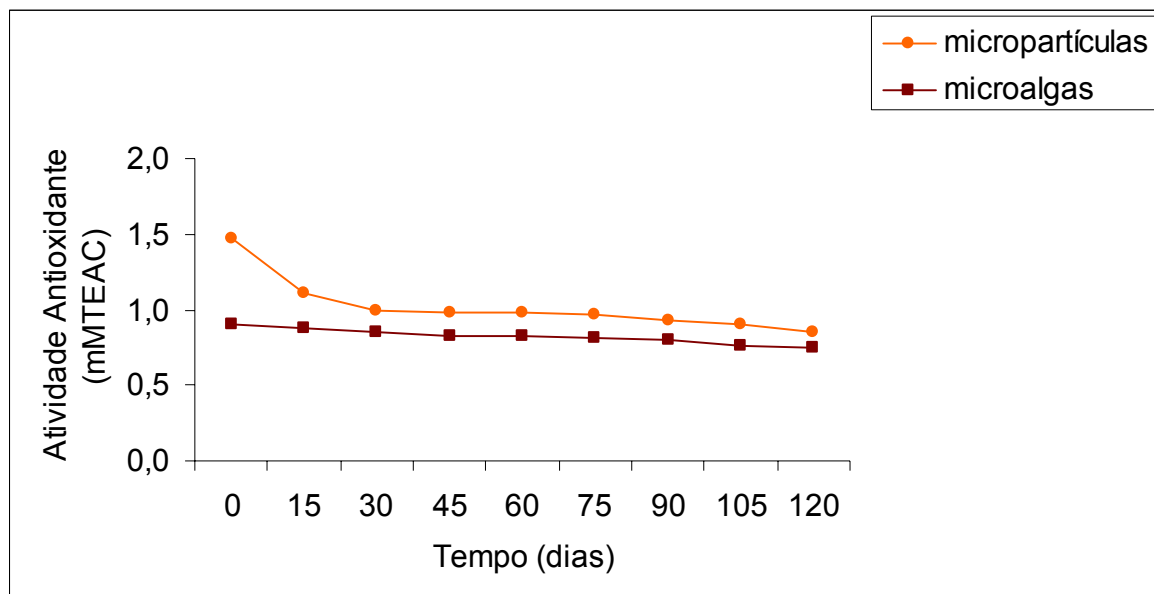


Figura 7 - Gráfico da atividade antioxidante (mM TEAC) da amostras de micropartículas e de microalga ao longo do tempo.

Percebe-se uma diminuição da atividade antioxidante (mM TEAC) para a micropartícula, nos primeiros 30 dias de acompanhamento. Tal diminuição provavelmente ocorreu devido a presença de moléculas de astaxantina presentes na superfície da micropartícula e portanto, susceptíveis a degradação oxidativa.

Os valores de TEAC para as micropartículas podem ser considerados bons quando comparados aqueles encontrados por outros autores. Segundo Miller (1996), num estudo da comparação da estrutura do carotenóide com sua atividade antioxidante, os valores em TEAC para o carotenóide astaxantina não passam de 0,03 mM. O autor atribui este fato à estrutura do carotenóide e não considera a disponibilidade deste para a reação.

Estrutura, forma física (agregados ou monômeros, forma cis ou trans), localização ou sítio de ação na molécula carotenóide dentro da célula, potencial de interação com outros carotenóides ou antioxidantes, concentração dos carotenóides são os fatores que influenciam a ação dos carotenóides em sistemas biológicos (YOUNG; LOWE, 2001).

Wood et al (1997) demonstraram que a  $\beta$ -criptoxantina e a zeaxantina (ambas xantofilas) foram mais efetivas contra o radical alquilperoxila (ROO) em membranas lipossomais que o  $\beta$ -caroteno e o licopeno. Zeaxantina e  $\beta$ -caroteno tem o mesmo comprimento de cadeia conjugada C=C e o mesmo comportamento em solução

aquosa; portanto, as diferenças observadas devem-se principalmente a localização e orientação destes na bicamada lipídica.

A concentração de carotenóides na amostra de microalga é aproximadamente vinte vezes maior do que a encontrada nas micropartículas, porém a localização do pigmento dentro da célula de microalga dificulta a disponibilidade do mesmo, justificando a atividade antioxidante mais baixa quando comparada à encontrada para as micropartículas.

A célula encistada de *Haematococcus pluvialis* consiste em 70% de carboidratos, 3% de celulose e 6% de proteínas (HAGEN; SIEGMOUND; BRAUNE, 2002). O encistamento da célula dificulta a biodisponibilidade da astaxantina (SARADA et al, 2006). Este fato já foi reportado por Sommer, Potts e Morrisey (1991) em um experimento com alimentação de truta arco-íris com células encistadas de *Haematococcus pluvialis*. A alimentação não resultou na pigmentação da carne da truta e a astaxantina só ficou disponível para ser assimilada após o rompimento da célula encistada.

Não há consenso entre os pesquisadores em relação à atividade antioxidante dos carotenóides, mas estudos já realizados permitem concluir que em sistemas biológicos existem muitos fatores que podem reduzir a eficácia destes compostos, entre estes se destaca a biodisponibilidade (YOUNG; LOWE 2001).

#### 4. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para a confecção das micropartículas possibilitou a produção de micropartículas com dimensões ideais para serem usadas na indústria de alimentos e na alimentação de organismos aquáticos.

O tamanho e formato das micropartículas foram relacionados com o processo de secagem por liofilização e com a proporção água e óleo na emulsão primária.

A má distribuição da emulsão foi a responsável pelo baixo rendimento em micropartículas.

A quantidade de astaxantina encontrada nas micropartículas foi satisfatória e proporcional à quantidade de microalga utilizada para sua confecção.

A quitosana demonstrou um grande desempenho para encapsular a astaxantina protegendo sua atividade antioxidante e preservando sua cor, além de torná-la mais disponível para o meio de reação.

Ajustes na metodologia são necessários para aumentar os índices de rendimento e eficiência de encapsulação, bem como, padronizar o tamanho e o formato das micropartículas.

O sucesso da quitosana como agente encapsulante da astaxantina, possibilita a utilização mais eficiente deste pigmento em diversas áreas inclusive na aqüicultura mercado em ascensão e maior consumidor mundial de astaxantina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSTUS, R.; ROMO, L.; YANEZ, K.; DIAZ, G.; ROMO, C. Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 289-293, 2003.

CHIEN, P. J.; SHEU, F.; YANG, F. H. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 225-229, 2005.

CYSEWSKI, G. R., TODD LORENZ, R. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and secondary Products – Species of High Potential: *Haematococcus*. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science, UK, 2004, p. 281 – 288.

DONG, H., CHENG, L., TAN, J., ZHENG, K., & JIANG, Y. Effect of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p.355–358, 2004.

FELIX, V. L. **Extracción supercrítica de astaxantina de biodesechos de jaiba (*Callinectes sapidus*) con CO<sub>2</sub>/etanol y su microencapsulado con quitosano**. 1999. Tesis de maestría. Centro de Investigación em Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313 - 332, 2005.

GENTA, I.; GIUNCHEDI, P.; PAVANNETO, F.; CONTI, B.; PERUGINI, P.; CONTE, U. Preparation of chitosan microparticulate drug delivery systems. In R. A. A. Muzzarelli; M. G. Peter (Eds.), **Chitin Handbook**. Italy: European Chitin Society, 1997, p. 391–396

HAGEN, C.; SIEGMUND, S.; BRAUNE, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **European Journal of Phycology**, v. 37, p 217-226, 2002.

HIGUERA, C. I.; FÉLIX, V. L.; GOYCOOLEA, V. F. M.; ARGÜELLES, M. W. M. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. **Carbohydrates Polymers**, v. 56, n. 1, p. 41-45, 2004.

JIANG, Y. M.; LI, Y. B. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **Food Chemistry**, v. 73, p. 139-143, 2001.

KOLAKOWSKA, A.; KOLAKOWSKI, E.; SZCZYGIELSKI, M. Winter season krill (*Euphausia superba* Dana) as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Die Nahrung**, v. 38, p. 128-134, 1994.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCIA-PARILLA, M. C.; TRONCOCO, A.M.; FETT, R. Atividade antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 24, n.4, p.691-693, 2004.

LIZARDI, M. J. **Implementación de tecnologías alternativas para la obtención de polisacáridos funcionales a partir de biodesechos pesqueros quitinosos**. 1998. Tesis de Maestría. Centro de Investigación em Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.

MACDOGALL, D. B. Colour measured of food: principles and practice. In: **Colour in food**, D.B. MacDogall, Editor. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, England, 2002.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 102-105, 2003.

MAYYA, K. S.; BHATTACHARYYA, A.; ARGILLIER, J. F. Micro-encapsulation by complex coacervation: influence of surfactant. **Polymer International**, v. 52, p. 644-647, 2003.

MESBAHI, G.; JAMALIA, J.; FARAHNAKY, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. **Food Hydrocolloids**, v.19, p.731-735, 2005.

MILLER, N. J.; SAMPSON, J.; CANDEIAS, L. P.; BRAMLEY, P. M.; RICE-EVANS, C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS Letters**, v. 384, p. 240-242, 1996.

MOLINA-GRIMA, E.; ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; ROBLES-MEDINA, A. Downstream Processing of Cell-mass and Products. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science, UK, 2004, p. 215 – 251.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; Meyers, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal Food microbiology**, v. 74, p. 65-72, 2002.

PARTANEN, R.; YOSHII, H.; KALLIO, H.; YANG, B.; FORSSELL, P. Encapsulation of sea buckthorn kernel oil in modified starches. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 79, n. 3, p. 219-223, 2002.

PENICHE, C. et al. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. **Macromolecular Bioscience**, v.3, p. 511-520, 2003.

PSZCZOLA, D. E. Natural colours: pigments of imagination. **Food Technology**, v. 52, n.6, p.70-82, 1998.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. UK: Blackwell Science, 2004, 566 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. ILSI Press, Washington, 1999, p. 37-51.

ROLLER, S.; COVILL, N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 202-209, 2000.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 80-86, 2000.

SARADA, R.; VIDHYAVATHI, R.; USHA, D.; RAVISHANKAR, G. A. An Efficient Method for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 7585-7588, 2006.



SOMMER, T. R.; POTTS, W. T.; MORRISEY, N. M. Utilization of microalgae astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 94, p. 79-88, 1991.

SUHNEL, S.; LAGREZE, F.; CAMPESTRINI, L. H.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, J. F. Extração de carotenóides da gônada da Vieira *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758): determinação de protocolo de extração exaustiva e efeito da composição de organosolvente na solução extratora. (no prelo).

SPINELLI, V. A. **Quitosana, polieletrólito natural para o tratamento de água potável**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TOZAKI, H.; ODORIBA, T.; OKADA, N.; FUJITA, T.; TERABE, A.; SUZUKI, T.; OKABE, S.; MURANISHI, S.; YAMAMOTO, A. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats. **Journal Controlled Release**, v. 82, n. 1, p. 51-61, 2002.

VELASCOS, J.; MARMESAT, S.; DOBARGANES, C.; MARQUEZ-RUIZ, G. Heterogeneous Aspects of Lipid Oxidation in Dried Microencapsulated Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1722-1729, 2006

WIELAND-BERGHAUSEN S.; SCHOTE U.; FREY M.; SCHMIDT, F. Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCl. **Journal of Controlled Release**, v. 85, p. 35-43, 2002.

WOODALL, A. A.; BRITON, G.; JACKSON, M. J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. **Biochemical ET Biophysical Acta-General Subjects**, v. 1336, n. 3, p. 575-586, 1997.

YEO, Y.; BELLAS, E.; FIRESTONE, W.; LANGER, R.; KOHANE, D. S. Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compound. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7518-7525, 2005.

YOSHIHIKO, O.; MAYUMI, S.; TAKAHIRO, A.; HIROYUKI, S.; YOSHIHIRO, S.; ICHIRO, N.; TETSUAKI, T. Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights. **Biocontrol Science**, v. 8, p. 25-30, 2003.

YOUNG, A.; LOWE, G. M.; Antioxidant and prooxidante properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. **385**, n.1, p. 7- 20, 2001.

### **CAPITULO 3**

#### **Análise Térmica, Morfologia e Espectroscopia no Infravermelho de micropartículas de quitosana e astaxantina**

## Análise Térmica, Morfologia e Espectroscopia no Infravermelho de micropartículas de quitosana e astaxantina

### RESUMO

A quitosana é um polissacarídeo linear obtido da desacetilação da quitina. Várias aplicações para a quitosana foram propostas na literatura principalmente no desenvolvimento e produção de filmes, membranas e micropartículas. A astaxantina é um carotenóide presente em organismos marinhos que possui atividade antioxidante e é altamente susceptível a oxidação devido a sua estrutura insaturada. Neste trabalho micropartículas de quitosana com astaxantina foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise térmica (DSC, TGA). Os resultados obtidos por FTIR identificaram a formação do complexo quitosana – astaxantina via ligações de hidrogênio entre os grupos funcionais amida e carbonila, respectivamente. As análises térmicas permitiram acompanhar o processo de desidratação e a temperatura de transição vítrea dos componentes (quitosana e astaxantina) individualmente e quando presentes nas micropartículas. Foi possível observar por DSC, a fusão da fase oleosa no interior da micropartícula. A microscopia eletrônica de varredura apontou micropartículas com morfologia não esférica, dimensões variando de 30  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  e superfície rugosa. A formação do complexo quitosana – astaxantina alterou a estabilidade térmica quando comparado aos componentes individualmente, fato elucidado por análise termogravimétrica.

**Palavras chave: quitosana, astaxantina, FTIR, DSC, MEV.**

## 1. INTRODUÇÃO

A quitosana é um material biodegradável e atóxico, é uma substância que vem sendo utilizada na biomedicina, na indústria de cosméticos, na agricultura, como fibra têxtil e no tratamento de água. Além disso, outra aplicação da quitosana está na produção de microcápsulas (TOZAKI et al, 2002)

A astaxantina é um carotenóide de ocorrência natural e está presente principalmente em organismos marinhos como crustáceos e moluscos e representam um composto biológico importante. Alguns estudos demonstram que a astaxantina possui uma forte atividade antioxidante e um efeito protetor contra doenças degenerativas (KURIHARA et al, 2002; NAGUIB, 2000). Muitos autores reportam que a atividade antioxidante da astaxantina é maior que a do  $\beta$ -caroteno e do  $\alpha$ -tocoferol, porém, a astaxantina é muito susceptível a processos de degradação oxidativa, devido a presença de uma longa cadeia de dupla ligações na sua estrutura (JYONOUCHI et al, 2000). Devido a sua alta instabilidade, compostos como a astaxantina não podem ser manipulados na sua forma cristalina, estabilizados em emulsões ou microencapsulados.

A encapsulação é uma técnica de aprisionamento de ingredientes sensíveis em cápsulas. Este processo é muito utilizado para proteger os compostos voláteis durante seu processamento e armazenamento, baseia-se na preparação de uma emulsão entre o composto a ser encapsulado e o agente de encapsulação, seguido da secagem da emulsão (PARTANEN et al., 2002).

A microencapsulação com matrizes poliméricas teve um considerável aumento nas últimas décadas, resultado de um grande número de aplicações na indústria, agricultura, fármacos e biotecnologia (PENICHE et al, 2003).

Biopolímeros de ocorrência natural como a quitosana apresentam um grande potencial como matriz encapsulante (RIBEIRO et al, 2005).

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina e compreende os copolímeros de glucosamina e a N-acetil-glucosamina (copolímero de  $\beta$ -(1-4)-D-glucosamina e  $\beta$ -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina), sendo encontrada em abundância na natureza, principalmente em carapaça de crustáceos (KATO et al., 2003)

Devido ao caráter básico, atribuído à presença do grupamento amina nas unidades repetidas, e à sua biodegradabilidade, esses dois polímeros vêm

despertando bastante interesse de cientistas e tecnólogos, que têm descoberto diversas aplicações, especialmente na área biomédica (SINGH; RAY, 1994).

Micropartículas de astaxantina com quitosana foram preparadas e caracterizadas quanto à forma e estrutura utilizando análise térmica (DSC, TGA), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação das micropartículas

As micropartículas de quitosana foram preparadas através de emulsificação pelo método de coacervação proposto por BUSTUS et al (2003). Foram misturados 8 mL de uma solução de astaxantina 400 ppm, veiculada em óleo de soja com 0,1 mL de tween 20 (emulsificante) e 32 mL de uma solução de quitosana 2% em ácido acético 1%. A mistura foi emulsificada com o auxílio de um agitador mecânico (TE 139 – Tecnal), a uma velocidade de 8000 rpm, conforme Higuera et al. (2004).

A emulsão primária obtida foi lentamente aspergida com a utilização de um vaporizador manual em 10 volumes de uma solução 0,2N de NaOH /etanol (4:1) com uma suave agitação a fim de induzir o endurecimento e a precipitação das paredes das micropartículas. Em seguida, foram adicionados 6,4 mL de glutaraldeído (solução aquosa 25%) na seguinte proporção, 2 mL de glutaraldeído para cada 10 mL de solução de quitosana utilizada na emulsão primária (MAYYA et al., 2003).

### 2.2. Morfologia das micropartículas

As micropartículas liofilizadas foram colocadas em porta-amostra (stubs) e cobertas com uma camada de ouro/paládio para formar um filme condutor utilizando-se o equipamento Cool Sputter Coater (Baltec, SDC 005).

Micrografias das amostras foram obtidas usando-se um microscópio eletrônico de varredura (Philips, Model XL30) numa intensidade de 10 kv, com diversos aumentos.

### 2.3. Espectroscopia de Infravermelho

Espectroscopia de infravermelho (FTIR) foi realizada com espectrofotômetro 16 PC Perkin Elmer com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , num intervalo de número de onda de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ , a temperatura ambiente. Os espectros FTIR foram obtidos antes e depois do processamento da quitosana e astaxantina em micropartículas para observação de grupos funcionais, em pastilha de KBr de grau espectrofotométrico. Foi tomado o cuidado para a utilização de mesma massa de KBr, quitosana, astaxantina e micropartículas na elaboração das pastilhas.

#### 2.4. Calorimetria Exploratória de Varredura

Termogramas das micropartículas (quitosana/astaxantina), quitosana e astaxantina em óleo de soja foram obtidos com um calorímetro exploratório de varredura (Shimadzu DSC50) interligado a um computador para aquisição dos dados pelo software DSC50. Amostras de aproximadamente 15 mg foram colocadas em painéis de alumínio hermeticamente fechadas, utilizando-se uma panela vazia como referência. As amostras foram submetidas a uma primeira varredura de temperatura até  $130^{\circ}\text{C}$  (taxa de aquecimento de  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) para remover água adsorvida e destruição da “história térmica”. Foram rapidamente resfriadas ( $-50^{\circ}\text{C}$ ) com nitrogênio líquido e uma segunda varredura foi efetuada até  $300^{\circ}\text{C}$  (taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com uma atmosfera dinâmica de nitrogênio de  $50\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras de astaxantina em óleo foram resfriadas até  $-50^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido e submetidas à análise até  $300^{\circ}\text{C}$  (taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

Todos os testes foram realizados em duplicata. A temperatura de transição vítrea foi calculada no ponto de inflexão na linha base causada pela variação do calor específico da amostra.

#### 2.5. Análise Termogravimétrica (TGA, DrTGA)

Análises termogravimétrica (TGA) e termogravimétrica diferencial (DrTGA) foram realizadas em equipamento Shimadzu (Shimadzu50) interligado a computador



para aquisição dos dados, usando-se o software TGA-50. Experimentos não-isotérmicos foram realizados a partir da temperatura ambiente (25°C) até 600°C. Todas as análises foram realizadas com cerca de 10 mg de amostra em panela de platina sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 cm<sup>3</sup>. min<sup>-1</sup>). As amostras (micropartículas, quitosana e astaxantina em óleo) foram submetidas a uma taxa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

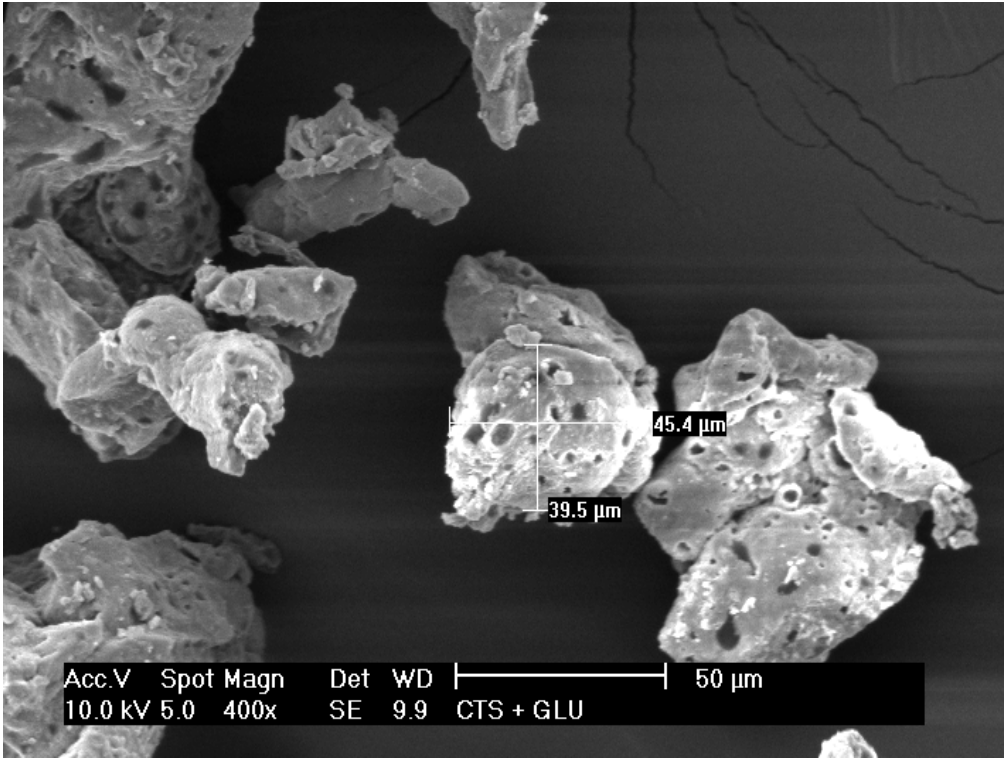
#### 3.1. Morfologia

A análise das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura revela que as mesmas apresentam um tamanho não homogêneo e um formato não esférico com o diâmetro variando de 33  $\mu\text{m}$  a 54  $\mu\text{m}$ , além de apresentar superfície rugosa e estriada (Figura 1a -1e).

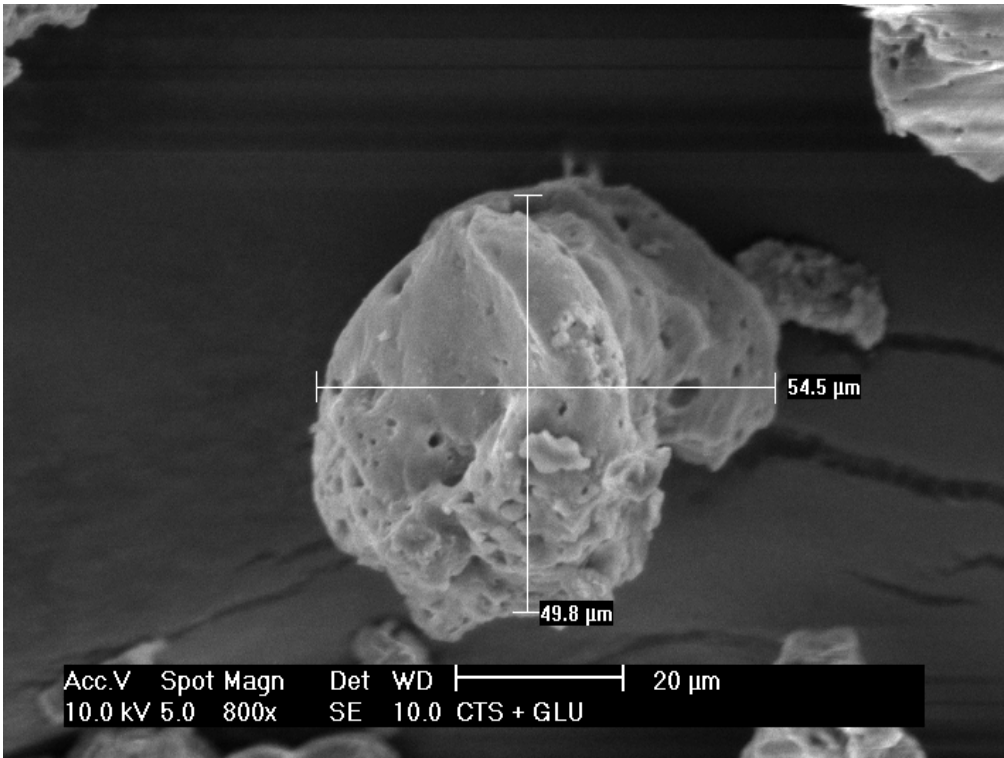
A microscopia também indica a formação de um filme contínuo marcado por depressões e rugosidades da parede. De acordo com a literatura, a morfologia de micropartículas obtidas por spray-dryer (Young, Sarda e Rosenberg 1993) ou por coacervação seguida por secagem a vácuo (Hogan et al., 2005 e Santinho et al., 1999), apresentam um formato mais esférico, com a parede menos rugosa e dimensões variada. Como as micropartículas foram obtidas por liofilização, é possível que durante o congelamento da emulsão a fase aquosa tenha deformado os glóbulos de astaxantina em óleo e, que posteriormente, com a desidratação estes tenham mantido a deformação provocada pela dilatação da fase aquosa da emulsão, resultando num formato não esférico.

Mukai-Correa et al. (2005) observaram em micropartículas secas por liofilização, analisadas por microscopia eletrônica de varredura, um alto grau de aglomeração, um contorno próximo do esférico e um diâmetro em torno de 150  $\mu\text{m}$ . O material polimérico usado por estes autores foi caseína, o material encapsulado foi gordura vegetal hidrogenada e a metodologia utilizada foi gelificação iônica.

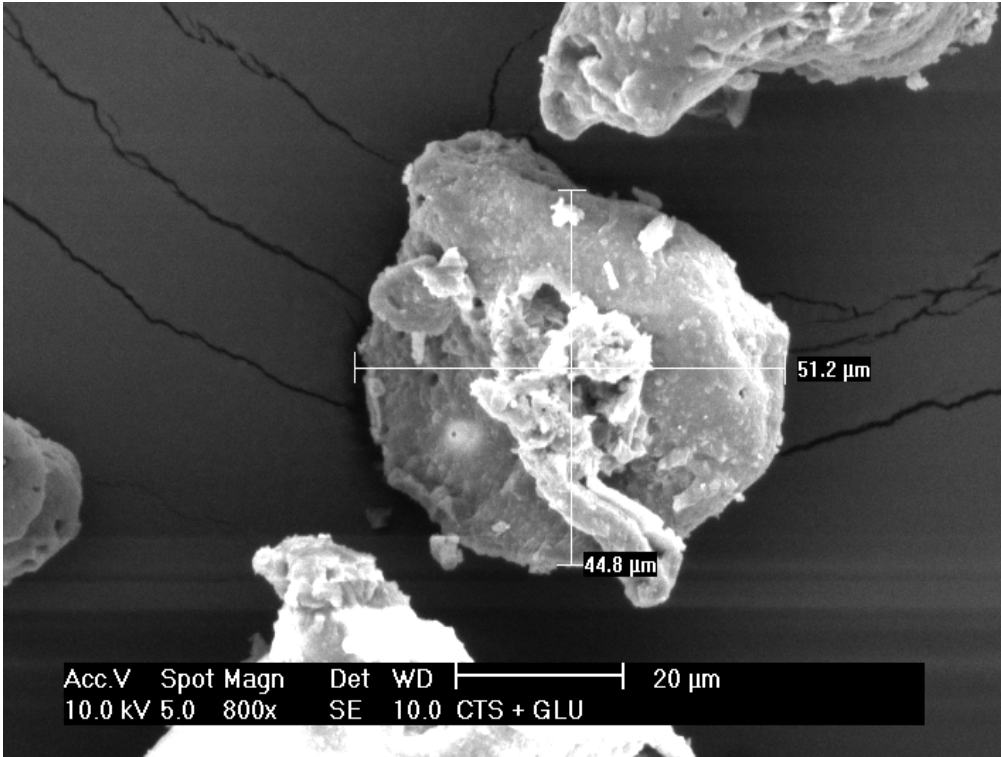
Para verificar a existência ou não de poros nas micropartículas, foi realizado um ensaio piloto onde estas foram imersas e agitadas em éter de petróleo ou água (dados não apresentados). As micropartículas sedimentaram após alguns segundos e se depositaram no fundo de tubos de ensaio, podendo ser facilmente re-suspendidas por agitação, seguido de nova sedimentação sob repouso. Dentro do intervalo de tempo do estudo, as amostras imersas em água ou éter de petróleo aparentaram estabilidade sob condições de estocagem a temperatura ambiente e sem abrigo da luz.



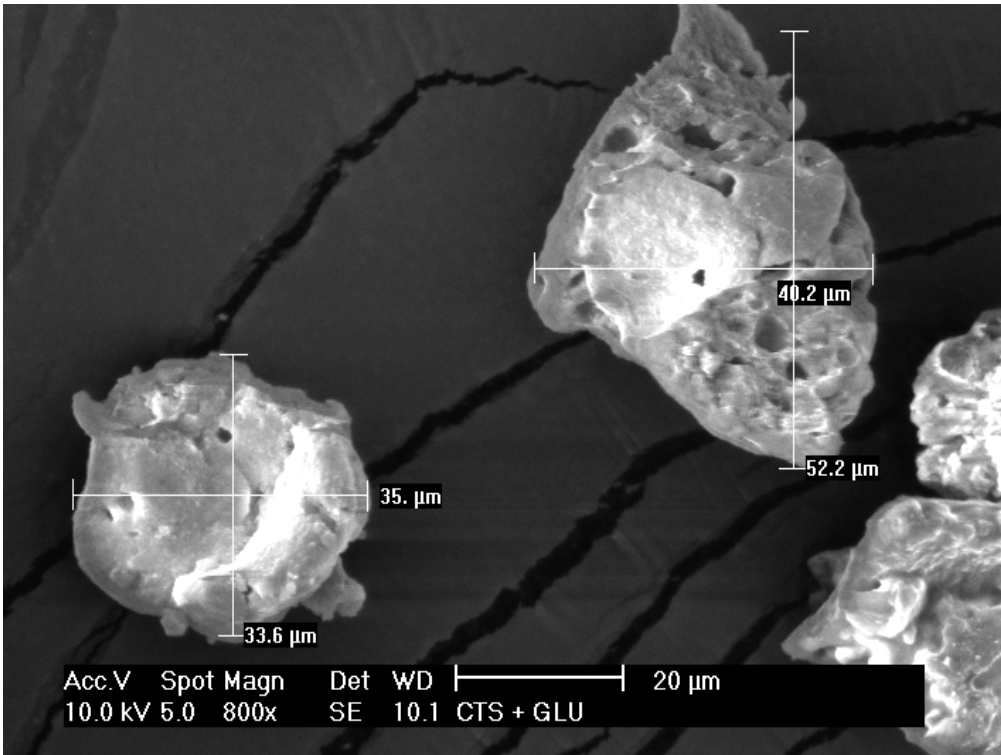
(a)



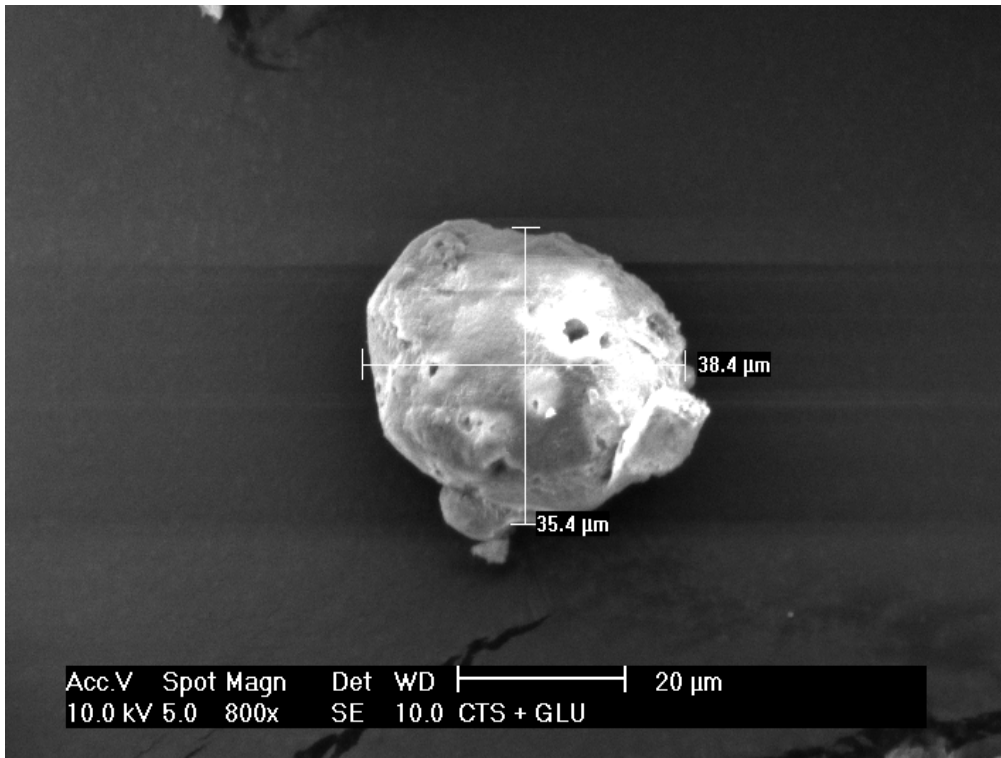
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 1 – Micrografias por microscopia eletrônica de varredura da superfície de micropartículas, com as respectivas medidas em duas dimensões (a, b, c, d, e).

### 3.2. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A Figura 2 mostra os espectros de FTIR para a astaxantina (a), quitosana (b), micropartícula quitosana/astaxantina (c) e micropartícula quitosana/astaxantina reticulada com glutaraldeído.

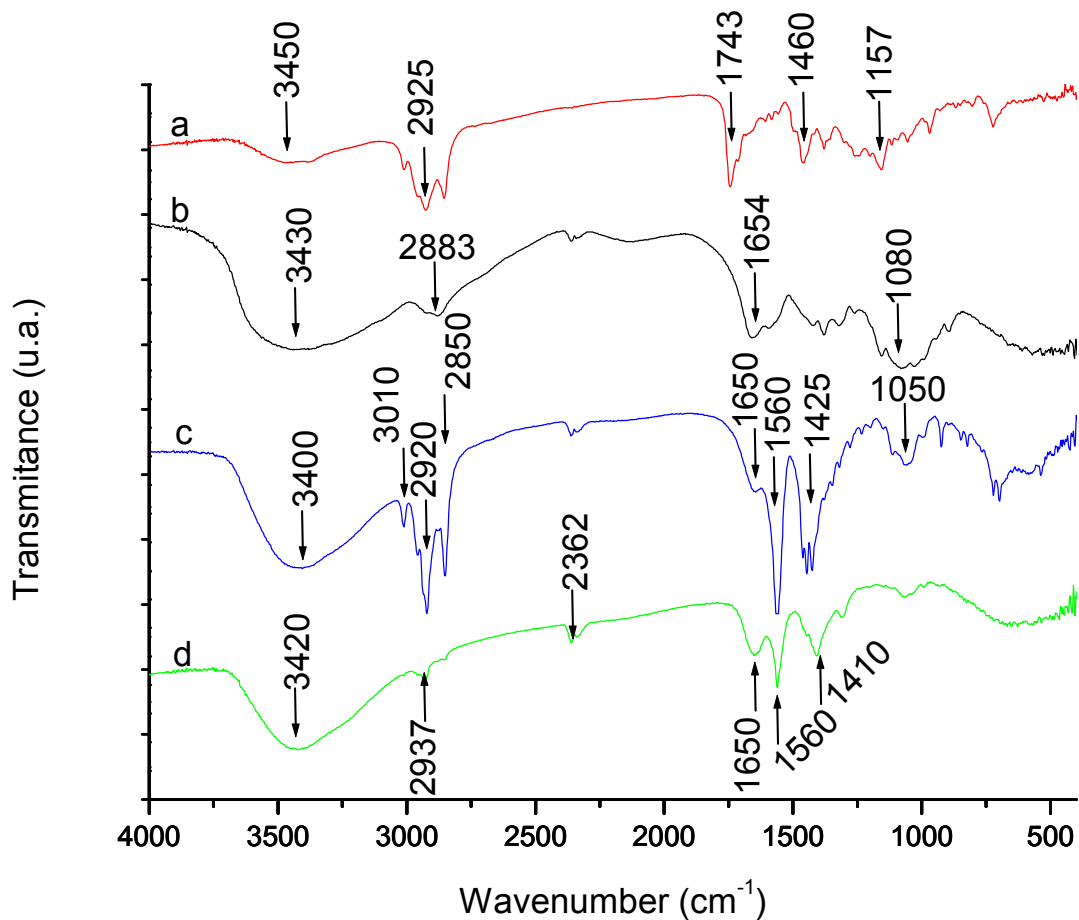


Figura 2 – Espectros de infravermelho para astaxantina (a), quitosana (b), micropartícula quitosana/astaxantina (c) e micropartícula quitosana/astaxantina reticulada com glutaraldeído (d).

No espectro da astaxantina (Figura 2-a) a banda na região  $3450\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento OH, enquanto estiramentos na região  $3010\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$  e  $2854\text{ cm}^{-1}$  correspondem à presença da cadeia isoprenóide. A banda na região de  $1743\text{ cm}^{-1}$  está relacionada com a deformação axial de  $\text{C}=\text{O}$  sob efeito indutivo de um grupo OH vizinho. O efeito indutivo reduz o comprimento da ligação  $\text{C}=\text{O}$  e aumenta em consequência a constante de força e a frequência da absorção. Che et al. (2007), atribuíram a banda em  $1736\text{ cm}^{-1}$  à presença do ligação  $\text{C}=\text{O}$  na molécula de astaxantina. A banda na região de  $1460\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular assimétrica ( $\delta_{\text{as}}$ ) de grupamentos metila ( $\text{CH}_3$ ).

O espectro de infravermelho para a quitosana (Figura 2-b) mostra bandas de absorção em  $3430\text{ cm}^{-1}$  (estiramento OH combinado com NH), duas outras bandas em  $2910\text{-}2883\text{ cm}^{-1}$  são típicas de grupos C-H. A banda amida I, um estiramento

C-O juntamente com uma deformação NH é visualizada em  $1654\text{ cm}^{-1}$ . Nota-se um pequeno ombro, devido sobreposição da banda amida I, na região de  $1590\text{ cm}^{-1}$  relacionado a grupos  $\text{NH}_2$  da quitosana. Tem-se ainda, uma banda a  $1080\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento C-O do anel piranosídico. O espectro obtido no presente estudo, para a quitosana, é similar aos publicados por Pawlak e Mucha (2003) e Tirkistani (1998b).

A estrutura química da quitosana apresenta dois grupamentos polares capazes de formar ligações de hidrogênio, o grupo hidroxila e o grupo amino. No espectro de infravermelho da micropartícula (quitosana/astaxantina) (Figura 2-c) a banda na região do estiramento OH e NH desloca-se para valores menores ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ), sugerindo a presença de interação via ligações de hidrogênio entre os componentes, o mesmo acontecendo para a micropartícula tratada com glutaraldeído, porém com um deslocamento menor ( $3420\text{ cm}^{-1}$ ). Considerando que durante a reação de reticulação “cross-linking” com glutaraldeído alguns grupos amino são transformados em imina, pode-se presumir que para a amostra de quitosana reticulada (Figura 2-d), exista um número menor de grupos amino disponíveis para interagir via ligações de hidrogênio, ocasionando um efeito menor no deslocamento da banda na região de  $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ .

Outra região do espectro de infravermelho da micropartícula com e sem tratamento com glutaraldeído onde se pode verificar a presença de interação entre as moléculas que compõem a micropartícula (quitosana e astaxantina) é a região da amida I (quitosana) e carbonila (astaxantina). Verifica-se o aparecimento de duas bandas ( $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$ ). Sendo que no espectro da micropartícula sem reticulação a banda a  $1560\text{ cm}^{-1}$  aparece com maior intensidade, enquanto a banda a  $1650\text{ cm}^{-1}$  aparece como um “ombro” sobreposto. Já para a amostra de micropartícula tratado com glutaraldeído (reticulada) há uma maior definição entre as duas bandas ( $1650$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$ ), sugerindo a participação dos grupos amida I (quitosana) e carbonila (quitosana e astaxantina), via ligação de hidrogênio na interação molecular, em ambos os casos (com e sem glutaraldeído).

### 3.3. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica envolve a medida da variação de massa (perda) de uma amostra, sob a forma de produtos voláteis, em função da temperatura ou do tempo. Quando materiais poliméricos são submetidos a um tratamento térmico podem apresentar mudanças estruturais ocasionadas por perda de água adsorvida ou quebra de ligações químicas nas cadeias principais e laterais.

As Figuras 3 a 5 mostram as curvas termogravimétricas para os sistemas em estudo. É observado, de maneira geral, que tanto para quitosana pura como para as micropartículas (com ou sem tratamento com glutaraldeído) ocorre um estágio inicial de perda de massa na região que vai até próximo de 200°C. Este estágio inicial de decréscimo de massa está relacionado à perda de água adsorvida ou água ligada. Os sítios ligantes para as moléculas de água na quitosana são os grupos hidroxila (OH) e amino (NH<sub>2</sub>) presentes na cadeia polimérica. Este resultado é similar aos relatados por Nieto, Peniche-Covas e Padron (1991); Tirkistani (1998a e 1998b); Neto et al (2005).

Ao se ampliar à região do primeiro estágio de perda de massa, a qual está relacionada a perda de água ligada ou adsorvida, nas curvas de DrTGA, percebe-se que seus formatos não são similares (Figura 6) . Os polissacarídeos (quitosana) possuem uma forte afinidade por água e podem facilmente hidratar, resultando em macromoléculas com estrutura desordenada. De acordo com Kittur et al. (2002), as propriedades de hidratação destes polissacarídeos dependem da estrutura primária e supramolecular. Assim, variações na área do pico (relacionada a quantidade de perda de água) e/ou a posição da temperatura de máxima velocidade de perda de massa indica que estes sistemas diferem em sua capacidade de ligação de água e na força da interação entre a água e o polímero (quitosana).

A curva termogravimétrica para a quitosana indica uma perda de massa no estágio inicial (perda de água) da ordem de 9,013 % e uma temperatura de máxima perda a 75,11°C, já para a micropartícula quitosana-astaxantina uma perda de massa de 8,816% a uma temperatura de máxima perda a 78,89°C, enquanto para a amostra de micropartículas reticuladas com glutaraldeído a perda de massa é menor, na ordem de 4,188 % a uma temperatura de máxima perda de massa a 89,73°C (Figura 6).



Considerando a estrutura química da quitosana com seus dois grupamentos (hidroxila e amino) disponíveis para ligação com a molécula de água e os estudos de Rueda et al (1999) com espectroscopia de infravermelho, que revelaram que a interação da molécula de água é mais forte com os grupos hidroxila do que com os grupos amino, além do que foi revelado pelos espectros de infravermelho com transformada de Fourier (Figura 2a-2d), pode-se presumir que no caso da quitosana pura a perda de água ocorre numa menor  $T_{máx}$ , devido a uma maior facilidade da remoção de água (ligada a grupos amino).

Considerando que durante as reações de reticulação “crosslinking” alguns grupos amino são transformados em imino, pode-se presumir, que numa amostra de micropartícula onde a quitosana tenha sofrido reticulação exista um número menor de grupos amino disponíveis para interagir com moléculas de água, resultando numa perda de água menor. Além disso, a  $T_{máx}$  desloca-se para valores mais altos, porque neste caso, as moléculas estão ligadas ao grupos hidroxila, onde sua interação é mais forte.

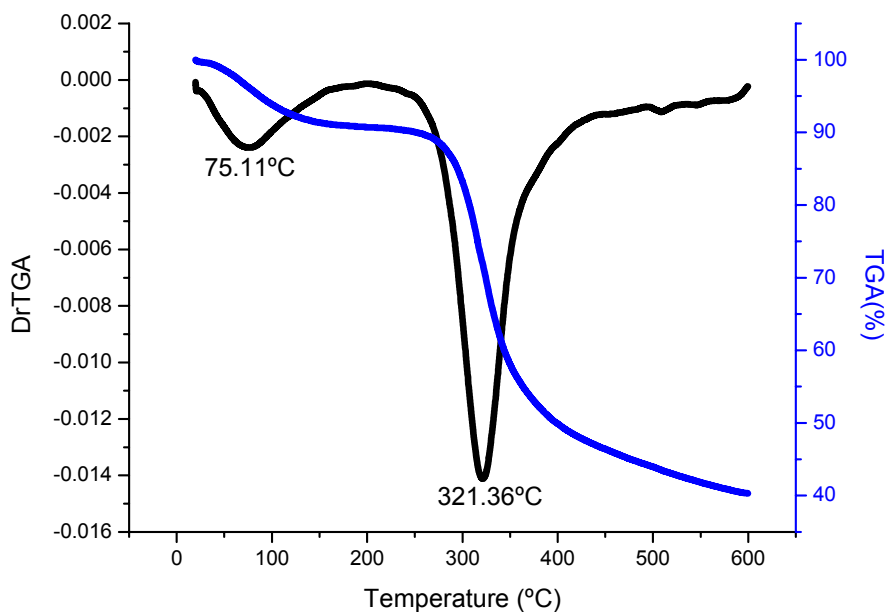
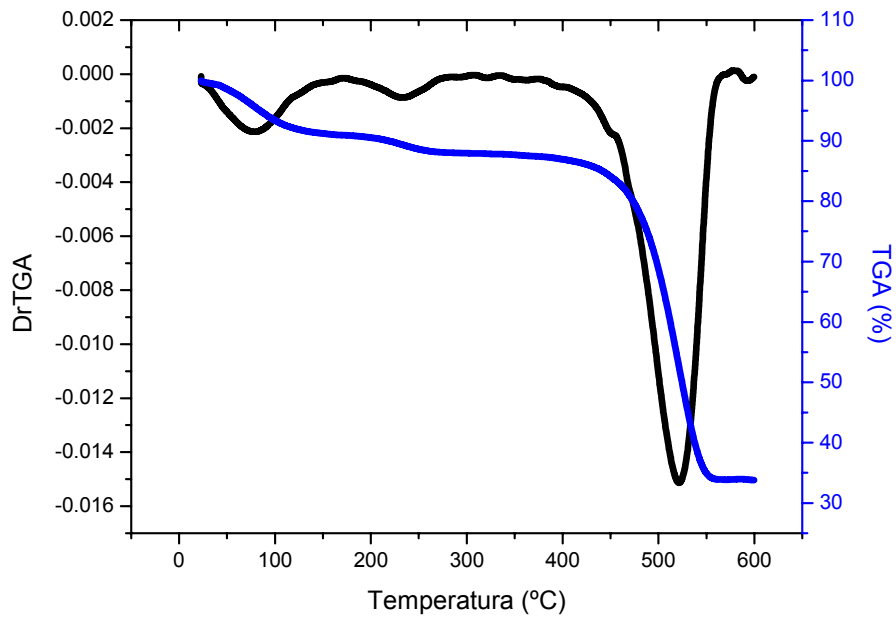
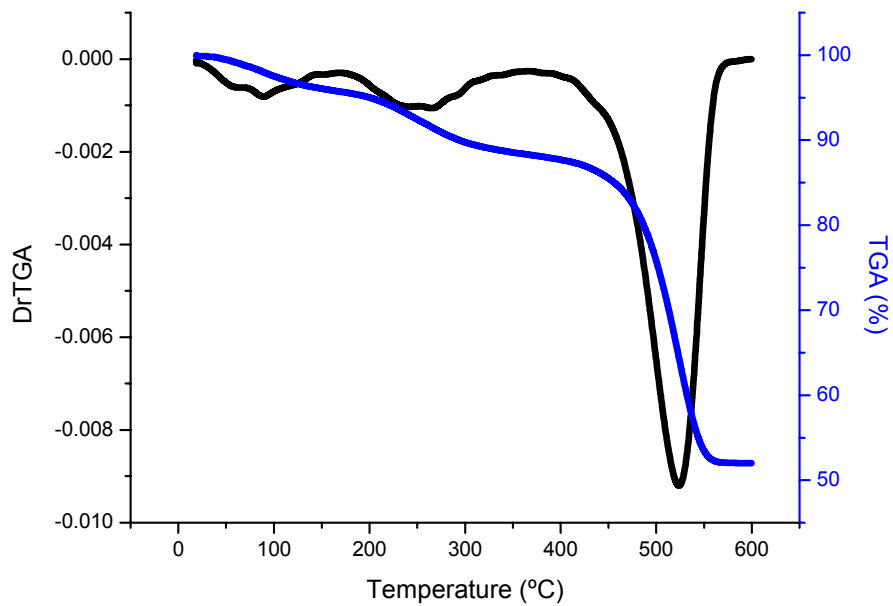


Figura 3 – Termograma da quitosana pura



**Figura 4** – Termograma da micropartícula (quitosana/astaxantina).



**Figura 5** – Termograma da micropartícula (quitosana/astaxantina) com glutaraldeído.

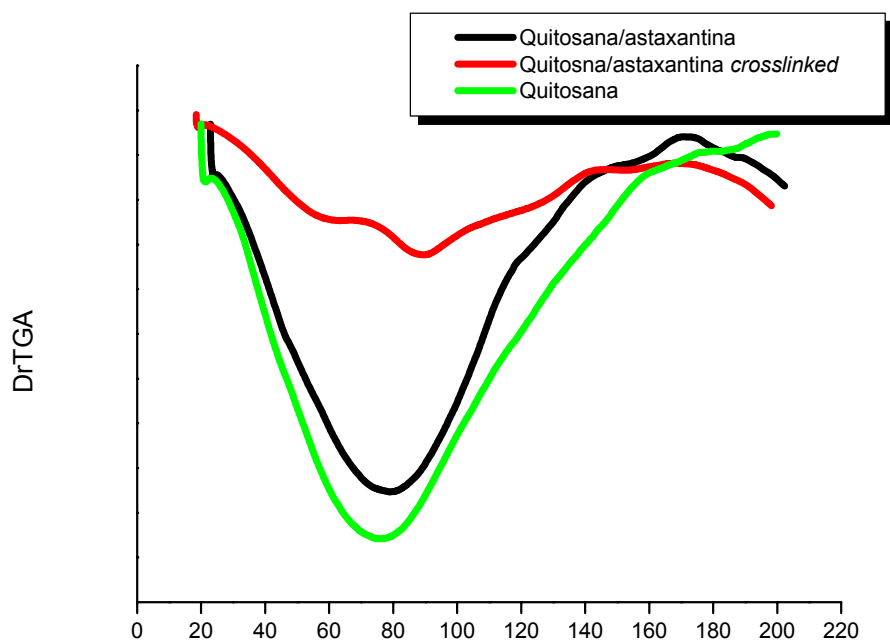


Figura 6 – Região ampliada da perda de água para quitosana pura, micropartícula quitosana/astaxantina e quitosana/astaxantina entrecruzada com glutaraldeído.

Enquanto se observa dois estágios de perda de massa para a quitosana pura, para as amostras de micropartículas (Figuras 4 e 5) percebe-se três de decomposição térmica. A degradação térmica para a quitosana indicou uma  $T_{m\acute{a}x}$  para o segundo estágio de perda de massa de  $321,36^{\circ}\text{C}$  ( $285,74\text{-}368,43^{\circ}\text{C}$ ) e uma perda de massa da ordem  $50,340\%$ . Zohuriaan e Shokrolahi (2004) reportam um primeiro estágio de perda de massa com um  $T_{m\acute{a}x}$  de  $47^{\circ}\text{C}$  ( $45,0\text{-}90,0^{\circ}\text{C}$ ) e uma perda de  $6\%$ , enquanto para o segundo estágio de perda de massa ( $282,5\text{-}358,4^{\circ}\text{C}$ ) uma  $T_{m\acute{a}x}$  de  $325,5^{\circ}\text{C}$  e uma perda de massa de  $40,5\%$ . Já Tirkistani (1998a, b) relata  $T_{m\acute{a}x}$  em  $334^{\circ}\text{C}$  com uma perda de massa de  $49\%$  para a quitosana pura, no segundo estágio de perda de massa. Tais resultados são similares aos obtidos pelo presente estudo.

As micropartículas apresentaram um segundo estágio de perda de massa com picos de máxima velocidade de perda de massa em  $232,99^{\circ}\text{C}$  (Figura 4) e  $264,80^{\circ}\text{C}$  (Figura 5). O termograma do óleo contendo astaxantina (Figura 7) apresenta um único estágio de perda de massa, entre  $423,06^{\circ}\text{C}$  e  $482,89^{\circ}\text{C}$ , com um pico de máxima velocidade de perda em  $454,09^{\circ}\text{C}$ . Com base nestes dados, é possível atribuir ao segundo estágio de perda de massa das micropartículas (Figuras 4 e 5) uma diminuição da estabilidade térmica das cadeias poliméricas da quitosana provocada pelo óleo contendo astaxantina. E que esta desestabilização térmica é

menor na amostra que sofreu o tratamento químico (reticulação) com glutaraldeído (Figura 5).

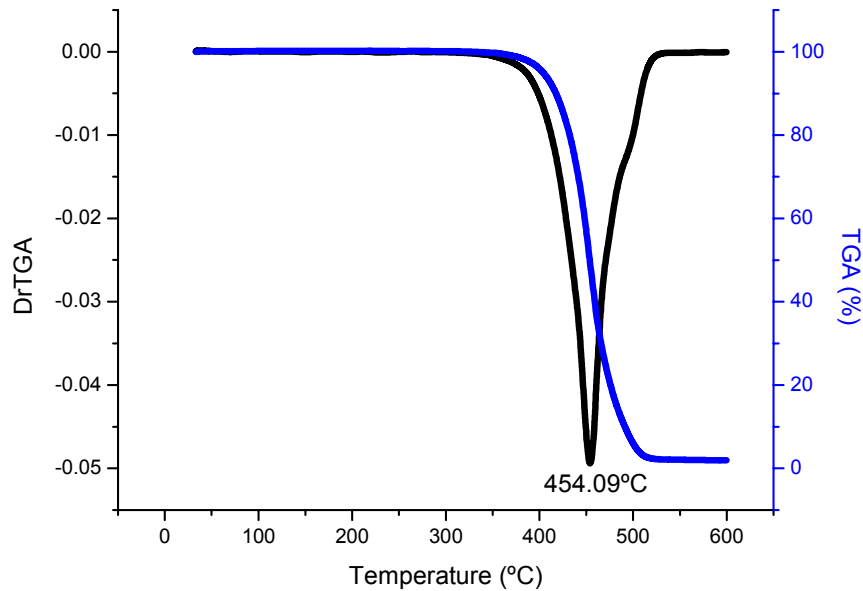


Figura 7 – Termograma de astaxantina em óleo de soja (0,04 g/dL)

### 3.4. Calorimetria Exploratória de Varredura

A fusão da solução de astaxantina em óleo (Figura 8) se deu num intervalo de temperatura de  $-21,63^{\circ}\text{C}$  “onset” a  $-2,16^{\circ}\text{C}$  “endset”, com um pico em  $-9,72^{\circ}\text{C}$ . As propriedades de um óleo refletem sua composição, principalmente de ácidos graxos.

De acordo com Hammond et al. (2005) o óleo de soja tem um ponto de fusão de  $-0,6^{\circ}\text{C}$  e um ponto nuvem de  $-9,0^{\circ}\text{C}$ . Hartmann et al. (1996) em análise por DSC de óleo de soja típico, relataram uma temperatura de “onset” a  $-39,6^{\circ}\text{C}$ , de “endset” a  $-0,6^{\circ}\text{C}$  e um máximo a  $-9,4^{\circ}\text{C}$ , resultado este similar ao obtido no presente estudo (Figura 8).

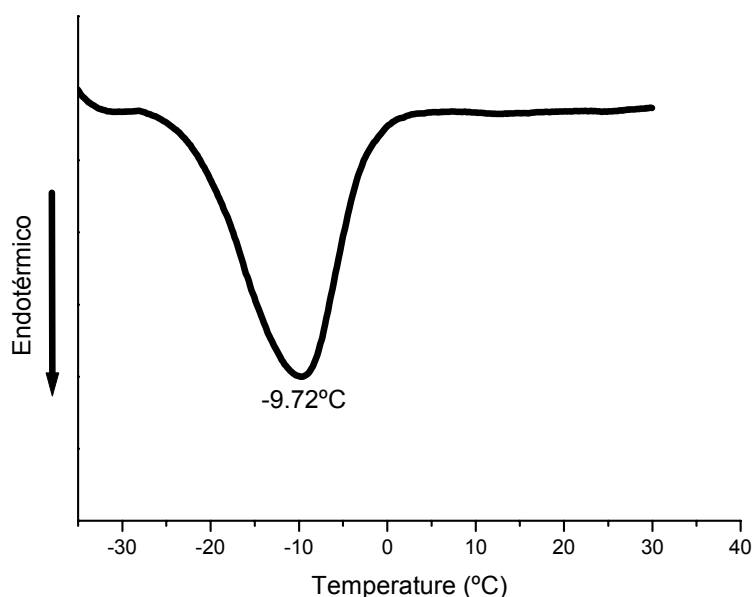


Figura 8 – Termograma DSC para solução astaxantina/óleo de soja.

Um dos critérios que se costuma adotar em sistemas poliméricos para avaliação de possíveis interações entre os componentes dos sistemas baseia-se da determinação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ).

A amostra de quitosana foi primeiramente submetida a uma primeira corrida de DSC para remoção de água e destruição da história térmica da amostra. As análises de TGA (Figuras 3 e 6) demonstraram que a amostra de quitosana pura continha cerca de 9 % de água. A Figura 9 apresenta o termograma DSC para a quitosana pura (2<sup>a</sup>-corrida).

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) pode ser obtida por calorimetria exploratória de varredura. A  $T_g$  da quitosana é ainda objeto de controvérsia nos meios científicos. A principal razão pode ser por se tratar de um polímero natural, algumas propriedades como cristalinidade, massa molar e grau de desacetilação podem apresentar variações conforme a fonte e/ou método de extração e isso certamente irá influenciar na  $T_g$ . Ratto et al (1995) observaram uma  $T_g$  para a quitosana a 30°C para teores de água de 8 % a 30 %. Lazadidou e Biliaderis (2005) encontraram um  $T_g$  variando de -23°C a 67°C, de acordo com o teor de água da amostra, indicando nos dois casos um efeito plastificante da água. Por outro lado, Skurai, Maegawa e Takahashi (2000) observaram a  $T_g$  em 203°C, enquanto Kittur et

al (2002) e Neto et al (2005) não encontraram evidências de Tg, sugerindo que a Tg para a quitosana poderia estar próxima da faixa de temperatura de degradação térmica. No presente estudo foi determinada uma Tg de 104,08°C (Figura 9), após uma primeira corrida para remoção de água adsorvida na amostra.

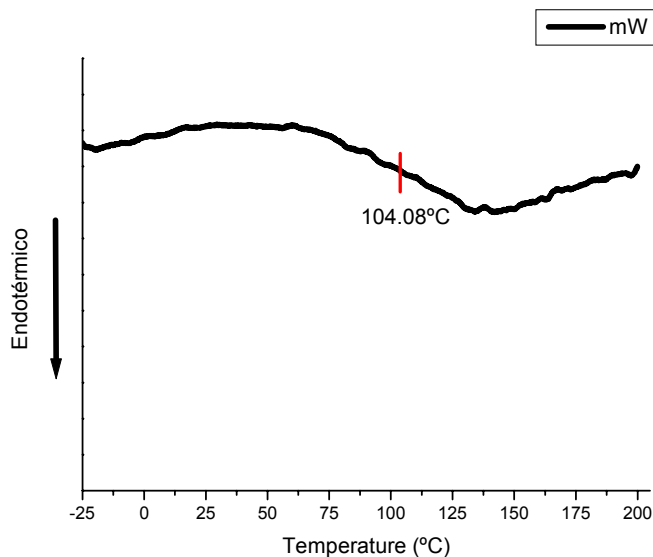


Figura 9 – Termograma DSC para a quitosana.

Os termogramas das micropartículas quitosana-astaxantina sem e com reticulação química são apresentados nas Figuras 10 e 11. Em ambas as amostras é perceptível um pico endotérmico predominante devido a remoção de água adsorvida.

Para a amostra quitosana-astaxantina sem o tratamento com glutaraldeído este pico endotérmico situa-se a 118,50 °C, enquanto na amostra que sofreu o tratamento com glutaraldeído este pico está deslocado para um temperatura mais alta, isto é, para 135,67°C. Estas temperaturas estão de acordo com as análises termogravimétricas, onde o tratamento com glutaraldeído efetuou um deslocamento no pico de velocidade máxima de perda de massa, também para temperaturas mais elevadas, devido à reação de reticulação química (crosslinking). Isto demonstra uma alteração na relação de força na interação polímero-água entre as amostras.

Em ambas às amostras de micropartículas foi possível a determinação da temperatura de transição vítrea (Tg). Observa-se que houve uma diminuição na Tg da quitosana presente na micropartícula, possivelmente devido a um efeito plastificante provocado pelos ácidos graxos e astaxantina microencapsulados. A

plastificação, a nível molecular, leva a um aumento do espaço intermolecular ou volume livre, diminuindo a viscosidade local e aumentando a mobilidade. O efeito plastificante foi mais pronunciado na amostra que não sofreu reticulação ( $T_g = 55,50^\circ\text{C}$ ) do que na amostra que foi submetida ao tratamento com glutaraldeído ( $T_g = 60,70^\circ\text{C}$ ).

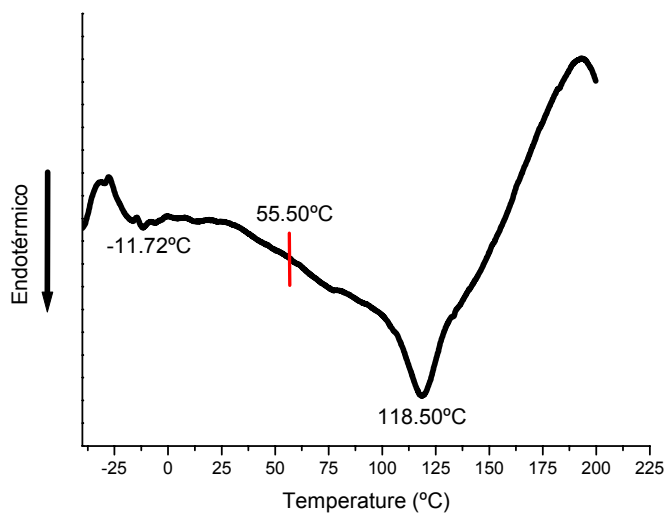


Figura 10 – Curvas de DSC para a micropartícula quitosana-astaxantina em óleo.

Um pico endotérmico discreto, em temperaturas negativas, foi observado nas amostras de micropartículas (Figuras 10 e 11, devido à fusão da fração lipídica presente, demonstrando a microencapsulação).

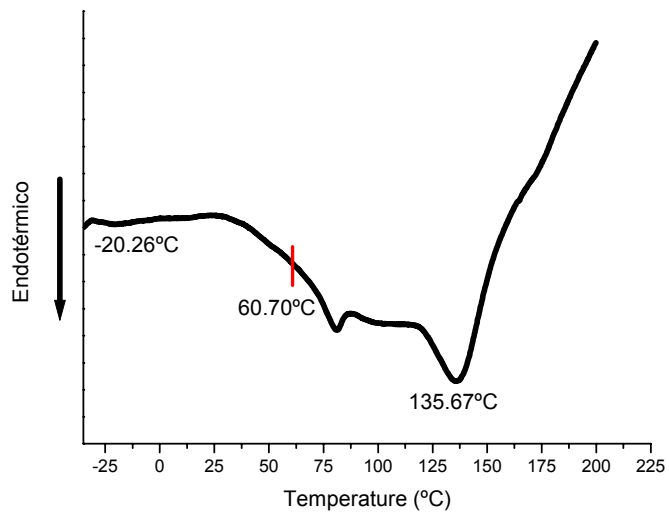


Figura 11 – Curva de DSC para a micropartícula quitosana – astaxantina em óleo tratado com glutaraldeído.



#### 4. CONCLUSÕES

O tamanho não homogêneo das micropartículas ocorreu pela distribuição irregular da emulsão e o formato não esférico foi atribuído ao processo de secagem por liofilização.

O aparecimento e o deslocamento de bandas na região do infravermelho possibilitaram a identificação de grupos funcionais característicos da quitosana e da astaxantina bem como possibilitaram a identificação do complexo astaxantina-quitosana nas micropartículas.

As análises termogravimétricas demonstraram que o complexo astaxantina-quitosana reduziu a capacidade de hidratação da quitosana e diminuiu sua estabilidade térmica

Foi possível a identificação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) da quitosana e das micropartículas.

A temperatura de transição vítrea da quitosana está relacionada com sua capacidade de hidratação.

Os ácidos graxos presentes na astaxantina provocaram um efeito plastificante na quitosana diminuindo a temperatura de transição vítrea da quitosana.

A reticulação da quitosana com glutaraldeído aumenta a estabilidade térmica da quitosana nas micropartículas.

A expansão contínua e crescente do mercado mundial de produção de astaxantina e a abertura de novos mercados (farmacêutico e de alimentos) para este produto são um incentivo para maiores estudos e aprimoramento de técnicas para viabilizar o uso deste carotenóide.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO, P.L.M.; PIRES, A.T.N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, 79, p.147-152, 2003.

CHANDY, T.; RAO, G.H.; WILSON, R.F.; DAS, G.S. Delivery of LMW heparin via surface coated chitosan/peg-alginate microspheres prevents thrombosis. **Drug Delivery**, v. 9, p. 87–96, 2002.

CHEN, X.; CHEN, R.; GUO, Z.; LI, C.; LI, P. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with  $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chemistry**, 101, p.1580-1584, 2007.

EARL G. HAMMOND, E. G.; JOHNSON, L.A.; SU, C.; WANG, T.; WHITE, P. J. Soybean oil. In: SHAHIDI, F. (Ed). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, v. 3, 6th ed. EUA, John Wiley & Sons, Inc., 2005, p. 577-653.

HARTMANN R. B.; W. FEHR R.; WELKE G. A.; HAMMOND E. G.; DUVICK D. N.; CIANZIO S. R. Association of elevated palmitate content with agronomic and seed traits of soybean. **Crop science**, v. 36, p. 1466–1470, 1996.

HIGUERA, C. I.; FÉLIX, V. L.; GOYCOOLEA, V. F. M.; ARGÜELLES, M. W. M. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. **Carbohydrates Polymers**, v. 56, n. 1, p. 41-45, 2004.

HOGAN, S. A.; McNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 137 – 144, 2001.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; IJIMA, K.; GROSS, M. D. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. **Nutraceutical Cancer**, v. 36, p. 59-65, 2000.

KATO, Y.; ONICHE, H.; MACHIDA, Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, p. 303-309, 2003.

KITTUR, F.S.; PRASHANTH, K.V.H.; UDAYA SANKAR, K.; THARANATHAN, R.N. Characterization of chitin and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, 49, p.185-193, 2002.

KURIHARA, H.; KODA, H.; ASAMI, S.; KISO, Y.; TANAKA, T. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. **Life Science**, v. 70, p. 2509 - 2520, 2002.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. **Carbohydrates Polymers**, v. 48, p. 179 – 190, 2005.

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. Caracterização de micropartículas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 73 – 80, 2005.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1150-1154, 2000.

NETO, C.G.T.; GIACOMETTI, J.A.; JOB, A.E.; FERREIRA, F.C.; FONSECA, J.L.C.; PEREIRA, M.R. Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydrate Polymers**, 62, p.97-103, 2005.

NIETO, J.M.; PENICHE-COVAS, C.; PADRON, G. Characterization of chitosan by pyrolysis-mass spectroscopy, thermal analysis and differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**, 176, p. 63-68, 1991.

ONAL, S.; ZIHNIUGLU, F. Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: oral therapeutic peptide delivery. **Artificial Cells Blood Substitute and Immobilization Biotechnology**, v. 30, p. 229–237, 2002.

PARTANEN, R.; YOSHII, H.; KALLIO, H.; YANG, B.; FORSELL, P. Encapsulation of sea buckthorn kernel oil in modified starches. **Journal of The American Oil Chemists Society**, v. 79, n. 3, p. 219-223, 2002.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, p. 153-166, 2003.

PENICHE, C. et al. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. **Macromolecular Bioscience**, v.3, p. 511-520, 2003.

RATTO, J.; HATAKEYAMA, T.; BLUMSTEIN, R. B. Differential scanning calorimetry investigation of phase transition in water/chitosan systems. **Polymer**, v. 36, p. 2915 – 2919, 1995.

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, p. 31 – 40, 2005.

RUEDA, D. R.; SACALL, T.; BAYER, R. K. Differences in the interaction of water with starch and chitosan films as revealed by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Carbohydrates Polymers**, v. 40, p. 49 – 56, 1999.

SAKURAI, K.; MAEGAWA, T.T.; TAKAHASHI, T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/ poly (n-vinyl pyrrolidone) blends. **Polymer**, v. 40, p. 19 – 56, 2000.

SANTINHO, A. J. P.; PEREIRA, N. L.; FREITAS, O.; COLLET, J. H. Influence of formulation on the physicochemical properties of casein microparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 186, p. 191 – 198, 1999.

SHAIKH, J.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**, v. 94, p. 105 - 110, 2006.

SINGH, D. K.; RAY, A. R. Graft copolymerization of 2-hydroxyethylmethacrylate onto chitosan films and their blood compatibility. **Journal Applied Polymers Science**, v. 53, p. 1115, 1994.

TIRKISTANI, F.A.A. Thermal analysis of chitosan modified by cyclic oxygenated compounds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 61, p.161-164, 1998a.

TIRKISTANI, F.A.A. Thermal analysis of some chitosan Schiff bases. **Polymer Degradation and Stability**, v 60, p.67-70, 1998b.

TOZAKI, H.; ODORIBA, T.; OKADA, N.; FUJITA, T.; TERABE, A.; SUZUKI, T.; OKABE, S.; MURANISHI, S.; YAMAMOTO, A. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats. **Journal Controlled Release**, v. 82, n. 1, p. 51-61, 2002.

ZOHURIAAN, M.J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, p.575 - 579, 2004.

YOUNG, S.L.; SARDA, X.; ROSENBERG, M. Microencapsulation properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 2868 – 2877, 1993.

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A – Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA) – Curitiba/PR – Outubro/2006.**

**Perfil de liberação de astaxantina em micropartícula de quitosana**

Renata Á. Ozório; Bianca H. Beal; Roberto B. Derner; Roseane Fett; Pedro L. M. Barreto

O interesse cada vez maior da indústria por carotenóides naturais pode ser explicado pela capacidade atribuída a eles de prevenir doenças degenerativas, combatendo os radicais livres, atuando como agentes anticâncer e estimuladores imuno-sistemáticos. Devido a sua alta instabilidade, estes compostos usualmente não são manipulados na sua forma cristalina, mas preferencialmente imobilizados em emulsões ou microcápsulas. A microencapsulação é um processo que consiste na formação de uma matriz polimérica, ou uma cobertura ao redor do composto em particular, a fim de proteger sua atividade biológica dos fatores ambientais, aumentando assim, sua estabilidade físico-química. Dentre as matrizes mais comumente utilizadas estão aquelas que incluem os hidrolisados de amido e as gelatinas, bem como caseinatos, derivados de celulose, pectina, beta-ciclodextrina e quitosana. O presente trabalho tem por objetivo traçar o perfil de liberação da astaxantina a partir das micropartículas de quitosana, em dois solventes distintos, água destilada e éter de petróleo. Para tanto foram preparados 40 amostras com 100mg de micropartículas, sendo 20 amostras para cada solvente. Em seguida realizou-se leitura em espectrofotômetro UV-VIS (450nm), conforme metodologia descrita por Fett et al (2002), com construção de uma curva da quantidade de astaxantina liberada em função do tempo de exposição ao solvente (água ou éter de petróleo). As micrografias de superfície, obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura, mostram as micropartículas com aspecto esferóide com diâmetro em torno de 35-50  $\mu\text{m}$  e superfície rugosa. Verificou-se uma diferença nos perfis de liberação de astaxantina a partir das micropartículas de quitosana quando em água ou éter de petróleo. A liberação máxima foi maior em água ( $6,3 \cdot 10^{-3}$  g/100g de micropartícula) do que em éter de petróleo ( $0,3 \cdot 10^{-3}$  g /100g de micropartícula). A liberação de astaxantina em éter de petróleo foi máxima após 5 minutos, em seguida apresentou um declínio na liberação, demonstrando que a astaxantina liberada se encontrava adsorvida na camada externa da micropartícula, ou seja, astaxantina que não estava encapsulada. Em água, houve uma liberação mais lenta, atingindo um máximo após 40 minutos de exposição, apresentando uma relação exponencial da liberação de astaxantina em função do tempo de exposição ao solvente.

**APÊNDICE B – Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA) – Curitiba/PR – Outubro/2006.**

### **Espectrometria no Infra-Vermelho do complexo quitosana-astaxantina em micropartículas**

Renata Á. Ozório; Roberto B. Derner; Pedro L. M. Barreto

Os processos de desenvolvimento, de produção e de utilização de compostos naturais com propriedades bioativas apresentam elevada significância devido às inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica, entre esses compostos, destaca-se a astaxantina, com atividade antioxidante. O processo de microencapsulação vem sendo usado para proteger e disponibilizar compostos bioativos em alimentos. Dentre os polímeros empregados nos processos de microencapsulação a quitosana mostra-se uma alternativa eficiente e economicamente viável. O objetivo deste trabalho foi elaborar uma micropartícula de quitosana contendo astaxantina microencapsulada, avaliar a morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e verificar alterações químicas provocadas pela formação do complexo quitosana-astaxantina tanto na molécula polimérica como na molécula encapsulada (astaxantina) por espectroscopia de infravermelho (FTIR). As análises foram realizadas na astaxantina solubilizada em éter de petróleo, em quitosana (estado sólido) e micropartículas de astaxantina encapsuladas em quitosana. Foi utilizado um espectrofotômetro Perkim Elmer, com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , na faixa de  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr, com a utilização de mesma massa (70 mg). O espectro FTIR da amostra de quitosana mostra as seguintes bandas de absorção:  $3430\text{ cm}^{-1}$ , estiramento O-H;  $2130\text{ cm}^{-1}$ , estiramento N-H<sub>3</sub><sup>+</sup>;  $1654\text{ cm}^{-1}$ , deformação C=O de grupamento amida;  $1590\text{ cm}^{-1}$ , deformação N-H de grupo amino;  $1421\text{ cm}^{-1}$ , deformação O-H de anel;  $1380\text{ cm}^{-1}$ , deformação CH<sub>3</sub> de grupo amida;  $1080\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C-O. A astaxantina apresenta um espectro com as seguintes bandas de absorção:  $3450\text{ cm}^{-1}$ , estiramento O-H;  $3010\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$  e  $2854\text{ cm}^{-1}$  devido a deformação do grupo isoprenóide presente na cadeia molecular da astaxantina;  $1743\text{ cm}^{-1}$  a deformação C=O. Quando se compara o espectro FTIR da micropartícula com os espectros de seus componentes isolados, verifica-se um deslocamento da banda relativa ao estiramento O-H para um número de onda de  $3400\text{ cm}^{-1}$ ; uma diminuição da intensidade da banda a  $1650\text{ cm}^{-1}$  e o aparecimento



de uma banda intensa a  $1560\text{ cm}^{-1}$ , indicando a formação de um complexo quitosana-astaxantina. As micrografias de superfície, obtidas por MEV, mostram as micropartículas com aspecto esferóide com diâmetro em torno de  $35\text{-}50\ \mu\text{m}$  e superfície rugosa.

## APÊNDICE C – Trabalho apresentado no Brazilian MRS Meeting 2006 - V Encontro da SBPMat - Sociedade Brasileira de Pesquisas em Materiais – Florianópolis/SC –Outubro/2006.

### Morphological characterization and infrared spectra of astaxanthin/chitosan microparticules

Pedro L. M. Barreto<sup>1</sup>, Jefferson Rotta<sup>1</sup>, Roberto B. Demer<sup>1</sup>, Renata A. Ozorio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Santa Catarina, Food Science and Technology Departmente, 88034-001, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis/SC, Brazil

**Abstract** – Microparticule of chitosan with astaxanthin encapsulated was prepared. The morphological characteristics were examined using a scanning electron microscope (SEM). The SEM micrographs show a non-homogeneous size and a diameter of 33-52  $\mu\text{m}$ , with a rather smooth surface. The FTIR spectra of microparticules indicating a formation of a astaxanthin-chitosan complex.

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotene-4,4'-dione) is a carotenoid pigment found in certain marine animals and plants such as fish, shrimp and algae [1]. The most important commercial application of astaxanthin is in the aquaculture industry where it is used in the formulation of feed for farmed salmon and shrimp to provide the typical muscle colour, which is widely accepted by consumers throughout the world. In human nutrition, astaxanthin has been gaining widespread popularity as a dietary supplement due to its powerful antioxidant properties. The antioxidant property of astaxanthin is due to a total of 11 conjugated carbon-carbon double bonds (isoprenoid chain). Because astaxanthin is a highly unsaturated molecule, it can easily be damaged by heat or light, which can cause the loss of biological properties.

Due to the nature of its chemical configuration, the chitosan chain has a rather rigid configuration and this property has been successfully used for the preparation of films, gels and spheres which are currently used in the biomedical, cosmetic and food industries. One of their main applications is in the production of microspheres with delayed release of drugs in which chitosan chains are cross-linked with glutaraldehyde. The information on microencapsulation and characterization of astaxanthin microencapsulated in a chitosan matrix cross-linked with glutaraldehyde is very scarce [2].

Microencapsulation of astaxanthin was carried out through the multiple emulsion/solvent evaporation technique by Higuera-Ciapara et al. (2004)[2]. Once the multiple emulsion was formed, glutaraldehyde was added (50% aqueous solution) at a rate of 1 mL for each 10 mL of chitosan solution utilized in the primary emulsion. The cross-linking reaction was allowed to proceed at 50°C during 2 h. The dried microparticule were obtained by lyophilization. The microphotographs of the dried microspheres were obtained with a scanning electron microscope-SEM (Philips XL30). The FTIR spectra (FTIR, Perkin-Elmer) were recorded before and after processing of the chitosan and astaxanthin into microparticule form for observation of the functional groups, in IR-grade KBr tablet.

SEM micrographs of microparticules are shown in Fig. 1. They had a non-homogeneous size and a diameter of 33-52  $\mu\text{m}$ , with a rather smooth surface. The visible holes are not pores as monitored by ether solubilization (data not show), and may be attributed to the drying process. In the IR spectrum of pure astaxanthin the characteristic absorbance at 1743  $\text{cm}^{-1}$  was assigned to C=O, isoprenoid chain stretch (3010  $\text{cm}^{-1}$ , 2925  $\text{cm}^{-1}$  and 2854  $\text{cm}^{-1}$ ). In the chitosan spectrum the major IR absorption band were attributed to O-H stretch (3430  $\text{cm}^{-1}$ ), N-H<sup>3</sup> stretch (2130  $\text{cm}^{-1}$ ), N-H bend (1590  $\text{cm}^{-1}$ ), C-O stretch (1100  $\text{cm}^{-1}$ ). When is was compared the FTIR spectra of chitosan and astaxanthin with the microparticule with and without the cross-linking (glutaraldehyde) there was a pronounced change in peak attributed to carbonyl with a deslocation to 1650  $\text{cm}^{-1}$  and with a simultaneous decrease of peak intensity. There was observed the appear of a intense peak at 1560  $\text{cm}^{-1}$ , indicating a formation of a astaxanthin-chitosan complex.

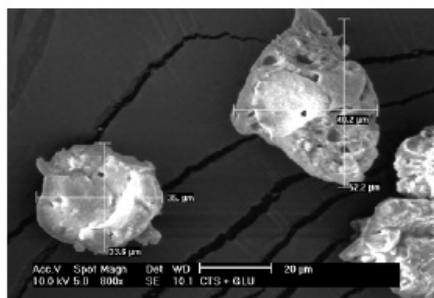


Fig. 1. SEM micrographs of lyophilized microparticules of chitosan-astaxanthin.

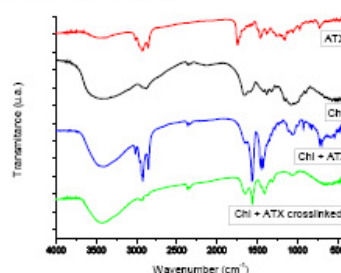


Fig. 2. The IR spectra of astaxanthin (ATX), chitosan (Chi) and microparticules with and without crosslinking (glutaraldehyde).

#### References

- [1] S. Boussiba, L. Fan, A. Vonshak, *Methods in Enzymology*, 386-391, 213 (1992).
- [2] I. Higuera-Ciapara, L. Felix-Valenzuela, F.M. Goycoolea, W. Arguñelles-Monal, *Carbohydrate Polymers*, 41-45, 56 (2004).

## APÊNDICE D – Trabalho apresentado no XI Internacional Macromolecular Colloquium e 6th Internacional Symposium on Natural Polymers and composites Gramado/RS – Abril/2007.



### MORPHOLOGICAL AND PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF CHITOSAN/ASTAXANTHIN MICROPARTICLES



Pedro L. M. Barreto<sup>1\*</sup>, Jefferson Rotta<sup>1</sup>, Renata Á. Ozorio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, barreto@cca.ufsc.br

Microparticle of chitosan with astaxanthin encapsulated was prepared. The morphological characteristics were examined using a scanning electron microscope (SEM). The SEM micrographs show a non-homogeneous size and a diameter of 33-52  $\mu\text{m}$ , with a rather smooth surface. The FTIR spectra of microparticles indicating a formation of an astaxanthin-chitosan complex. The thermal degradation properties of pure chitosan; astaxanthin oil and chitosan/astaxanthin microparticle was studied by thermogravimetric analysis under nitrogen atmosphere. The results showed that chitosan present two stages of decomposition, astaxanthin oil one stage and chitosan/astaxanthin microparticle three stages of thermal decomposition. DSC results indicate that glass transition temperature of chitosan shift to lower value in microparticle due to plasticizing effect of astaxanthin oil.

#### Introduction

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotene-4,4'-dione) is a carotenoid pigment found in certain marine animals and plants such as fish, shrimp and algae [1]. The most important commercial application of astaxanthin is in the aquaculture industry where it is used in the formulation of feed for farmed salmon and shrimp to provide the typical muscle colour, which is widely accepted by consumers throughout the world. In human nutrition, astaxanthin has been gaining widespread popularity as a dietary supplement due to its powerful antioxidant properties. The antioxidant property of astaxanthin is due to a total of 11 conjugated carbon-carbon double bonds (isoprenoid chain). Because astaxanthin is a highly unsaturated molecule, it can easily be damaged by heat or light, which can cause the loss of biological properties.

Due to the nature of its chemical configuration, the chitosan chain has a rather rigid configuration and this property has been successfully used for the preparation of films, gels and spheres which are currently used in the biomedical, cosmetic and food industries. One of their main applications is in the production of microspheres with delayed release of drugs in which chitosan chains are cross-linked with glutaraldehyde. The information on microencapsulation and characterization of astaxanthin microencapsulated in a chitosan matrix cross-linked with glutaraldehyde is very scarce [2].

#### Experimental

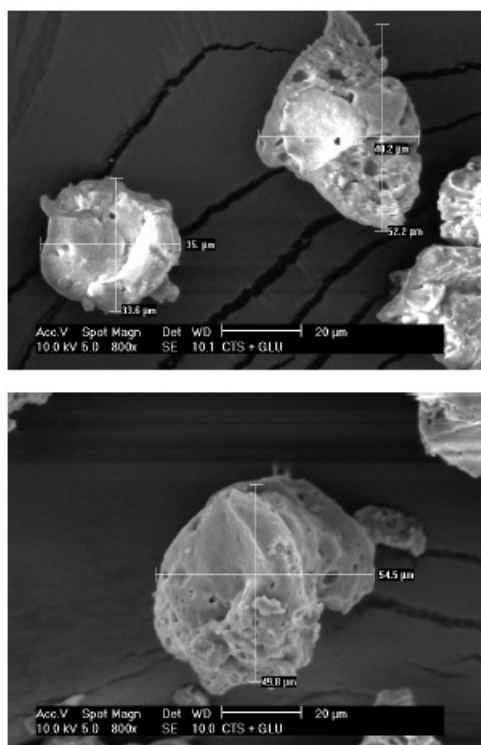
Microencapsulation of astaxanthin was carried out through the multiple emulsion/solvent evaporation technique by Higuera-Ciajara et al. (2004)[2]. Once the multiple emulsion was formed, glutaraldehyde was added (50% aqueous solution) at a rate of 1 mL for each 10 mL of chitosan solution utilized in the primary emulsion (chitosan-astaxanthin oil). The cross-linking reaction was allowed to proceed at 50°C during 2 h. The dried microparticle were obtained by lyophilization. The microphotographs of the dried microspheres were obtained with a scanning electron microscope-SEM (Philips XL30). The FTIR spectra (FTIR, Perkin-Elmer) were recorded before and after processing of the chitosan and astaxanthin into microparticle form for observation of the functional groups, in IR-grade KBr tablet.

Thermogravimetric (TGA) analysis and differential (DTG) thermogravimetric analysis were carried out with a Shimadzu TG50 system. All analyses were performed in platinum pan under a dynamic nitrogen atmosphere (50  $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ) in the temperature range 25-600°C at a heating rate of 10°C·min<sup>-1</sup>.

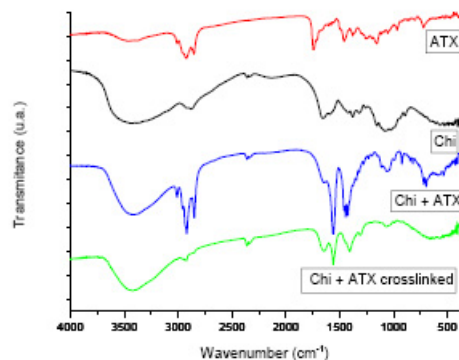
DSC measurements were performed in a DSC 50 (Shimadzu, Japan) under nitrogen (50  $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ). The samples were first heated to 150°C (heating rate of 20°C·min<sup>-1</sup>) to remove adsorbed water. They were then rapidly cooled to room temperature with liquid nitrogen and a second scanning to 300°C (heating rate of 10°C·min<sup>-1</sup>) was obtained.

## Results and Discussion

SEM micrographs of microparticles are shown in Fig. 1. They had a non-homogeneous size and a diameter of 33-54  $\mu\text{m}$ , with a rather smooth surface. The visible holes are not pores as monitored by ether solubilization (data not show), and may be attributed to the drying process. In the IR spectrum of pure astaxanthin the characteristic absorbance at  $1743\text{ cm}^{-1}$  was assigned to C=O, isoprenoid chain stretch ( $3010\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$  and  $2854\text{ cm}^{-1}$ ). In the chitosan spectrum the major IR absorption band were attributed to O-H stretch ( $3430\text{ cm}^{-1}$ ), N-H<sub>3</sub><sup>+</sup> stretch ( $2130\text{ cm}^{-1}$ ), N-H bend ( $1590\text{ cm}^{-1}$ ), C-O stretch ( $1100\text{ cm}^{-1}$ ). When is was compared the FTIR spectra of chitosan and astaxanthin with the microparticle with and without the cross-linking (glutaraldehyde) there was a pronounced change in peak attributed to carbonyl with a dislocation to  $1650\text{ cm}^{-1}$  and with a simultaneous decrease of peak intensity. There was observed an intense peak at  $1560\text{ cm}^{-1}$ , indicating a formation of an astaxanthin-chitosan complex via hydrogen bonds between carbonyl and amine groups. (Figure 2).

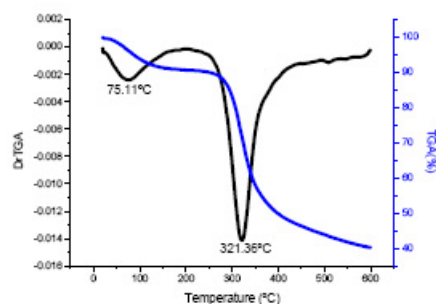


**Figure 1** – SEM micrographs of lyophilized microparticles of chitosan-astaxanthin.



**Figure 2** – The IR spectra of astaxanthin (ATX), chitosan (Chi) and microparticles with and without crosslinking (glutaraldehyde).

TGA and DrTGA curves for chitosan showed that the weight loss took place in two stages. The first one reaches the maximum  $75.11^{\circ}\text{C}$  with a weight loss of 9.013%. The second stage starts at  $285.74^{\circ}\text{C}$  and reaches a maximum at  $321.36^{\circ}\text{C}$  with a weight loss of 50.34%. This result is similar to the ones of Nieto, Peniche-Covas, and Padron (1991) [3], Turkistani (1998) [4] and Neto, Giacometti, Job, Ferreira, Fonseca and Pereira (2005) [5]. The first stage is assigned to the loss of water. Considering the chitosan structure, it can be seen that water molecules can be bound by two polar groups, hydroxyl and amine, present in this macromolecule. The second one, corresponds to the decomposition (thermal and oxidative) of chitosan, vaporization and elimination of volatile products.



**Figure 3** – TGA and DrTGA of chitosan.

The thermal degradation of astaxanthin oil is showed in Figure 4. Only one stage is observed which starts at  $328.38^{\circ}\text{C}$  and an end at  $565.42^{\circ}\text{C}$ , with a maximum at  $454.09^{\circ}\text{C}$ . The weight loss mass reach 97.874%.

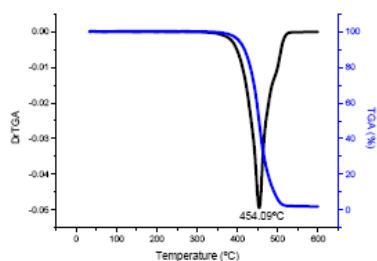


Figure 4 – TGA and DWTGA of astaxanthin oil.

The thermal stability of chitosan-astaxanthin microparticle is showed in Figure 5. The weight loss took place in three stages. As pure chitosan, the first stage is assigned to the loss of water. In contrast to the pure chitosan and astaxanthin oil, in which the main stage of degradation was found to occur in a single process (range 201-595°C), the microparticle chitosan-astaxanthin showed a more complex behavior in the range 190-600°C. For the microparticle, it seems clear that more than one specimen underwent a mass loss, reflected in the appearance of two peaks (264.8°C and 523.7°C) in Figure 5.

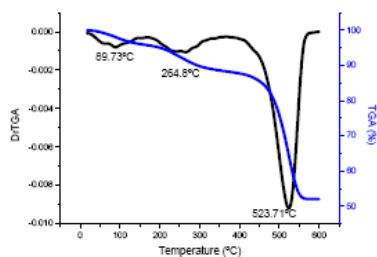


Figure 5 – TGA and DWTGA of chitosan-astaxanthin microparticle.

The astaxanthin oil fusion onset at -21.63°C and endset at -2.16°C, with a peak at -9.72°C, as showed in Figure 6. Glass transition temperature of chitosan is in agreement which was related by Mucha and Pawalak (2005) [6] in the vicinity of 110-140°C for water contents ranging from 8 to 30%. In this present work was found a mid point at 104.08°C (Figure 7), with 9.013% of moisture.

The DSC thermogram of chitosan-astaxanthin microparticle is shown in Figure 8. It's possible to see the astaxanthin oil fusion at ca. -11.72°C, the shift of glass transition to a lower temperature (55.50°C) due to plasticization effect of astaxanthin oil, and a endothermic peak corresponding to water evaporation at 118.5°C (bound water to hydroxyl and amine groups of chitosan main chain).

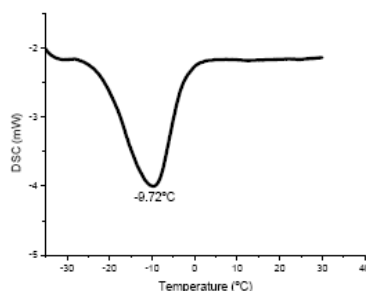


Figure 6 – DSC thermogram of astaxanthin oil.

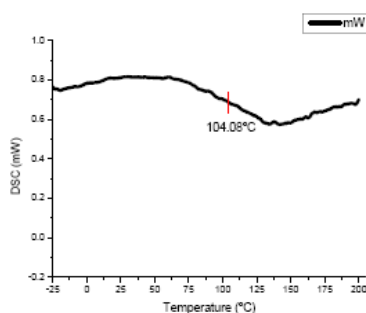


Figure 7 – DSC thermogram of chitosan show the glass transition temperature.

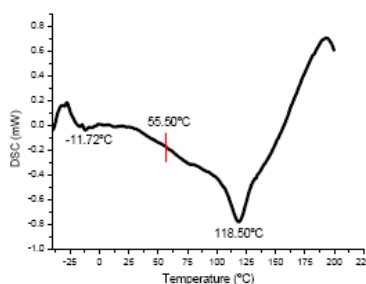


Figure 8 – DSC thermogram of chitosan - astaxanthin microparticle.

## Conclusions

The microparticles had non-homogeneous size and non-spherical shape. The FTIR spectra showed the formation of a chitosan-astaxanthin complex. From the

DSC curves it was possible to observe a decrease in chitosan glass transition temperature due to plasticizing effect of astaxanthin oil. The TGA curve of chitosan-astaxanthin oil microparticles showed a more complex thermal degradation than pure components, due to chitosan-astaxanthin chemical interactions, as confirmed by FTIR.

## References

1. S. Boussiba, L. Fan, A. Vonshak, *Methods in Enzymology*, 1992, 213, 386-391
2. I. Higuera-Ciapara, L. Felix-Valenzuela, F.M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, *Carbohydrate Polymers*, 2004, 56, 41-45.
3. J.M. Nieto; C. Peniche-Covas; G. Padron. *Thermochimica Acta*. 1991, 176, 63-68.
4. F.A.A. Tirkistani. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 60, 67-70.
5. C.G.T. Neto, J.A. Giacometti; A.E. Job; F.C. Ferreira; J.L.C. Fonseca; M.R. Pereira. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 62, 97-103.
6. M. Mucha, A. Pawlak. *Thermochimica Acta*, 2005, 427, 69-76.