



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Oscar Wilfredo Díaz Gamboa

**MICROENCAPSULAÇÃO DE TOCOFERÓIS EM MATRIZES LIPÍDICAS
ADVINDAS DE GORDURAS LOW TRANS INTERESTERIFICADAS
QUIMICAMENTE**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Profa. Dra. Lireny Aparecida. Guaraldo Gonçalves

Orientadora

Este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado defendida por Oscar Wilfredo Diaz Gamboa, aprovada pela comissão julgadora em 19/12/2011 e orientado pela Prof.(a) Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves.

Assinatura do Orientador

Campinas – SP – Brasil

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

D543m Diaz Gamboa, Oscar Wilfredo
Microencapsulação de tocoferóis em matrizes
lipídicas advindas de gorduras low trans interesterificadas
quimicamente / Oscar Wilfredo Diaz Gamboa. --
Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Micropartícula lipídica. 2. Cromatografia líquida.
3. Alfa tocoferol. 4. Low trans. 5. Spray chilling. I.
Gonçalves, Lireny Aparecida Guaraldo. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Tocopherol microencapsulation with chemistry interesterify
low trans fat matrix

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Lipid microparticles

Liquid Chromatography

Alpha-tocopherol

Low trans

Spray chilling

Área de concentração:Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves [Orientador]

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo

Suzana Caetano da Silva Lannes

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Data da defesa: 19/12/2011

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
(Orientadora)

Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes
(Membro)

Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(Membro)

Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo
(Membro)

Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues
(Membro)

Dra. Rosiane Lopes da Cunha
(Suplente)

Dra. Carmen Sílvia Fávoro Trindade
(Suplente)

Dr. Mario Roberto Marostica Junior
(Suplente)

Dedico este Trabalho

Aos meus pais, irmãos e a minha
Amada esposa Maria e
Filha Saraíh.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir a realização deste sonho e por estar sempre ao meu lado, me dando sabedoria e força para nunca desistir.

À minha orientadora, professora Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves, pela oportunidade concedida, confiança, paciência e pela atenção dedicada durante toda a realização deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Raimundo Grosso. Agradeço a disposição, os ensinamentos e a disponibilidade do laboratório para realização dos experimentos e análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Renato Grimaldi, pela amizade e bons momentos compartilhados.

À Dra. Ana Paula, Leilane e Julio pela amizade, consideração e ajuda preciosa.

A os técnicos e estagiários do Laboratório de Óleos e Gorduras.

Aos queridos amigos de Laboratório, Maria Cristina, Julice, Rita, Gabriel, Gustavo, Aliciane, e Georgia, pelos bons momentos compartilhados ao longo destes anos.

Às ex-alunas Kelly, Cibele, Luciene e Raquel, por todos os momentos do nosso convívio no laboratório.

À Ingrid, Marcella, Tatiane e Priscila, pela ajuda constante na rotina dos trabalhos no laboratório.

Aos funcionários da Pós-Graduação, Cosme e Marcos, sempre tão prestativos e atenciosos.

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de minha formação profissional.

Ao Laboratório de Óleos e Gorduras, pela acolhida durante todos estes anos e pelos bons momentos compartilhados.

E a todos os que não foram citados, mas que estão cientes de sua participação direta ou indireta na realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

INDICE	
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE TABELAS	xv
RESUMO GERAL	xviii
ABSTRACT	xx
INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA	1
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Microencapsulação	5
1.2. Material de parede	7
1.2.1. Lipídios	10
1.2.1.1.. Polimorfismo de lipídios	13
1.3. Microencapsulação no setor alimentício	16
1.4. Processos de Microencapsulação e controle	19
1.5. Técnicas de Microencapsulação	20
1.5.1. Spray chilling	20
1.5.2. Spray Drying	21
1.5.3. Gelificação iônica	22
1.5.4. Coacervação complexa	23
1.6. Material Ativo	24
1.6.1. Tocoferóis	24
1.6.1.1. Atividade das Unidades de Vitamina E	27
1.6.1.2. Recomendações Nutricionais de tocoferol Recomendada	27
1.6.1.3. Microencapsulação de tocoferóis	28
1.6.1.4. Determinação analítica de tocoferóis	30
1.6.1.4.1. Quantificação	31
1.6.1.5. Validação de Métodos Analíticos de tocoferóis	31
1.6.2. Liberação do Ingrediente Ativo	34
1.6.3. Estabilidade do Ingrediente Ativo	35
1.7. Métodos utilizados para o estudo das partículas lipídicas	38

1.7.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
1.7.2. Difração de Raios-X	39
1.7.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	40
1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	43

CAPÍTULO 2: VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE TOCOFEROL POR CLAE

Resumo	62
2.1. Introdução	63
2.2. Materiais e Métodos	64
2.3. Resultados	67
2.4. CONCLUSÕES	71
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	72

CAPITULO 3: PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS LIPIDICAS COM α - TOCOFEROL POR SPRAY CHILLING: CARACTERIZAÇÃO, ESTABILIDADE E LIBERAÇÃO

Resumo	74
3.1. Introdução	76
3.2. Materiais e métodos	78
3.2.1. Materiais	78
3.2.2. Equipamentos	79
3.2.3. Caracterização da matéria prima	79
3.2.4. Produção de microparticulas lipídicas (MpL) – Ensaio Preliminares	80
3.2.4.1. Determinação da proporção da matriz lipídica (parede)	80
3.2.4.2. Determinação das proporções entre matriz lipídica e recheio	81
3.2.4.3. Determinação dos parâmetros para produção das micropartículas Lipídicas (MpL)	81
3.2.5. Processo de produção de microparticulas lipídicas (MpL)	82
3.2.6. Planejamento experimental	83
3.2.7. Determinação de tocoferóis	84
3.2.7.1. Implantação da metodologia	84

3.2.7.2. Equipamento e condições operacionais	85
3.2.7.3. Identificação e quantificação	86
3.2.8. Determinação da eficiência de encapsulação	87
3.2.9. Morfologia das microparticulas lipídicas (MpL)	87
3.2.10. Distribuição de tamanho e diâmetro médio das microparticulas lipídicas (MpL)	88
3.2.11. Estudo da estabilidade das microparticulas lipídicas (MpL)	88
3.2.11.1. Análise térmica (DSC)	89
3.2.11.2. Difração de raios-X	91
3.2.12. Avaliação da resistência das microparticulas lipídicas (MpL) em meio ácido	92
3.2.13. Avaliação da ação enzimática sobre as microparticulas lipídicas (MpL)	92
3.2.14. Avaliação da liberação do recheio	93
3.2.15. Análise estatística	94
3.3. Resultados e discussão	95
3.3.1. Caracterização da matéria prima	95
3.3.2. Produção de microparticulas lipídicas (MpL) – Ensaio preliminares	96
3.3.2.1. Determinação da proporção da matriz lipídica	96
3.3.2.2. Determinação das proporções entre matriz lipídica e recheio	97
3.3.3. Processo de produção de microparticulas lipídicas (MpL)	97
3.3.4. Quantificação de tocoferóis	98
3.3.4.1. Detecção de tocoferóis por CLAE	98
3.3.4.2. Determinação dos parâmetros de calibração	98
3.3.5. Determinação da eficiência de encapsulação	99
3.3.5.1. Otimização do processo de microencapsulação	102
3.3.6. Morfologia das microparticulas lipídicas (MpL)	105
3.3.7. Distribuição de tamanho e diâmetro médio das microparticulas lipídicas (MpL)	109
3.3.8. Estudo da estabilidade	111
3.3.8.1. Produção de micropartículas lipídicas (MpL)	111

3.3.8.2.	Determinação da eficiência de encapsulação	111
3.3.8.3.	Avaliação térmica (DSC)	113
3.3.8.4.	Difração de raios-X	118
3.3.9.	Avaliação da resistência das micropartículas lipídicas em meio Ácido.	125
3.3.10	Avaliação da ação enzimática sobre as micropartículas lipídicas (MpL) por microscopia ótica	126
3.3.11.	Avaliação de liberação do recheio	129
3.4..	CONCLUSÕES	133
3.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
CAPITULO 4: APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE TOCOFEROIS EM SISTEMA ALIMENTÍCIO		142
	Resumo	142
4.1.	Introdução	144
4.2.	Material e Métodos	147
4.2.1.	Aplicação em sistema alimentício	147
4.2.2.	Avaliação sensorial do sistema Alimentício	148
4.2.2.1.	Teste de Aceitação	148
4.2.2.2.	Teste de Intenção de compra	148
4.2.3.	Análise estatística	149
4.3.	Resultados	150
4.4.	CONCLUSÕES	152
4.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
5.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	155
	CONCLUSÕES GERAIS	156
	ANEXOS	158

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1

- Figura 1.** Definição do tipo de estrutura obtido nos processos de microencapsulação. A: mononucleada – microcápsula; B: multinucleada –microesfera. 7
- Figura 2.** A-. NLC -Tipo I : Estrutura com imperfeições (direita). B-. NLC - Tipo II: Sem estrutura (estado sólido amorfo). C-. NLC - Tipo III: Multiplo (oleo/gordura/água). 12
- Figura 3.** Tipos de empacotamento de cadeias (a) e estruturas das subcélulas das três formas mais comuns de polimorfismos em triacilgliceróis (b) 14
- Figura 4.** Três polimorfismos típicos de triacilgliceróis. 16
- Figura 5.** Vitamina E – Estruturas químicas. 25

CAPITULO 2

- Figura 1.** Cromatogramas referentes ao tempo de retenção do α -tocoferol. CLAE – Detetor de Fluorescência $\lambda_{exc.}$ 290 e $\lambda_{em.}$ 330nm. 67
- Figura 2.** Curvas de calibração do α -tocoferol. 68

CAPITULO 3

- Figura 1.** Equipamento “*Spray Chilling*” para a produção de microparticulas lipídicas. 76
- Figura 2.** Disposição de amostras em estocagem a 22 °C escuro (BOD). 89

- Figura 3.** Termograma típico obtido com o DSC, com indicação da Tonset, T_{máx} e endset, em (°C). 90
- Figura 4.** Difratoograma de Raios-X, explicativo do método de determinação de Índice de cristalinidade relativa. 93
- Figura 5.** Sistema agitação na avaliação da liberação das microparticulas lipídicas. 95
- Figura 6.** Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura do ensaio A com proporção: lipídio/recheio (90/10). 106
- Figura 7.** Histograma de distribuição do tamanho do ensaio A com proporção: lipídio/recheio (90/10). 110
- Figura 8.** Termogramas da curva de fusão dos ensaios: A (proporção-Lipídio/Recheio90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). 116
- Figura 9.** Termogramas da curva de cristalização dos ensaios: A (proporção-Lipídio/Recheio90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). 117
- Figura 10.** Termogramas da curva de fusão e cristalização do padrão (proporção-Lipídio/Recheio100/0) 117
- Figura 11.** Curva de difração de raios-X dos ensaios: A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). Temperatura: 22°C; tempos: 0, 60, 120 e 180 dias. 122
- Figura 12.** Curva de difração de raios-X dos ensaios: A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). Temperatura ambiente: 25°C ±5; tempos: 0, 60, 120 e 180 dias. 123

- Figura 13.** Curva de difração de raios-X dos ensaios: A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). Temperatura: -18°C; tempos: 0 e 180 dias. 124
- Figura 14.** Imagens dos ensaios após 2h de incubação em solução aquosa pH-1,2 obtidas por microscopia ótica. 126
- Figura 15.** Imagens das micropartículas lipídica durante 4h de incubação em solução de lipase pancreática (2,0 mg/mL), obtidas por microscopia ótica. 128
- Figura 16.** Curvas de liberação do α -tocoferol das microcapsulas lipídicas em função do tempo. A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). 130

ÍNDICE DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1.	Trabalhos encontrados na literatura sobre microencapsulação	8
Tabela 2.	Valores de Ingestão Dietética para vitamina E.	28

CAPITULO 2

Tabela 2.	Resultados dos parâmetros da validação na determinação do α -Tocoferol por HPLC.	69
Tabela 3.	Resultados do ensaio de robustez expressos em média \pm desvio padrão.	70

CAPITULO 3

Tabela 1.	Proporções da matriz lipídica.	80
Tabela 2.	Variáveis independentes preestabelecidas para otimização da eficiência da microencapsulação de α -tocoferol.	83
Tabela 3.	Modelo experimental com valores reais e codificados para eficiência da microencapsulação de α -tocoferol.	84
Tabela 4	Codificação de ensaios com teores variáveis de tocoferóis como recheio.	88
Tabela 5 .	Caracterização da matriz lipídica interesterificada óleo de Algodão/PTH (65:35).	95
Tabela 6.	Caracterização da matriz lipídica interesterificada Lipídio interesterificado/ OSTH (70:30)	95

Tabela 7.	Temperatura de fusão das misturas na matriz lipídica.	96
Tabela 8.	Modelo de regressão linear, obtido em HPLC, para detector de fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm) para α -tocoferol.	98
Tabela 9.	Concentração média (mg/100g) de tocoferol presente nas microcapsulas.	99
Tabela 10:	Modelo experimental com valores reais e codificados para otimização da eficiência da microencapsulação do α -tocoferol.	100
Tabela 11.	Efeitos estimados para a eficiência (%).	102
Tabela 12.	Coeficiente de regressão para a eficiência (%).	103
Tabela 13.	ANOVA para a eficiência (%) da microencapsulação do α -tocoferol.	103
Tabela 14.	Efeitos estimados para a concentração de α -tocoferol.	104
Tabela 15.	ANOVA para a determinação da concentração do α -tocoferol.	105
Tabela 16.	Diâmetro médio dos ensaios (média \pm DP)	108
Tabela 17.	Valores de eficiência da microencapsulação de α -tocoferol (% \pm desvio padrão) dos ensaios.	111
Tabela 18.	Valores de retenção e concentração média da microencapsulação do α -tocoferol após 180 dias de estocagem.	112
Tabela 19.	Parâmetros calorimétricos obtidos na curva de fusão dos ensaios analisados no tempo zero	114
Tabela 20.	Parâmetros calorimétricos obtidos na curva de cristalização dos ensaios analisados no tempo zero.	115
Tabela 21.	Graus de cristalinidade (%) dos ensaios avaliados durante 180 dias à temperatura de 22°C .	120

Tabela 22.	Graus de cristalinidade (%) dos ensaios avaliados durante 180 dias a temperatura ambiente.	120
Tabela 23.	Graus de cristalinidade (%) dos ensaios avaliados durante 180 dias à temperatura de -18°C.	121
Tabela 24.	Porcentagem do α -tocoferol liberado ao longo do tempo das micropartículas lipídicas, em óleo de girassol.	129

CAPITULO 4

Tabela 1.	Quantidade, em mg de microcapsulas lipídicas contendo α -tocoferol em 100 ml do produto (iogurte).	148
Tabela 2.	Médias dos consumidores para cada um dos atributos avaliados no teste de aceitação com 56 pessoas.	151
Tabela 3.	Porcentagens para intenção de compras das amostras de iogurte avaliadas.	152

RESUMO

O presente projeto visou estabelecer condições ideais de obtenção de um produto que poderá ser disponibilizado para comercialização no Brasil tendo como foco a encapsulação para aplicação na área alimentícia. Tocoferóis são antioxidantes naturais que podem ser utilizados para enriquecimento de alimentos. Contudo há a necessidade de proteção desse agente ativo por métodos especiais como a microencapsulação. No presente estudo foram desenvolvidos sistemas compostos por micropartículas obtidas por “*spray chilling*” utilizando lipídios interesterificados sem isômeros *trans* com óleo de soja totalmente hidrogenado na relação de 70:30% m/m respectivamente, com ponto de fusão na faixa de 40-65 °C para formação das matrizes. Alfa-tocoferol foi utilizado como princípio ativo a ser encapsulado. Para a obtenção das micropartículas matrizes lipídicas foram fundidas e mantidas em banho à temperatura de 65 °C. O α -tocoferol foi adicionado nas misturas lipídicas que em seguida foram homogeneizadas em ultraturrax. As soluções foram pulverizadas em atomizador duplo fluido aquecido também a 65 °C e pressão de ar de 0,25 MPa, com a atomização efetuada dentro de uma câmara resfriada a 10 °C. Foi realizado um planejamento DCCR (Delineamento Central Rotacional) com 2 variáveis independentes: a velocidade de homogeneização (3000 a 11000 rpm) e a concentração de tocoferol (5-25 g/100g). A quantificação do princípio ativo encapsulado foi realizada utilizando técnica isocrática de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os tratamentos foram caracterizados em relação à eficiência de encapsulação, morfologia, tamanho médio, estabilidade e liberação do princípio ativo. Para o estudo da estabilidade os tratamentos foram submetidos à estocagem por 180 dias em três diferentes temperaturas (ambiente 25°C \pm 5 °C, em estufa 22 °C e freezer a -18°C). Medidas de difração de raios-X (0, 60, 120, 180 dias) e medidas calorimétricas (tempo zero) foram efetuadas. Foi realizada a incorporação das micropartículas em um produto comercial (iogurte), que foi avaliado sensorialmente. De forma geral, as partículas lipídicas obtidas neste trabalho apresentaram bons resultados quanto à eficiência de encapsulação e

apresentando forma esférica, com paredes contínuas, porém rugosas. Os termogramas, obtidos por calorimetria diferencial de varredura (DSC), em tempo zero, não apresentaram diferenças entre os ensaios. Os difratogramas foram muito semelhantes entre os tratamentos e constatou-se a presença de 3 picos principais que parecem estar associados à forma polimórfica β . As micropartículas de liberação apresentaram boa capacidade de controle da liberação do composto ativo, mostrando-se potenciais para o uso futuro na indústria de alimentos. Finalmente os resultados da análise sensorial de aceitação não foram estatisticamente significativos para os atributos avaliados.

Palavras-chave: *Micropartículas lipídicas; Spray chilling; Tocoferol; Difração de raios-X*

ABSTRACT

This project aimed to establish optimal conditions for obtaining a product that will be commercially available in Brazil, focusing on encapsulation for use in the food industry. Tocopherols are natural antioxidants that can be used for food enrichment. However, there is the need for protection of active agent by special methods, such as microencapsulation. The present study developed systems composed of microparticles obtained by "*spray chilling*" using an interesterified fat with no *trans* isomers with fully hydrogenated soybean oil in the ratio of 70:30% w/w respectively, with a melting point in the range of 40-65°C for the formation of matrices to encapsulate α -tocopherol as active principle. To obtain small particles a lipid matrices were melted in a water bath at a temperature of 65°C. The α -tocopherol was added to the lipid mixtures and then homogenized in Ultra Turrax for 5 min. The solutions were sprayed in double-fluid atomizer also heated to 65°C and air pressure of 0.25 MPa, the atomization performed inside a chamber cooled to 10°C. Were conducted a CCR design (Central Composite Rotational Design) with two independent variables: the speed of homogenization (3000 to 11000 rpm) and the concentration of tocopherol (5-25 g/100 g). The quantification of the active ingredient encapsulated was performed using isocratic HPLC technique. The treatments were characterized with respect to encapsulation efficiency, morphology, average size and stability of the microparticles and release of active ingredient. For the stability study treatments were subjected to storage for 180 days at three different temperatures (ambient 25°C \pm 5°C, 22°C in an oven and freezer - 18°C). Since x-rays diffraction measurements (0, 60, 120, 180 days) and calorimetric measurements (time zero) were made. Were performed the incorporation of the microparticles in a commercial product (yogurt), which was evaluated using the sensory evaluation. In general, the lipid particles studied in this work showed good results in terms of encapsulation efficiency showing spherical shape, with solid rough walls. The thermograms obtained by DSC at time zero did not differ between trials. The XRD patterns were very similar among treatments and found the presence of three major peaks that are associated with the polymorphic form β . The microparticles showed good ability to control the release of the active

principle, showing potential for future use in the food industry. Finally the results of an smooth sensory acceptance indicated that the tested samples did not differ statistically from the standard sample for evaluated attributes.

Keywords: *lipid microparticles, spray chilling, α -tocopherol; X-ray Diffraction*

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As vitaminas são micronutrientes essenciais que contribuem para o crescimento normal e manutenção da saúde. Alguns trabalhos destacam o papel de algumas vitaminas como antioxidantes, podendo proteger o organismo contra radicais livres, evitando doenças degenerativas (Burig & Hennekens, 1997; Martin *et al.*, 1998).

Nutricionalmente, o alfa-tocoferol é o representante mais importante do grupo de compostos com atividade de vitamina E, pois previne o dano celular ao inibir a peroxidação lipídica, a formação de radicais livres e doenças cardiovasculares, melhora a circulação sanguínea, regenera tecidos e é útil no tratamento de seios fibrocísticos e tensão pré-menstrual (Bramley *et al.*, 2000; Pryor, 2000).

Quando um alimento produzido industrialmente não apresenta as quantidades mínimas recomendadas de determinados compostos nutritivos, tal como vitaminas, este pode ser enriquecido. De acordo (Brasil, 1998), é permitido enriquecer alimentos com vitamina E, adicionando alfa-tocoferol ou outras substâncias que apresentem ação vitamínica E, podendo ser adicionados na forma de soluções ou pré-mix.

Contudo, a vitamina E é muito instável, pois é oxidada lentamente pelo oxigênio atmosférico, através de uma reação catalizada por luz e calor, na presença de metais como prata e ferro (Mahan e Arlin, 2002).

A microencapsulação é uma tecnologia para recobrimento de substâncias ativas para a proteção e/ou liberação controlada das mesmas. No caso do alfa-tocoferol torna-se uma alternativa interessante para viabilizar o transporte, armazenamento e aplicação em processos industriais (Reithmeier *et al.* 2001; Trotta *et al.* 2005; Muller *et al.* 2000; Muller *et al.* 2002).

Assim, a microencapsulação empregando partículas lipídicas como matriz de substâncias ativas tem sido proposta como uma alternativa a sistemas

coloidais e lipossomas (Siekmann & Westesen, 1992; Muller *et al.* 2000), por apresentar grande flexibilidade com respeito ao empacotamento e tamanho das partículas. Entre os lipídios, podem ser usados fosfolipídios, triacilgliceróis, ceras, ácidos graxos ou suas misturas (Reithmeier *et al.* 2001).

Na produção de micropartículas lipídicas sólidas (SLMP – solid lipid microparticles) por “spray chilling”, a massa do lipídio fundido junto com o material de recheio é atomizado formando gotas que rapidamente solidificam-se em contacto com o frio (Magee & Olson, 1981a, 1981b). Na área de alimentos as SLMP tem sido desenvolvida varias aplicações, incluindo vitaminas e minerais (Gibbs *et al.* 1999), glicose, bacto-peptona e enzimas (Magee & Olson, 1981a, 1981b), vitaminas hidrossolúveis, peptídeos e outras substancias bioativas (Onal & Langdon, 2004a, 2004b).

Apesar da facilidade da produção e da possibilidade da fabricação industrial, as microparticulas (SLMP) ou nanoparticulas sólidas lipídicas (SLN) podem apresentar algumas desvantagens. Dentre elas estão incluídas a baixa capacidade de encapsulação e expulsão do material de recheio durante o armazenamento devido à estrutura cristalina e às características dos planos polimórficos lipídicos durante o processo de solidificação e cristalização nos sítios amorfos da matriz transportadora (Mehnert & Mäder, 2001)

Para evitar este problema, micropartículas lipídicas denominadas como lipídios nano-estruturados (NLC) tem sido propostas com o objetivo de incrementar a capacidade de carga das partículas e minimizar a expulsão do material do núcleo (Jenning *et al.* 2000; Muller *et al.* 2002, Siekmann & Westesen, 1992; Muller *et al.* 2000)

A literatura recente apresenta diversos trabalhos a respeito a micropartículas lipídicas (Maschke *et al.* 2007; Hu *et al.* 2005; Onal & Langdon, 2004b; Jores *et al.*, 2003; Reithmeier *et al.* 2001; Trotta *et al.* 2005;. Müller *et al.* 2000; Müller *et al.* 2002).

Este trabalho tem como objetivo o estudo de um processo de microencapsulação de tocoferóis por “*spray chilling*” empregando matrizes lipídicas compostas por lipídios interesterificados sem isômeros *trans* com óleo de soja totalmente hidrogenado.

Esta tese se encontra organizada em quatro capítulos. No capítulo 1, foi realizado um levantamento bibliográfico dos assuntos pertinentes à elaboração deste trabalho de tese; foram apresentados os fundamentos e as aplicações do processo da microencapsulação abordando questões como as técnicas e materiais (parede e recheio) da microencapsulação, métodos analíticos aplicados ao estudo das micropartículas que incluem a microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X e calorimetria diferencial de varredura.

No capítulo 2 é abordado a validação do desenvolvimento da metodologia para a determinação do α -tocoferol utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), avaliando os parâmetros de limite de quantificação, linearidade, precisão e robustez.

No capítulo 3, concentrou-se a atenção na parte experimental do processo de produção das micropartículas lipídicas obtidas por *spray chilling*. Neste capítulo foram descritos os materiais, equipamentos, metodologias e resultados obtidos. Os dados obtidos foram discutidos em relação à eficiência de encapsulação, morfologia, diâmetro médio e a sua distribuição, análise térmica, polimorfismo, estabilidade e liberação, permitindo avaliar potenciais usos destas micropartículas na indústria de alimentos. A complementação do estudo destas micropartículas é apresentada no capítulo 4, em que as mesmas foram avaliadas sensorialmente em relação a um conjunto de atributos: de aparência, aroma, sabor e impressão global.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Este projeto teve como objetivo o estudo de um processo de microencapsulação por “*spray chilling*” de tocoferóis em matrizes lipídicas sem isômeros trans advindos de interesterificação química.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência total de encapsulação por “*spray chilling*” através de variação de parâmetros de encapsulação como concentração de tocoferóis e proporções de lipídios.
- Determinar as características morfológicas e de distribuição de tamanho das micropartículas.
- Avaliar a estabilidade das micropartículas em função da temperatura.
- Estudar o comportamento das micropartículas sob a ação de diferentes meios (pH, enzimas digestivas) por microscopia ótica.
- Avaliar a liberação do tocoferol encapsulado utilizando o óleo de girassol como meio de liberação.
- Realizar um teste de aceitação de iogurte adicionado das micropartículas obtidas em relação a um conjunto de atributos: aparência, aroma, sabor e impressão global.

CAPITULO 1

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1. MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação pode ser definida como um processo no qual uma membrana envolve pequenas partículas de sólido, líquido ou gás, com o objetivo de proteger o material de condições adversas do meio, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada do encapsulado em condições pré-estabelecidas (Shahidi & Han, 1993).

Nos últimos trinta anos, os estudos dessa técnica permitiram a ampliação do seu uso para as indústrias de alimentos, farmacêutica, aromas e sabores, tintas, química, agrícola, dentre outras (Fanger, 1974; Pothakamury & Barbosa-Cánovas, 1995; Ré, 1998; Wieland-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. Na indústria de alimentos, a microencapsulação vem sendo aplicada com sucesso na proteção de substâncias sensíveis à temperatura, oxidação, umidade, reações indesejáveis, como acidulantes, flavorizantes, corantes, enzimas, microrganismos, sais minerais, lipídios, vitaminas, aminoácidos (Bakan, 1973; Jackson & Lee, 1991; Karel, 1990). Além da

função de proteção, outras vantagens podem ser associadas à encapsulação de substâncias (Goodwin & Somerville, 1974; Shahidi & Han, 1993; Ré, 1998):

- Conversão de substâncias líquidas ou gasosas em pós, permitindo sua melhor utilização em sistemas desidratados;
- Mascaram 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 estão veiculadas.

Essas vantagens permitem que os produtos microencapsulados tenham melhor potencial de uso, tanto pela minimização na perda de suas características desejáveis (sejam estas nutricionais, sensoriais ou químicas) quanto pelo controle de sua ação no alimento, pela possibilidade de uma “liberação programada”. A possibilidade de controle na taxa de liberação do material de recheio das cápsulas é uma das funções mais exploradas dessa tecnologia e está diretamente relacionada com características da parede formada como: estrutura química, espessura, tamanho, porosidade e solubilidade (Fanger, 1974). Por sua vez, essas características determinam a permeabilidade e a difusividade do recheio pela parede. 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 micropartículas e do meio onde serão utilizadas.

A liberação do material encapsulado segue uma série de etapas: absorção de solvente (muitas vezes a água) pela cápsula, dissolução ou erosão da parede, dissolução do recheio, permeação do recheio pela parede, difusão do recheio no solvente. A liberação de compostos das micropartículas pode ser representada por uma cinética de ordem zero, de primeira ordem ou em função da raiz quadrada do tempo. O controle da taxa de liberação é muito desejado no desenvolvimento de microcápsulas, e algumas variáveis que permitem esse controle são: o coeficiente

de difusão, a espessura da parede da cápsula, a porosidade da mesma, a variação na concentração de saturação do material de recheio e sua distribuição na partícula (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 1 A). 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 microesfera ou micro partícula (Figura 1 B). O tipo de partícula produzida influi na quantidade de recheio carregado e no comportamento de liberação do mesmo.

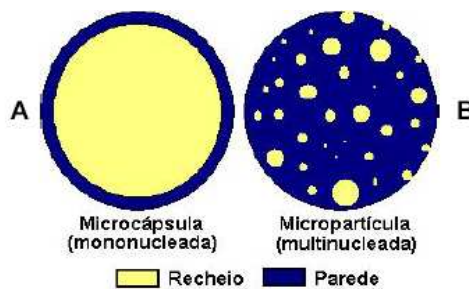


Figura 1. Definição do tipo de estrutura obtido nos processos de microencapsulação. A: mononucleada – microcápsula; B: multinucleada –microesfera. (Fonte: Alvim, 2005)

1.2. Material de parede

O material de parede é usado para cobrir, dar forma à cápsula, reter o recheio e permitir a sua liberação quando desejado. Sua escolha está relacionada com as propriedades físicas e químicas do recheio (Jakson & Lee, 1991; Nori, 1996).

Segundo Ré (1998) e Cardoso (2000), o material de parede deve apresentar as seguintes características tecnológicas: 1) Boa propriedade emulsificante e de formação de filme; 2) Baixa viscosidade, mesmo em soluções com alta concentração de sólidos; 3) Baixa higroscopicidade e boas propriedades de secagem; 4) Estabilidade, ausência de sabores desagradáveis, e 5) boa proteção ao recheio. Polímeros diversos como gomas, carboidratos, celuloses, lipídios, proteínas e alguns materiais inorgânicos (silicatos, argilas, etc.) apresentam as características supracitadas e são muito utilizados na microencapsulação de substâncias (Jakson & Lee, 1991; Cardoso, 2000).

No desenvolvimento de sistemas de microcápsulas com liberação controlada, o grande desafio é a manutenção da integridade da parede que controla a saída do material. Isso exige, em muitos casos, que o material usado na confecção da parede seja insolúvel ou parcialmente solúvel. Várias proteínas, devido às suas propriedades físico-químicas e conseqüentes propriedades funcionais, como formação de gel e emulsificação, oferecem uma boa opção de material de cobertura (Lee & Rosenberg, 2000).

A gelatina, a albumina, caseína e proteínas do soro de leite, proteínas da soja, bem como os polissacarídeos, como a pectina, celulose, goma arábica, alginatos, quitosana, vêm sendo estudados como material de cobertura para microencapsulados. Além das vantagens tecnológicas apresentadas por esses polímeros, estes também são componentes naturais, muitos de alto valor nutritivo, facilitando sua utilização em alimentos por serem considerados inócuos, ao contrário de alguns polímeros sintéticos, que muitas vezes não são permitidos, ou têm seu uso limitado, devido a uma possível toxicidade (Pothakamury & Barbosa-Cánovas, 1995).

A Tabela 1 mostra diversos trabalhos publicados nos últimos anos sobre o uso de vários polímeros em microencapsulação de substâncias por diversas técnicas.

Tabela 1. Trabalhos encontrados na literatura sobre microencapsulação.

Material de parede	Recheio	Método de encapsulação	Autores
Isolado protéico de soja	Óleo de peixe	Gelificação térmica e /ou enzimática (transglutaminase)	Cho et al., 2003
Blenda de polímeros	Oleoresina de paprica	Spray Drying	Rodrigue-Huezo et al. 2004
Gelatina + G. Arabica	Óleos	Coacervação complexa	Lamprecht et al., 2000, 2001
Goma Arábica	Óleos essenciais	Spray Drying	Bertolini, 1999.
Prot. de soro de leite	Fármacos	Dupla emulsificação e enrijecimento por calor	Lee & Rosenberg, 2000.
Amido	Óleo de peixe	Spray Drying	Cardoso, 2000.
Lipídios (com diferentes pontos de fusão)	Ácido cítrico	Spray Cooling	Nori, 1996.
Óleo Hidrogenado de Palma	Ferro, Iodo, Vitamina A	Spray Cooling	Wegmuller, 2006.
Tripalmitato	Insulina	Spray Congealing	Maschke, 2007.
Misturas de Lípidios	Compostos solúveis em água	Spray Chilling	Chambi, 2008
Lipídios (ponto de fusão > temp. ambiente)	Total ou parcialmente solúveis em água	Spray chilling	Langdon et al., 1998, 2003, 2007.
Alginato, goma gelana e pectina	Óleo e proteínas	Gelificação iônica	Mukai-Corréa et al. 2004, 2005.
Pectina + caseína	Microrganismos	Coacervação complexa e Spray Drying	Oliveira, 2006.
Alginato de sodio	α -tocoferol	Gelificação iônica e extrusão	Yoo, et al. 2006
Quitosana	α -tocoferol	Spray Drying	Yenilmez, 2011

Observa-se que não há citações na literatura da obtenção de micropartículas de tocoferóis pelo uso de “*spray cooling*” ou “*spray chilling*”, o que demonstra a necessidade desta pesquisa.

1.2.1. Lipídios

A palavra "lipídio" é derivada do grego *lipos* que significa *gordura*. Neste grupo, podem ser encontradas substâncias como os óleos (ésteres formados a partir de AG- ácidos graxos e que se apresentam sob a forma líquida), gorduras (ésteres formados a partir de AG e que se apresentam sobre a forma sólida) e ceras (os principais componentes são ésteres formados a partir de AG e álcoois de cadeia longa). (Holum 1994).

Do ponto de vista químico a definição de lipídio relaciona-se com a solubilidade em meio apolar e engloba diversas substâncias extraíveis por solventes apolares.

Genericamente falando, a estrutura fundamental dos lipídios é composta de AG ou estruturas diretamente a eles relacionadas como os alcoóis, aldeídos ou aminas. O entendimento da estrutura química dos AGs, e de suas características físicas, químicas e biológicas são essenciais para o estudo do seu metabolismo e funções. (Gunstone 1996).

Os ácidos graxos são caracterizados pela longa cadeia de átomos de carbono (geralmente de 12 a 22 átomos de carbono) com uma carboxila ao final. Podem apresentar cadeia saturada, insaturada, raramente ramificada e oxigênio. Podem ser saturados de cadeia pequena e média (C4 – C14). As cadeias de C20 – C30 estão presentes freqüentemente em ceras. Os ácidos graxos insaturados apresentam tamanho de cadeia de C10-C30 e podem ter até seis duplas ligações, sendo C16, C18 e C22 mais comuns. Mais de 1000 triacilgliceróis naturais foram identificados, mas somente cerca de 30 estão presentes em óleos e gorduras (Gusntone, 2003; Uieara, 2005).

A cadeia hidrocarbonada de um AG saturado existe, normalmente, em uma forma estendida, já que esta conformação linear, flexível, é o estado de menor energia. Em contraste, os AGs insaturados contém dobramentos rígidos em suas cadeias carbônicas pois as duplas ligações não giram, e uma angulação de

30 graus é produzida para cada uma das duplas ligações presentes (configuração *cis*). A conformação linear dos AG saturados permite um melhor empacotamento dos mesmos, fazendo com que as moléculas fiquem mais próximas umas das outras, aumentando a interação entre elas. No caso dos AG insaturados a dupla ligação não permite um empacotamento tão eficiente das moléculas, fazendo com que as interações entre elas sejam menores. Como consequência temos que os AG saturados possuem um ponto de fusão maior que os AG insaturados.

O uso de lipídios para a liberação prolongada de drogas é bem difundido na indústria farmacêutica. A tecnologia desenvolveu-se a partir a produção de micropartículas lipídicas por “spray-congelling” (Eldem, Speiser & Hincal, 1991). Houve quebra de continuidade de produção por diferentes motivos e reapareceu no mercado através do uso de homogeneizador por alta pressão ou por precipitação de uma microemulsão (Muller & Lucks, 1996; Gasco, 1993).

O desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) superou muitos problemas em relação à tradicional tecnologia de transporte de nanopartículas o qual limitou o uso em lipossomas e emulsões ou até impediu a introdução no mercado de nanopartículas poliméricas. No entanto, as revisões elaboradas por Mehnert e Mader em 2001 ressaltaram criticamente aspectos negativos importantes tais como: 1) Limitação da capacidade de carga da droga; 2) Expulsão da droga durante o armazenamento; 3) Alto conteúdo de água da dispersão SLN aquosa (70-95%).

Isto conseqüentemente levou a uma nova geração de nanopartículas lipídicas, as nanopartículas lipídicas transportadoras (NLC). Estas são produzidas por misturas de lipídios sólidos com lipídios líquidos incompatíveis espacialmente conduzindo a nanoestruturas especiais com uma melhoria na incorporação e liberação da droga (Muller, 2002).

Pré-requisitos para um bom alojamento ideal da droga no microencapsulado são as distâncias entre as cadeias dos ácidos graxos dos glicerídeos e as imperfeições nos cristais. As distâncias entre as cadeias dos

ácidos graxos podem ser aumentadas usando misturas de ácidos graxos saturados e insaturados de diferentes comprimentos. Para alcançar a “mais alta incompatibilidade”, em lugar de escolher um lipídio sólido, a nova partícula lipídica será produzida misturando lipídios sólidos com lipídios líquidos muito diferentes quimicamente (óleos). Isto leva a maiores imperfeições no cristal e elevada carga da droga (Fig. 2 A).

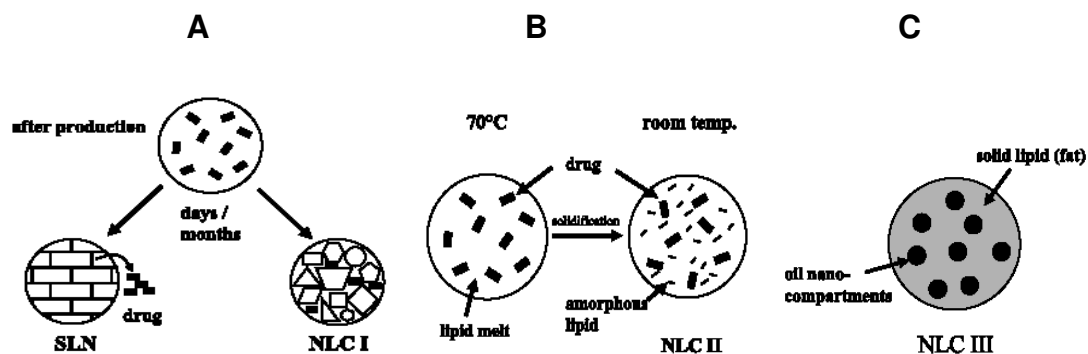


Figura 2. A-. NLC -Tipo I : Estrutura com imperfeições (direita). B-. NLC - Tipo II: Sem estrutura (estado sólido amorfo). C-. NLC - Tipo III: Múltiplo (oleo/gordura/água). Fonte: Muller (2002).

O processo de cristalização pode em muitos casos causar a expulsão da droga. Pelo uso de misturas especiais de lipídios sólidos e lipídios líquidos (ex. Hidroxiotacosanil hidroxiestearato, isopropilmiristato) as partículas tornam-se sólidas após resfriamento mas não cristalinas (Fig. 2 B). O estado sólido (redução na mobilidade dos lipídios) poderia ser verificado por ressonância magnética nuclear (RMN), a ausência de um processo de fusão poderia ser verificada por calorímetro diferencial de varredura (DSC) (Müller and Jennings, 1999; Jennings, 1999).

A alta concentração da droga pode levar a uma expulsão imediata durante o processo de resfriamento ou diluição em água fria. Baseado nisso, o tipo III múltiplo de NLC foi desenvolvido. Na matriz sólida as nanopartículas dos lipídios contêm nanocompartimentos minúsculos de óleo líquido. Nestes compartimentos a solubilidade da droga é elevada, aumentando desta maneira a capacidade de

carga da droga (Fig. 2 C). Os nanocompartimentos estão rodeados por uma matriz lipídica sólida, permitindo desta maneira uma liberação prolongada da droga.

Como os nanocompartimentos dentro da nanopartícula (200 nm) não podem ser produzidos por meios mecânicos, estes são gerados por um processo de separação de fases durante a produção da partícula (Müller, 2002).

1.2.1.1. Polimorfismo dos Lípidios

Formas polimórficas são fases sólidas de mesma composição química que diferem entre si na estrutura cristalina, mas produzem fases líquidas idênticas após a fusão (Gunstone & Norris, 1983, Nawar, 1985). Podem ser: a) monotrópicas: se uma é estável e outra meta-estável, independentemente da mudança da temperatura; b) enantiotrópica: cada uma tem uma faixa de estabilidade definida; cada forma pode ser estável e a transformação pode ir em qualquer direção, dependendo da temperatura. A maioria das substâncias sólidas pode existir em duas ou mais diferentes formas cristalinas (Vaeck, 1970).

Os triacilgliceróis sofrem transições de fase sólido-líquido entre as temperaturas ambiente e corporal. A previsão das transições de fase de gorduras naturais em misturas complexas depende do conhecimento preciso das moléculas de triacilgliceróis, dos processos de formação de cristais e da heterogeneidade de formas cristalinas possíveis (German & Simoneau, 1998).

Devido a seu alto grau de complexidade molecular, os triacilgliceróis podem empacotar em várias estruturas cristalinas relativamente estáveis e diferentes. Estes diversos empacotamentos de cadeia, ou formas polimórficas, têm energias, arranjos de grade e hábitos cristalinos diferentes. A propriedade de cristalização reversível e o desenvolvimento de plasticidade estão relacionados com a funcionalidade desejável das gorduras (German & Simoneau, 1998).

Em geral, TAG com três ácidos graxos saturados apresentam empacotamento duplo de cadeias, enquanto que o empacotamento triplo de

cadeia (Figura 4a) é obtido de TAG com diferentes tamanhos de cadeia e insaturação (Metin *et al*, 2005).

As diferenças entre os polimorfos são mais visíveis a partir de uma visão destes planos, a qual mostra a estrutura sub-celular (Figura 4b).

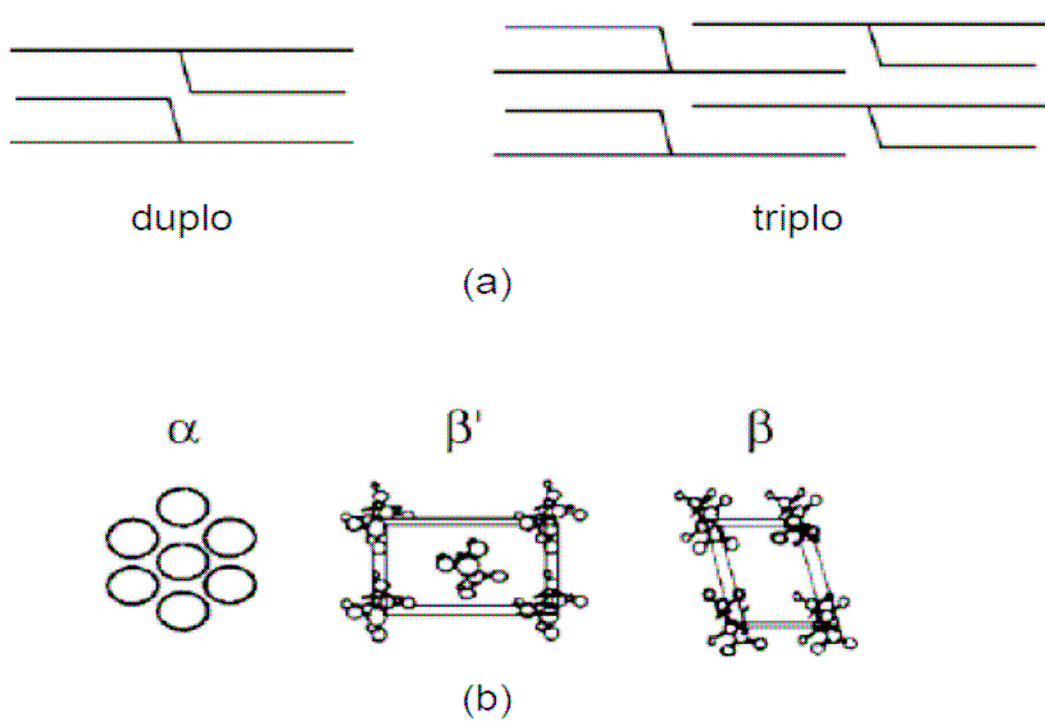


Figura 3. Tipos de empacotamento de cadeias (a) e estruturas das subcélulas das três formas mais comuns de polimorfismos em triacilgliceróis (b)

As moléculas de TAG são capazes de empacotar em diferentes arranjos cristalinos ou polimórficos, os quais exibem diferentes temperaturas de fusão. As formas polimórficas das gorduras são muitas vezes simplesmente classificadas em três categorias α , β' e β . A forma α é a menos estável com menor ponto de fusão e calor latente. A forma β é a mais estável com maior ponto de fusão e maior calor latente. As transformações de α , para β' e desta para β ocorrem nesta ordem e são irreversíveis, exceto por fusão ou recristalização. Com relação ao

empacotamento da cadeia, a forma α é hexagonal, a β é ortorrômbica e a β' é triclínica (Timms, 1985; O'brien, 1998; Marangoni, 2002). Porém, algumas gorduras exibem mais formas polimórficas do que as citadas acima, como por exemplo, a manteiga de cacau, que apresenta seis formas cristalinas (LOISEL *et al*, 1998).

Cada polimorfo é constituído de um composto comum, mas compõe uma fase separada. Apenas um polimorfo é termodinamicamente estável a uma temperatura e pressão específica. Logo, todos os outros polimorfos são potencialmente capazes de serem transformados em polimorfos estáveis. Algumas transformações são rápidas e reversíveis, outras não.

Em algumas misturas de triacilgliceróis, a forma β não está presente e a β' é a mais estável ou duas formas de β estão presentes. A cristalização polimórfica é primariamente determinada pela taxa de nucleação, sendo governada pela termodinâmica e fatores cinéticos (Sato, 2001).

O comportamento de cristalização dos triacilgliceróis é um fator muito importante, pois determina algumas propriedades físicas como consistência e plasticidade das gorduras (Czerniak, 2005). A Forma α é a que possui menor estabilidade termodinâmica e se transforma facilmente nas formas β' ou β , dependendo do tratamento térmico. Estudos realizados por meio da técnica de difração de raios-X sugeriram que as formas α e β' podem ser cristalizadas partindo diretamente de uma gordura líquida. A Forma β pode ser obtida pela cristalização de uma gordura líquida, pela transformação da forma β' ou da forma α (Marangoni e Mcgauley, 2003).

Na Figura 4 observam-se diversas transformações polimórficas envolvendo a cristalização de triacilgliceróis. As três formas foram cristalizadas diretamente da forma líquida pela utilização de condições apropriadas. As transformações polimórficas ocorrem da forma menos estável (alfa) para a forma mais estável (beta) podendo passar ou não através da forma beta-prima.

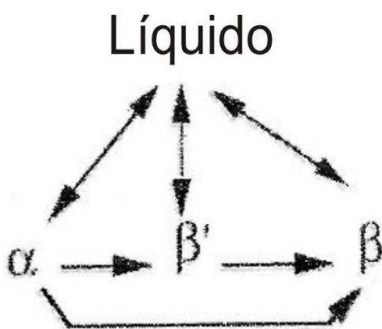


Figura 4. Polimorfismos típico de triacilgliceróis (Sato *et al.*,2001).

1.3. Microencapsulação no setor alimentício

Como visto anteriormente, a microencapsulação não é um processo novo, mas sua aplicação em alimentos processados industrialmente é recente. No passado a encapsulação de ingredientes alimentícios representava elevação de custos e os técnicos não sabiam como lidar com o ingrediente encapsulado. Em função disto, este processo foi desacreditado e quase abandonado. Entretanto, gradualmente mostrou ser uma tecnologia de sucesso e atualmente gera 30% dos negócios anuais no setor de aditivos. É basicamente uma tecnologia transferida de produtos farmacêuticos para produtos alimentícios que só obteve credibilidade comercial quando foi aplicado sal encapsulado nos *hamburgers* da linha dos McLean Deluxe Hamburgers da empresa McDonald's, o que resultou na melhoria da aceitabilidade dos mesmos (Duxbury & Swientek, 1992).

Nos últimos anos, há uma tendência mundial que aponta para a necessidade de que os alimentos não sejam mais somente vistos como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também como fonte de bem-estar e de saúde para os indivíduos. Esta mudança de perspectiva requer, indiscutivelmente, mudanças de paradigma no desenvolvimento de novos produtos, aplicando-se os métodos tradicionais, mas também se observando a necessidade do controle da bioacessibilidade de determinados componentes dos alimentos. Esta abordagem

se torna cada vez mais relevante conforme se estabelecem as relações entre genética, alimentação e saúde (Sanguansri e Augustin, 2006), e a microencapsulação é um meio efetivo de se alcançar tais objetivos.

Enquanto as embalagens convencionais normalmente são empregadas para facilitar transporte, armazenagem, manipulação e apresentação, as microcápsulas são geralmente empregadas para melhorar o desempenho do material ou criar novas aplicações (Arshady, 1993). Portanto, os propósitos gerais da microencapsulação podem ser: fazer um líquido comportar-se como sólido, separar materiais reativos, reduzir toxicidade do material ativo, controlar liberação do material, reduzir volatilidade ou flamabilidade de líquidos, mascarar sabor de componentes amargos, aumentar a vida-de-prateleira, proteger contra luz, água, calor entre outros (Andres, 1977; Chen, Veiga & Rizzuto, 1988; Jackson & Lee, 1991). Entre os materiais relacionados aos produtos alimentícios que são normalmente encapsulados podem-se incluir: ácidos, bases, aminoácidos, corantes, enzimas, microrganismos probióticos, óleos essenciais, gorduras, vitaminas e minerais, sais, açúcares e gases (Jackson & Lee, 1991, Kailasapathy, 2006), peptídeos bioativos (Arimoto, Ichikawa & Fukumori, 2004) e diversas outras classes de bioativos.

A encapsulação protege e aumenta a estabilidade das vitaminas em alguns extremos de umidade e de temperatura, permite liberação controlada no trato intestinal, melhora suas propriedades e retarda a perda da cor e a produção dos aromas devido à rancidez oxidativa (Janovsky, 1993; Trindade & Grosso, 2000).

Dzieak (1988a) reportou que a encapsulação de acidulantes como o ácido ascórbico, cítrico, fumárico e láctico foi realizada para evitar oxidação e permitir que os mesmos fossem dissolvidos em condições específicas de temperatura; a dos aromatizantes foi realizada com a finalidade de aumentar significativamente a vida de prateleira. A dos agentes de fermentação, para que os mesmos tivessem um espectro maior de aplicações, principalmente em pizzas, onde, estando encapsulados, evitavam o endurecimento da massa, e em salgadinhos extrusados, aumentavam o escoamento da massa; a dos adoçantes foi realizada

objetivando diminuir a higroscopicidade; a de vitaminas e minerais, para que pudessem ser incorporados aos alimentos com a finalidade de fortificação dos mesmos (Labell 1993).

Duxbury & Swientek (1992), reportaram que nos USA, 100% da granola em barra é fortificada através da incorporação de minerais e vitaminas encapsulados atendendo às recomendações de uma dieta balanceada. Estes autores também citaram vários produtos encapsulados onde a cápsula é utilizada também como apelo visual, tornando o produto mais atrativo especificamente para crianças. Para adultos as cápsulas são utilizadas com a mesma finalidade, porém como sachês decorativos e nutritivos para aperitivos.

Helguera (2000) fez referência à utilização de especiarias encapsuladas para conferir aroma e cor a produtos caseiros e a produtos assados industrializados, tais como pães e bolos.

Giese (1993) reportou a aplicação de condimentos, aromatizantes, corantes e ingredientes nutritivos encapsulados, contidos em sachês feitos de filmes comestíveis, que se dissolvem instantaneamente em macarrões e sopas de preparo rápido.

A aplicação desta tecnologia estendeu-se à incorporação de aditivos que podem alterar a textura de produtos processados (Ré, 2000).

É possível a utilização de agentes encapsulantes que liberariam o princípio ativo em uma determinada condição de processo, por exemplo, em uma dada temperatura de cozimento (Schwartzberg & Rao, 1990).

A encapsulação tem sido o meio para proteger aromas voláteis e delicados que são utilizados nas indústrias de alimentos, buscando padronizar a qualidade dos produtos manufaturados (Bertolini, Siani & Grosso, 2001).

Microrganismos têm sido microencapsulados para protegê-los contra a presença de oxigênio, contra as baixas temperaturas de congelamento

(Ranadheera, Baines & Adams, 2010), contra o efeito bactericida do suco gástrico e outros meios ácidos (Rao, Shiwnarain & Maharaj, 1989; Fávaro-Trindade & Grosso, 2000, 2002; Hansen *et al.*, 2002).

Wegmuller *et al.*, (2006) desenvolveram microcápsulas pelo método de *spray cooling*, contendo ferro, iodo e vitamina A para fortificação de sal, utilizando óleo hidrogenado de palma como agente encapsulante. As microcápsulas obtidas eram altamente estáveis, e não foram detectadas diferenças sensoriais.

Rocha (2009) pesquisou a encapsulação de licopeno, fez aplicação destas capsulas em bolos que se mostraram satisfatórios quanto à coloração do alimento.

Vale a pena ressaltar, entretanto, que comparativamente às outras indústrias, como farmacêutica, agroquímica e cosmética, o desenvolvimento de produtos contendo ingredientes ativos é geralmente mais desafiador na indústria alimentícia (Ubbink e Krüger, 2006).

1.4 Processos de microencapsulação e controle

Segundo Arshady (1993) e Nori (1996), os pontos críticos da microencapsulação são: a composição correta entre o material encapsulante e o núcleo, a comestibilidade do alimento que contém o ingrediente encapsulado, a escolha correta do material de parede da microcápsula (suas características físico-químicas, solubilidade, cristalinidade, capacidade de formação de filme e propriedades de barreira), o tamanho desejado da microcápsula, a sensibilidade do material encapsulado, o custo de operação, a aplicabilidade para produtos alimentícios e o mecanismo de liberação do material ativo. Porém, na prática, na maioria das vezes o critério decisivo na escolha é o custo do material de parede, que na encapsulação de óleos essenciais pode chegar em até 95% do preço do produto final.

1.5. Técnicas de microencapsulação

Existem diversas técnicas de microencapsulação que são usadas comercialmente, sendo divididas em três grupos conhecidos como métodos físicos, químicos e físico-químicos. Dentro dos métodos físicos, alguns exemplos são *spray drying*, *spray chilling*, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização. Entre os métodos químicos estão inclusão molecular e polimerização interfacial, e os métodos físico-químicos mais estudados são coacervação, gelificação iônica e incorporação em lipossomas (Jackson & Lee, 1991; Ré, 2000).

1.5.1. “Spray chilling”

Atualmente a técnica de *spray chilling* (denominada também *spray cooling* ou *spray congealing*) ganha considerável atenção. É um processo físico rápido, seguro, sem uso de solvente, reprodutível, baixo valor de produção e de fácil ajuste de tamanho de partícula (Albertini *et al*, 2008).

É um processo semelhante ao *spray drying*, pois em ambos há uma dispersão do recheio no material liquefeito e aplicação de condições controladas (temperatura, agitação, tempo, etc) na fase de emulsão para produção das micropartículas. A diferença é que a temperatura usada no *spray drying* para a produção das partículas é alta, e no *spray cooling* a câmara é resfriada (Thies, 1987; Dziezak, 1988; Schrooyen *et al*, 2001).

São usados, no *spray chilling*, lipídios com pontos de fusão que podem variar de 45°C a 122°C, incluindo triglicerídios, diglicerídios, monoglicerídios, ácidos graxos livres, esteróides ou ceras (Taylor, 1983; Dziezak, 1988; Jackson & Lee, 1991).

O material a ser encapsulado é misturado à matriz fundida e atomizado por bicos dentro de uma câmara, onde as micropartículas se solidificam rapidamente ao entrar em contato com ar frio ou N₂ líquido na câmara em temperaturas abaixo

do ponto de solidificação da gordura ou cera fundida. A performance do processo de *spray chilling* depende estritamente da eficiência da atomização da mistura fundida, que pode ser pulverizada por diferentes diâmetros do bico atomizador. A viscosidade da mistura fundida é muito importante. Sua alimentação e a pressão utilizada no spray resultarão numa distribuição homogênea das partículas.

Durante o processo de produção, é preciso que os parâmetros estabelecidos para as partículas sejam mantidos, caso contrário elas podem apresentar qualidade reduzida. Um ponto importante é a manutenção da temperatura durante todo o processo, evitando o fenômeno de polimorfismo dos lipídios, que pode levar a diferentes graus de cristalinidade nos lipídios, alterando características como liberação modulada e eficiente armazenamento do recheio (Lamb, 1987; Dziezak, 1988; Jackson & Lee, 1991; Schrooyen *et al*, 2001).

Micropartículas produzidas por este processo são insolúveis em água. Assim, podem ser encapsulados produtos hidrofílicos, como minerais, vitaminas, enzimas, acidulantes, produtos voláteis e sensíveis a altas temperaturas, mas podem, também, serem encapsulados produtos hidrofóbicos, como alguns flavours, óleos essenciais, entre outros. Os ingredientes encapsulados por este método podem encontrar aplicações em misturas de sopas, alimentos com alto teor de gordura e produtos de panificação (Dziezak, 1988).

1.5.2. “Spray drying”

O método de *spray drying* (secagem por atomização) é o mais comumente utilizado na indústria de alimentos devido a seu baixo custo e sua simplicidade se comparado aos demais. Várias vantagens justificam a sua utilização crescente. Dentre essas vantagens está a produção de partículas com alta reprodutibilidade, alta retenção do recheio, a versatilidade da técnica tanto na operacionalização de materiais sensíveis ou resistentes à temperatura, a capacidade de processar diversas matérias-primas e a flexibilidade na formulação, além de baixo custo e boa estabilidade quanto à estocagem. Os fatores de formulação e os parâmetros

de processo determinam as propriedades das partículas produzidas (Wendel & Çelik, 1997; Ré, 1998; Oneda & Ré, 2003).

A microencapsulação por *spray dryer* baseia-se na obtenção de uma matriz que retém o composto de interesse na sua estrutura. Essa estrutura formada é normalmente do tipo “esponja”, com o recheio disperso ao longo da mesma. A distribuição do recheio faz dessa partícula um sistema multinucleado sendo adotado muitas vezes o termo microesfera para defini-la (Teunou & Poncelet, 2002).

O processo envolve quatro estágios seqüenciais: (a) Atomização dos materiais de alimentação através de um bico atomizador; (b) Contato das gotículas produzidas com o ar; (c) Secagem (d) Coleta das micropartículas sólidas (Broadhead, Rouan & Rhodes, 1992).

As principais variáveis do processo de secagem por *spray drying* são de ordem operacional: a temperatura do ar de entrada e saída, padrão do fluxo de ar, distribuição de temperatura e umidade, tempo de residência; e de ordem estrutural: geometria da câmara e o tipo do atomizador (Ré, 1998; Cardoso, 2000). Quanto às características relativas ao produto atomizado, especial atenção é dada à viscosidade, solubilidade, estabilidade da solução/suspensão/emulsão formada.

1.5.3. Gelificação iônica

A polimerização iônica, ou ligação iônica de polieletrólitos, apresenta condições brandas, é simples, rápida e de baixo custo. Envolve uma solução polimérica aquosa, com íons de baixa massa molar, em que polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Cápsulas de alginato ou pectina de baixo teor de metoxilação são muito usadas como material de cobertura, sendo os íons cálcio os mais usados como agente (Mestdagh e Axelos, 1998).

A concentração de polissacarídeo e cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética da formação do gel, bem como o volume, estabilidade e porosidade das cápsulas, podendo influenciar na difusão de solutos para dentro e para fora da matriz polimérica (Mestdagh e Axelos, 1998).

Dietas protéicas, carboidratos e partículas insolúveis em água podem ser incorporadas e eficientemente mantidas por microcápsulas fabricadas por gelificação iônica, com o uso de hidrocolóides (Villamar & Langdon, 1993, Mukai-Corrêa *et al.*, 2004).

Já as misturas de polissacarídeos podem melhorar as características do gel resultante. Quando dois polissacarídeos são misturados, podem produzir diferentes tipos de estrutura, incluindo redes provenientes de entumescimento geradas a partir de separação de fases, redes interpenetrantes e redes pareadas (Amsden, 1998; Mestdagh e Axelos, 1998).

1.5.4. Coacervação complexa

O processo de coacervação é considerado por muitos como a técnica original e verdadeira de microencapsulação. A coacervação, também chamada de separação espontânea de fases, foi desenvolvida no início do século passado e, leva à formação de partículas bem pequenas com recheio uninuclear. O termo é oriundo do latim “co” e “acervus”, que significa união e agregação de partículas (Shahidi & Han, 1993; Thies, 1995; Menger *et al.*, 2000; Ducel *et al.*, 2004; Strauss & Gibson, 2004).

A formação dos complexos de polímeros deve-se principalmente às interações eletrostáticas que dependem do grau de ionização dos polímeros e, do pH (Weinbreck *et al.*, 2004). Coacervar depende da carga líquida do sistema, sendo conseqüentemente influenciada pela estequiometria por parâmetros estruturais (conformação e comprimento de cadeia apropriados) dos polímeros e

pelas condições do meio como pH, força iônica, temperatura e natureza dos reagentes.

A coacervação complexa pode ser induzida em sistemas onde estão dispersos dois colóides hidrofílicos com cargas elétricas opostas. A neutralização de cargas positivas de um dos colóides pela carga negativa do outro é usada para ocasionar a separação da fase do complexo coacervado (Scheri, Marquez & Martucci, 2003).

Esta técnica consiste em uma separação espontânea de fases, pela formação de um complexo insolúvel entre dois ou mais polímeros. Para que isso aconteça, duas condições devem ser atendidas: os biopolímeros devem estar juntos em solução e as cargas opostas entre as suas cadeias devem estar em quantidades estequiométricas. A composição e concentração dos polímeros de parede, condições do meio como pH e força iônica estão diretamente relacionados com a eficiência de produção das microcápsulas e com características variadas de estrutura, tamanho e porosidade (Yeo *et al.*, 2005).

A coacervação complexa é favorável por não utilizar solventes orgânicos nem altas temperaturas. Micropartículas produzidas por coacervação complexa são funcionalmente adequadas à encapsulação de materiais hidrofóbicos. A taxa de permeabilidade de compostos químicos através da estrutura de rede de um polímero é dependente da habilidade de inchamento da micropartícula, a qual é influenciada por diversos fatores tais como densidade, reticulação, cristalinidade, porosidade, hidrofilicidade, e a própria estrutura química do polímero (Akin & Hasirci, 1995).

1.6. Material ativo

1.6.1 Tocoferóis

A Vitamina E é representada por 8 compostos (4 tocoferóis e 4 tocotrienóis) que apresentam atividades biológicas semelhantes, porém com potenciais

Estas substâncias são muito apolares, existindo basicamente na fase lipídica dos alimentos. Quando não estão esterificadas, apresentam habilidade de atuarem como antioxidantes, extinguindo radicais livres através da doação de um hidrogênio fenólico e de um elétron (Fennema, 2003).

A atuação da vitamina E como um antioxidante para o organismo humano é de extrema importância, sendo que os tocoferóis estão naturalmente presentes nas membranas celulares, atuando como um fator de proteção contra a oxidação endógena e exógena (Christie, 2007).

É relatada a proteção do LDL (*Low density lipoprotein*) contra oxidação pela ação da vitamina E, o que interfere na ocorrência de doenças cardiovasculares (Kagan *et al.*, 1992). O potencial desta vitamina é avaliado para diversas doenças relacionadas ao stress oxidativo, tais como a endometriose (Petean *et al.*, 2007), além de estimular as células do sistema imunológico (Kindlein *et al.*, 2007).

Devido a interação dos tocoferóis e tocotrienóis com agentes oxidantes, pela sua função antioxidante, o processamento associado ao armazenamento pode levar a mudanças significativas nos níveis de vitamina E dos alimentos (Eitenmiller & Lee, 2004). Devido esta capacidade antioxidante a adição de α -tocoferol às dietas animais é um meio efetivo de melhorar a estabilidade das carnes quanto à oxidação, além de melhorar o sabor (Sheldon *et al.*, 1997; O'Neill *et al.*, 1998).

Os componentes da vitamina E apresentam boa estabilidade na ausência de oxigênio, em ampla faixa de temperatura (Ball, 2006). Tratamentos anaeróbicos de alimentos, tal como a produção de enlatados, apresentam baixa interferência na atividade da vitamina. No entanto, a presença de radicais livres e condições que promovem a oxidação de lipídios insaturados influenciam drasticamente nesta atividade (Fennema, 2006).

A microencapsulação deste composto se torna interessante também pelo fato de ser lipossolúvel, sendo que sua solubilização em meio aquoso é facilitada sem os prejuízos trazidos pelas emulsões (Yoo *et al.*, 2006)

1.6.1.1 Atividade das Unidades de Vitamina E

O conteúdo de vitamina E é geralmente expresso pela sua atividade biológica, usando a escala de Unidade Internacional (UI). Neste sistema, a atividade biológica de 1 mg de d- α -tocoferol é equivalente a 1,49 UI de vitamina E e de 1 mg de acetato de dl- α -tocoferil é equivalente à 1 UI. Até 1980 a ingestão diária recomendada (IDR) para vitamina E era expressa em UI; e a partir de então, o termo tocoferol equivalente (TE) é usado para expressar a IDR, sendo que 1 mg de dl- α -tocoferol é equivalente à 1 TE (Rupérez *et al.*, 2001).

Todas as formas da vitamina E apresentam atividades biológicas, expressas em tocoferol equivalente, definidos como: α -tocoferol, mg x 1 TE; β -tocoferol, mg x 0,5 TE; γ -tocoferol, mg x 0,1 TE; δ -tocoferol, mg x 0,03 TE; α -tocotrienol, mg x 0,3 TE e β -tocotrienol, mg x 0,05 TE. As atividades biológicas do γ - e δ -tocotrienol foram abaixo do nível de detecção (National Research Council, 1989).

1.6.1.2 Recomendações Nutricionais de tocoferol

Os valores de recomendações nutricionais de vitamina E, segundo o Institute of Medicine - dietary reference intakes (2000), encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de Ingestão Dietética para vitamina E.

Estagio da vida	Vitamina E ^a(mg/dia)
Bebês	
0 – 6 meses	4**
7 – 12 meses	5**
Crianças	
1 – 3 anos	6*
4 – 8 anos	7*
Homens	
9 – 13 anos	11*
14 – 18 anos	15*
19 – 30 anos	15*
31 – 50 anos	15*
51 – 70 anos	15*
Maior de 70 anos	15*
Mulheres	
9 – 13 anos	11*
14 – 18 anos	15*
19 – 30 anos	15*
31 – 50 anos	15*
51 – 70 anos	15*
Maior de 70 anos	15*
Estado Fisiológico	
Gravidez	
≤ 18 anos	15*
19 – 30 anos	15*
31 – 50 anos	15*
Lactação	
≤ 18 anos	19*
19 – 30 anos	19*
31 – 50 anos	19*

a – Como α -tocoferol (RRR e os 2R estereoisômeros

*RDA - Quota diária recomendada

**AI - Ingestão Adequada

Fonte: Institute of Medicine - Dietary Reference Intakes (2000).

1.6.1.3. Microencapsulação de tocoferóis

Yoo *et al.* (2006) produziram microcápsulas de α -tocoferol utilizando como material de parede alginato de sódio em um processo de gelificação iônica,

utilizando solução de CaCl_2 . Os autores obtiveram bons resultados em relação à retenção de α -tocoferol, de 31,15 a 58,32%, e, além disso, foi estudada a liberação *in vitro* cujos resultados mostraram uma resistência estrutural das cápsulas ao ambiente ácido (liberação de 28,8% do tocoferol após 24h em pH 1,2) e uma liberação rápida do material de recheio sob condições do ambiente levemente alcalinas (81,5% de alfa-tocoferol em pH 7,4).

Fuchs *et al.* (2006) realizaram a microencapsulação, por *spray dryer*, de óleo vegetal como modelo para encapsulação de óleos com custo mais elevado como o alfa-tocoferol, utilizando como material de parede maltodextrina e goma arábica. Após a produção das cápsulas o produto passou pelo processo de aglomeração para melhorar suas propriedades de fluidez. Os autores obtiveram, para o material não aglomerado partículas pequenas ($< 50 \mu\text{m}$) cujo rendimento foi de 94%. As microcápsulas apresentaram 4,7g/100 g massa seca comparado ao valor inicial de 5%, sendo que apenas 2% do material oleoso encontrava-se na superfície da cápsula. Em um teste de vida de prateleira acelerada (60°C), ou no tempo zero, o óleo encapsulado é mais oxidado do que o óleo sem proteção, ainda, após 8 semanas à temperatura ambiente o produto microencapsulado oxidou muito menos do que o óleo sem proteção.

Pierucci *et al.* (2007) produziram micropartículas de α -tocoferol através da secagem por atomização utilizando como material de parede concentrado protéico de ervilha, as micropartículas apresentaram alta retenção de α -tocoferol ($> 77\%$), tamanho menor do que $7 \mu\text{m}$, formas esféricas e vários graus de rugosidade. Para o estudo da estabilidade as micropartículas foram adicionadas a um gel alimentício e estocadas por 90 dias, apresentando conteúdo de tocoferol menor para o produto não microencapsulado, o que mostra a eficiência protetora do processo de encapsulação.

1.6.1.4. Determinação Analítica de tocoferóis

Os tocoferóis e tocotrienóis apresentam propriedades físico-químicas peculiares que fazem com que estes sejam separados e quantificados por cromatografia líquida (CLAE). Tocoferóis são apolares, não voláteis, e facilmente detectáveis por suas características UV, fluorescente e eletroquímica, que indicam seus detectores de quantificação (Nelis, D'Haese e Vermis, 2000).

As colunas analíticas para CLAE mais utilizadas para a determinação de vitaminas são de dois tipos: as de fase normal e as de fase reversa. As de fase normal são polares (sílica e outros), produzem separação em fases móveis extremamente apolares e promovem a separação de todos os tocoferóis (Turner e Mathiasson, 2000); enquanto as de fase reversa são revestidas em grau variável (de 6 a 18%) com polímeros apolares, octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18), que propiciam melhor resposta com fases móveis polares (Snyder; Kirkland e Glajch, 1997). Porém, nesta fase, ao contrário da fase normal, não há separação completa do β - e do γ -tocoferol e tocotrienol.

Embora os isômeros β -, e γ -tocoferol e tocotrienol não sejam separados pela coluna C18 usando uma fase móvel polar (acetonitrila ou metanol-água), esta técnica pode ser aplicada para análise de lipídios antioxidantes nos casos onde um dos componentes do par isomérico esteja ausente na amostra e/ou não seja de fundamental importância a separação dos isômeros na pesquisa realizada. Os produtos de origem animal e vegetal contêm na sua composição, principalmente, α e γ -tocoferol (Cert, Moreda e Pérez-Camino, 2000).

Algumas vantagens práticas quanto ao uso desta técnica está relacionado ao fácil equilíbrio da fase móvel, reprodutibilidade dos picos cromatográficos característicos, compatibilidade com grande sensibilidade eletroquímica de detecção, baixa volatilidade dos solventes usados na fase móvel e boa seletividade para os isômeros geométricos dos tocotrienóis (Abidi, 2000).

Existem vários detectores que podem ser usados junto ao CLAE, como: detector de absorvância ultravioleta (UV), detector de fluorescência (FL), e detector eletroquímico (Abidi, 2000).

Para a determinação de vitamina E, o detector de fluorescência é geralmente utilizado devido a sua elevada sensibilidade e especificidade quando comparado ao detector de ultravioleta, pois os tocoferóis são compostos que apresentam propriedades fluorescentes (Kamal-Eldim *et al*, 2000; Panfili, Frantianni e Irano, 2003).

1.6.1.4.1. Quantificação

Para quantificar as formas de vitamina E em CLAE, tanto a padronização externa quanto a interna pode ser considerada.

Para a utilização do padrão externo, usam-se concentrações conhecidas de soluções de padrões comerciais. As curvas de calibração são construídas graficando alturas do pico ou suas áreas absolutas contra as concentrações correspondentes. Conseqüentemente, a padronização externa pode dar boa precisão, prevenindo as flutuações e perdas associadas com a amostra (Nelis, D'Haese e Vermis, 2000).

1.6.1.5. Validação de Métodos Analíticos

A confiabilidade de resultados analíticos está associada ao trabalho criterioso envolvendo procedimentos de preparação da amostra, extração das substâncias de interesse, remoção de interferentes e o passo de determinação final. Portanto, a avaliação da eficiência de um método requer que este seja validado. A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos. No Brasil, os procedimentos adotados baseiam-se em

guias disponibilizados por órgãos credenciadores nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (INMETRO). Podem também ser baseados em guias internacionais como “International Standardization for Organization” (ISO), “International Conference on Harmonization” (ICH), ou ainda nas Diretivas da Comunidade Européia, e guias disponibilizados pelo “United States – Food and Drug Administration” (US-FDA). Os parâmetros de validação empregados para métodos analíticos incluem a seletividade, linearidade e faixa de aplicação, exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. A linearidade refere-se à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma faixa de aplicação. A relação matemática que descreve esta proporcionalidade geralmente é expressa pela curva analítica. A qualidade desta curva é avaliada por parâmetros estatísticos, tais como o coeficiente de correlação linear (r), obtido a partir do método matemático de regressão linear. Para a quantificação são utilizados métodos como a padronização externa, padronização interna, superposição de matriz e adição de padrão (Ribani, *et al.*, 2004).

A precisão de um método representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Para um número pequeno de determinações, costuma-se calcular a precisão pela estimativa do desvio padrão absoluto (s). Para processos de validação, a precisão é considerada em três níveis distintos; repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, quais sejam, mesmo local, procedimento, analista e instrumento usado sob as mesmas condições, repetições efetuadas em curto intervalo de tempo. A avaliação do efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores é medida pela chamada precisão intermediária. Tanto

a repetitividade como a precisão intermediária é expressa por meio da estimativa do desvio padrão (RSD), e o número de repetições recomendado para o cálculo do RSD varia de sete a nove, de acordo com as recomendações das agências credenciadoras. A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas em diferentes laboratórios, portanto sob condições variadas, tais como diferentes operadores, local, equipamentos, entre outros. Refere-se, conseqüentemente, a estudos colaborativos, que podem também contribuir para testar a exatidão do método, (Ribani , *et al.*, 2004).

A exatidão é o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor de referência aceito como verdadeiro (Inmetro, 2003). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão).

O número de ensaios varia segundo a legislação, conforme International Conference on Harmonization (ICH, 1997) e Anvisa (2003), sendo necessário um mínimo de nove determinações, envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (Ribani *et al.*,2004)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do composto de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, por meio de um procedimento experimental. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser medida por meio de um procedimento experimental, com registro das determinações de exatidão e precisão. Tanto LD como LQ podem ser calculados por método visual, pela relação sinal-ruído ou ser baseado em parâmetros da curva analítica. Para análises cromatográficas, a medição do ruído não é simples, picos maiores tendem a aumentar a relação sinal-ruído, resultando em LD e LQ mais baixos. O

emprego de parâmetros da curva analítica, estatisticamente mais confiáveis, pode substituir a técnica sinal-ruído (Ribani , *et al.*, 2004).

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Um método diz-se robusto quando este não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros (Inmetro, 2003). A robustez de um método é avaliada, por exemplo, pela variação como concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação de temperatura, como tempo de agitação, etc. (Ribani *et al.*, 2004)

1.6.2 Liberação do Ingrediente Ativo

Uma das mais importantes propriedades da microencapsulação é a liberação gradual do material ativo a taxas controladas (Versic, 1988).

A liberação de um material de recheio de uma microcápsula pode ocorrer de diferentes formas. Não existe um tipo de curva de liberação que satisfaça todas as necessidades. Além disso, os dados de liberação reais tendem a se desviar das curvas de liberação idealizadas. A liberação pode ocorrer de diferentes formas, podendo-se representar quatro modelos teóricos de liberação: o primeiro considera a existência de um mecanismo de "disparo" que inicia a liberação sendo que geralmente este disparo se dá pela presença de uma força externa ou fatores como luz, calor, pH e degradações químicas da cápsula; o segundo mecanismo assume que a parede da cápsula atua como reservatório, supondo que a taxa de liberação é constante; o terceiro modelo pressupõe a migração através da parede, mas considera um efeito adicional de liberação ocasionado por pequenos rompimentos na estrutura da cápsula; o quarto modelo considera a parede como uma membrana semipermeável, seletiva a diferentes massas moleculares (Thies, 1995).

Entre os vários mecanismos de liberação se inclui o processo de fratura, onde a cobertura pode ser quebrada ou fraturada por forças externas como pressão ou por cisalhamento; por forças internas através da difusão, onde um gradiente de concentração faz com que ocorra a transferência de massa de um meio mais concentrado para um menos concentrado, e através da biodegradação que consiste na liberação enzimática do material ativo, sendo muito utilizada na degradação de coberturas de lipídeos (Yazaw *et al.*, 1974).

A comparação entre os materiais obtidos por diferentes processos de encapsulação é realizada por diversos métodos analíticos, sendo o teste de dissolução um dos mais utilizados, porque apresenta uma comparação quantitativa das solubilidades de diferentes materiais (Wendel & Çelik, 1998).

1.6.3 Estabilidade do ingrediente ativo

O estudo da estabilidade de um constituinte, através de sua perda ou do aparecimento de sub-produtos ao longo do tempo deve ser baseado no conhecimento da reação química envolvida no processo que, por sua vez, determina um comportamento cinético de aparecimento ou de perda da espécie envolvida. A determinação da cinética química de uma reação envolve o estudo de taxas e mecanismos pelos quais uma espécie se converte a outra. A taxa de reação química é determinada pela massa ou concentração de um produto produzido ou por um reagente consumido por unidade de tempo. O mecanismo da reação, por outro lado é mais difícil de ser determinado desde que este envolve o conhecimento da sequência de passos que produzem o resultado final.

Considerando a natureza complexa dos alimentos é difícil determinar o mecanismo real das reações intermediárias que levam a uma mudança particular, porém alguns procedimentos são adotados para avaliar a cinética global de produção ou consumo de constituintes do alimento de interesse, assumindo-se

que fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e concentrações de outros componentes são mantidas constantes (Ross, 1997).

Reações químicas em alimentos que seguem cinética de ordem zero apresentam uma taxa constante de mudanças da concentração de um produto ou reagente. Ou seja, quando a concentração é graficada contra o tempo obtém-se uma linha reta. Se a concentração X tempo apresentar um comportamento exponencial linearizável pela aplicação do logaritmo natural, a concentração da reação segue um modelo cinético de primeira ordem (Singh, 1996).

Os testes de estabilidade são feitos para se conhecer o perfil de comportamento do produto microencapsulado e do recheio livre, frente a condições propícias à oxidação de corantes naturais, para se verificar se o processo de encapsulação resulta em melhoria ou não da estabilidade conforme Beatus *et al.* (1985).

A transformação dos lipídios resulta em aumento da superfície da partícula, diminuição da capacidade de encapsulação e perda do controle sob a liberação modulada, levando a problemas de estabilidade física das partículas. Por isso, esta estabilidade tem sido muito estudada, principalmente através de medidas de tamanho de partícula (por difração a laser), carga superficial (potencial zeta) e análise térmica (calorimetria diferencial de varredura - DSC) (Mehnert & Mäder, 2001; Wissing *et al.*, 2004b; Wissing, Kayser & Müller, 2004a). As técnicas de espectroscopia de infravermelho e reometria também estão sendo usadas para análises da estabilidade das nanopartículas (Mehnert & Mäder, 2001).

Numerosos fatores têm influência no tamanho médio das partículas, tais como a composição lipídica, o processo de formulação, a composição do recheio, os parâmetros do processo (temperatura, equipamento de homogeneização, etc.), a presença de tensoativo, as condições de estocagem, entre outros. Estes fatores têm influência no processo de cristalização lipídica e, portanto, no aumento do tamanho médio das partículas (Heurtault *et al.*, 2003). Além da difração a laser, difração de luz dinâmica, ressonância magnética nuclear, microscopia óptica,

microscopia eletrônica e microscopia de força atômica também têm sido usados para análise do tamanho de partículas (Mehnert & Mäder, 2001; Heurtault *et al*, 2003; Wissing *et al*, 2004b).

Quase todas as partículas em contato com um líquido adquirem uma carga em sua superfície, e o potencial elétrico no plano externo da partícula é chamado de potencial zeta (Heurtault *et al*, 2003). O potencial zeta é um indicador importante e útil de mudanças na carga da partícula, que pode ser usado para prever e controlar a sua estabilidade. A medida do potencial zeta é geralmente importante para o entendimento dos processos de dispersão e agregação nas aplicações das nanopartículas (Mehnert & Mäder, 2001; Heurtault *et al*, 2003).

Termoanálise por DSC fornece informações sobre o comportamento de cristalização, transição polimórfica, temperatura de fusão, entalpia e grau de cristalinidade das partículas. Outra técnica usada para análise do grau de cristalinidade é a difração de raios-X, que também torna possível a investigação da tendência de cristalinidade e a transição polimórfica das nanopartículas (Mehnert & Mäder, 2001; Heurtault *et al*, 2003; Wissing *et al*, 2004b).

Autores investigaram o efeito da luz e da temperatura na estabilidade física de partículas de SLN. Foi encontrado que o aumento de tamanho das partículas podia ser induzido por um aumento da energia cinética (luz, temperatura) no sistema. Estocagem sob luz artificial levou à gelatinização do sistema com 7 dias de armazenamento, sob luz natural dentro de 3 meses e em ambiente escuro o aumento das partículas começou depois de 4 meses de estocagem. Esta gelatinização foi acompanhada de uma diminuição da magnitude do potencial zeta de -24,7 para menos de -18 mv. A influência da temperatura da estocagem no tamanho da partícula também foi analisada, e houve um aumento muito rápido quando em altas temperaturas enquanto que sob refrigeração o tamanho foi estável por 180 dias (Freitas & Müller, 1998). Ainda neste mesmo estudo, foi analisado o estado polimórfico dos lipídios. Com o aumento da energia cinética, houve polimorfismo de uma mistura de formas β' , α e sub α em apenas β' , acompanhada de formação de gel. Se as condições que aumentaram a energia

cinética (temperatura e luz) tivessem sido controladas, esta transformação poderia ter sido evitada (Freitas & Müller, 1998).

1.7 Métodos Utilizados para o Estudo das Partículas Lipídicas

Os métodos mais importantes para caracterização das microcápsulas e posterior avaliação do processo de encapsulação incluem: a microscopia ótica e eletrônica de varredura (MEV) que avaliam as estruturas, geral, externa e interna; raios-X e a análise térmica (DSC) que avaliam a estrutura fina; a microscopia e o analisador de tamanho de partículas (Mastersizer S), que também fornece a distribuição do tamanho das cápsulas; a cromatografia CG ou CLAE e a espectroscopia que avaliam a composição da parede e do recheio (Thies, 1995; Aguilera, 2005).

1.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura combina as melhores características da microscopia ótica e da microscopia eletrônica de transmissão. A preparação dos ensaios é mais simples e introduz menos artefatos. Além disso, permite avaliar tanto as características da superfície como as internas, dependendo das técnicas de preparação utilizadas. Pode-se utilizar uma ampla faixa de aumentos (20 a 100.000x) e alcançar uma profundidade de campo aproximadamente 500 vezes maior que a microscopia ótica (Aguilera & Stanley, 1990; Aguilera, 2005).

A caracterização morfológica das microcápsulas é uma análise essencial, pois avalia se o processo de encapsulação foi eficiente ou não, através da qual pode-se observar visualmente se ocorreu a formação das cápsulas, a integridade das paredes e também a distribuição de tamanho das mesmas. Variações nos parâmetros do processamento tais como temperatura e tipo de atomizador podem acarretar mudanças na morfologia das cápsulas, que por sua vez podem interferir nas importantes características do produto final e na estabilidade das

microcápsulas (Rosenberg *et al.*, 1985 e 1988). Estes mesmos autores, após um longo trabalho sobre a microestrutura de cápsulas oriundas do processamento por atomização, concluíram que a microestrutura determina também características do produto como, densidade, porosidade, e volatilidade do material retido, sendo esta uma análise fundamental para a avaliação e caracterização das cápsulas.

As variações da morfologia das cápsulas são características dos materiais encapsulantes empregados no processamento de obtenção das microcápsulas. As dobras ou rugosidades apresentadas nas superfícies irregulares das cápsulas foram caracterizadas como concavidades por Archeri (1997). A topografia da superfície do produto final da encapsulação deve ser sempre analisada e é dependente da temperatura de secagem ou das taxas de secagem do processo e do material de parede utilizado (Rosenberg & Young, 1993).

1.7.2 Difração de Raio-X

A difração de raios-X é usada para identificar o polimorfismo de cristais e é baseada na determinação do espaçamento dos cristais (*long e short spacings*). O princípio deste método consiste em excitar um anticátodo feito de um material como, por exemplo, o cobre que irá emitir raios-X que serão difratados pela estrutura cristalina a um determinado ângulo formado com os planos de átomos nessa estrutura. O ângulo depende da estrutura cristalina da amostra (Gioielli, Simões & Rodrigues, 2003) e o conjunto dos picos que aparecem em um difratograma de raios-X, funciona como uma impressão digital daquele material, isto é, cada substância cristalina exibe um único arranjo de picos no difratograma.

Para estudos em lipídios, difração de raios-x fornece sem equívocos a forma polimórfica correta apresentada pela amostra, e esta análise pode prover informações adicionais além das características polimórficas, tais como comprimento da cadeia carbônica ou densidade da camada lipídica, através do espaço interplanar (Timms, 1984).

A identificação das formas polimórficas é realizada com base nos espaçamentos curtos do cristal. A forma α apresenta uma linha de difração simples em 4,15 Å. A forma β prima é caracterizada por duas linhas de difração forte, com uma linha proeminente em 3,8 e 4,2 Å, enquanto a forma β está associada a uma série de linhas de difração, com uma linha proeminente em 4,6 Å e as linhas de menor intensidade de 3,7 e 3,8 Å (AOCS, 2004; Rousseau & Marangoni, 2002).

1.7.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As propriedades térmicas e estruturais de óleos e gorduras podem ser avaliadas através da calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a difração de raios-X (Czerniak *et al.*, 2005).

Efeitos endotérmicos e exotérmicos correspondem a mudanças de energia térmica na amostra. Quando uma substância funde, energia em forma de calor é necessária para romper as interações que mantêm a amostra no estado sólido. A energia aplicada corresponde a um efeito endotérmico. A finalidade dos sistemas térmicos diferenciais (DSC) é registrar a diferença entre as mudanças de entalpia que ocorrem entre uma amostra e um material de referência, quando ambos são aquecidos sob as mesmas condições. O DSC é uma técnica muito versátil que permite o uso de amostras sólidas, líquidas, na forma de pós, filmes entre outros (Nassu, 1994).

Quando a calorimetria é usada para investigar as propriedades térmicas de gorduras, vários picos podem ser observados durante o resfriamento ou aquecimento das amostras. Esses picos refletem a ocorrência das transições térmicas da amostra, o que muitas vezes torna difícil a sua interpretação dependendo das taxas de aquecimento, resfriamento e história térmica do material. No entanto, para o auxílio na identificação das formas polimórficas presentes em uma amostra de gordura, a técnica de difração de raios-X pode ser

conveniente, pois auxilia e complementa a interpretação dos eventos térmicos ocorridos na amostra (Keller *et al.*, 1996).

A velocidade de aquecimento/resfriamento pode variar de 0,1 a 200°C/min ou ser constante, no caso de operações isotérmicas. Velocidades pequenas são usadas, geralmente, em estudos que envolvem cristais líquidos, pureza de compostos e cinética de reações. No que diz respeito ao tamanho da amostra, velocidades maiores que 10°C/min são usadas para amostras pequenas e para amostras maiores são encontrados melhores resultados com análises a velocidades menores, como por exemplo, 5°C/min (Nassu, 1994).

Na curva a temperatura onset é aquela correspondente ao ponto no qual a curva começa a se desviar da linha base. Temperatura máxima de pico corresponde à evolução máxima de pico, na velocidade utilizada; esta temperatura não representa o máximo da reação nem o término do fenômeno, e sua posição é muito influenciada pela velocidade de aquecimento/resfriamento, se tornando um dado não muito relevante na análise geral da curva de DSC. Temperatura de conclusão do fenômeno térmico é a temperatura na qual a curva volta à linha base após a conclusão do fenômeno térmico (Nassu, 1994).

No caso de lipídios o DSC acoplado a um acessório que permita operações a temperatura sub-ambiente, é uma ótima técnica para investigação de seus comportamentos térmicos e monitoramento de processos de modificação, como fracionamento, hidrogenação e interesterificação. Para tais substâncias, temperaturas entre -50 e 80 °C são, geralmente, as de maior interesse, e as entalpias variam de 100 a 200 J/g (Ma *et al.*, 1990; Raemy & Lambelet, 1991).

Polimorfismo, é a existência de mais de uma forma cristalina em uma mesma substância, é freqüentemente encontrado em lipídios. Muitos triacilgliceróis ocorrem em α , β' ou β , que, nesta ordem, apresentam crescentes estabilidades termodinâmicas, temperaturas e entalpias de fusão e dilatação térmica (Nassu, 1994). O método mais usado para análise do polimorfismo é a difração de raios-X, pois as formas poliméricas possuem diferentes padrões de

identificação, mas o DSC pode investigar a influência da composição química, parâmetros de processo e história térmica no polimorfismo, uma vez que temperatura, tempo e número de etapas de aquecimento e resfriamento podem ser reproduzidos sob controle de um microcomputador (Ma *et al*, 1990; Raemy & Lambelet, 1991; Nassu, 1994).

Medidas calorimétricas obtidas por esta técnica podem permitir uma avaliação acurada do comportamento de fusão e de cristalização de materiais cristalinos como micropartículas produzidas com material lipídico. A quebra ou fusão das junções cristalinas durante o aquecimento ou o resfriamento da amostra pode produzir informações sobre o polimorfismo, a ordenação cristalina, a possibilidade de misturas eutéticas ou informações sobre o processo de transição vítrea (Jenning *et al*, 2000c).

1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

.WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 56, p. 1257-1272, 2004a.

ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. Review. *Journal of chromatography A*. v.881, p.197-216, 2000.

AGUILERA, J.M.; STANLEY, D.W. *Microstructural Principles of Food Processing & Engineering*. Cambridge: Elsevier Applied Science, p. 343, 1990..

AGUILERA. J.M. Why food microstructure? *Journal of Food Engineering*. v.67, n.1-2, p.3-11, 2005.

AKIN, H.; HASIRCI, N. Preparation and characterization of crooslinked gelatin microspheres. *Journal of Applied Polymer Science*, v.58, n.1, p.95- 100, 1995.

ALVIM, I.D. *Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes*. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2005.

AMSDEM, B.S., B. S. Solute difusión in hydrogels. An examination of the retardation effect. . *Polymer Gels and Networks*, v.6, n.1, p.13-43, 1998.

ANDRES, C. Encapsulation ingredients. *Food Processing Industry*, v. 12, n. 38, p. 44, 1977.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, Resolução – RE no 899, de 29 de maio de 2003.

AOCS, American oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the AOCS. 4a. ed. Champaign, 1997; 2004.

ARCHERI, D. P. R. Seleção de material de parede para a microencapsulação de óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) através da secagem por atomização. Campinas. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 1997.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation*, v.10, n. 4, p. 413-435, 1993.

BAKAN, J.A. Microencapsulation of foods and related products. *Food Technology*, Chicago, 34-44, 1973.

BALL, G.F.M. Vitamins in foods. Analysis, Bioavailability, and Stability. New York: Taylor & Francis Group, 2006.

BEATUS, Y.; RAZIEL, A.; ROSEMBERG, M.; KOPELMAN, I. J. Spraydrying microencapsulation of Paprika Oleoresin. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 18, p. 28-34, 1985.

BERTOLINI, A. C. Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalol e citral microencapsulados em goma arábica por atomização. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 1999, 82p.

BERTOLINI, A. C.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Stability of monoterpenes of encapsulated in gum arabic by spray- drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n.2, p. 780 - 785, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.o 31, de 13 janeiro de 1998. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Diário Oficial da

República Federativa do Brasil, Brasília, DF, v. 136, n. 11-E, p. 4-5, 16 jan. Seção 1, 1998.

BROADHEAD, J., ROUAN, S.K.E., RHODES, C.T. The spray-drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Vol. 18, p. 1169 – 1206, 1992.

BRAMLEY, P.M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F.J.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H.E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P.J.A.; WAGNER, K.H. Vitamin E. *Journal Science Food Agriculture*, v.80, p.913-938, 2000.

BURING, J. E., HENNEKENS, C. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Nutr. Rev.*, New York, v. 55, n. 1, p. S53-S60, 1997.

CARDOSO, F. S. N. Produção de microencapsulados de amido com recobrimento em leite fluidizado. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M.C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. Review. *Journal Chromatography A*, v.881, p.131-148, 2000.

CHAMBI, H. N. M.; ALVIM, I. D.; BARRERA-ARELLANO, D.; GROSSO, C. R. F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular. *Food Research International*, v. 41, p.229-236, 2008.

CHEN, A. C.; VEIGA, M. F.; RIZZUTO, A. Cocrystallization: encapsulation process. *Food Technology*, v. 42, n. 11, p. 87-90, 1988.

CHO, Y. H.; SHIM, H.K; PARK, J. Encapsulation of Fish Oil by an Enzymatic Gelation Process Using Transglutaminase Cross-linked Proteins. *Journal of Food Science*, v.68, n.9, p.2717-2723, 2003.

CHRISTIE, W.W, Lipid analysis-isolation, separation, identification and structural analysis of lipids (3rd ed.), The Oily Press, Bridgwater, England. 2003.

CHRISTIE, W.W. Tocopherols and tocotrienols – structure, composition, biology and analysis. Scottish Crop Research Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland, 2007.

CZERNIAK, A.S., KARLOVITS, G., LACH, M., SZLYK, E. X-ray diffraction and differential scanning calorimetry studies of β' to β transitions in fat mixtures. Food Chemistry, v.92, p.133-141, 2005.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects, v. 232, n. 2-3, p. 239-247, 2004.

DUXBURY. D.D.; Swientek, R. J. Encapsulated ingredients face healthy future. Food Processing, February, p.38-46, 1992.

DZIEZAK, J. D.. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. Food Technology, n. 42, p. 136-151, 1988.

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated volatiles. Hanser Publ. Co., Munich, p. 37-52, 1993.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and charac-terisation of their surface morphology by scanning elec-tron microscopy. Pharm. Res. 8, 47–54., 1991.

FANGER, G. O. Microcapsulation: A brief history and introduction in: Microencapsulation: Processes and applications. Vandegaer, J.E. ed Plenum Press, New York, p. 1-20., 1974.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. The effect of the immobilization of *L.acidophilus* & *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Milchwissenschaft*, v.55, n.9, p.496-499, 2000.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L.acidophilus*(La-05) & *B. Lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and bile. *Journal of Microencapsulation*, v.19, n.4, p.485-494, 2002.

FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1067p. 2003;

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 168, p. 221-229, 1998.

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

GASCO, M.R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. US Patent: 5250236, 1993.

GERMAN, J.B., SIMONEAU, C. Phase transitions of edible fats and triglycerides: theory and applications. In: RAO, M.A., HARTEL, R.W., eds. *Phase/state transitions in foods: chemical, structural, and rheological changes*. New York: Marcel Dekker, p.187-216. 1998.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 50, p. 213-234, 1999.

GIESE, J. Packaging, storage, and delivery of ingredients. *Food Technology*, v. 47, n. 8, p. 54-63, 1993.

GIOIELLI, L.A., SIMÕES, I.S., RODRIGUES, J.N. Crystal morphology and interactions of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats. *Journal of Food Engineering*. v.57, p.347-355, 2003.

GOODWIN J.T.; SOMEVILLE G. R. Physical methods for preparing microcapsules in: *Microencapsulation: Processes and applications*. Vandegaer, J.E. ed Plenum Press, New York, p. 1-20, 1974.

GUNSTONE, F. D. & PADLEY F. B.. *Lipid Technologies and Applications*. Part 1- Gunstone, F.D., Fatty acids and lipids structure. New York : Marcel Dekker, Inc, p. 1-16, 1996.

GUNSTONE, F. D.. Lipid chemistry – a personal view of some developments in last 60 years. *Biochimica et Biophysica, Acta* 1631, p. 207-217, 2003.

HANSEN, L.T.; WONJTAS, A.P.M.; JIW, Y.L.; PAULSON, A. T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, v. 19, p. 35-45, 2002.

HEGER, R. Release kinetics/mechanism in: *Microencapsulation of Food Ingredients*, Vilstrup, P. Heatherhead publishing, p. 55 – 75, 255p., 2001.

HELGUERA, L.I. Mejorando los sabores. *Alimentos procesados*, p.47-51, 2000.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, n. 24, p. 4283 - 4300, 2003.

HOLUM RJ. Lipids. In: Fundamentals of general, organic, and biological chemistry, John Wiley & Sons, Ins, p. 566-582, 1994.

HU, F. Q.; JIANG, S. P.; DU, Y. Z.; YUAN, H.; YE, Y.Q.; ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 45, p. 167-173, 2005.

ICH, International Conference on Harmonization Tripartite Guideline; Validation of Analytical Procedures: Methodology, Fed. Regist., 62, 27463. 1997

ILÍC, I., DREU, R., BURJAK, M., HOMAR, M., KERČ, J., SRCIC, S. Microparticles size control and glimepiride microencapsulation using congealing technology. International Journal of pharmaceutics, v.385, p.76-183, 2009.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE/FOOD and NUTRITION BOARD. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, National Academy Press, 800p. 2000.

JACKSON, L.S.; LEE, K., Microencapsulation and the food industry. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie Food Science & Technology. v.24, p. 289-297, 1991.

JANOVSKY, C. Encapsulated ingredients for the baking industry. Cereal Foods World, v. 38, n. 2, p. 85-87, 1993.

JENNING, V., Feste Lipid-Nanopartikel (SLN) als Tragersystem für die dermale Applikation von Retinol. Ph.D. thesis, FU, Berlin. 1999.

JENNING, V.; GOHLA, S. H. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, n. 196, p. 219-222, 2000.

JENNING, V.; MÄDER, K.; GOHLA, S. H. Solid lipid nanoparticles (SLNTM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a H-NMR study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 205, p. 15-21, 2000c.

JORES, K., MENHERT, W., & MADER, K. Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: A nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. *Pharmaceutical Research*, v.20, p.1274–1283, 2003.

KAGAN, V.E.; SERVINOVA, E.A.; FORTE, T.; SCITA, G.; PACKER, L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*. v.33, p.385-397, 1992.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, London, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.

KAMAL-ELDIN, A.; GÖRGEN, S.; PETTERSSON, J.; LAMPI, A.M. Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, v.881, p.217-227, 2000.

KAREL, M. Encapsulation and controlled release of food components in: *Biotechnology and Food Processes Engineering*. Schwartzberg, H.G.; Rao, M. A. Eds IFT Basic Symposium Series. Marcel Dekker, p. 277-293, 1990.

KELLER, G., LAVIGNE, F., LOISEL, C., OLLIVON, M., BOURGAUX, C. Investigation of the complex thermal behavior of fats – combined DSC and X-ray diffraction techniques. *Journal of Thermal Analysis*. v.47, p.1545-1565, 1996.

KINDLEIN, G.; RIBEIRO, A. M. L.; CANAL, C.W.; VIEIRA, M.M., Feeding different levels of vitamin E and selenium has no effect on serum immunoglobulin Y (IgY) production by layers vaccinated against *Escherichia coli* and avian encephalomyelitis virus. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.37, n.5, p.1374-1379, 2007.

LABELL, F. Gum arabic effective for dry flavors. *Food Processing*, p. 82- 83, 1993.

LAMB, R. Spray chilling. *Food Flavours, Ingredients, Packaging and Processing*. v.9, n. 12, p. 39, 1987.

LAMPRECHT A.; SCHAEFER U.; LEHR C. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for ω 3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition *Journal of. Microencapsulation*, v. 18, n. 3, p. 347-357, 2001.

LAMPRECHT, A.; SCHAFER, U.F.; LERHR, C. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.49, p.1-9, 2000.

LANGDON, C. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture*, v. 227, n.1-4, p. 259–275, 2003.

LANGDON, C.; CLACK, B.; ÖNAL, U. Complex microparticles for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and pharmaceuticals to marine fish larvae. *Aquaculture*, v.268, n.1-4, p.143-148, 2007.

LANGDON, C.J.; BUCHAL, M.A. Comparison of lipid-walled microcapsules and lipid spray beads for the delivery of water-soluble, low-molecular-weight materials to aquatic animals. *Aquaculture Nutrition*, v.4, p. 275-284, 1998.

LEE, S.J.; ROSENBERG, M. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 33, p. 80-88, 2000.

LOISEL, C.; KELLER, G.; LECQ, G.; BOURGAUX, C.; OLLIVON, M. Phase transitions and polymorphism of cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Chicago, v. 75, n.4, p 425-439, 1998.

MA, C. -Y.; HARWALKAR, V. R.; MAURICE, T. J. Instrumentation and techniques of thermal analysis in food research. In: HARWALKAR, V. R. & MA, C. -Y., *Thermal Analysis of Foods*. London, Elsevier, cap 1, p. 1-15, 1990.

MACHLIN, I, J. Vitamin E – Handbook of Vitamins: nutritional, biochemical and clinical aspects. NY: Marcel Dekker, 1984, p.99-146.

MAGGE JR., E. L.; OLSON, N. F. Microencapsulation of cheese ripening systems: formation of microcapsules. *Journal of Dairy Science*, v. 64, p.600-610, 1981a.

MAGGE JR., E. L.; OLSON, N. F. Microencapsulation of cheese ripening systems: stability of microcapsules. *Journal of Dairy Science*, v. 64, p.611-615, 1981b.

MAHAN, L. K., ARLIN, M. T. KRAUSE alimentos, nutrição e dietoterapia. 8. ed. São Paulo: Roca, p.957, 2002..

MARANGONI, A.G., MCGAULEY, S.E. Crystallization. *Growth Des.* 3, 95, 2003.

MARANGONI, A.G. Crystallization, structure and functionality of fats. *Food Research International*, Barking, v. 35, n. 10, p. 907-908, 2002.

MARTIN, A., WU, D., MEYDANI, S. N., BLUMBERG, J. B., MEYDANI, M. Vitamin E protects human aortic endothelial cells from cytotoxic injury induced by oxidized LDL in vitro. *J. Nutr. Biochem.*, Stonehm, v. 9, n. 4, p. 201-8, 1998.

MASCHKE, A.; BECKER, C.; EYRICH, D.; KIERMAIER, J.; BLUNK, T.; GÖPFERICH, A. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p. 175-187, 2007.

MASCHKE, A.; BECKER, C.; EYRICH, D.; KIERMAIER, J.; BLUNK, T.; GÖPFERICH, A. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p. 175-187, 2007.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles – production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 47, p. 165-196, 2001.

MENGER, F. M.; PERESYPKIN, A. V.; CARAN, K. L.; APKARIAN, R. P. A Sponge Morphology in an Elementary Coacervate. *Langmuir*, v. 16, p. 9113-9116, 2000.

MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. *Biopolymer science: Food and Non-food Applications*. p.303-314. 1998.

METIN, S. & HARTEL, R.W. *Crystallization of Fats and Oils*. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 2005

MÜLLER, R. H., RADTKE, M., & WISSING, S. A., Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 121- 128, 2002.

MÜLLER, R. H., RADTKE, M., & WISSING, S. A., Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 121- 128, 2002.

MÜLLER, R. H.; MÄDEN, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, p. 161-177. 2000.

MUKAI-CORRÊA R.; PRATA, A.S.; ALVIM I. D.; GROSSO, C. R. F. Caracterização de Microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por geleificação iônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.8, n.1, p. 73-80, 2005.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A.S.; ALVIM I.D; GROSSO C.R.F. Controlled release of Protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. *Current Drug Delivery*, v 1, n. 3, p265-273, 2004

MUKAI-CORRÊA. R. Preparo e caracterização de microcapsulas obtidas por polimerização ionica para alimentação de larvas de peixe. *Dissertação*. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 173p, 2003.

MULLER, R.H., JENNING, V., Zusammensetzung, Herstellung und Verwendung einer Suspension verfestigter, amorpher Oltropfchen, Deutsche Patentanmeldung 199 38 371.5, 1999.

MULLER, R.H., LUCKS, J.S., Arzneistofftrager aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanosphären (SLN). *European Patent EP0605497*, 1996.

NASSU, R. T. Estudo do comportamento térmico de óleos e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC). Campinas, SP: Unicamp, 94p. *Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1994.*

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Recommended dietary allowances. 10th edition. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R., ed. Food chemistry. 2.ed. New York: Marcel Dekker, p. 139-244. 1985.

NELIS, H.J.; D'HAESE, E.; VERMIS, K. Vitamin E. In: De Leenheer, A.P. Modern chromatography analysis of vitamins. 3ed, revised and expanded. University of Ghent. Ghent, Belgium. 2000.

NOGALA-KALUCKA, M. Fat soluble vitamins. In: Zikorski, Z.E.; Kolakowska, A. Chemical and Functional Properties of Lipids Foods. CRC Press, 2003.

NORI, M. A. Ingredientes e aditivos microencapsulados na industria de limentos. Engenharia de Alimentos. São Paulo, v. 1, p. 33-34, 1996.

NORI, M. A. Produção de microcápsulas de ácido cítrico para utilização em produtos cárneos. São Paulo, Tese – (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo – USP. 1996.

O'BRIEN, R.D. Fats and Oils Formulation. In: Fats and Oils – Formulating and O'NEILL, L.M.; GALVIN, K.; MORRISSEY, P.A.; BUCKLEI, D.J., Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat and meat products. British Poultry Science, v. 39, p. 365-371, 1998.

OLIVEIRA, C. A. Viabilidade de Lactobacillus acidophilus e Bifidobacterium lactis, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro. Dissertação. Universidade Estadual de São Paulo – Riberão Preto. 2006.

ONAL U, LANGDON C. Characterization of lipid spray beads for delivery of glycine and tyrosine to early marine fish larvae. Aquaculture, v. 233, n. 1-4. p. 495-511, 2004.

ONAL U, LANGDON C. Lipid spray beads for delivery of riboflavin to first-feeding fish larvae. *AQUACULTURE*, v. 233, n.1-4, p. 477-493, 2004.

ONEDA, F.; RÉ, M.I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. *Powder Technology*, v. 130, p. 377– 384, 2003.

PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO, M. Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.3940-3944, 2003.

PETEAN, C.C.; GOMES, F.M.; SILVA, J.C.R.; FERRIANI, R.A.; MOURA, M.D.; REIS, R.M.; ALBUQUERQUE, P.A.; NAVARRO, S., Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. Rio de Janeiro, v.29, n.6, p.303-309, 2007.

PIERUCCI, A.P.T.R.; ANDEADE, L.R.; FARINA, M.; PEDROSA, C.; ROCHA-LEAO, M.H.M. Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *Journal of Microencapsulation*. v.24, n.3, p.201–213, 2007.

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

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biol. Med.*, v.28, p.141-164, 2000.

RAEMY, A.; LAMBELET, P. Thermal behavior of foods. *Thermochimica Acta*, v. 193, p. 417-439, 1991.

RANADHEERA, R.D.C.S., BAINES, S.K., ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. *Food research international*, v.43, p.1-7, 2010.

RAO, A.V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, I. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Can. Inst. Food Science and Technology Journal*, v. 22, n. 4, p. 345-49, 1989.

RÉ, M. I. Cápsulas inteligentes. *Ciência Hoje*, v. 27, n. 162, p. 24-29, 2000.

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

REITHMEIER, H.; HERRMANN, J.; GÖPFERICH, A. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 218, p.133–143, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I., C., S., F., MELO, L.; F., C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, G. A. Produção, caracterização, estabilidade e aplicação de microcápsulas. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2009.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science*, v.50, p. 139-144, 1985.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. The microstructure of spray-dried microcapsules. *Food Microstructure*, v. 7, p. 15-23, 1988.

ROSENBERG, M.; YOUNG, S. Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milk fat-structure evaluation. *Food Structure*, v.12, p. 31-41, 1993.

ROSS, E. W. Mathematical modeling of quality loss. In: *Food Storage Stability*, TAUB, I. A.; Singh, R. P. Boca Raton, CRC Press, p.331-351, 1997.

ROUSSEAU, A.G. MARANGONI, in *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, edited by C.C. Akoh (CRC Press, New York, p.301, 2002.

RUPÉREZ, F.J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. Review. *Journal of Chromatography A*, v.935, p.45–69, 2001.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, London, v. 17, n. 10, p. 547-556, 2006.

SATO, K.. Crystallization behaviour of fats and lipids- a review. *Chemical Engineering Science*, vol. 56, p. 2255-2265, 2001.

SCHERI, D.P.R.; MARQUEZ, M.O.M.; MARTUCCI, E.T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.23, p. 1-6, 2003.

SCHROOYEN, P. M. M.; VAN DER MEER, R.; KRUIF, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 60, p. 475-479, 2001.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHELDON, B.W.; CURTIS, P.A.; DAWSON, P.L.; FERKET, P.R., Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability flavor, color and volatile profiles of refrigerated and frozen turkey breast meat. *Poultry Science*, v. 76, p. 634- 641, 1997.

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Sub-micron sized parenteral carrier systems based on solid lipid. *Pharm. Pharmacological Lett.*, n. 1, p. 123-126, 1992.

SINGH, R. P. *Computer Applications in Food Technology Use of Spread Sheets in Graphical, Statistical and Process Analyses*. Academic Press, 1996.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. L.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*, 2ed. Wiley Interscience Publication and John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.

STRAUSS, G.; GIBSON S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, v.18, p.81–89, 2004.

TAYLOR, A. H. *Encapsulation systems and their applications in the flavor industry*. *Food Flavours, Ingredients, Packaging and Processing*, n. 5, p. 48, Sept, 1983.

TEUNOU, E.; PONCELET, D. Batch and continuous fluid bed coating – review and state of art. *Journal of Food Engineering*. v.53, p. 325-340, 2002.

THIES, C. *Complex Coacervation. How to make Microcapsules - Lecture and Laboratory Manual*. 1995.

THIES, C. *How to Make Microcapsules Lecture and Laboratory Manual*. St. Louis. Missouri, 1995.

THIES, C. Microencapsulation. In: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, p. 724-745 (H. F. Mark, N. M. Bikales. C. G. Overberger, G. Menges, J. I. Kroschwitz). New York, 1987.

TIMMS, R. E. Phase behavior of fats and their mixtures. Progress Lipid Research, v. 23, p. 1-38, 1984.

TIMMS, R.E.; Physical Properties of Oils and Mixtures of Oils. Journal of American Oil Chemists' Society, Chicago, v. 62, p. 241-248, 1985.

TRINDADE, M.A.; GROSSO, C.R.F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. Journal of Microencapsulation, v. 17, n.2, p.169-176, 2000.

TROTTA, M., CAVALLI, R., CARLOTTI, M.E., BATTAGLIA, L., DEBERNARDI, F. Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique International Journal of Pharmaceutics, v. 288, p. 281-288, 2005

TURNER, C.; MATHIASSEN, L. Determination of vitamins A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up. Journal of Chromatography A. v.870. p.275-283, 2000.

VAECK, S.V. Cacao butter and fat bloom. In: PRATT, C.D., SCHUEMANN, H.W., eds. – Twenty years of confectionery and chocolate progress. Westport: AVI, p.123-155, 1970.

VERVIC, R. J. Flavor Encapsulation: An overview. Chapter 1. Risch, S. J.; Reineccius, G. A. Flavor Encapsulation. ACS Symposium Series 370. American Chemical Society, Washington, D.C.- USA, p. 1-6, 1988.

VILLAMAR, D. F.; LANGDON, C. J.; Delivery of dietary components to larval shrimps (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. Marine Biology, v.115, n.4, p. 635-642. 1993.

WEGMULLER, R.; ZIMMERMANN, M. B.; BUHR, V. G.; WINDHAB, E. J.; HURREL, R. Development, stability, and sensory testing of microcapsules containing iron, iodine and vitamin A for use in food fortification. Journal of Food Science, Chicago, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2006.

WEINBRECK, F.; WEINTJES, R.H.W.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G.W.; DE KRUIF, C.G. Rheological properties of whey protein/gum Arabic coacervates, Journal of Rheology, v.48, n.6, p.1215-1228, 2004.

WENDEL, S.C. & ÇELIK, M; An overview of spray drying applications, Pharmaceutical Technology, Vol. 21, n. 10, p. 124-156, 1998.

WIELAND-BERGHAUSENS, 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, n.1-3, p. 35-43, 2002.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H.; MANTHEI, L.; MAYER, C. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. Pharmaceutical Research, v. 21, n. 3, p. 400-405, 2004b.

YAZAW, K.; ARAI, R.; KITAJIMA, M.; KONDO, A. Method of producing oil and fat encapsulated amino acids, U. S. Patent 3.804.776, 1974.

YENILMEZ, E., BASARA NUME, YAZANUM, Y. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its *in vitro* controlled release study. Carbohydrate Polymers, v. 84, n.2,1, p. 807-811, 2011.

YEO, Y.; BELLAS, E. ; FIRESTONA, W. ; LANGUER, R. ; KOHANE, D.S. Complex Coacervates for Thermally Sensitive Controlled Release of Flavour Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n. 53, p. 7518-7525, 2005.

YOO, S.; SONGB, Y.; CHANGC, P.; LEE, H.G., Microencapsulation of alfa-tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromol*, 2006.

CAPITULO 2

VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE α -TOCOFEROL POR CLAE

RESUMO

A validação é essencial para definir se uma metodologia desenvolvida está completamente adequada aos objetivos a que se destina, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Além disso, pode ser considerado um dos principais instrumentos de garantia da qualidade. Devido à importância da vitamina E para a saúde e a necessidade de técnicas sensíveis e confiáveis, um método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi validado para quantificação de α -tocoferol em cápsulas. Foram avaliados os parâmetros de limite de quantificação, linearidade, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e robustez. Os limites de detecção e quantificação foram estimados como sendo 3 e 10 vezes a razão sinal/ruído, respectivamente. A repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas através dos coeficientes de variação (CV) obtidos para dez determinações e os resultados apresentaram valores de 1,538 e 7,76% respectivamente. Obteve-se faixa de linearidade de quantificação ampla para o composto com coeficiente de regressão igual a 0,9999. Todos os resultados se mostraram satisfatórios, o método demonstrou-se adequado para a quantificação de α -tocoferol em micropartículas, considerando os parâmetros especificados pela Anvisa-Brasil Resolução 899/2003 e Inmetro DOQ CGCRE-008, 2003.

Palavras-chave: Validação; α -Tocoferol; Cromatografia líquida, microcapsulas.

2.1. INTRODUÇÃO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparação, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve sofrer uma avaliação denominado validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (Ribani, *et al.*, 2004).

A validação deve ser considerada quando se desenvolvem ou efetuam adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos. No Brasil, os procedimentos adotados baseiam-se em guias disponibilizados por órgãos credenciadores nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (INMETRO). Podem também ser baseados em guias internacionais como “International Standardization for Organization” (ISO), “International Conference on Harmonization” (ICH), ou ainda nas Diretivas da Comunidade Européia, e guias disponibilizados pelo “United States – Food and Drug Administration” (US-FDA). Os parâmetros de validação empregados para métodos analíticos incluem a seletividade, linearidade e faixa de aplicação, exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez, (Ribani, *et al.*, 2004).

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Padrões e solventes

Hexano (Burdick & Jackson) e Isopropanol (marca EM Science) com grau cromatográfico CLAE. Os padrões cromatográficos utilizados (α -Tocopherol, Cat 613424 – Celbiochem) foram de pureza não inferior a 95%.

Equipamento e condições operacionais

As determinações de tocoferóis foram conduzidas utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Perkin-Elmer 250, tendo-se como detector de fluorescência Perkin Elmer, series 200 em condição isocrática à temperatura ambiente. As separações foram conduzidas utilizando-se uma coluna Hibar (Merk, Darmstadt, Cartridge n° 0/3117, sorbent lot n° F 823888) contendo LiChrosorb Si 60 (5 μ m) e fase móvel de hexano:isopropanol (99:1, v:v) grau HPLC, acoplada a coluna de guarda Li Chro Cart 4-4 (Merck) de LiChrospher Si 60 (5 μ m) , caracterizando uma cromatografia de fase normal. A detecção dos tocoferóis foi realizada por fluorescência utilizando λ de excitação igual a 290 nm e λ de emissão de 330 nm. As injeções foram realizadas com um loop de 20 μ L. O processamento dos dados foi realizado através do Peak Simple Chromatography Software.

Identificação e Quantificação

A separação, identificação e quantificação de tocoferóis foi realizada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), também conhecida por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Conforme o método AOCS Ce 8-89.

Os picos dos isômeros de tocoferóis foram detectados utilizando o detector de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 292 nm e emissão de 326 nm.

A identificação do tocoferol foi baseada na comparação dos tempos de retenção pelos padrões validados sobre as mesmas condições, de operação.

A quantificação foi realizada por padronização externa, tendo sido construída a curva analítica com 5 níveis de concentração; cada ponto foi representado pela média de 5 determinações. As concentrações de α -tocoferol variaram na faixa de 2,0250 a 17,0079 $\mu\text{g/mL}$

Validação Analítica

A validação da metodologia analítica foi conduzida segundo a Resolução da Anvisa (2003) e Inmetro (2003).

Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados como sendo 3 e 10 vezes a razão sinal/ruído, respectivamente.

Precisão

A precisão foi avaliada em relação aos níveis de repetibilidade e reprodutibilidade. Para se avaliar a repetibilidade do método, foi injetada uma solução contendo os padrões do produto ativo. Este procedimento foi realizado por 10 vezes consecutivas em um mesmo dia. Os resultados foram expressos como o desvio relativo (% RSD) da medida da área dos picos e do tempo de retenção (n=10).

Ao nível de reprodutibilidade, a precisão do método foi avaliada repetindo-se esse procedimento durante três dias. Os resultados foram expressos como o desvio relativo (% RSD) da medida da área dos picos e do tempo de retenção (n=3).

Robustez

A robustez do método cromatográfico foi determinada por análises dos ensaios sob diferentes condições. Foram testadas duas variações em relação ao método original, como variação no fluxo na fase móvel ($\pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$) e proporção da fase móvel ($\pm 0,1\% \text{ v/v}$).

2.3. RESULTADOS

Etapas Analíticas

A Figura 1 apresenta um cromatograma com a separação simultânea do α -tocoferol em solução padrão. A vitamina E (α -tocoferol) foi eluída em tempo de retenção de 4,916 min. Comparando com dados mais recentes da literatura, o tempo de análise foi inferior ao do método de Gomis, Fernandez e Gutierrez (2000), que foi de 15 min, e de Escrivá *et al.* (2002) que foi de 18 min para a eluição do α -tocoferol. Apenas Rodas e colaboradores (2003), obtiveram uma separação tão rápida quanto à obtida neste trabalho.

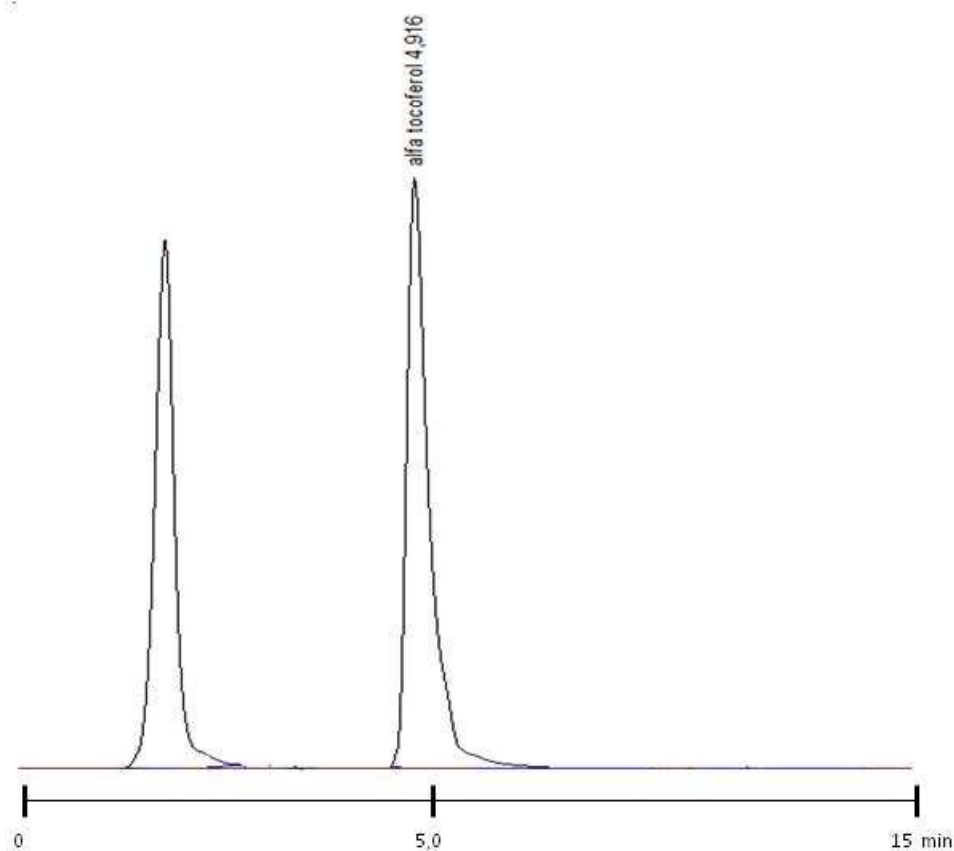


Figura 1. Cromatograma referentes ao tempo de retenção do α -tocoferol.
CLAE – Detetor de Fluorescência λ_{exc} 290 e λ_{em} 330nm.

Curva de calibração (linearidade)

As curvas de padronização do α -tocoferol apresentaram boa linearidade, no intervalo de concentração pré - estabelecido (Figura 2). Isto pode ser verificado pelos valores dos coeficientes de correlação, pois está muito próxima ao valor ideal 1,0, o que demonstra que há uma relação linear definida entre as variáveis X e Y, o que significa que 99,99 % da variação total em torno da média é explicada pela regressão, restando 0,01% para ser explicado pelos resíduos.

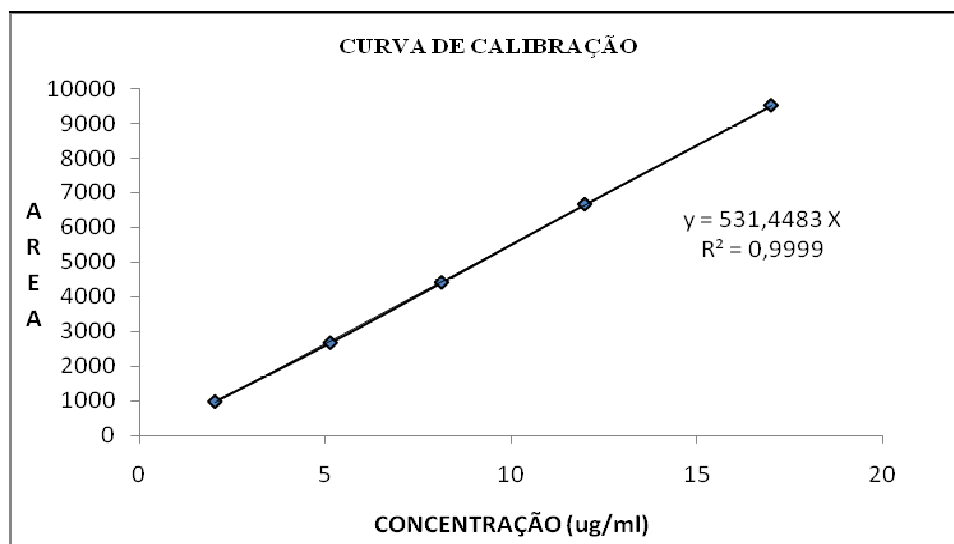


Figura 2. Curvas de calibração do α -tocoferol na faixa de concentrações de 2,025 a 17,0079 $\mu\text{g/mL}$.

Desta forma, a calibração externa realizada com o padrão de α -tocoferol, permitiu a determinação, nas faixas de concentrações usadas, a relação linear entre as concentrações e resposta do detector.

Validação do Método

Os parâmetros de validação do método determinado para o α -tocoferol são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros da validação na determinação do α -Tocoferol por CLAE.

Parâmetros de validação	α - tocoferol
Equação da curva analítica	Y= 531,4483X
R ²	0,9999
Repetibilidade (n=10)*	1,538
Reprodutibilidade (n=3)*	7,76
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,031
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,122

*Os parâmetros repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliados através do cálculo do desvio padrão relativo, DPR (%). LOD = Limite de detecção; LOQ = Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação (Tabela 1) encontrados para o α -tocoferol foram de 0,031 $\mu\text{g/mL}$ e 0,122 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Salovaananen *et al.*, 2000; Escriva *et al.*, 2002 e Gomis, 2000, relataram limites de detecção de 0,020 $\mu\text{g/mL}$, 0,083 $\mu\text{g/mL}$, e 0,031 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Isto demonstra que o método utilizado neste trabalho permite obter uma boa detecção do α -tocoferol no sistema cromatográfico.

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e reprodutibilidade, utilizando-se padrões. A tabela 1 aponta os desvios relativos (DPR) para a área obtida na repetibilidade de 1,538 %. Já a reprodutibilidade demonstrou resultado com um desvio relativo de 7,76 %. Enquanto os desvios relativos em relação ao tempo de retenção da substância ficaram abaixo de 0,82% para a repetibilidade e abaixo de 10% para a reprodutibilidade.

Em geral, tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade apresentaram valores de RSD menores do que 15%. O método está de acordo com as exigências de validação (Anvisa, 2003; Ribani *et al.*, 2004).

Finalmente com o objetivo de avaliar a robustez do método foram testadas duas variações em relação ao método original, como variação no fluxo na fase móvel ($\pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$) e proporção da fase móvel ($\pm 0,1\% \text{ v/v}$). A comparação entre as médias do método testado com o obtido no ensaio do método original forneceu valores menores que 2%. Desta forma, a metodologia desenvolvida foi considerada robusta. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados do ensaio de robustez expressos em média \pm desvio padrão.

Fluxo da Fase Móvel (- 0,1 mL min ⁻¹)	Fluxo da Fase Móvel (+ 0,1 mL min ⁻¹)	Proporção da Fase Móvel (-0,1% v/v)	Proporção da Fase Móvel (+0.1% v/v)
6.369,58 \pm 107,4 (1,68%)	6.338,11 \pm 144,4 (2,28%)	6.503,67 \pm 45,1 (0,69%)	6.438,1 \pm 149,8 (2,33%)

média do método original: 6.422,834.

2.4. CONCLUSÕES

A validação da metodologia analítica em estudo demonstrou-se apropriada para a finalidade pretendida, pois o método forneceu dados que comprovam que o mesmo é válido, uma vez que todos os parâmetros (linearidade, LD, LQ, precisão, robustez), no intervalo das concentrações analisadas, atenderam às exigências analíticas recomendadas pela Anvisa.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

AOCS, American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the AOCS. 4^a. ed. Champaign, 2004.

ESCRIVÁ, M., ESTEVE, P. S., FARRÉ, R., FRÍGOLA, A. Determination of liposoluble vitamins in cooked meal, milk and products by liquid chromatography. J. Chromatogr. A. v. 947, p. 313-318, 2002.

GOMIS, D.;B.; FERNANDEZ, K. P.; GUTIERREZ, A. MA. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in Milk by microcolumn liquid chromatography. J. Chromatogr. A. v. 891, p. 109-114, 2000.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I., C., S., F., MELO, L.; F., C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quimica Nova, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RODAS, M., MORERA, P. S., CASTELLOTE, B., LOPEZ-SABATER, M. C. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of vitamins A and E in infantis formulas. J. Chromatogr. A. v.1018, p.197-202, 2003.

SALO-VAANANEN, P.; OLLILAINEN, V.; MATTILA, P.; LEHIKONEN, K.; SALMELAMÖLSÄ, E.; PIIRONEN, V. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble

vitamins in selected animal products after small-scale extraction. Food Chemistry, v.71, p.535-543, 2000.

CAPITULO 3

PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS COM α -TOCOFEROL POR *SPRAY CHILLING*: CARACTERIZAÇÃO, ESTABILIDADE E LIBERAÇÃO

RESUMO

O α -tocoferol é um antioxidante natural que pode ser utilizado para enriquecimento de alimentos e aplicação em cosméticos e alimentos por apresentar atividade como vitamina E. Contudo, há a necessidade de proteção desse agente ativo por um método como o da microencapsulação. O objetivo deste trabalho foi microencapsular α -tocoferol por *spray chilling*, utilizando como agentes encapsulantes matrizes lipídicas interesterificadas quimicamente (algodão/palma e soja totalmente hidrogenada) sem isômeros *trans*, avaliando a eficiência de encapsulação e caracterizando a morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliando o tamanho médio das micropartículas por difração a laser (Mastersizer S). As variáveis de estudo foram a velocidade de homogeneização (3000 a 11000 rpm) e a concentração de tocoferol (5-25 g/100g). Para a obtenção das micropartículas, as matrizes lipídicas foram fundidas e mantidas em banho à temperatura de 65 °C. O α -tocoferol foi adicionado à matriz fundida seguido de homogeneização em ultra-turrax por 5 min. As soluções foram pulverizadas por atomizador duplo fluido aquecido a 65 °C e pressão de ar de 0,25 MPa, com a atomização efetuada dentro de uma câmara resfriada a 10 °C. Para a avaliação foi realizado um planejamento DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com duas variáveis independentes com 11 ensaios. A quantificação do α -tocoferol foi realizada utilizando técnica isocrática de CLAE. Os resultados apresentaram uma eficiência de encapsulação de tocoferol na faixa de 89,6 a 99,3%. Em geral, as micropartículas apresentaram formas esféricas com paredes rugosas, mas contínuas, sem rachaduras ou poros e com diâmetros médios que apresentaram valores entre 50,79 a 92,76 μm .

Para o estudo da estabilidade foi realizado um planejamento com quatro ensaios os quais foram submetidos à estocagem por 180 dias em três diferentes temperaturas (ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, em estufa 22°C e freezer -18°C), medidas de difração de raios-X (0, 60, 120, 180 dias) e medidas calorimétricas (tempo zero) foram efetuadas. A eficiência de encapsulação foi superior a 90%.

Os termogramas, obtidos por DSC, em tempo zero, não apresentaram diferenças entre os ensaios. Os difratogramas, obtidos por difração de raios-X, foram muito semelhantes entre os tratamentos e foi constatada a presença de 3 picos principais nos seguintes ângulos $2\theta = 19,3^{\circ} d = 4,6\text{Å}$, $2\theta = 22,8^{\circ} d = 3,8\text{Å}$ e $2\theta = 23,1^{\circ} d = 3,7\text{Å}$, que parecem estar associados à forma polimórfica β . As porcentagens de cristalinidade das formulações obtidas ao longo do tempo foram relativamente baixas, inferiores a 30%, sem diferença significativa com relação ao tempo de estocagem e muito próximas entre os ensaios. As curvas de liberação não apresentaram liberação inicial alta indicando a ausência de efeito “burst” e distribuição homogênea do material de recheio por toda a extensão da partícula.

Palavras chaves: Micropartículas, liberação, Spray chilling, Gorduras zero trans.

3.1. INTRODUÇÃO

Uma das recentes alternativas para proteger, prolongar a funcionalidade e controlar a liberação de um ingrediente de alimentos é o uso da microencapsulação (Shahidi & Han, 1993). O interesse industrial por essa tecnologia deve crescer rapidamente nos próximos anos, porque este pode levar a produtos com novas propriedades funcionais, mais estáveis e assim com maior vida útil. A incorporação de novas tecnologias é hoje no Brasil, essencial para que as mais variadas indústrias ofereçam produtos com maior valor agregado, o que representa uma vantagem na disputa por mercados internos e externos (Ré, 2000).

A Microencapsulação pode ser definida como a tecnologia usada para proteger as substâncias do meio ambiente devido à volatilidade e facilidade de oxidação na presença da luz, ar, umidade e temperaturas elevadas.

A microencapsulação de alimentos emprega formulações contendo o ingrediente a ser preservado em mistura com agentes encapsulantes dos mais variados: amido ou seus derivados, proteínas, gomas, lipídios, ou combinações entre estes agentes.

A utilização de lipídios para a produção de micropartículas é uma atraente alternativa como material de revestimento pela habilidade que têm de formarem uma variedade de estados morfológicos como emulsões, lipossomas e micropartículas sólidas, sendo usados principalmente na área farmacêutica há muito anos. A técnica de “*spray chilling*” tem sido utilizada com vantagem no processo exercendo efeito polimórfico nas propriedades de cristalização dos lipídios, consolidando um produto estável (Eldem *et al*, 1991a).

Na produção de micropartículas lipídicas sólidas (SLMP – solid lipid microparticles) por “*spray chilling*”, a massa do lipídio fundido junto com o material

de recheio é atomizado formando gotas que rapidamente solidificam-se em contacto com o frio (Magee & Olson, 1981a, 1981b). Na área de alimentos as SLMP tem sido desenvolvida para várias aplicações, incluindo vitaminas e minerais (Gibbs *et al.* 1999), glicose, bacto-peptona e enzimas (Magee & Olson, 1981a, 1981b), vitaminas hidrossolúveis, peptídeos e outras substâncias bioativas (Onal & Langdon, 2004a, 2004b).

Apesar da facilidade da produção e da possibilidade da fabricação industrial, as micropartículas (SLMP) ou nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) podem apresentar algumas desvantagens. Dentre elas estão incluídas a baixa capacidade de encapsulação e expulsão do material de recheio durante o armazenamento devido à estrutura cristalina e às características dos planos polimórficos lipídicos durante o processo de solidificação e cristalização nos sítios amorfos da matriz transportadora (Westesen *et al.* 2005).

Para evitar este problema, micropartículas lipídicas denominadas como lipídios nano-estruturados (NLC) tem sido propostas com o objetivo de incrementar a capacidade de carga das partículas e minimizar a expulsão do material do núcleo (Jenning *et al.* 2000; Muller *et al.* 2002, Siekmann & Westesen, 1992; Muller *et al.* 2000)

Este trabalho tem como objetivo o estudo de um processo de microencapsulação de tocoferóis por “*spray chilling*” empregando misturas lipídicas obtidas de (óleo de algodão interesterificado com óleo de palma totalmente hidrogenado) e óleo de soja totalmente hidrogenado, constituindo misturas sem isômeros trans.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Materiais

- Lipídios interesterificados (LI) (óleo de algodão (AO) interesterificado com óleo de palma totalmente (PTH)), refinados e desodorizados, produzidos na Unicamp (Laboratório de Óleos e Gorduras: Engenharia de Alimentos).

A reação de interesterificação química foi realizada conforme as condições descritas por Grimaldi e colaboradores (2005), de acordo com o que segue abaixo:

- 200 g das matérias-primas nas devidas proporções: óleo de algodão (65% m/m) e óleo de palma 100% hidrogenado (35% m/m), em recipiente kitassato;
 - Fusão, mistura e secagem a vácuo dos óleos sob agitação magnética e aquecimento de 100° C por 30 min;
 - Adição do catalisador metóxido de sódio na proporção de 0,4% em relação ao peso de óleo (0,8 g / 200 g de óleo);
 - Reação sob agitação, vácuo e temperatura de 100° C por 20 min;
 - Adição de solução aquosa de ácido cítrico a 5% m/m (1,4 g) para interromper a reação;
 - Lavagem com água quente e ácido cítrico até remoção dos sabões à neutralidade do óleo.
 - Secagem a vácuo sob agitação e temperatura de 100° C, até obtenção de meio lipídico transparente.
-
- Óleo de Soja totalmente hidrogenado (OSTH) industrialmente, fornecido pela Ind. Triângulo Alimentos.
 - Material ativo para ser encapsulado : α -Tocoferol : Roche (E307*), Code: 0410276004, Lote: UT01110039, (pureza 95%).
 - Óleo de girassol comercial Sadia.

- Enzima lipase pancreática suína adquirida da Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, EUA, cod. P-7012, lote: 09K7356).
- Hexano (Burdick & Jackson) e Isopropanol (marca EM Science) com grau cromatográfico CLAE.

3.2.2. Equipamentos

Atomizador duplo fluido (parte integrante do mini Spray Dryer Büchi-191, diâmetro de “nozzle” de 0,7 mm, Flawil, Suíça), Câmara fria para a solidificação das partículas (Ultratorac, LKB – Bromma, Alemanha), Ultra-Turrax mod. T18 marca IKA, banho-maria marca Marconi, pHmetro Digimed mod. MD20, balança analítica Ohaus mod. AS200, balança semi-analítica Marte mod. AS2000c. Ainda foram utilizados, Homogeneizador rotativo para tubos Phoenix mod. AP22, microscópio ótico Jenaval e Nikon Eclipse E800 (Tokio, Japan) e os equipamentos cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Perkin Elmer mod. 250 para quantificação de tocoferóis. O estudo de estabilidade foi efetuado em estufa de B.O.D. Modelo 347 CD (Fanem, Brasil)

3.2.3. Caracterização da matriz lipídica

A caracterização da matriz lipídica interesterificada quimicamente (LI) utilizada neste trabalho foi realizada pela Dra. Denise Fabiana Silvestre Becker de Almeida (2008) em relação a:

- Determinação de ponto de fusão
- Composição em Ácidos graxos (AG)
- Composição triacilglicerólica (TAG)
- Curva de sólidos
- Consistência
- Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)
- Curvas Isotérmicas de cristalização

- Microscopia dos cristais sob luz polarizada
- Diâmetro médio dos cristais

3.2.4. Produção de micropartículas lipídicas (MpL) – Ensaio Preliminares

3.2.4.1. Determinação da proporção da matriz lipídica (parede)

Para obter micropartículas lipídicas (MpL) pelo processo de “*spray chillig*”, a matriz lipídica foi definida com base no perfil de fusão e no aspecto estável destas após pulverização a temperatura ambiente (25°C). Foram realizados testes com misturas de lipídios interesterificados (LI) com ponto de fusão de 42°C, com óleo de soja 100% hidrogenado (OSTH) com ponto de fusão aproximado de 70°C, nas proporções descritas na Tabela 1. Para a determinação do ponto de fusão foi empregado tubo capilar aberto, de acordo com o método Cc 3-25 da A.O.C.S. (2004).

Tabela 1. Proporções da matriz lipídica.

Amostra	Proporções (%)	
	¹ LI	² OSTH
1	40	60
2	60	40
3	70	30
4	80	20

¹ Lipídio interesterificado- 65% AO : 35% PTH; ² Oleo de soja totalmente hidrogenado

As frações interesterificadas foram advindas da interesterificação química de óleo de algodão (OA:65%) com óleo de palma 100% hidrogenado (PTH:35%) sem isômeros trans e para melhorar a resistência mecânica de parede das micropartículas foi utilizado o óleo de soja 100% hidrogenado sem isômeros trans nas proporções apresentadas na Tabela 1.

3.2.4.2. Determinação das proporções entre mistura lipídica e recheio

A escolha das proporções adequadas entre a mistura lipídica e recheio na produção das micropartículas lipídicas (MpL) foi realizada através da formação de soluções com diferentes teores dos dois componentes. Foram preparadas matrizes lipídicas (lipídios interesterificados e óleo de soja 100 % hidrogenado (OSTH) com α -tocoferol. Estas misturas foram testadas em diferentes proporções, sendo homogeneizadas com o Ultra-Turrax a 3000 e 11000 rpm por 5 min. A temperatura das misturas foi mantida a 65°C com banho maria. As misturas foram avaliadas visualmente levando-se em conta à estabilidade da solução, viscosidade e formação de micropartículas após pulverização.

3.2.4.3. Determinação dos parâmetros para produção das micropartículas lipídicas (MpL)

Simultaneamente foram realizados testes preliminares para conhecimento do funcionamento do equipamento (Figura 1), variando-se parâmetros como: Diâmetro do bico atomizador (1,5; 1,0 e 0,7mm)/ Temperatura de injeção da amostra no bico atomizador (60, 65, 70 e 75°C)/ Temperatura da camisa do bico atomizador (faixa 60-70°C)/ Pressão do ar (0,1 a 0,5 MPa). A temperatura e a distância a ser percorrida pela solução até o ponto do encontro com a superfície fria, fornecida por uma câmara fria, foram mantidas constantes, pelo fato do equipamento não poder ser alterado em sua estrutura. Não foram avaliados os fluxos de material introduzido no bico atomizador em função da precariedade do protótipo utilizado.

Um produto teste (70 I: 30 OSTH) com as variáveis citadas, em diferentes experimentos foi submetido ao processo de encapsulação apenas após visualização sob microscópio sobre formação ou não de uma cápsula.

3.2.5. Processo de produção de micropartículas lipídicas (MpL)

Para a obtenção de micropartículas por *spray chilling*, foram utilizados como agente encapsulante matrizes lipídicas compostas por lipídios interesterificados sem isômeros *trans* com óleo de soja totalmente hidrogenado na relação de 70:30% m/m respectivamente, e como substância ativa a ser encapsulada α -tocoferol nas concentrações de 5 a 25 g/100 g. As matrizes lipídicas foram fundidas e mantidas em banho à temperatura de 65 °C. O α -tocoferol (concentração diferenciada) foi adicionado seguido de homogeneização em Ultra-Turrax (rotação conforme planejamento) por 5 min. As micropartículas lipídicas sofreram pulverização em atomizador duplo fluido (diâmetro de nozzle de 0,7 mm) aquecido também a 65 °C e pressão de ar de 0,25 Mpa, com a atomização efetuada dentro de uma câmara resfriada (Ultratorac, LKB – Bromma, Germany) a 10 °C conforme esquema de equipamento apresentada na Figura 1.



Figura 1. Foto da montagem do equipamento "*Spray Chilling*" para a produção de micropartículas lipídicas.

3.2.6 Planejamento experimental

Para o estudo da produção de micropartículas lipídicas contendo tocoferóis foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) $2^2 + 4$ pontos axiais + 3 repetições no ponto central. A Tabela 2 apresenta os valores utilizados no planejamento para as variáveis independentes: velocidade de homogeneização e proporção lipídio: recheio a Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento. Para a análise do planejamento completo foi utilizado o programa STATISTICA 9.0 (Experimental Design: Central Composite Design).

Tabela 2. Variáveis independentes pré-estabelecidas para otimização da eficiência da microencapsulação de α -tocoferol.

Variáveis	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Recheio (%)	5	10	15	20	25
Velocidade de homogeneização (rpm)	3,000	5,000	7,000	9,000	11,000

Tabela 3 Modelo experimental com valores reais e codificados para eficiência da microencapsulação de α -tocoferol.

Ensaio	Real		Codificados	
	R (%)	H (rpm)	X ₁	X ₂
1	10	5000	-1	-1
2	20	5000	+1	-1
3	10	9000	-1	+1
4	20	9000	+1	+1
5	5	7000	-2	0
6	25	7000	+2	0
7	15	3000	0	-2
8	15	11000	0	+2
9	15	7000	0	0
10	15	7000	0	0
11	15	7000	0	0

R - Recheio (%); H –velocidade de homogeneização no ultra-turrax (rpm/5min).

3.2.7 Determinação de Tocoferol

3.2.7.1. Metodologia

A separação, identificação e quantificação de tocoferóis, presente nas micropartículas obtidas por *spray chilling*, foi realizada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme o método AOCS Ce 8-89 (2004). O procedimento do método é descrito para a determinação de tocoferóis em amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); partindo-se do

princípio de que o óleo, ou a gordura, foi dissolvido em um solvente orgânico e submetido à separação dos tocoferóis em coluna de fase normal. A concentração em tocoferóis contidos na amostra foi expressa em mg/100g de amostra microencapsulada.

Para a extração do α -tocoferol foram tomadas 0,05 g de micropartículas, que transferiu-se para um valão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com hexano e colocado em ultrasom por dez (10) minutos para completa dissolução. Um mL da solução foi pipetada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completado com hexano. As amostras diluídas foram injetadas no cromatografo líquida de alta eficiência (CLAE) e logo quantificadas.

Para realização das análises cromatográficas o solvente orgânico hexano utilizado na diluição dos ensaios e os utilizados como fase móvel na separação cromatográfica: hexano, isopropanol possuíam grau cromatográfico CLAE. Todos os componentes da fase móvel foram devidamente filtrados para remover partículas maiores do que 0,45 μ m e degaseificados utilizando banho ultrassônico, vácuo e agitação simultaneamente.

A realização da filtração para eliminação de partículas maiores do que 0,45 μ m devem ser efetuadas para evitar possíveis entupimentos nas tubulações do equipamento cromatográfico, que possuem diâmetro de 2,0 μ m. A filtração também permite a retirada de gases dissolvidos nos solventes para a obtenção de uma linha de base estável e evita a variação nos tempos de retenção das substâncias. Ao realizar a filtração da fase móvel, também é necessário observar a compatibilidade química das membranas. Foram utilizadas membranas SARTORIUS de 0,45 μ m de diâmetro.

3.2.7.2. Equipamento e condições operacionais

As análises de tocoferóis foram conduzidas utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Perkin-Elmer 250, tendo-se como detector

de fluorescência Perkin Elmer, series 200 a em condição isocrática. As separações foram conduzidas utilizando-se uma coluna Hibar RT 250 x 4,0 mm, series 200 Li Chromosorb Si 60, 5 μm e fase móvel de hexano:isopropanol (99:1, v:v), caracterizando uma cromatografia de fase normal. A detecção dos tocoferóis foi realizada por fluorescência utilizando λ de excitação igual a 290 nm e λ de emissão de 330 nm. As injeções foram realizadas com um loop de 20 μL e o fluxo de fase móvel foi de 1mL/min à temperatura ambiente. O processamento dos dados foi realizado através do Peak Simple Chromatography Software.

3.2.7.3. Identificação e Quantificação

O Padrão de α -Tocopherol (Cat 613424 – Celbiochem), com pureza de 95%, foi diluído em hexano e injetado no cromatógrafo para determinação do tempo de retenção. Por comparação dos tempos de retenção dos picos presentes na amostra em análise com o tempo de retenção obtido com o padrão, o tocoferol presente na amostra foi identificado. Soluções com concentrações de tocoferóis entre 2,0250 e 17,0079 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas para construção de curvas de calibração utilizadas na quantificação dos tocoferóis. Cada ponto da curva de calibração corresponde à média de cinco injeções. Para permitir as análises destes ensaios por CLAE, estas foram diluídas em hexano. A concentração das soluções variou em função da concentração de α - tocoferol presente em cada amostra, de forma que a concentração destas substâncias não ultrapassasse a escala de detecção.

O cromatograma obtido foi integrado através do sistema automático Peak Simple, para fornecer a área de cada pico presente. O valor da área foi interpolado na curva de calibração e forneceu um valor de concentração. Como a amostra foi diluída, o valor de concentração obtido deve ser corrigido, dividindo-o pela concentração da solução, a fim de indicar a concentração no material original. Os resultados foram avaliados em termos da quantidade total de tocoferol. O cálculo da concentração de tocoferol realizou-se utilizando a Equação 1.

$$C_{amostra} \left[\frac{\mu\text{g tocoferol}}{100 \times \mu\text{g amostra}} \right] = \frac{\text{concentração de tocoferol na solução} \left[\frac{\mu\text{g tocoferol}}{\text{mL}} \right]}{\text{concentração da solução} \left[\frac{\mu\text{g de amostra}}{\text{mL}} \right]} \times 100 \quad (1)$$

3.2.8. Determinação da Eficiência de Encapsulação (% EE)

A eficiência de encapsulação para as micropartículas produzidas em cada ensaio do planejamento experimental foi calculada como a quantidade de tocoferol presente nas micropartículas, em relação ao tocoferol inicialmente utilizado na produção das mesmas. O cálculo foi determinado como se segue:

$$EE (\%) = \frac{\text{Tocoferol quantificado}}{\text{Tocoferol inicial utilizado}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.9. Morfologia das micropartículas lipídicas (MpL)

Para observação da morfologia e distribuição por microscopia eletrônica de varredura, os produtos encapsulados foram fixados em stubs de alumínio com uma fita de cobre dupla face e cobertas com uma fina camada de ouro em sputter Balzers SCD50 (Baltec, Liechtensten) com corrente de 40 mA por 75 segundos. As imagens foram captadas por microscópio eletrônico de varredura Jeol JMS-T300 (Tokyo, Japan), com aceleração de voltagem de 10 kV e aumentos de 300x e 2500x. Este equipamento está disponível na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp–Laboratório Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC).

3.2.10. Distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas lipídicas (MpL)

As micropartículas foram avaliadas quanto ao tamanho médio e a distribuição de tamanho por difração de luz laser usando um Analisador Mastersizer (MAM 5005, Malvern, Germany) com unidade de dispersão Sample Suspension Unit. Para a análise as micropartículas foram colocadas em 400 mL de água e 3mL de tween, deixando estabilizar por 2 minutos. Após este tempo o ensaio foi submetido a Ultrassom deixando o mesmo estabilizando o ensaio por 10 minutos. Este equipamento está disponível na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp – Laboratório Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC).

3.2.11. Estudo da Estabilidade das micropartículas lipídicas (MpL)

Para o estudo da estabilidade das micropartículas lipídicas contendo tocoferóis foram produzidos quatro ensaios (Tabela 4) seguindo a mesma metodologia descrita em 3.2.5.

Tabela 4. Codificação de ensaios com teores variáveis de tocoferóis como recheio.

Ensaio	Proporção: *Lípido/Recheio (% m/m)
A	90:10
B	80:20
C	95:5
D	85:15

*Lípido: 70/30 (% m/m), 70 LI / 30 Osth

Os quatro ensaios produzidos foram colocados em placas Petri (Figura 2) e submetidos a estocagem por 180 dias em três diferentes temperaturas (BOD a

22°C escuro, temperatura ambiente 25°C±5°C e -18°C) . Os ensaios foram analisados por calorimetria diferencial de varredura (DSC) em corridas de fusão e de cristalização após a produção; foram determinadas a eficiência de encapsulação e análises de difração de raios-X, nos tempos de 0, 60, 120, e 180 dias.



Figura 2. Disposição de amostras em estocagem a 22 °C escuro (BOD).

3.2.11.1. Análise Térmica (DSC)

As curvas de cristalização e fusão de micropartículas de tocoferol em diferentes concentrações foram obtidas por análise calorimétrica de varredura, utilizando-se equipamento DSC Perkin Elmer TA7 (Germany), com módulo de resfriamento com refrigeração automática.

As análises foram conduzidas com aproximadamente 10 mg das micropartículas em cápsulas de alumínio herméticas em atmosfera inerte (N₂), segundo a metodologia da *American Oil Chemists' Society*, método Cj 1-94 da AOCS (2004). A amostra foi submetida ao seguinte programa de temperatura: permanência a 80°C por 10 minutos, decréscimo de 80 °C a -40°C a uma taxa de resfriamento de 10°C /min, manutenção a -40°C por 30 minutos e aquecimento de

-40°C a 80°C a uma taxa de aquecimento de 5°C/min. A curva de fusão foi obtida no segundo aquecimento (amostra homogênea).

Nos termogramas, a temperatura de início (onset) é aquela na qual se inicia o processo (de cristalização ou de fusão), a temperatura final é aquela na qual o processo termina, a temperatura do pico é aquela na qual o efeito é máximo, e a área mostra a intensidade do efeito (entalpia).

Os termogramas obtidos foram normalizados com base na massa dos ensaios. Através do *software* do equipamento, foram determinadas as temperaturas iniciais de fusão e cristalização (*Onset*), as temperaturas dos picos endotérmicos e exotérmicos (*Peak*), as temperaturas finais de fusão e cristalização (*Endset*), as áreas dos picos (mJ) e as entalpias de transição de fases (ΔH , J.g⁻¹).

A Figura 3 mostra um resultado típico da análise das propriedades térmicas e no termograma estão assinalados a Temperatura de Início de Fusão (°C), Temperatura de Pico (°C) e a Temperatura de Fusão (°C). A Entalpia de Fusão (DH) foi determinada pela integração da área sob a curva selecionada a partir das Temperaturas de Início da Fusão (*T_{onset}*) e da Temperatura de Fusão (*T_{endset}*).

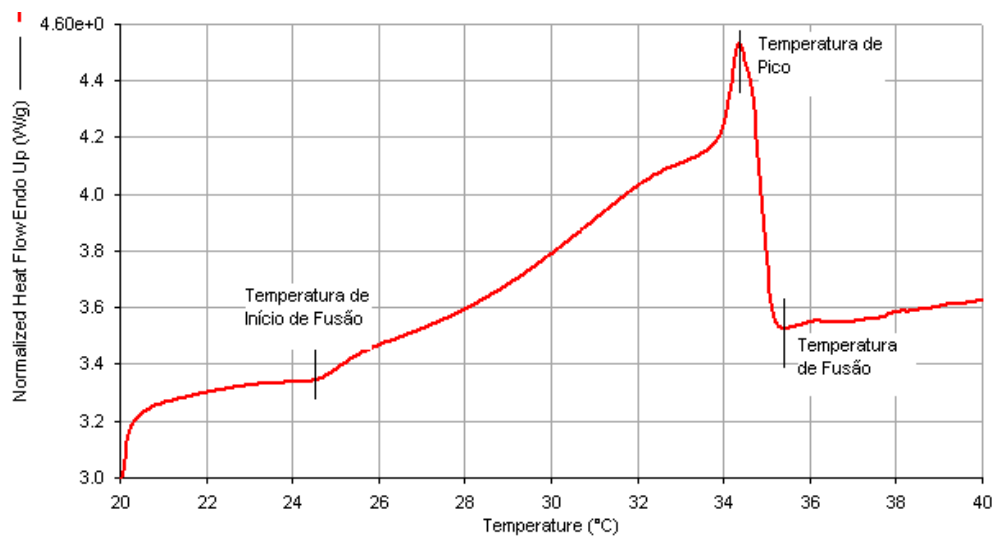


Figura 3. Termograma típico obtido com o DSC, com indicação da *T_{onset}*, *T_{máx}* e *T_{endset}*, em (°C).

3.2.11.2. Difração de Raio-X

As modificações da cristalinidade nas micropartículas lipídicas foram analisadas em temperatura ambiente em Difractometria de Raios-X após 180 dias de estocagem (a 22, 25 e -18°C). Os difratogramas foram obtidos utilizando aparelho Shimadzu modelo XRD 7000 (Tokyo, Japan). Foram usadas radiação de cobre ($\alpha = 1,54060$), voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA, intervalo de medida em ângulo 2θ de 5 a 35 graus, com tamanho de passo de 0,02 graus, usando contagem de tempo de 0,03%seg a temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). O aparelho foi equipado com fenda de divergência de 1 grau e fenda receptora de 0,30 mm, de acordo com metodologia do grupo de pesquisa do Laboratório de Difração de Raios-X – Engenharia Química da Unicamp.

O Índice de Cristalinidade Relativa (I_c) foi quantitativamente estimado de acordo com o método proposto por Hermans & Weidinger (1948) e modificado por Rabek (1980), conforme a Figura 4. O Índice de Cristalinidade é definido como a razão entre a área da região cristalina (A_c) e a área total coberta pela curva ($A_c + A_a$), composta pela área da região cristalina (A_c) e a área da região amorfa (A_a), a partir da Equação (3).

As cristalinidades relativas dos ensaios foram calculadas, com auxílio do programa Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA), através da seguinte equação:

$$I_c = \frac{A_c}{A_c + A_a} \quad (3)$$

Onde: I_c = Índice de Cristalinidade Relativa, A_c = Área da região cristalina da curva, A_a = Área da região amorfa da curva.

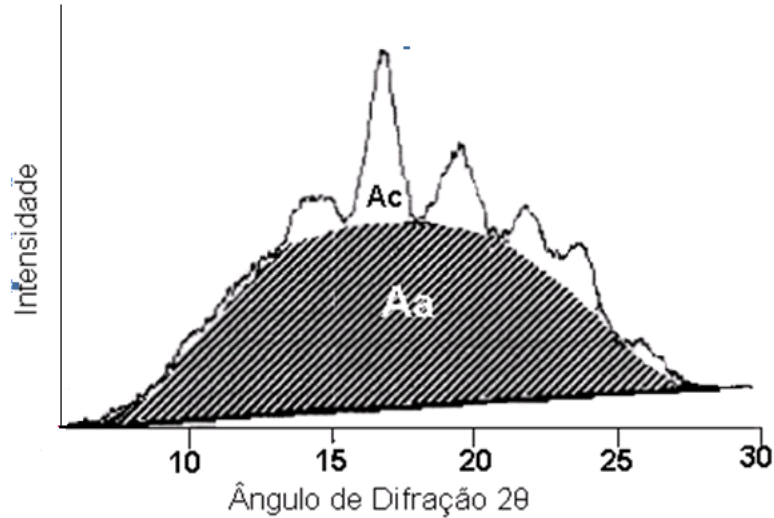


Figura 4. Difratograma de Raios-X, explicativo do método de determinação de Índice de cristalinidade relativa.

3.2.12. Avaliação da Resistência das micropartículas lipídicas (MpL) em meio ácido

Com a finalidade de testar a resistência das micropartículas baixo condições gástricas de pH e conhecer sua viabilidade no trato instestinal foi realizado este estudo.

Micropartículas foram pesadas (100 mg) para avaliar a integridade da parede, adicionando-se 1 mL de solução aquosa ajustada a pH 1,2 com HCl 0,1N a temperatura de 37°C por 2 horas sem agitação. Após o tratamento, as imagens foram observadas em microscópio óptico (Jenaval, Carl Zeiss, Germany) com objetiva de 12,5x e optovar 1,0x, câmera H-1 (China), software FT EDN-2, Microscopy Image processing system.

3.2.13. Avaliação da ação enzimática (Lípase pancreática) sobre as micropartículas lipídicas (MpL)

Simulando as condições intestinais, a viabilidade de absorção no trato intestinal foi testada frente à lipase pancreática em pH 7. De acordo com a

metodologia citada por (Bernejo *et al.*, 2002 e Intawongse & Dean, 2006), com adaptações. Para cada ensaio foram pesadas 5,0 mg de micropartículas, adicionado-se 1 mL de solução de lipase pancreática (2,0 mg/mL em NaHCO₃ 0,1N) com ajuste para pH 7,0 e incubada por 4 horas em banho-maria a 37°C. Após o tratamento as micropartículas foram observadas utilizando-se microscópio óptico (Jenaval, Carl Zeiss, Germany) com objetiva de 12,5x e optovar 1,0x, câmera H-1 (China), software FT EDN-2, Microscopy Image processing system.

3.2.14. Avaliação da liberação do recheio

A porcentagem de recheio liberado foi determinada em tempos 0, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas à temperatura ambiente. Para cada ensaio foram pesados 100 mg de micropartículas em tubo de ensaio com tampa, e então acrescentados 20 mL de óleo de girassol. Os tubos foram vedados com o auxílio de fita veda roscas e protegidos com papel alumínio para evitar possível degradação do tocoferol. Estes foram colocados sob agitação em agitador rotativo de tubos Phoenix AP-22 (São Paulo, Brasil) e, em cada intervalo de tempo, a solução foi filtrada em lã de vidro. Para cada tempo foram preparadas três replicatas. O conteúdo deste filtrado foi quantificado por CLAE quanto ao conteúdo de tocoferol liberado (Figura 5).

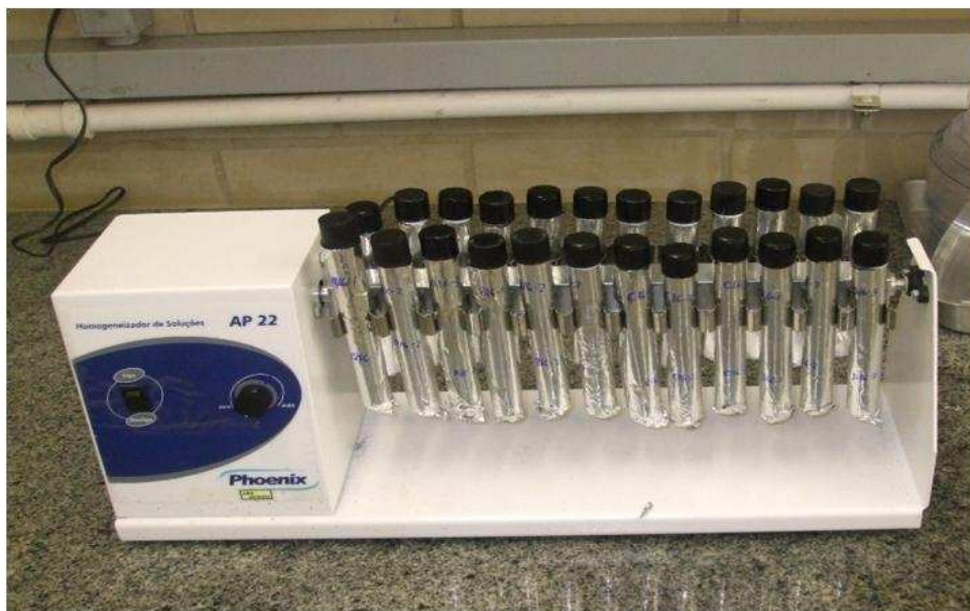


Figura 5. Sistema agitação na avaliação da liberação das micropartículas lipídicas

3.2.15. Análise estatística

As diferenças significativas entre os valores obtidos foram avaliadas por análise de diferença de médias no intervalo de 95% de confiança de acordo com o teste de TUKEY e ANOVA, com auxílio do software *Statística 5.5 for Windows* (Statsoft Inc., 1995).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Caracterização da matéria prima

Tabela 5 . Caracterização da matriz lipídica interesterificada óleo de Algodão/PTH (65:35).

Composição Ac. Graxos (%)	TAG (%)	Grupos de TAG (%)	Textura gf/cm²	Ponto de fusão (°C)
C16:0- (29,5)	POO- (13,1)	UUU- (18,7)	1240,6	42
C18:0- (19,1)	PLL- (11,6)	SUU- (34,5)		
C18:1- (12,7)	POL- (8,2)	SSU- (27,6)		
C18:2- (35,5)	PPL- (14,1)	SSS- (19,2)		
S= 50,1	PPS- (8,5)			
M= 13,1	PPP- (5,5)			
P= 35,6				
P/S= 0,7				

S= Saturado; M= Monoinsaturado; P/S= Relação polinsaturado / saturado
L= linoléico; O= oléico; P= palmítico; S= esteárico.
Fonte : Silvestre, 2008.

Tabela 6. Caracterização da matriz lipídica interesterificada Lipídio interesterificado/ Osth (70:30)

Composição Ac. Graxos (%)	Grupos predominantes de TAG (%)	Polimorfismo	Textura gf/cm²	Ponto de fusão (°C)
S=65,3	SSS- (43,4)	Beta	5368,2	60,8
P= 25				
P/S= 0,38				

S= Saturado; P/S= Relação polinsaturado / saturado

3.3.2. Produção de micropartículas lipídicas (MpL)– Ensaios preliminares

3.3.2.1. Determinação da proporção da matriz lipídica

A composição entre o lipídio interesterificado e Osth permitiu a obtenção de misturas com pontos de fusão variados, apresentados na Tabela 7 para as quatro proporções de misturas desses lipídios. Observa-se que as misturas 2 e 3 apresentaram ponto de fusão muito próximos em torno de 60°C. No entanto a mistura 3, foi escolhida por apresentar as seguintes características: 1- Ótimo ponto de fusão com menor porcentagem de ácidos graxos saturados; 2- Boa estabilidade após pulverização apresentando micropartícula bem soltas, além de apresentar características físicas boas quanto à textura ou qual comunica uma resistência mecânica de parede para as microcapartículas.

Tabela 7. Temperatura de fusão das misturas lipídicas nas proporções descritas e das matrizes puras (média ± desvio padrão)

Amostra	Proporções (%)		P.F (°C)
	¹ LI	² OSTH	
Matriz A	100	0	42.0 ± 038
Matriz B	0	100	70.0 ± 0,22
Mistura 1	40	60	66.8 ± 0,5
Mistura 2	60	40	61.3 ± 0,25
Mistura 3	70	30	60.8 ± 0,42
Mistura 4	80	20	58.3 ± 0,25

¹ Lipídio interesterificado : 65% OA / 35% PTH; ² Oleo de soja 100% hidrogenado
PF= Ponto de fusão

A textura de um lipídio é uma das propriedades físicas importantes das gorduras, pois se encontra diretamente associada às diversas aplicações. Esta propriedade pode ser considerada como um aspecto funcional e relevante das gorduras, que são misturas de cristais de gordura sólida e óleo líquido. Os cristais de gordura formam uma rede tridimensional, que comunica plasticidade ao material. Dados complementares desta fração interesterificada escolhida são mostradas no ANEXO.

3.3.2.2. Determinação das proporções entre mistura lipídica e recheio

Para a etapa inicial da produção de micropartículas lipídicas foi necessária a formação de uma solução entre a matriz lipídica e o produto ativo. As características desejadas para as soluções formadas foram: 1 – estabilidade visual da solução; 2 – viscosidade aparente que permita o escoamento e a atomização; 3 – formação de micropartículas com maior quantidade possível de recheio. Foram testados recheios que contemplassem a partir da concentração máxima de tocoferol, uma dosagem que não ultrapassasse os valores de ingestão diária (15 mg/dia para adultos) aceitável na porção de encapsulado. Nesta hipótese foram escolhidas faixas entre 5 a 25 % de recheio nas cápsulas (5 a 25 g α -tocoferol/100 g de produto). Os resultados preliminares mostraram que as proporções acima de 25% de recheio produziram soluções muito viscosas dificultando o escoamento na atomização e as micropartículas obtidas apresentaram muitos agregados. No caso das outras combinações, as soluções apresentaram uma viscosidade suficiente para permitir a atomização, sendo usadas no planejamento experimental, as proporções 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 e 75:25.

3.3.3. Processo de produção das micropartículas lipídicas (MpL)

O planejamento experimental apresentado na Tabela 3 mostra as condições estudadas para produção das micropartículas lipídicas. Foi observado que para todos os ensaios conduzidos, conforme o planejamento experimental houve a formação de micropartículas lipídicas. Assim mesmo, observou-se que visualmente as micropartículas apresentaram-se bem dispersas com exceção do ensaio 6, em que as micropartículas se apresentaram mais aglomeradas dificultando a sua análise. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os ensaios, e partindo-se de uma concentração diferente de tocoferol em 4 níveis foram selecionados os ensaios 1, 4, 5 e 9 para seguir no estudo de caracterização, estabilidade e liberação, e posteriormente ser utilizado na

aplicação de um sistema alimentício. Os ensaios foram identificados com as letras A, B, C e D, respectivamente para estudos posteriores neste trabalho.

3.3.4. Quantificação de Tocoferóis

3.3.4.1. Detecção dos Tocoferóis por CLAE

A detecção foi realizada em detector de fluorescência, pois os tocoferóis também são detectáveis por fluorescência e este parâmetro é muito utilizado, pois confere à detecção uma maior sensibilidade e especificidade. De acordo com as condições propostas o tempo de retenção de eluição para α - tocoferol foi de 4,916 min.

3.3.4.2. Determinação dos Parâmetros da Calibração

A calibração do cromatógrafo líquido foi feita para o detector de fluorescência (excitação 290 nm e emissão 330 nm) e está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8. Modelo de regressão linear, obtido em CLAE, para detector de fluorescência (excitação 290 nm e emissão 330 nm) para α -tocoferol.

TOCOFEROL	CONCENTRAÇÃO	MODELO DE REGRESSÃO	R ²
Alfa	2,0250 a 17,0079 g/mL	Y= 531,4483X	0,9999

Desta forma, a calibração externa realizada com o padrão de α -tocoferol permitiu a determinação, nas faixas de concentrações usadas, a relação linear entre as concentrações e a resposta do detector. A etapa seguinte foi a de quantificação destes compostos. Na Tabela 9 estão apresentadas as concentrações de tocoferol presentes nas micropartículas. Pode-se observar que

os resultados mostraram uma alta concentração de tocoferol que foi encapsulado variando de 4,5 a 23,4 mg/100 g. (Valores nominais de 5,0 a 25 mg/100 g.

Tabela 9. Concentração média (mg/100g de cápsula) de tocoferol presente nas micropartículas.

ENSAIOS	CONCENTRAÇÃO MÉDIA (mg/100g de cápsula)	C.V
1	9672,06	0,45
2	18310,62	0,94
3	9579,26	1,19
4	18311,14	1,14
5	4483,81	0,07
6	23365,65	1,00
7	13609,43	0,60
8	14813,34	0,29
9	14895,63	0,50
10	14085,87	4,74
11	14041,07	0,90

n=3 (repetições por ensaio). C.V. = coeficiente de variação.

3.3.5. Determinação da eficiência de encapsulação

A Tabela 10 apresenta as porcentagens da eficiência de microencapsulação total determinadas nos ensaios, um dia após a produção das micropartículas. Estes resultados mostraram altas porcentagens de encapsulação (89,6 a 99,3%). Isto pode ser devido à composição da matriz lipídica utilizando o lipídio interesterificado e Osth que diferem quanto ao comprimento da cadeia carbônica e, conseqüentemente, quando aos pesos moleculares dos ácidos graxos que prevalecem na sua composição. Associado a estes fatores, temos que

formas polimórficas das matrizes são diferentes: o lipídio interesterificado cristaliza na forma β prima, enquanto que Osth cristaliza na forma β . Desta forma, estas diferenças fazem com que o empacotamento molecular na grade cristalina fique muito dificultado ou altamente imperfeito, levando à tendência de se aumentar a retenção do recheio, por dificultar a organização cristalina e a alteração polimórfica, resultando em maior espaço para a acomodação do recheio (Müller, Radtke & Wissing, 2002a; Müller Radtke & Wissing, 2002b; Schubert & Müller-Goymann, 2005). Assim mesmo a solubilidade existente entre o recheio e a matriz lipídica é outro fator que pode ter contribuído para lograr uma alta eficiência de encapsulação.

Tabela 10. Modelo experimental com valores reais e codificados para otimização da microencapsulação de α -tocoferol

Ensaio	V alores Experimentais				X Eficiência (%)	Y Concentração mg/100 g de cápsula
	Real		Codificados			
	R (%)	H (rpm)	X ₁	X ₂		
1	10	5000	-1	-1	96,7	9672,06
2	20	5000	+1	-1	91,5	18310,62
3	10	9000	-1	+1	95,8	9579,26
4	20	9000	+1	+1	91,6	18311,14
5	5	7000	-2	0	89,6	4483,81
6	25	7000	+2	0	93,5	23365,65
7	15	3000	0	-2	90,7	13609,43
8	15	11000	0	+2	98,7	14813,34
9	15	7000	0	0	99,3	114895,63
10	15	7000	0	0	93,9	14085,67
11	15	7000	0	0	93,6	14041,07

R - Recheio (%); H –velocidade de homogeneização no ultra-turrax (rpm/5min).

A literatura relata que altas eficiências de encapsulação utilizando matrizes lipídicas na produção de micropartículas por *spray chilling* foram anteriormente obtidas. Na encapsulação de glicose em matriz lipídica contendo ácido esteárico, ácido oléico e gordura vegetal hidrogenada e como tensoativo a lecitina foram obtidas eficiências de 78,3 a 97,8% (Leonel *et al*, 2010). Matrizes lipídicas compostas por triacilgliceróis de cadeia média encapsulando isoflavonas apresentaram eficiências de encapsulação variando de 57 a 70%, sendo que este aumento acompanhou um simultâneo aumento da proporção de lipídio em relação à quantidade de recheio no meio (Jeon *et al*, 2005).

Em estudo, avaliando-se diferentes matrizes lipídicas e tensoativos, foram observadas, em todas as formulações testadas, altas eficiências de encapsulação, acima de 98,5% (Quintanar *et al* 2005). Na encapsulação de solução de glicose em matriz lipídica contendo gordura de leite e os tensoativos Span 60 e Glicomul, obtiveram-se eficiências de encapsulação variando de 80 a 90% (Magee & Olson, 1981). Na encapsulação de recheios lipofílicos em matriz lipídica usando como tensoativo a lecitina de soja, em todos os recheios testados a eficiência de encapsulação ficou entre 85 e 95% (Zur, Schwarz & Mehnert, 1998). Na encapsulação de tetracaína por diferentes tipos de triacilgliceróis e lecitina ou poloxamer 188 como tensoativos, obtiveram-se eficiências de encapsulação de 85 a 98%, sendo os menores valores encontrados quando foi usado o poloxamer 188; isto foi explicado pela maior solubilidade do recheio neste tensoativo, mas mesmo com uma ligeira diminuição da quantidade encapsulada, todos os valores ficaram acima de 80% (Schwarz & Mehnert, 1999).

Matrizes lipídicas compostas por ácido esteárico e diferentes quantidades de ácido oléico indicaram que a eficiência de encapsulação aumentou de 47 para 70% quando a concentração de oléico no meio passou de 0 para 30%. Isto foi justificado pelo maior grau de distúrbio nos cristais lipídicos, aumentando as imperfeições e assim criando mais espaço para a acomodação do recheio dentro da matriz lipídica (Hu *et al*, 2005).

3.3.5.1. Otimização do Processo de Microencapsulação

Na Tabela 10 encontram-se os valores X e Y, das variáveis dependentes, que correspondem à eficiência e concentração da microencapsulação de α -tocoferol e valores reais e codificados do modelo experimental. As primeiras 4 linhas determinam o modelo linear e são referentes ao experimento fatorial completo. As linhas 5 a 8 correspondem aos pontos axiais, enquanto as linhas 9 a 11 correspondem aos pontos centrais.

Os efeitos estimados, o coeficiente de regressão dos fatores lineares, quadráticos e da interação do recheio e velocidade de homogeneização para a eficiência pode ser observados nas Tabelas 11 e 12. Nenhum dos fatores apresentou significância estatística ao nível de 95% de confiança, de modo que não existem fatores significativos para a construção do modelo matemático. O coeficiente de correlação (r) representa a relação entre as respostas observadas e os valores previstos pelo modelo matemático. Este valor, quanto mais próximo de 1 ou 100%, mais preditivo é o modelo (Barros, Sacarminio & Bruns, 1995). A eficiência apresentou um $r^2 = 0,3853$, indicando que o modelo explica apenas 38,50% da variação dos dados observados. Os baixos valores de r podem ser devidos à influência de outros pontos críticos não determinados no presente modelo.

Tabela 11. Efeitos estimados para a eficiência (%). $R^2 = 0,3853$

	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média/Interação	95,40*	1,82*	52,18	0,000*	90,13	100,07
(1) Recheio (L)	-0,27	2,06	-0,13	0,901	-5,55	5,022
Concentração (Q)	-2,00	1,62	-1,23	0,272	-6,17	2,17
(2) Homogeneização (L)	2,53	2,05	1,23	0,273	-2,75	7,82
Homogeneização (Q)	-0,42	1,62	-0,26	0,803	-4,59	3,74
1L x 2L	0,5	3,56	0,14	0,893	-8,66	9,66

Obs: *Valores que se apresentam significativos a $p \leq 0,05$.

(L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

Tabela 12. Coeficiente de regressão para a eficiência (%). $R^2 = 0,3853$

	Coef. Regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor
Média/Interação	82,387	20,972	3,9283	0,05911
(1) Recheio (L)	-0,999	1,436	0,6954	0,55024
Concentração (Q)	-0,040	0,029	-1,35660	0,30427
(2) Homogeneização (L)	0,001	0,004	0,2833	0,80350
Homogeneização (Q)	-0,000	0,000	-0,2914	0,79816
1L x 2L	0,000	0,000	0,15587	0,89045

Obs: *Valores que se apresentam significativos a $p \leq 0,05$.

(L) = termo linear; (Q) = termo quadrático

Tabela 13. ANOVA para a eficiência (%) da microencapsulação de tocoferol.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	39,9050	4	39,9050	3,14
Resíduo	63,5087	6	12,7018	
Total	103,3164	10		

Obs: * *Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

$F_{tab} = 4,53$

Na otimização do processo de microencapsulação deseja-se maximizar a maior incorporação do produto ativo dentro da cápsula. No entanto quando analisados os resultados dos ensaios do delineamento experimental da microencapsulação de tocoferol através do programa STATISTICA para eficiência de encapsulação de tocoferol, nenhum dos fatores apresentou significância estatística ao nível de 95% de confiança, de modo que não existiram fatores significativos para a construção do modelo matemático. Este dado pode ser confirmado na análise de variância (Tabela 13) ao mesmo nível de significância onde através do teste F, a significância da regressão e da falta de ajuste em relação a 95% de confiança ($p \leq 0,05$) não apresentou regressão significativa.

Os efeitos estimados, o coeficiente de regressão dos fatores lineares, quadráticos e da interação do recheio e velocidade de homogeneização para a concentração de α -tocoferol nas micropartículas lipídicas pode ser observados na Tabela 14.

Ao verificar os efeitos das variáveis independentes sobre a concentração de α -tocoferol, observou-se que apenas o recheio mostrou-se estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 14. Efeitos estimados para a concentração de α -tocoferol. $R^2 = 0,99505$

	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média/Interação	14241,39	257,961	55,21	0,000*	13578,28	14904,50
Recheio (L)	9189,02	290,325	31,65	0,000*	8442,71	9935,32
Recheio (Q)	-195,64	228,917	-0,85	0,432	-784,09	392,81
Homogeneização (L)	385,92	290,325	1,32	0,241	-360,39	1132,22
Homogeneização (Q)	-52,31	228,917	-0,23	0,828	-640,77	536,14
1L x 2L	46,65	502,858	0,09	0,929	-1245,99	1339,29

Obs: *Valores que se apresentam significativos a $p \leq 0,05$.

(L) = termo linear; (Q) = termo quadrático.

Na ANOVA (Tabela 15), o $F_{\text{calculado}}$ da regressão (1003,36) foi muito significativo com relação ao F_{tabelado} (4,53) e a porcentagem da variação explicada (R^2) pelo modelo foi muito boa com $R^2=0,9950$, concluindo-se que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 15. (ANOVA) para determinação da concentração de α -tocoferol.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc} **
Regressão	253960953	4	253960953	1003,1437
Resíduo	1264330	6	252866	
Total	255215747	10		

Obs: * *Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

F_{tab} = 4,53

3.3.6. Morfologia das micropartículas lipídicas (MpL)

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar detalhes da morfologia e da microestrutura das micropartículas. A microscopia de varredura tem sido empregada na obtenção de informações relativas à forma, ao tamanho em alguns casos à distribuição do recheio no interior das micropartículas.

As imagens das micropartículas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos quatro ensaios estudados estão apresentadas na Figura 6.

Em geral, as micropartículas apresentaram forma esférica com paredes rugosas mas contínuas, sem rachaduras ou furos. A rugosidade observada parece ser produzida pela presença de Osth conforme observado anteriormente por outros autores (Rodriguez *et al*, 1999; Savolainen *et al*, 2002). Pode-se também observar a grande variação na distribuição de tamanhos, confirmando os resultados observados na determinação do tamanho médio e distribuição de tamanho, obtidos por difração de luz laser.

Similarmente (Eldem, Speiser & Hincal, 1991a; Maschke *et al*, 2007; Xiaohong Lin *et al*, 2007; Leonel 2010; Albertini *et al*, 2008), empregando a microencapsulação por *spray cooling* e utilizando matrizes lipídicas como agentes encapsulante também observaram os mesmos resultados.

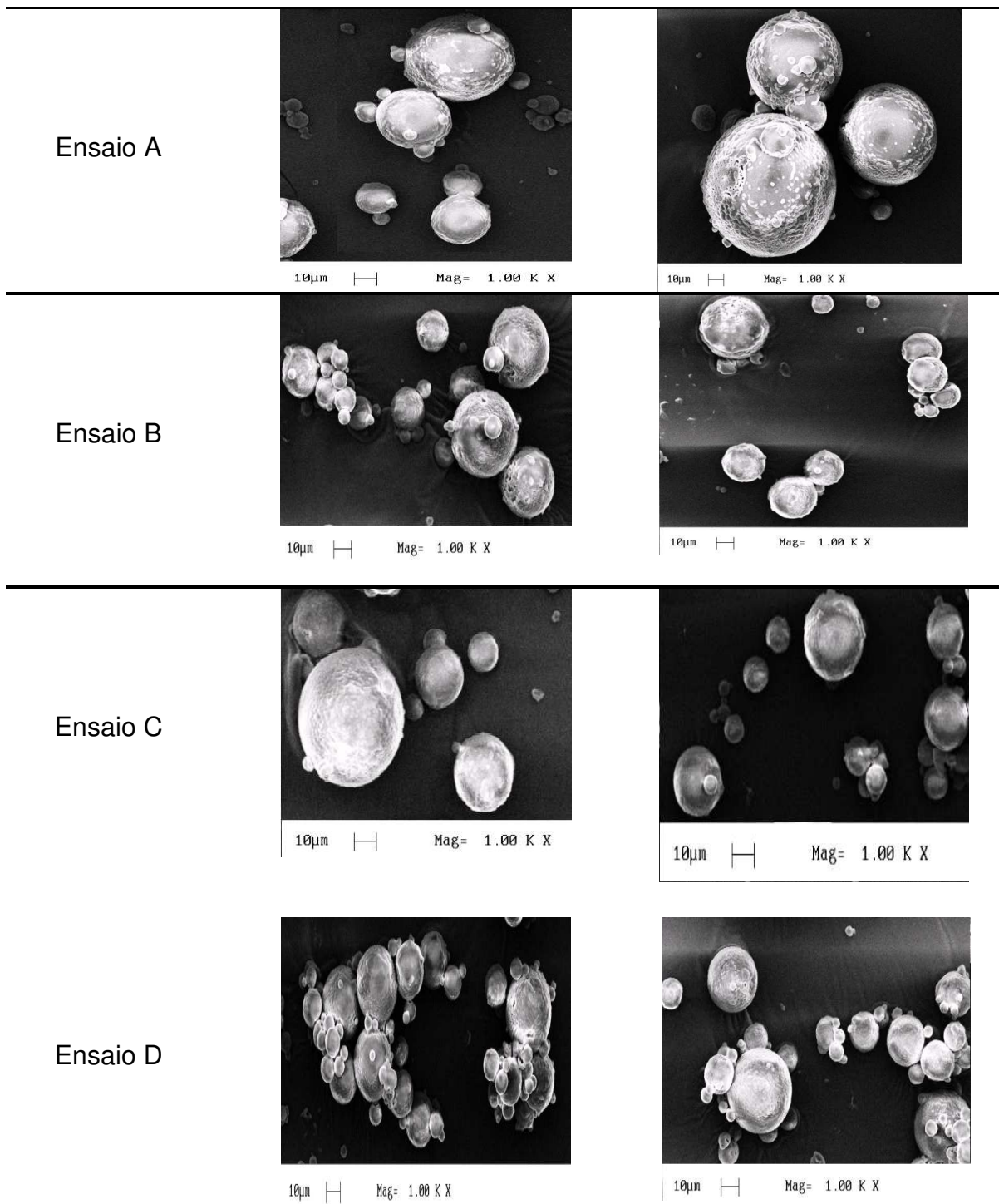


Figura 6. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos ensaios: A (proporção-Lípido/Recheio 90/10); B (proporção-Lípido/Recheio 80/20); C (proporção-Lípido/Recheio 95/5); e D (proporção-Lípido/Recheio 85/15).

3.3.7. Distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas lipídicas (MpL)

As micropartículas foram avaliadas quanto ao tamanho médio e à distribuição de tamanho por difração de luz laser. Os resultados obtidos para diâmetro médio e distribuição do tamanho das micropartículas estão descritos na Tabela 16 e Figura 7.

Na Tabela 16 observa-se que os diâmetros médios das micropartículas analisadas nos quatro ensaios apresentaram valores entre 50,79 a 92,76 μm , em concordância com trabalhos da literatura, que citam variações entre 1 e 500 μm . (Fávaro-Trindade et al., 2008) e conforme pode também ser observado através da microscopia eletrônica (MEV), apresentada neste trabalho. Esta diferença pode

Tabela 16. Diâmetro médio dos ensaios (média \pm desvio padrão)

Ensaio	Diâmetro médio (μm)
A (90:10)	92,76 \pm 62,54
B (80:20)	50,79 \pm 31,52
C (95:5)	69,01 \pm 46,63
D (85:15)	74,76 \pm 50,07

ter sido decorrente dos altos desvios, inerentes às características do material obtido por pulverização em *spray chilling*, também possivelmente às variações de concentração do recheio e velocidade de homogeneização. Como se observa nos resultados, o tamanho médio das partículas diminuiu com o aumento da velocidade de homogeneização. Essa influência é citada em estudos que fazem associações do tamanho das micropartículas com parâmetros de produção, tais como: proporção entre os componentes da parede, quantidade de recheio,

velocidade de agitação, taxa de resfriamento e tipo de secagem (Menger *et al.*, 2000; Lamprecht *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 2004).

Porém, pelos histogramas, verifica-se que as distribuições de tamanho das micropartículas de todos os ensaios estão próximas à normal, com ampla faixa, compreendidas entre 0,1 a 200 μm , com aproximadamente 65% das partículas situadas entre 30 a 100 μm . Albertini *et al* (2008), relataram que a maior porcentagem das partículas estiveram situadas entre 75 a 150 μm quando diferentes matrizes lipídicas foram produzidas Maschke *et al* (2007), usando matriz lipídica para encapsular insulina, observaram que 50% das partículas foram menores de 182,2 μm .

A interpretação dos dados em forma de histograma para análise de distribuição de tamanhos de microcápsulas também foi utilizada por Yúfera *et al.* (1996) e Villamar e Langdon (1993)

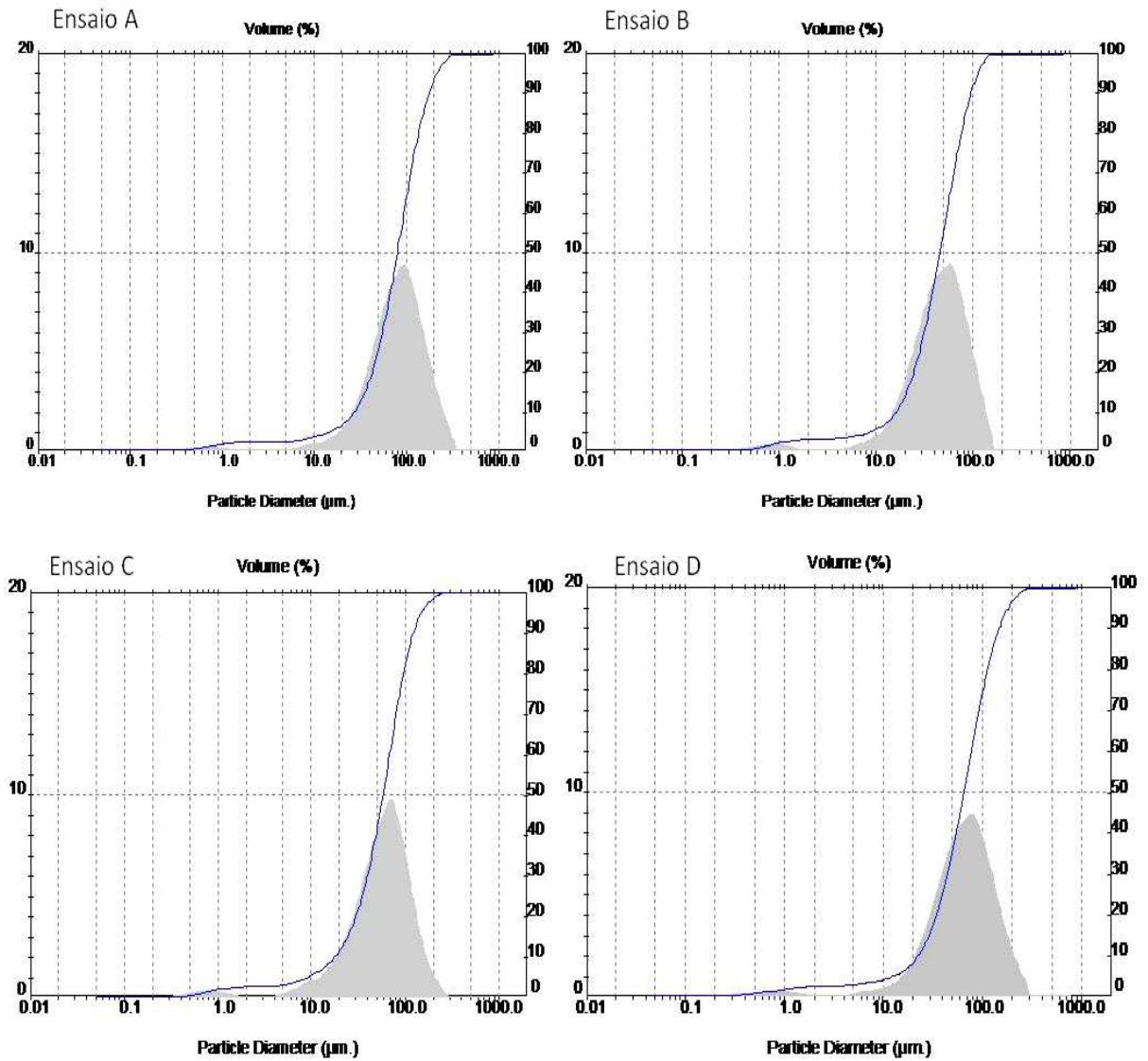


Figura 7. Histograma de distribuição do tamanho dos ensaios: A (proporção-Lípido/Recheio 90/10); B (proporção-Lípido/Recheio 80/20); C (proporção-Lípido/Recheio 95/5); e D (proporção-Lípido/Recheio 85/15).

3.3.8. Estudo da Estabilidade

3.3.8.1. Produção de Micropartículas Lipídicas (MpL)

Os quatro ensaios foram submetidos a estocagem por 180 dias em três diferentes temperaturas (temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, 22°C escuro e -18°C). Estes ensaios foram analisados por calorimetria diferencial de varredura (DSC) em corridas de fusão e de cristalização após a produção. Determinou-se a eficiência de encapsulação e análises de difração de raios-X, nos tempos de 0, 60, 120, e 180 dias.

3.3.8.2. Determinação da eficiência de encapsulação

Na Tabela 17 estão apresentadas as eficiências e concentrações de tocoferol presentes nas micropartículas determinadas nos ensaios um dia após a produção. Pode-se observar que os resultados demonstraram uma alta eficiência de 90,0 a 95,8%, e concentração de 4,498 a 18,518 mg/100 g. A Tabela 18 apresenta os resultados da retenção do α -tocoferol ao longo do tempo e da temperatura de estocagem das micropartículas lipídicas.

Tabela 17. Valores de eficiência da microencapsulação de α -tocoferol ($\% \pm$ desvio padrão) dos ensaios.

ENSAIOS	EFICIÊNCIA (%)	CONCENTRAÇÃO MÉDIA (mg/100g de capsula)	C.V
A (90:10)	95,8 \pm 2,99	9.575	3,11
B (80:20)	92,6 \pm 3,45	18.518	6,10
C (95:5)	90,0 \pm 3,81	4.498	4,20
D (85:15)	95,4 \pm 1,34	14.323	1,39

n=3 (repetições por ensaio).

C.V. = coeficiente de variação.

Pode-se observar que a retenção do tocoferol foi consideravelmente alta para todos os sistemas estudados variando de 94,1% a 99,7 %. A retenção dos ensaios que foram mantidos a -18°C obtiveram maiores valores, principalmente em relação os ensaios A, B e D armazenados à temperatura ambiente, embora esta diferença não seja significativa.

Tabela 18. Valores de retenção e concentração média da microencapsulação do α - tocoferol após 180 dias de estocagem.

TEMPERATURA (°C)	ENSAIOS	RETENÇÃO (%)	CONCENTRAÇÃO MÉDIA (mg/100g de capsula)	C.V
22 °C	A	99,0±0,42 ^a	9500,40	0,45
	B	99,0±3,89 ^a	18341,34	4,20
	C	98,5±7,35 ^a	4432,34	7,16
	D	99,1±3,25 ^a	14190,97	5,04
25 °C ± 5°C	A	94,8±2,05 ^a	9084,92	2,21
	B	94,1±0,283 ^a	17416,72	0,34
	C	98,8±2,55 ^a	4446,81	2,90
	D	94,8±1,28 ^a	13583,52	1,34
-18 °C	A	99,4±1,41 ^a	9516,69	0,46
	B	99,7±4,17 ^a	18463,15	1,27
	C	99,1±6,50 ^a	4460,70	7,32
	D	99,7±0,78 ^a	14291,20	0,80

Valores seguidos de letras minúsculas iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença estatística a $p < 0,05$

A _ (proporção lipídio/recheio 90/10); B _ (proporção lipídio/recheio 80/20); C _ (proporção lipídio/recheio 95/5); D _ (proporção lipídio/recheio 85/15)

A pouca variação observada ao longo do tempo em cada ensaio avaliado individualmente indica que a matriz lipídica, utilizando o lipídio interesterificado e OSTH, pode ter se comportado como agente de impedimento da expulsão do recheio ao longo do tempo e criando microestruturas para um bom alojamento da droga e conseqüentemente obter altas eficiências de encapsulação com alta retenção de tocoferol. Misturando lipídios quimicamente diferentes chega-se a maiores imperfeições no cristal criando maior espaçamento no cristal para acomodação de recheio (Muller and Jenning, 1999; Jenning, 1999).

Micropartículas lipídicas utilizadas na encapsulação de recheios lipofílicos indicaram que, quando foram usados apenas lipídios sólidos na matriz, a expulsão do recheio foi quase imediata, mas quando era incluído um lipídio líquido havia grande retardo da expulsão (Pietkiewicz, Sznitowska & Placzek, 2006).

3.3.8.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As propriedades térmicas de fusão e cristalização das micropartículas lipídicas obtidas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) no tempo zero, foram avaliadas com o objetivo de verificar possíveis diferenças em relação às diferentes proporções lipídio/material de recheio, produzindo diferentes comportamentos térmicos.

Os eventos térmicos que geram transições de primeira ordem apresentam variação de entalpia que pode ser endotérmica ou exotérmica e dão origem à formação de picos (Canevarolo, 2004).

A Tabela 19 registra para cada ensaio as temperaturas de fusão correspondentes aos picos registrados. Pode ser observado que os valores obtidos estão diretamente relacionados à proporção lipídio/recheio utilizado para a produção das micropartículas, pois os pontos de fusão menor e maior correspondem aos ensaios B e C que possuem menor e maior quantidade de matriz lipídica que são conformados por lipídios interesterificados e óleo de soja

totalmente hidrogenado (OSTH). A Tabela 20 registra os valores da temperatura de cristalização correspondente aos picos registrados. Pode ser observado que os valores obtidos estão diretamente relacionados à proporção (lipídio/recheio), utilizado para a produção das micropartículas. A temperatura de cristalização do ensaio C (95:5) foi de -0,2°C, enquanto para o ensaio B (80:20) foi de 4,9°C.

Tabela 19. Parâmetros calorimétricos obtidos na curva de fusão dos ensaios analisados no tempo zero

Ensaio	Picos	Temperatura onset (°C)	Temperatura de pico (°C)	Temperatura endset (°C)	Entalpia ΔH Jg ⁻¹
Padrão	1	45,22	55,2	57,6	76,32
	2	57,97	62,7	65,24	39,86
A	1	39,6	50,7	53,9	54,68
	2	53,9	59,7	63,5	28,96
B	1	32,7	48,5	49,0	37,98
	2	55,2	58,2	62,2	24,63
C	1	40,1	51,7	54,1	67,76
	2	54,6	60,2	64,0	33,42
D	1	37,7	49,4	51,3	50,15
	2	51,3	58,8	61,8	32,50

Padrão_ (proporção lipídio/recheio 100/0); A_ (proporção lipídio/recheio 90/10); B_ (proporção lipídio/recheio 80/20); C_ (proporção lipídio/recheio 95/5); D_ (proporção lipídio/recheio 85/15)

Assim mesmo os termogramas de fusão e de cristalização apresentaram-se muito semelhantes como pode ser observado nas Figuras 11 e 12. Na curva de fusão (Figura 11) observam-se 4 picos, dos quais dois picos endotérmicos distintos, separados por um pico exotérmico que poderia ser atribuído ao polimorfismo do OSTH. Segundo Bailey (1950), esta propriedade é mais evidente em gorduras

onde predomina um tipo de triacilglicerol, tais como manteiga de cacau, sebo, óleo de soja e de palma hidrogenados, entre outros.

Tabela 20. Parâmetros calorimétricos obtidos na curva de cristalização dos ensaios analisados no tempo zero.

Ensaio	Temperatura onset (°C)	Temperatura de pico (°C)	Temperatura endset (°C)	Entalpia ΔH Jg ⁻¹
Padrão	42,18	41,91	18	45,41
A	37,5	35,9	3,7	60,7
B	34,6	33,5	4,9	58,7
C	38,4	37,0	-0,2	68,4
D	36,3	35,0	-4,5	66,0

Padrão_ (proporção lipídio/recheio 100/0); A _ (proporção lipídio/recheio 90/10); B _ (proporção lipídio/recheio 80/20); C _ (proporção lipídio/recheio 95/5); D _ (proporção lipídio/recheio 85/15)

Supõe-se que o primeiro pico corresponde à fusão da forma α e o segundo, à forma β . O pico exotérmico existente entre os dois picos endotérmicos representaria a cristalização da forma instável para a forma mais estável.

Transições polimórficas de alguns materiais (como certas gorduras sólidas) geralmente ocorrem mais rapidamente em nanopartículas lipídicas do que no estado a granel (Schubert, Müller-Goymann 2005).

Lopez–Hernandez (2005) reportou também duas formas polimórficas a 53°C e 63°C, transições α e β em OSH.

No caso das curvas de cristalização (Figura12) os termogramas dos ensaios obtidos também são muito similares, caracterizando-se pela formação de dois picos um de menor magnitude que aparece próximo a 0°C, que provavelmente

deve-se aos triacilgliceróis do lipídio interesterificado, e outro pico maior, próximo a 40°C que representa a cristalização do OSH.

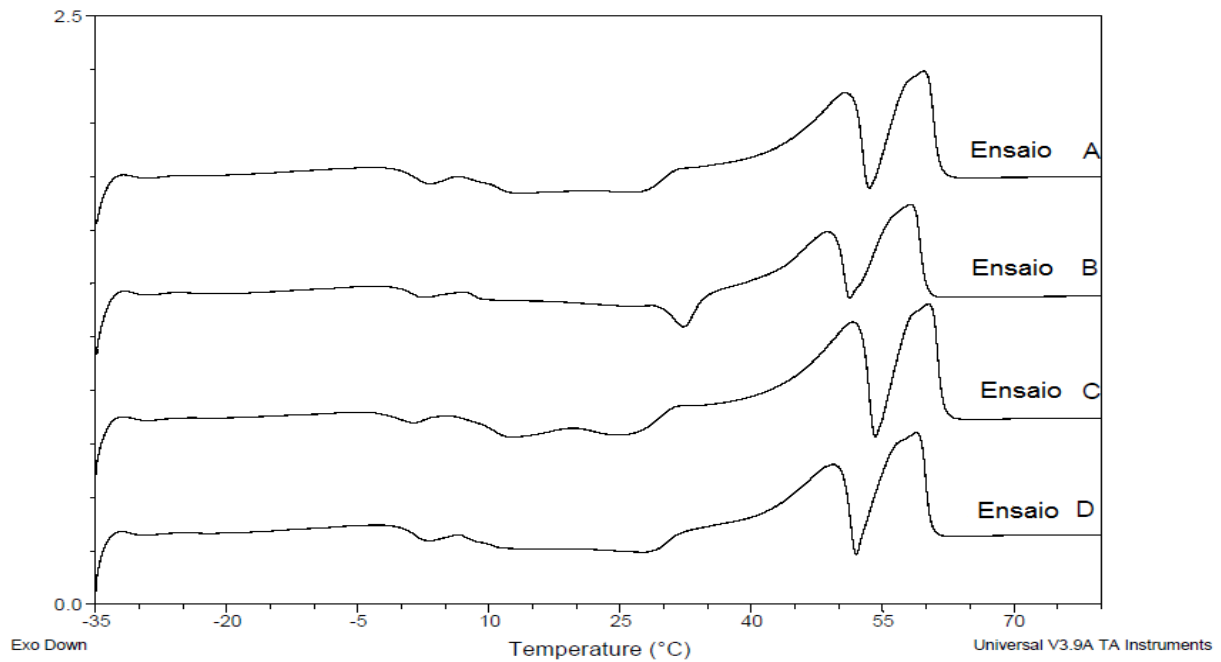


Figura 8. Termogramas da curva de fusão dos ensaios no tempo zero: A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15).

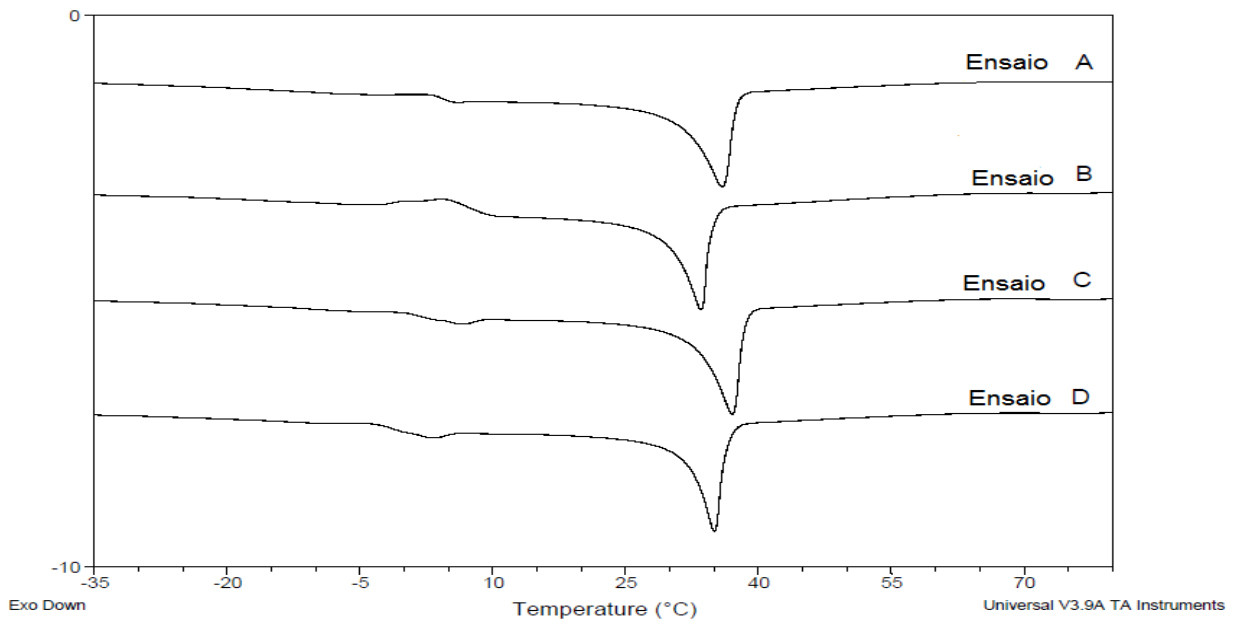


Figura 9. Termogramas da curva de cristalização dos ensaios no tempo zero: A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15).

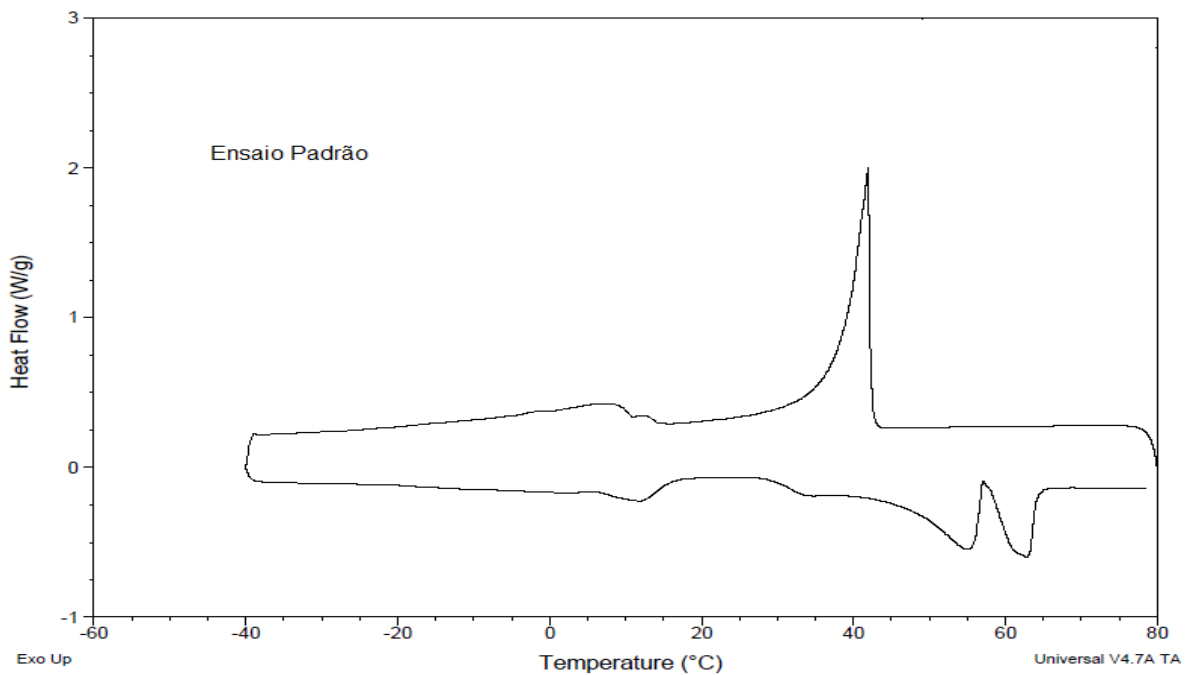


Figura 10. Termogramas da curva de fusão e cristalização do padrão (proporção-Lipídio/Recheio 100/0)

Finalmente em estudo comparativo das curvas de fusão e cristalização dos ensaios em relação às curvas de fusão e cristalização do padrão (Figura 13), pode-se concluir que a presença do α -tocoferol nas micropartículas não interferiu nas alterações das temperaturas de fusão e de cristalização das micropartículas nos ensaios realizados.

3.3.8.4. Difração de Raios X

Um ponto importante a ser considerado na caracterização das micropartículas lipídicas é a possível ocorrência de diferentes formas polimórficas. Formas polimórficas são fases sólidas de mesma composição química que diferem entre si na estrutura cristalina e devido ao seu alto grau de complexidade molecular, podem empacotar em várias estruturas cristalinas relativamente estáveis e diferentes. Estes diversos empacotamentos de cadeia, ou formas polimórficas, têm energias, arranjos de grade e hábitos cristalinos diferentes (Gunstone & Norris, 1983; Nawar, 1985).

As formas polimórficas dos triacilglicerídios podem ocorrer em três formas cristalinas, α , β' e β , por ordem crescente de estabilidade termodinâmica (German & Simoneau, 1998). A reorganização polimórfica para níveis mais organizados e energeticamente mais favoráveis é apontada como um problema na encapsulação de ativos cujo material de parede é lipídico, uma vez que esta reorganização poderia provocar a expulsão do material de recheio devido à produção de um material mais cristalino durante a transição de fase polimórfica lipídica após a produção das micropartículas lipídicas utilizando a técnica do *spray cooling* (Jenning, Thünemann & Gohla, 2000b; Müller, Radtke & Wising, 2002a; Müller, Radtke & Wising, 2002b; Schubert & Müller Goymann, 2005).

Adicionalmente à quantificação do α -tocoferol nos ensaios avaliados durante 180 dias de estocagem a diferentes temperaturas, a avaliação de uma possível reorganização polimórfica do material lipídico utilizado como material de parede foi feita pela técnica da difração de raios-X. Segundo Bunges & Unruh,

2007, a difração por raios-X permite obter informações inequívocas em relação às transformações das formas polimórficas e pode também ajudar a detectar processos como separação de fases.

As Figuras 11 a 13 representam um comparativo dos difratogramas dos ensaios das micropartículas estocadas durante 180 dias a diferentes temperaturas. Pode-se observar que todos os ensaios apresentaram espectros de difrações semelhantes. Os resultados constataram a presença de três picos principais detectados nos seguintes ângulos $2\theta = 19,3^\circ$ $d = 4,6\text{Å}$, $2\theta = 22,8^\circ$ $d = 3,8\text{Å}$ e $2\theta = 23,1^\circ$ $d = 3,7\text{Å}$, pela literatura parecem estar associados à forma polimórfica β , característica de muitos triacilgliceróis e ácidos graxos (Jenning, Sschäfer-Korting & Gohla, 2000a).

Attama *et al.* (2007) desenvolveram nanocápsulas utilizando misturas lipídicas. Os autores identificaram por meio de difração de raios-X diferentes formas polimórficas nos seguintes ângulos $19,3^\circ$, $6,0^\circ$, $23,1^\circ$ e $19,7^\circ$.

Shenk & Peschar, (2004), Shenk *et al.*, (2006), Keller *et al.*, (1996), constataram por meio de difração de raios-X em estudos com lipídios a presença de um pico principal em torno de $19,5^\circ$ concluindo que aquele comportamento era correspondente à forma cristalina β .

Com o objetivo de complementar a interpretação das análises de difração de raios-X, foi realizado o cálculo da Cristalinidade Relativa (Cr) nos ensaios avaliados. O cálculo da cristalinidade relativa é realizado com determinada frequência no estudo da cristalinidade de filmes poliméricos e até o momento, não foi detectado em literatura técnica o cálculo da Cr para sistemas gordurosos. De acordo com Van Soest e Vliegenthart (1997), a cristalinidade em um biopolímero semi-cristalino, como por exemplo o amido, pode ser definido como a razão entre a massa de cristais dominante pela massa total de material. Esse mesmo princípio foi aplicado para o cálculo da cristalinidade relativa das micropartículas lipídicas.

Para o cálculo da cristalinidade relativa dos ensaios das micropartículas lipídicas, utilizaram-se os resultados obtidos na difração de raios-X. Nesse caso, a área dos picos detectados nos difratogramas foi dividida pela área total registrada sob a curva. Para esse cálculo, utilizou-se o programa Microcal Origin 6.0. Os valores estão apresentados nas Tabelas 21 a 23.

Tabela 21. Graus de cristalinidade (%) dos ensaios avaliados durante 180 dias à temperatura de 22°C (média ± desvio padrão).

Tempo (dias)	Ensaio			
	A	B	C	D
0	22,2 ± 2,2	23,1 ± 3,2	28,3 ± 2,7	23,7 ± 0,7
60	24,5 ± 2,0	24,1 ± 5,1	28,8 ± 4,9	24,6 ± 1,9
120	28,6 ± 0,87	24,0 ± 5,2	26,8 ± 1,4	26,2 ± 1,3
180	24,7 ± 2,3	21,4 ± 3,1	27,4 ± 2,6	26,5 ± 3,5

A_ (proporção lipídio/recheio 90/10); B_ (proporção lipídio/recheio 80/20); C_ (proporção lipídio/recheio 95/5); D_ (proporção lipídio/recheio 85/15).

n=3 (repetições por ensaio)

Tabela 22. Graus de cristalinidade (%) dos ensaios avaliados durante 180 dias a temperatura ambiente C (média ± desvio padrão)..

Tempo (dias)	Ensaio			
	A	B	C	D
0	22,2 ± 2,2	23,1 ± 3,2	28,3 ± 2,7	23,7 ± 0,7
60	29,4 ± 6,2	28,3 ± 1,0	26,1 ± 2,0	23,6 ± 3,4
120	29,2 ± 1,2	24,3 ± 2,1	27,0 ± 4,2	24,5 ± 1,7
180	26,7 ± 3,6	21,6 ± 1,0	24,8 ± 2,5	20,4 ± 0,6

A_(proporção lipídio/recheio 90/10); B_(proporção lipídio/recheio 80/20); C_(proporção lipídio/recheio 95/5); D_(proporção lipídio/recheio 85/15).

n=3 (repetições por ensaio)

Em padrões de difração de raios-X, a cristalinidade da amostra é caracterizada pela forma, intensidade/altura dos picos, onde picos mais estreitos e

mais intensos indicam maior cristalinidade enquanto picos mais largos e pequenos são indicativos de regiões mais amorfas (Alves & Santana, 2004).

Os resultados indicaram que as porcentagens de cristalinidade das formulações obtidas ao longo do tempo foram relativamente baixas, inferiores a 30%, sem diferença significativa com relação ao tempo de estocagem e muito próximos entre os ensaios. Estes resultados eram esperados, considerando que a mistura lipídica (Lipídios interesterificados 70% e de óleo de soja totalmente hidrogenado 30%) foi a mesma para todos os ensaios, que diferiram apenas na proporção matriz/material de recheio. A baixa cristalinidade observada para as formulações parece ter sido provocada pela presença de estrutura amorfa que são lipídios sólidos, porém não cristalinos que conseqüentemente contribuem para aumentar a retenção do material de recheio dentro da matriz. Embora não existam dados quantitativos na literatura, os benefícios da estrutura amorfa sobre a eficiência de produtos são bem conhecidos (Alves & Santana, 2004).

Tabela 23. Graus de cristalinidade (%) dos ensaios avaliados durante 180 dias à temperatura de -18°C (média ± desvio padrão).

Tempo (dias)	Ensaio			
	A	B	C	D
0	22,2 ± 2,2	23,1 ± 3,2	28,3 ± 2,7	23,7 ± 0,7
180	20,5 ± 1,3	21,0 ± 2,2	23,7 ± 1,8	21,8 ± 0,8

A _ (proporção lipídio/recheio 90/10); B _ (proporção lipídio/recheio 80/20); C _ (proporção lipídio/recheio 95/5); D _ proporção lipídio/recheio 85/15)
n=3 (repetições por ensaio)

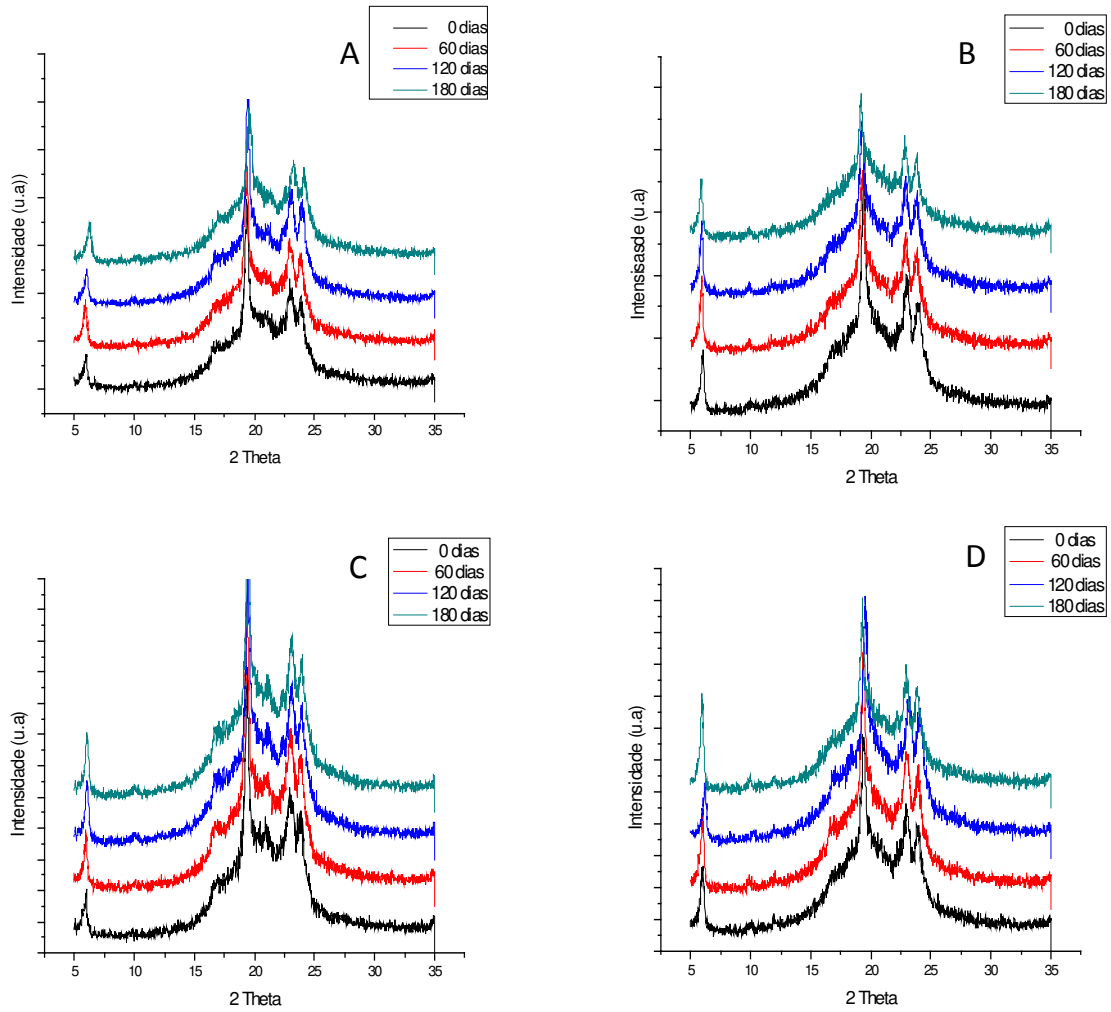


Figura 11. Curva de difração de raios-X dos ensaios: A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). Temperatura: 22°C; tempos: 0, 60, 120 e 180 dias.

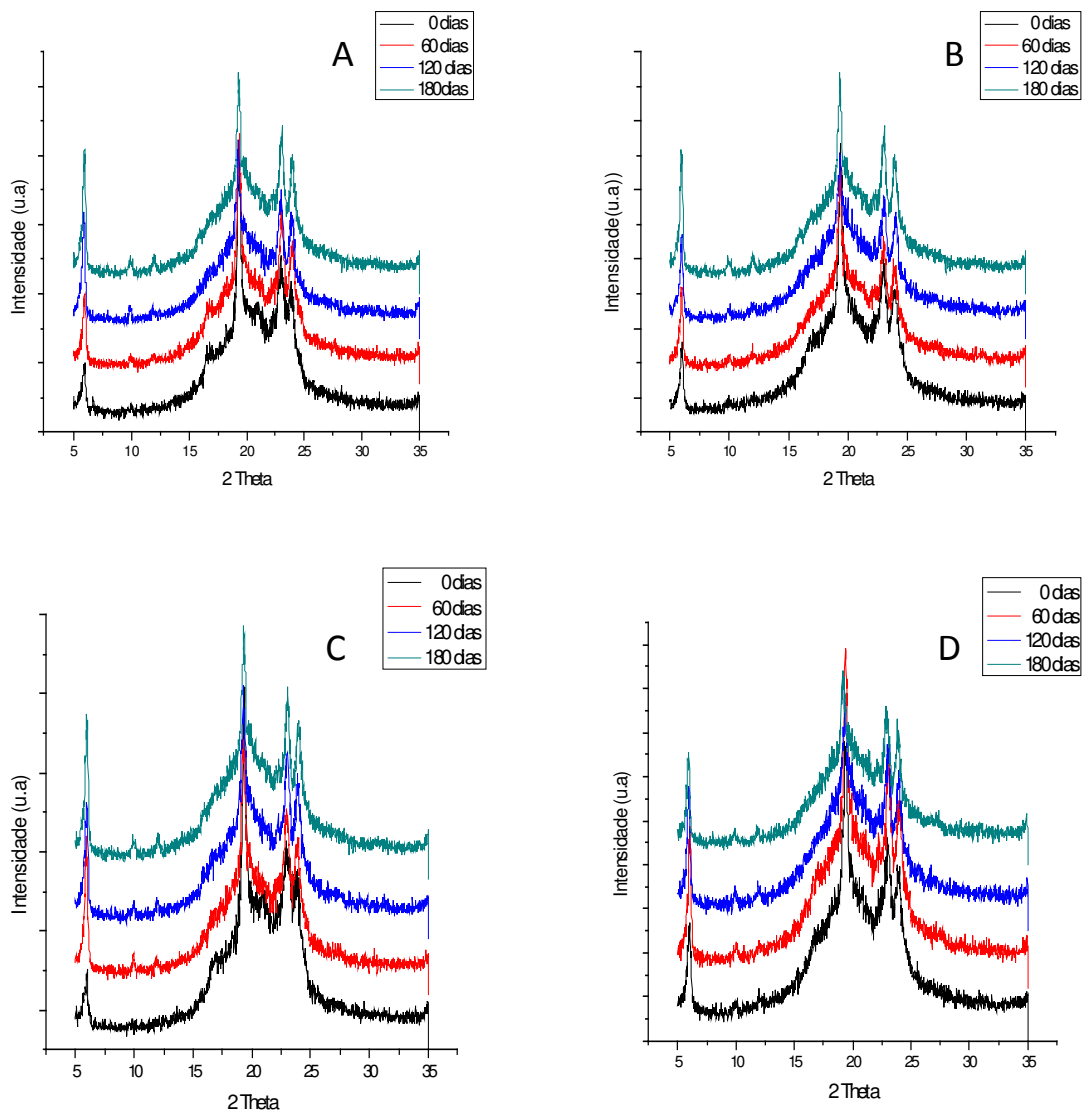


Figura 12. Curva de difração de raios-X dos ensaios: A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). Temperatura ambiente: 25°C \pm 5; tempos: 0, 60, 120 e 180 dias.

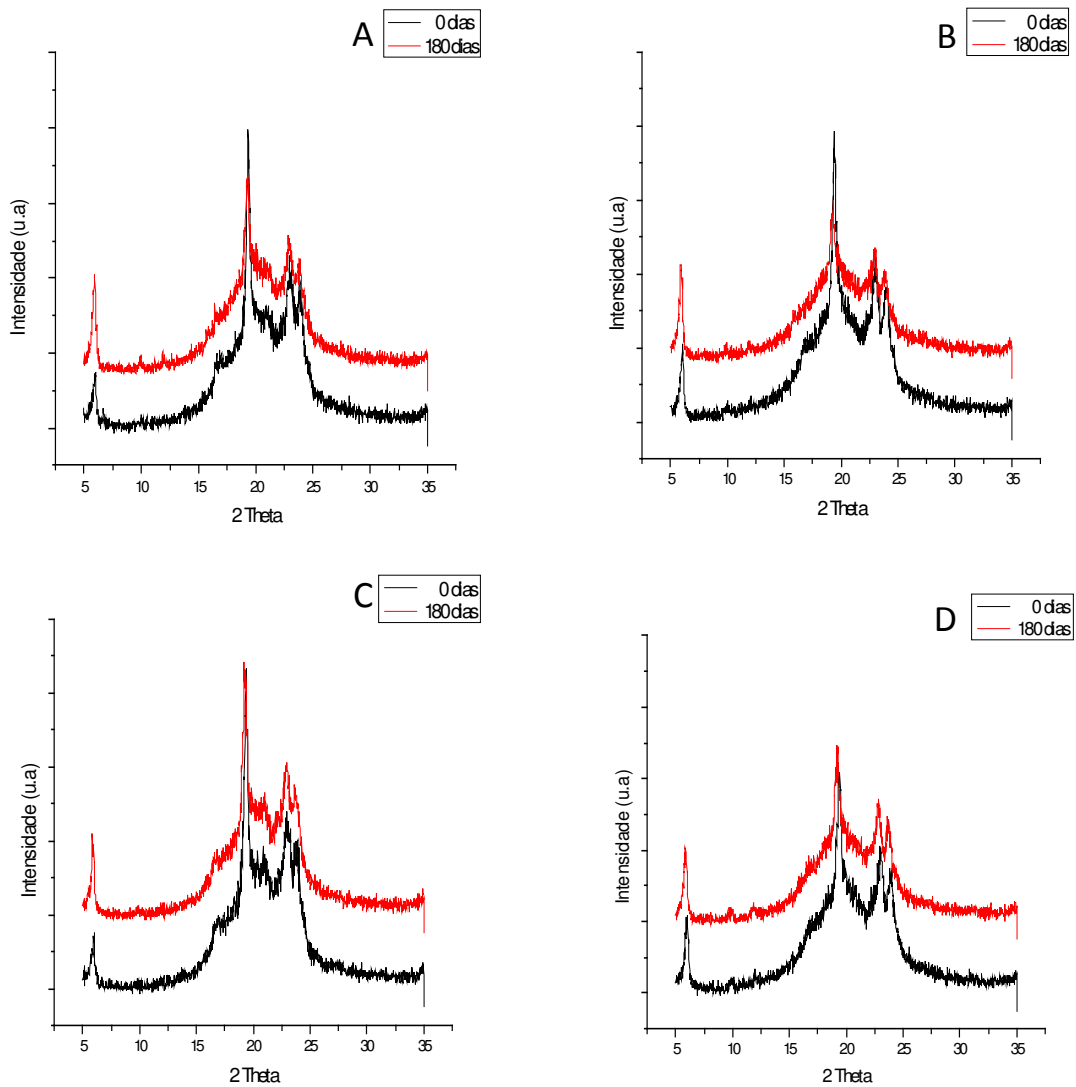


Figura 13. Curva de difração de raios-X dos ensaios: A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15). Temperatura: -18°C ; tempos: 0 e 180 dias.

3.3.9. Avaliação da resistência das micropartículas em meio ácido

Micropartículas obtidas por “*spray chilling*” apresentam algumas vantagens em relação a outros processos de obtenção de micropartículas. A principal é a alta capacidade de encapsulação apresentada por este tipo de processo. Porém, micropartículas ideais para o sistema de liberação de nutrientes devem proteger o material do núcleo, sem destruição sob ação de ácido forte, o que significa que o material de revestimento deve ser resistente ao meio ácido. Uma vez que a micropartícula chega ao intestino delgado, esta deve inicialmente liberar o material do núcleo rapidamente e manter a taxa de liberação, de tal modo que haja um equilíbrio entre a taxa de absorção e liberação Yoo *et al* (2006). Desta forma, o objetivo deste estudo foi testar a resistência das micropartículas lipídicas simulando o meio ácido (pH-1,2) do estômago do ser humano.

A Figura 14 mostra as micrografias óticas das micropartículas lipídicas após o tratamento de duas horas em solução aquosa a pH 1,2. Pode-se observar que as micropartículas dos ensaios (A, B, C e D) não sofreram nenhuma alteração em sua estrutura morfológica, permanecendo resistente ao meio ácido o que significa que os materiais lipídicos utilizados como revestimento das micropartículas podem ter bom desempenho no transporte de produtos ativos dentro do sistema gástrico.

pH = 1,2

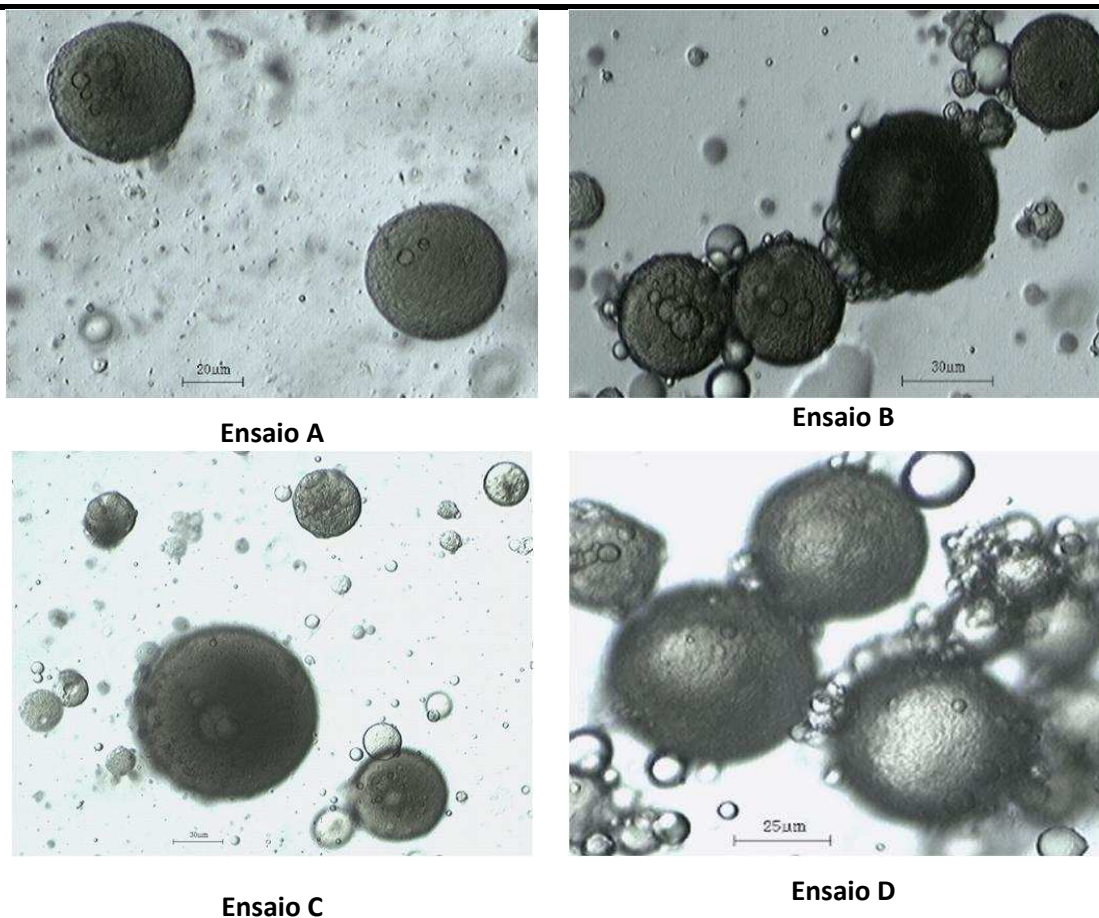


Figura 14 - Imagens dos ensaios após 2h de incubação em solução aquosa pH-1,2 obtidas por microscopia ótica, para ensaio A _ (proporção lipídio/recheio 90/10); B _ (proporção lipídio/recheio 80/20); C _ (proporção lipídio/recheio 95/5); D _ (proporção lipídio/recheio 85/15)

3.3.10. Avaliação da ação enzimática sobre as micropartículas lipídicas (MpL) por microscopia ótica

Para verificar o comportamento digestivo dos nutrientes frente às barreiras do trato gastrintestinal, são necessários alguns testes, para os quais se pode empregar metodologias *in vivo* e *in vitro*. Segundo Charteris *et al* (1998) as metodologias *in vitro* representam uma importante forma de caracterização dessa

capacidade, pois, além de garantir resultados confiáveis, são executadas com maior facilidade que os estudos *in vivo*.

Em nosso estudo verificou-se a viabilidade das micropartículas no trato intestinal diante da simulação das condições intestinais, utilizando solução de lipase pancreática suína (SIGMA) com pH ajustado para 7,0.

Os resultados mostraram (Figura 15) através da microscopia ótica, que, no transcurso de quatro horas de atividade enzimática, todas as micropartículas dos ensaios (A, B, C e D) foram gradualmente destruídas ou hidrolisadas e conseqüentemente o produto ativo será absorvida no trato intestinal. Estes resultados eram esperados devido à especificidade catalítica das lipases sobre os lipídios. É conhecido que as lipases são enzimas que clivam hidroliticamente um ânion de ácido graxo de um acilglicerol, ou seja, são responsáveis pela quebra e absorção de gorduras nos intestinos.

A especificidade da lipase pancreática de suínos pelo grupo terminal dos ácidos graxos dos triacilgliceróis tem sido mostrada por diversos autores (Schoenheyder & Volquartz, 1954; Savary & Desnuelle, 1956, citados por Freeman 1985). A literatura apresenta diversos trabalhos voltados à hidrólise de lipídios provenientes de diferentes matérias primas (Balcão e Malcata, Linfield *et al.*, Linfield *et al.*, Park *et al.*, Wang *et al.*, Bilyk *et al.*, Ghosh e Bhattacharyya).

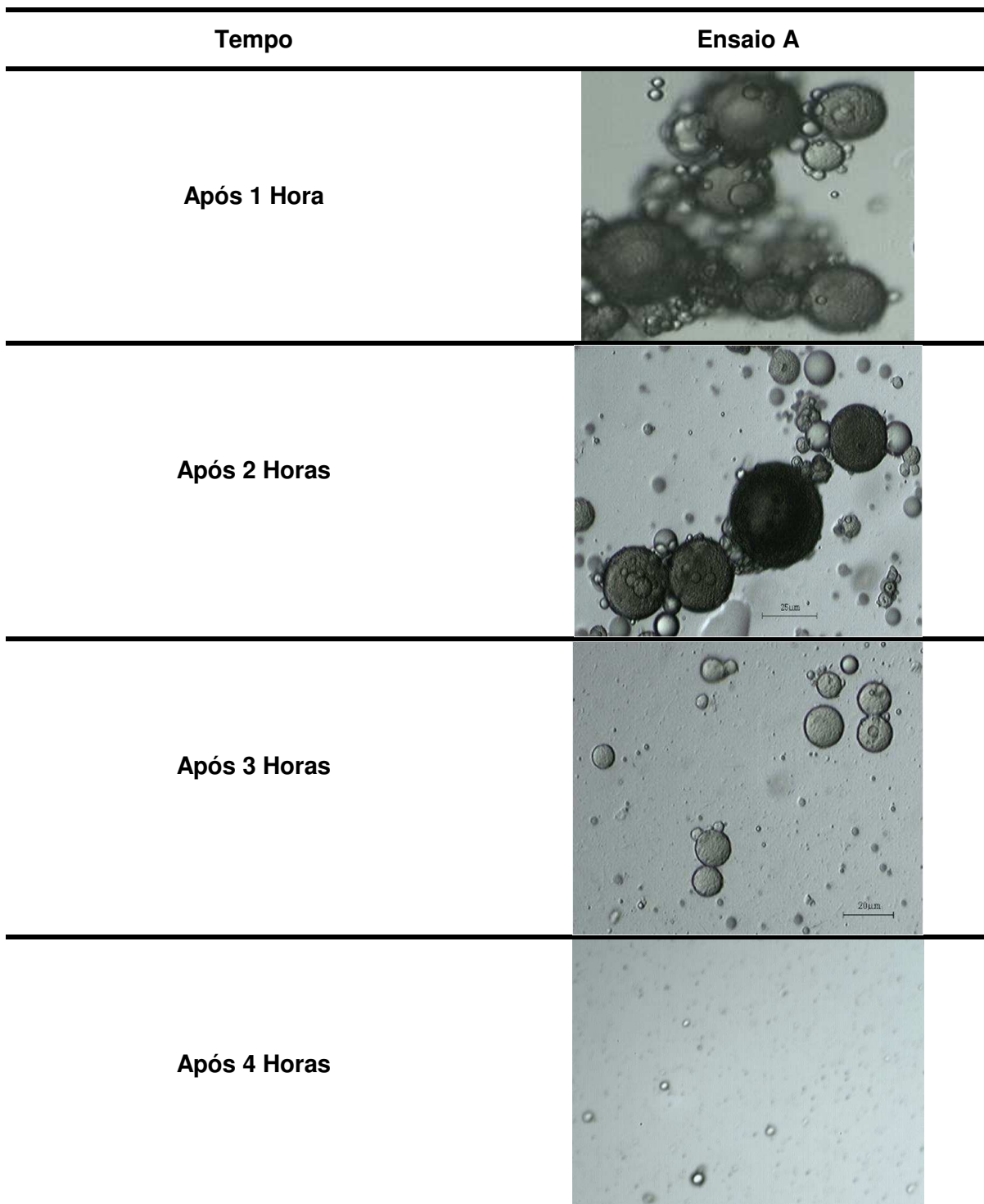


Figura 15. Imagens das micropartículas lipídicas durante 4h de incubação em solução de lipase pancreática (2,0 mg/mL), obtidas por microscopia ótica, para ensaio A _ (proporção lipídio/recheio 90/10); B _ (proporção lipídio/recheio 80/20); C _ (proporção lipídio/recheio 95/5); D _ (proporção lipídio/recheio 85/15).

3.3.11. Avaliação da liberação do recheio

As propriedades físicas e químicas tanto do recheio quanto do material de parede, assim como a técnica usada na produção das micropartículas afetam diretamente a liberação do recheio no meio (Jackson & Lee, 1991; Dziezak, 1993). No que diz respeito à matriz, densidade, cristalinidade, orientação, solubilidade, pré-tratamentos, nível de plasticidade e cross-linking são algumas propriedades diretamente ligadas ao perfil de liberação (Shahidi & Han, 1993).

Os perfis de liberação ao longo do tempo do α -tocoferol contido em micropartículas lipídicas são apresentados na Tabela 24 e Figura 16.

Tabela 24. Porcentagem de α -tocoferol liberado ao longo do tempo das micropartículas lipídicas, em óleo de girassol (média \pm desvio padrão).

Tempo (h)	Liberação (%)			
	Ensaio			
	A	B	C	D
1	40,0 \pm 2,53	35,6 \pm 0,37	39,7 \pm 0,68	27,3 \pm 1,98
2	73,8 \pm 0,94	65,9 \pm 2,58	76,5 \pm 0,72	62,0 \pm 3,44
4	77,3 \pm 0,43	70,8 \pm 0,79	83,4 \pm 1,38	68,6 \pm 4,78
6	78,4 \pm 3,21	72,9 \pm 1,92	86,3 \pm 0,22	75,5 \pm 2,57
12	85,6 \pm 1,34	74,3 \pm 3,11	87,6 \pm 2,83	81,2 \pm 0,67
24	87,5 \pm 3,36	75,6 \pm 2,45	89,5 \pm 2,10	83,0 \pm 2,81

A _ (proporção lipídio/recheio 90/10); B _ (proporção lipídio/recheio 80/20); C _ (proporção lipídio/recheio 95/5); D _ (proporção lipídio/recheio 85/15).

Na Tabela 24 observa-se que os valores de liberação do tocoferol das micropartículas lipídicas contendo α -tocoferol nos ensaios (A, B, C e D) apresentaram no geral valores acima de 60% de liberação do produto ativo no transcurso de 2 horas. Porém a liberação se prolongou por 24 horas até sua

estabilização. Assim mesmo observou-se que as micropartículas lipídicas apresentaram liberação controlada com perfis similares (Figura 16) com liberação máxima do produto ativo na faixa de 75,6 a 89,5%. Não foi observado efeito *burst* para nenhum ensaio. Uma possível explicação para estes resultados é atribuída à existência de solubilidade entre os materiais da microcapsula e o óleo de girassol utilizado como meio de liberação.

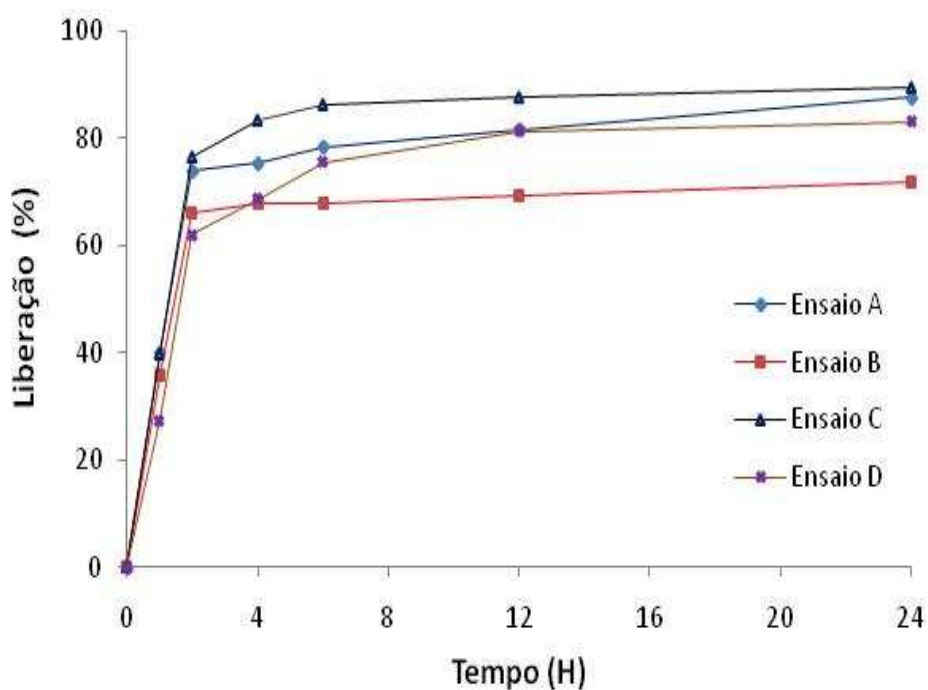


Figura 16. Curvas de liberação do α -tocoferol das microcapsulas lipídicas em função do tempo. A (proporção-Lipídio/Recheio 90/10); B (proporção-Lipídio/Recheio 80/20); C (proporção-Lipídio/Recheio 95/5); e D (proporção-Lipídio/Recheio 85/15).

Um estudo feito por Jennings *et al* (2000a), testando nanopartículas lipídicas compostas de uma mistura de mono-, di- e triacilgliceróis de ácido behênico na encapsulação de vitamina A, encontrou que nas primeiras seis horas a liberação foi constante e modulada, mas após houve um aumento considerável e imediato.

Foi proposto que a mudança na conformação dos lipídios para uma forma mais estável alterou (diminuiu) os espaços onde o recheio estava alocado, acarretando a sua expulsão rápida e imediata. Ainda neste estudo, comparando-se a liberação da vitamina A em meio aquoso e lipídico, os autores encontraram que, no primeiro meio, a liberação do recheio foi constante e modulada nas primeiras 24 horas, mas depois foi consideravelmente aumentada, devido, como dito anteriormente, às alterações polimórficas dos lipídios. Quando foi testada em meio lipídico a liberação foi rápida e imediata, por causa da solubilidade do recheio neste meio. Todos estes resultados foram confirmados por análises de difração de raios-X e medidas de DSC.

No estudo de partículas de cera de carnaúba ou ácido esteárico contendo dois tipos de recheios, um hidrofílico e outro hidrofóbico, observou-se que o perfil de liberação sofreu influência tanto da natureza da matriz lipídica quanto da característica de polaridade do recheio. Comparando-se a liberação do mesmo recheio nas duas matrizes, um aumento significativo ocorreu na matriz de ácido esteárico em relação à de cera de carnaúba, independente da natureza do recheio, sendo este comportamento atribuído às diferentes hidrofobicidades das duas matrizes lipídicas utilizadas. Em relação aos dois recheios testados, tanto na matriz de cera de carnaúba quanto na de ácido esteárico, a liberação do recheio hidrofílico foi maior do que a do recheio hidrofóbico, em decorrência de suas diferentes solubilidades em água (Rodriguez *et al*, 1999).

Avaliando partículas com matrizes lipídicas compostas por ácido esteárico e diferentes quantidades de ácido oléico na encapsulação de clobetasol, um recheio hidrofóbico, foi observado um perfil de liberação bifásico (efeito “burst” com posterior liberação a razão constante) em todas as formulações estudadas, sendo que a liberação se tornou mais rápida devido à inclusão do ácido oléico na matriz, aumentando com o aumento da quantidade do óleo na partícula. A liberação foi justificada pela possível presença do ácido oléico na superfície externa da matriz, formando pequenos aglomerados contendo o recheio, o qual foi liberado mais rapidamente. Os autores também justificaram o aumento da liberação conforme a

quantidade de ácido oléico era aumentada na formulação devido à diminuição do tamanho médio das partículas, aumentando assim a área superficial e conseqüentemente permitindo a maior liberação do recheio (HU *et al*, 2005).

Outro estudo avaliou a encapsulação de solução de glicose em duas diferentes matrizes lipídicas: ácido esteárico/ácido oléico e ácido esteárico/ácido láurico; observando que a primeira matriz foi mais eficiente na retenção do recheio do que a segunda, independente da concentração de glicose, da proporção lipídio/solução de glicose e da quantidade de tensoativo presente no meio; neste estudo foi encontrado um valor de T50 (tempo necessário para a liberação de 50% de recheio), 4,3 vezes maior na mistura esteárico/oléico em relação ao uso da mistura esteárico/láurico na produção das micropartículas. Estes resultados indicaram que a mistura contendo um ácido graxo em estado líquido nas condições de temperatura dos experimentos contribuiu para formar uma partícula mais estável frente a variações na concentração de tensoativo ou quando diferentes proporções entre mistura lipídica e solução de glicose foram utilizadas (Chambi *et al*, 2008).

Guo *et al* (2005) estudaram a liberação de aspirina encapsulada em óleo de soja hidrogenado como matriz lipídica, na relação de 1:5 em diferentes tamanhos de micropartículas. O objetivo do estudo foi investigar o tamanho das micropartículas com relação à liberação do recheio e o seu mecanismo. Foram produzidas micropartículas com alta eficiência de encapsulação. Os tamanhos de partículas variaram de 90 a 355 μm . A liberação foi realizada em pH 1,2 e pH 6,8 em água. Foi concluído, que quanto maior o tamanho de partícula menor a liberação do recheio. Obteve-se um modelo de primeira ordem ou Higuchi para partículas menores e de ordem zero para maiores.

3.4. CONCLUSÕES

A produção de micropartículas lipídicas contendo α -tocoferol foi possível em matrizes lipídicas utilizando atomização a frio (spray chilling) com bons resultados quanto à eficiência de encapsulação, variando na faixa de 89,6 a 99,3%. O diâmetro médio das micropartículas situou-se entre 50,8 e 92,8 μm e as micropartículas apresentaram forma esférica, com paredes contínuas, porém rugosas, decorrente da utilização do ácido esteárico totalmente hidrogenado.

O estudo de estabilidade os difratogramas, obtidos por difração de raios-X, foram muito semelhantes entre os ensaios e praticamente constantes durante a estocagem, corroborando que não houve mudanças polimórficas. Este resultado mostra que a matriz lipídica utilizando o lipídio interesterificado e OSTH, podem ter funcionado como agentes de impedimento da expulsão do recheio ao longo do tempo e criando microestruturas para um bom alojamento da droga. Os termogramas, obtidos por DSC, em tempo zero, não apresentaram diferenças entre as amostras.

As curvas de liberação não apresentaram liberação inicial alta indicando a ausência de efeito “burst” e distribuição homogênea do material de recheio por toda a extensão da partícula.

De forma geral, as partículas lipídicas estudadas neste trabalho apresentaram bons resultados quanto à eficiência de encapsulação e boa capacidade de controle da liberação do composto ativo utilizado como recheio, mostrando-se potenciais para o uso futuro na indústria de alimentos.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, B., PASSERINI, N., PATTARINO, F., RODRIGUEZ, L. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.69, p.348-357, 2008.

ALVES, G. P.; SANTANA, M. H. A. Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties. *Powder Technology*, v. 145, p. 139-148, 2004.

AOCS, American oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the AOCS. 4a. ed. Champaign, 1997; 2004.

AOCS, American oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the AOCS. 4a. ed. Champaign, 1989.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation*, v.10, n. 4, p. 413-435, 1993.

ATAMA, A. A., SHICKE, B. C., PAEPENMULLER, T., MULLER-GOYMANN, C.C. Solid lipid Nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: Characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 48-57, 2007.

BARROS NETO, B., SACARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2a. Ed. Campinas: Unicamp, p.299. 1995.

BAYLEY, A. E. Melting and Solidification of Fats. New York, Interscience, p.357. 1950.

BERMEJO, P.; PEÑA, E.M.; DOMÍNGUEZ, R.; BERMEJO, A.; COCHO, J.A.; FRAGA, J.M. Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an in vitro method. *Food Chemistry*, v.77, p.361-369, 2002.

BUNGES, H., UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 59, p. 379-402, 2007.

CANEVAROLO JR., S.V. Técnicas de caracterização de polímeros. Artliber editora Ltda. São Paulo, Brasil, 1ª Ed. p.229-235, 2004.

CHAMBI, H. N. M.; ALVIM, I. D.; BARRERA-ARELLANO, D.; GROSSO, C. R. F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular. *Food Research International*, v. 41, p.229-236, 2008.

CHARTERIS, W.P., P.M. KELLY, L. MORELLI AND K. COLLINS,. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial population. *Int. J. Food Microbiol.*,v.35,p.1-27, 1998.

ELDEM, T., SPEISER, P., HINCAL, A., Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterisation of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharm. Res.* 8, 47–54., 1991.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C; ROCHA, G.A. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.11, n.2, p.103-112, 2008.

FAVIER, A.E. fatores nutricionais e clínicas que afetam a biodisponibilidade dos elementos-traço em humanos . In: U. Schlemmer, Editor, Biodisponibilidade '93; implicações nutricionais, químicas e de processamento de alimentos da disponibilidade de nutrientes. Processo, Parte 1: Ettlingen ., Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe (1993), pp 202-212 , 1993.

FREEMAN, C.P. The digestion, absorption and transport of fats – non-ruminants. United Kingdom, 1985

GERMAN, J.B., SIMONEAU, C. Phase transitions of edible fats and triglycerides: theory and applications. In: RAO, M.A., HARTEL, R.W., eds. Phase/state transitions in foods: chemical, structural, and rheological changes. New York: Marcel Dekker, p.187-216. 1998.

GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G.; ANDO, L.Y. Otimização da reação de interesterificação química do óleo de palma. Química Nova, São Paulo, v.28, n.4, p.633-636, 2005.

GUNSTONE, F.D., NORRIS, F.A. - Lipids in foods: chemistry, biochemistry and technology. Oxford: Pergamon Press, p. 43-51. 1983.

HERMANS, P.H. & WEIDINGER, A. Journal of Apply Physic, p. 491, 1948.

HU, F.-Q., JIANG, S-P., DU, Y-Z., YUAN, H., YE, Y-Q., & ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 45, 167-173, 2005.

INTAWONGSE, M.; DEAN, J.R. *In-vitro* testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. Trends in Analytical Chemistry, v.25, n.9, p. 876-886, 2006.

JACKSON, L.S.; LEE, K., Microencapsulation and the food industry. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie Food Science & Technology. v.24, p. 289-297, 1991.

JENNING, V., Feste Lipid-Nanopartikel (SLN) als Tragersystem für die dermale Applikation von Retinol. Ph.D. thesis, FU, Berlin. 1999.

JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*, n. 66, p. 115-126, 2000a.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 199, p. 167-177, 2000b.

JEON, B. J.; KIM, N. C.; HAN, E. M.; KWAK, H. S. Application of microencapsulated isoflavone into milk. *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, n.7, p. 859-865, 2005.

KELLER, G., LAVIGNE, F., LOISEL, C., OLLIVON, M., BOURGAUX, C. Investigation of the complex thermal behavior of fats – combined DSC and X-ray diffraction techniques. *Journal of Thermal Analysis*. v.47, p.1545-1565, 1996.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C.M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for ω 3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition *Journal of Microencapsulation*, v.18, n. 3, p. 347-357, 2001.

LEONEL, A., CHAMBI, N., BARRERA-ARELLANO, D., PASTORE, H., GROSSO, C. Production and characterization of lipid microparticles produced by spray cooling encapsulating a low molar mass hydrophilic compound. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. V.30, n.1, 2010.

LEONEL, A. J. Produção e caracterização de partículas lipídicas constituídas por ácidos graxos, gordura vegetal hidrogenada e lecitina na encapsulação de um composto hidrofílico de baixa massa molar. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2009.

MAGEE JR., E.L., & OLSON, N.F., Microencapsulation of cheese ripening systems: Formation of microcapsules. *Journal of Dairy Science*, 64, 600-610, 1981a.

MASCHKE, A., BECKER, C., EYRICH, D., KIERMAIER, J., BLUNK T., & GOPFERICH A., Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 175-187, 2007.

MENGER, F. M.; PERESYPKIN, A. V.; CARAN, K. L.; APKARIAN, R. P. A SPONGE Morphology in an Elementary Coacervate. *Langmuir*, v. 16, p. 9113-9116, 2000.

MÜLLER, R. H., RADTKE, M., WISSING, S. A., Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, n.242, 121- 128, 2002a.

MÜLLER, R. H.; Radtke, M.; Wissing, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 54, sup 1, p. S131-S155, 2002b.

MULLER, R.H., Jennings, V., Zusammensetzung, Herstellung und Verwendung einer Suspension verfestigter, amorpher Öltröpfchen, Deutsche Patentanmeldung 199 38 371.5, 1999.

NAKAGAWA K.; IWAMOTO S.; NAKAJIMA, M.; SHONO A.; SATO B K.MICROCHANNEL Emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.278, p.198-205, 2004.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R., ed. *Food chemistry*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, p. 139-244. 1985.

PIETKIEWICZ, J.; SZNITOWSKA, M.; PLACZEK, M. The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 310, p. 64-71, 2006.

QUINTANAR, G. D.; TAMAYO E. D.; GANEM, Q. A.; ALLÉRMANN, E.; DOELKER, E. Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 26, p. 211-218, 2005.

RABEK, J.F. *Experimental Methods in Polymer Chemistry: Applications of wide-Angle X-Ray Diffraction (WAXD) to the Study of the Structure of Polymers*, Wiley-Interscience Chichester, U.K. p. 505, 1980.

RÉ, M. I. Cápsulas inteligentes. *Ciência Hoje*, v. 27, n. 162, p. 24-29, 2000.

RODRIGUEZ, L.; PASSERINI, N.; CAVALLARI, C.; CINI, M.; SANCIN, P.; FINI, A. Description and preliminary evaluation of a new Ultrasonic atomizer for spray congealing processes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.183. p.133-143, 1999.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. The microstructure of spray-dried microcapsules. *Food Microstructure*, v. 7, p. 15-23, 1988.

RODRIGUEZ, L., PASSERINI, N., CAVALLARI, C., CINI, M., SANCIN, P., FINI, A. Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomizer for spray-congealing processes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 183, p.133–143, 1999.

SAVOLAINEN, M.; KHOO, C.; GLAD, H.; DAHLQVIST, C.; JUPPO, A. M. Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 244, p. 151-161, 2002.

SCHENK, H., VISSER, P., PESCHAR, R. Alternative precrystallization of cocoa butter. *The Manufacturing Confectioner*. v.86, n.1, p.67-72, 2006.

SCHENK, H., PESCHAR, R. Understanding the structure of chocolate. *Radiation Physics and Chemistry*. v.71., p.829-835, 2004.

SCHUBERT, M. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Characterisation of surfacemodified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 61, p. 77-86, 2005.

SCHWARZ, C., MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization, *J. Microencapsulation*. V.16, p.205-213. 1999.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SILVESTRE, B.A.D. Desenvolvimento e aplicação de gorduras *Low Trans* em margarina e bolo tipo inglês. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2008.

VAN SOEST, J.J., VLIEGENTHART, J.F.G. Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties. *Tibtech*, v.15, p.208-213, 1997.

UBBINK, J.; KRÜGER, J. Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends in Food Science and Technology*, London, v. 17, n. 5, p. 244-254, 2006.

VILLAMAR, D. F.; LANGDON, C. J. Delivery of dietary components to larval shrimps (*Penaeus vannamei*) by means of complex of complex microcapsules. *Marine Biology*. New York. V.115, n.4, p.635-642. 1993.

ZUR, M. A.; Schwarz, C.; Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 45, p. 149-155, 1998.

XIAOHONG LIN A, XINWEI LI, LIQIANG ZHENG, LI YU , QIQING ZHANG , WEICHANG LIU. Preparation and characterization of monocaprates nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. v.311, p.106–111, 2007

CAPITULO 4

APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE TOCOFEROIS EM SISTEMA ALIMENTÍCIO

RESUMO

O consumo de alimentos enriquecidos com produtos ativos continua em constante crescimento devido à sua conveniência e associação com alimentos saudáveis. Desta forma, o enriquecimento desse tipo de produto em alimentos tem sido vista pela indústria como uma forma de surpreender o consumidor e ganhar mercado. No entanto, alimentos enriquecidos com produtos ativos encapsulados podem apresentar alterações sensoriais, principalmente de aparência, aroma e sabor. Para perceber essas alterações, emprega-se a avaliação sensorial. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um teste de aceitação em relação a um conjunto de atributos: aparência, aroma, sabor e impressão global, no qual cinquenta e seis consumidores avaliaram quatro amostras de iogurte comercial enriquecido com micropartículas de α -tocoferol e uma amostra padrão sem adição de micropartículas de α -tocoferol. Optou-se por colocar neste produto 60% da ingestão diária recomendada - IDR (6 mg tocoferol/100 ml produto) partindo-se de quatro diferentes concentrações de micropartículas, todas adicionadas após a formulação pronta. Para a realização desse teste utilizou-se uma escala hedônica de nove pontos e as diferenças significativas entre os valores obtidos foram avaliadas por análise de diferença de médias no intervalo de 95% de confiança. Os atributos avaliados nas amostras mostraram nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao padrão. Quanto à intenção de compra do produto, mais de 55% dos consumidores responderam que “provavelmente compraria” e “certamente compraria” o iogurte enriquecido com α -tocoferol. Concluí-se que a utilização de micropartículas lipídicas contendo α -tocoferol na formulação de iogurte é que pela boa aceitação do produto e disposição de compra pelo consumido, pode-se recorrer a uso de micropartículas mais concentradas para esta finalidade.

PALAVRAS-CHAVE: *logurte; aceitabilidade sensorial; vitamina E, micropartículas.*

4.1. INTRODUÇÃO

Importantes transformações demográficas, econômicas, sociais e tecnológicas ocorridas nas últimas décadas propiciaram mudanças significativas no padrão de morbimortalidade nas sociedades modernas. O aumento da expectativa de vida, a redução de mortes por doenças infectoparasitárias e o aumento da mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis tornaram complexo o quadro de saúde das populações. Neste contexto, mudanças nos indicadores nutricionais também foram observadas (Ferreira; Magalhães, 2005).

As tendências de transição nutricional decorrentes da urbanização e industrialização ocorridas neste século direcionam a população para uma dieta mais ocidentalizada, com especial destaque para o aumento da densidade energética, maior consumo de carnes, leite e derivados ricos em gorduras, e redução do consumo de frutas, cereais, verduras e legumes, a qual, aliada à diminuição progressiva da atividade física, converge para o aumento no número de casos de obesidade e doenças associadas, problemas em constante ascensão no Brasil e no mundo (Mariath *et al.*, 2007).

Observando este cenário, há uma tendência mundial que aponta para a necessidade de que os alimentos não sejam somente vistos como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também como fonte de bem-estar e de saúde para os indivíduos. Esta mudança de perspectiva requer, indiscutivelmente, mudanças de paradigma no desenvolvimento de novos produtos, aplicando-se os métodos tradicionais, mas também se observando a necessidade do controle da bioacessibilidade de determinados componentes dos alimentos. Esta abordagem se torna cada vez mais relevante, conforme se estabelecem as relações entre genética, alimentação e saúde (Sanguansri e Augustin, 2006), e a microencapsulação é um meio efetivo de se alcançar tais objetivos.

Desta forma o enriquecimento dos alimentos, com inúmeros nutrientes, tem se tornado cada vez mais importante e rotineiro. Dentre os compostos adicionados aos alimentos, encontram-se vitaminas, minerais e aminoácidos. O

enriquecimento com vitaminas pode ser realizada pela adição de vitaminas sintéticas, puras ou em misturas, denominada “premix” (Carvalho, 1994).

O enriquecimento da vitamina E em alimentos é cada vez maior devido, especialmente, às funções que desempenha no organismo como agente antioxidante, envolvido no retardamento do envelhecimento e na proteção a doenças crônicas não transmissíveis, como Parkinson, Alzheimer, câncer e doenças cardiovasculares (Bianchini & Penteado, 2003; Brigelius-Flohé *et al*, 2002; Meydani, 2000). A vitamina E previne o dano oxidativo celular pela inativação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Atualmente, além da sua ação antioxidante, são discutidas as suas propriedades não-antioxidantes como modulação da sinalização celular e da transcrição de genes (Munteanu, Zingg & Azzi, 2004).

A Vigilância Sanitária, que regulamenta a adição de nutrientes em alimentos no Brasil, define que para a fortificação ou o enriquecimento de vitaminas e de minerais, 100mL ou 100g do produto pronto para o consumo forneça, no mínimo, 15% da IDR de referência, no caso de líquidos, e 30% da IDR de referência, no caso de sólidos. Para alimentos suplementados a legislação estabelece no mínimo 25% e no máximo 100% da IDRI do nutriente suplementado (Brasil, 1998 a, b).

Ressaltando-se a importância e o interesse da indústria de alimentos e do consumidor em, respectivamente, disponibilizar e adquirir produtos com qualidade sensorial e nutricional e observando-se, hoje, disponível no mercado, uma grande variedade de produtos, vem-se comprovar a necessidade de pesquisas que adequem tais produtos a fim de atender as exigências do consumidor.

Para este propósito, lança-se mão da Análise Sensorial, uma ferramenta que permite compreender as sensações e desejos do consumidor frente àquilo que experimenta, compra ou almeja adquirir.

Na indústria de alimentos, diversos são os testes e métodos de análise sensorial utilizados na avaliação sensorial de alimentos. A aplicação dos mesmos assegura informações importantes para as áreas de controle de qualidade, processamento, desenvolvimento e otimização de produtos e marketing (Piggott, 1995).

A Análise de Aceitação, um dos testes de consumidor, é uma metodologia valiosa e essencial para todo programa de avaliação sensorial. O hedonismo representa um componente substancial da resposta humana aos alimentos e seus estímulos. O hedonismo lida com o “gostar” e “desgostar” e envolve uma grande variedade de comportamentos, tais como: escolha entre dois ou mais produtos, escalas de aceitação de produtos, frequência de consumo e intenção de compra (Moskowitz, 1983).

Os testes de aceitação ou afetivos requerem equipe com grande número de participantes que representem a população de consumidores atuais ou potenciais do produto. A Escala Hedônica é um dos métodos mais empregados para medir da aceitação de produtos. Nela, o consumidor expressa sua aceitação em uma escala previamente estabelecida que varia, gradativamente, com base nos termos gosta e desgosta (Chaves; Sproesser, 2001).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Aplicação em sistema alimentício

Micropartículas lipídicas contendo α -tocoferol foram produzidas no Laboratório de Controle de qualidade do Departamento de Nutrição da Universidade de Campinas (Unicamp), de acordo com a metodologia descrita no capítulo 3 item 3.2.5.

O sistema modelo escolhido para a aplicação das micropartículas foi iogurte batido comercial. Para o respectivo estudo foi elaborada uma amostra padrão (sem adição de micropartículas de α -tocoferol), utilizando como matéria-prima só iogurte batido comercial. A partir da amostra padrão, foram preparadas quatro amostras adicionadas de capsulas lipídicas contendo α -tocoferol na concentração de 60% da IDR para adultos, de acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2005).

Tabela 1. Quantidade (em mg) de micropartículas lipídicas contendo α - tocoferol em 100 ml do produto (iogurte).

Amostra	% IDR**	Concentração de tocoferol (mg /100g de cápsulas)	mg micropartículas / 100 ml iogurte
Padrão	0	0	0
A	60	9575,18	60
B	60	18517,59	32
C	60	4497,9	133
D	60	14323,22	42

A _ (proporção lipídio/recheio 90/10); B _ (proporção lipídio/recheio 80/20); C _ (proporção lipídio/recheio 95/5); D _ (proporção lipídio/recheio 85/15)

Nota: **IDR de 10 mg

Fonte: Brasil, 2005

4.2.2. Avaliação sensorial do sistema alimentício

A avaliação sensorial foi realizada pelo teste de aceitação e intenção de compra em relação a um conjunto de atributos: aparência, aroma, sabor e impressão global, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em Campinas (SP), no período de (10:00 às 15:00 horas).

4.2.2.1.. Teste de aceitação

Foram convidados 56 consumidores de iogurte para realizar estudos de aceitação das amostras de iogurte comercial batido em relação à aparência, aroma, sabor e impressão global.

Para avaliar a aceitabilidade das amostras, os provadores receberam 25 mL de cada amostra à temperatura de refrigeração, em copos plásticos brancos de 40 mL. As amostras foram codificadas com números de três dígitos aleatórios e servidas aos julgadores de forma monádica seqüencial em ordem balanceada. Entre as avaliações das amostras, os provadores foram solicitados a lavar a boca com água à temperatura ambiente para eliminar possíveis sensações residuais. Todos os provadores avaliaram as amostras, através da escala hedônica estruturada de nove pontos (9=gostei muitíssimo a 1=desgostei muitíssimo).

O teste se deu em uma única sessão e em condições laboratoriais, ou seja, cabines sensoriais individuais, sob luz branca, temperatura ambiente confortável controlada a 20°C e ausência de ruídos e odores externos. Os provadores dispunham de água mineral a temperatura ambiente dentro das cabines.

4.2.2.2. Teste de Intenção de Compra

Na mesma ficha de aplicação de teste de aceitação foi avaliada a atitude do consumidor em relação à compra do produto. Foi utilizada a escala de atitude de

compra de cinco pontos, em que 5 indicava que o provador “certamente compraria o produto” e 1, que o provador “certamente não compraria o produto” (Meilgaard, Civille & Carr, 1999).

4.2.3. Análise estatística

Os resultados do Teste de Aceitação foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de comparação de médias de Tukey, ($p < 0,05$). com auxílio do software *Statística 5.5 for Windows*.

4.3. RESULTADOS

Teste de Aceitação

Participaram dos testes alunos de Graduação e Pós-graduação da Faculdade de Eng. de Alimentos (FEA) – Unicamp. Dos 56 consumidores, 35 eram do gênero feminino e 21 do masculino. A idade variou entre 17 e 32 anos.

As médias dos resultados das avaliações dos atributos aparência, aroma, sabor, textura e impressão global avaliados estão apresentadas na Tabela 2.

A análise de variância mostrou que as amostras não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) da amostra padrão em relação à aceitação e considerando que a média das notas das amostras para todos os atributos analisados encontraram-se ao redor de 7,0 (o que representa um índice de aceitação superior a 75%), indicando que todas as amostras foram bem aceitas.

A média das notas atribuídas à impressão global para a amostra padrão foi de 6,59 (índice de aceitação: 74%), a qual está entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”.

Tabela 2. Médias dos consumidores para cada um dos atributos avaliados no teste de aceitação com 56 pessoas.

Ensaio	Atributos Avaliados			
	Sabor	Aparência	Aroma	Imp. Global
Padrão	6,48 ^a	6,91 ^a	6,7 ^a	6,59 ^a
A	6,8 ^a	7,08 ^a	6,78 ^a	6,84 ^a
B	6,68 ^a	7,16 ^a	6,78 ^a	6,8 ^a
C	7,07 ^a	6,98 ^a	6,91 ^a	7,0 ^a
D	7,05 ^a	7,13 ^a	6,91 ^a	6,86 ^a

Médias com letras em comum na mesma coluna indicam que as médias não têm diferença significativa entre si ($p < 0.05$) pelo teste de Tukey.

Desta maneira pode-se considerar que o enriquecimento com microcápsulas lipídicas contendo α -tocoferol no iogurte comercial não interferiu nos atributos sensoriais do produto comercial.

Teste de intenção de compra

Após o teste de aceitação, os provadores foram solicitados a expressar a sua intenção de compra para as cinco amostras em estudo. A maioria dos consumidores respondeu que “provavelmente compraria” e “certamente compraria” os iogurtes enriquecidos com α -tocoferol. Esses resultados mostram que a intenção de compra está em concordância com a aceitação do consumidor pelo produto.

Tabela 3. Porcentagens para intenção de compras das amostras de iogurte avaliadas.

Escala	Amostras				
	Padrão	A	B	C	D
Certamente não compraria	14,3%	7,14%	8,9%	1,8%	3,6%
Provavelmente não compraria	19,6%	16,1%	10,6%	10,7%	5,4%
Tenho dúvidas se compraria	16,1%	16,0%	14,3%	12,5%	26,8%
Provavelmente compraria	26,8%	25,0%	33,9%	32,9%	30,4%
Certamente compraria	26,8%	28,6%	32,1%	34,0%	28,6%

4.4. CONCLUSÕES

A aceitação das amostras de iogurte comercial enriquecidos com micropartículas lipídicas contendo α -tocoferol como produto ativo não foram estatisticamente significativo em relação à amostra padrão ($p < 0,05$), sendo que estas não afetaram a aceitação dos atributos sensoriais característicos do iogurte comercial.

Pode-se concluir que a fortificação de α -tocoferol na formulação de iogurte é uma opção interessante para a indústria, uma vez que o produto avaliado apresentou uma boa aceitação e intenção de compra pelo consumidor.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIANCHINI R, PENTEADO MVC. Vitamina E. In: Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole; 2003. p.23-164.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18828&word=Acesso> em: 01 setembro 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Alimentos adicionados de nutrientes essenciais: alimentos enriquecidos [acesso em 04 set 2011]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Alimentos adicionados de nutrientes essenciais: suplementos vitamínicos e ou minerais [acesso em 04 set. 2011]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>

BRIGELIUS-FLOHÉ R, KELLY FJ, SALONEN JT, NEUZIL J, ZINGG JM, AZZI A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. Am J Clin Nutr. 76(4):703-16, 2002.

CARVALHO, P.R.N. Enriquecimento de Alimentos. Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1-7, 1994.

CHAVES, J. B. P.; SPROSSER, R. L. Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas. Viçosa: UFV, 2001. 81 p.

MARIATH, A., GRILLO, L., OLIVEIRA DA SILVA, R.,SCHMITZ, P., CAMPOS, C., MEDINA, J., KRUGER, R. Obesity and risk factors for the development of chronic non-transmissible diseases among consumers in a foodservice unit. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 23(4):897-905, abr, 2007

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. *Sensory Evaluation Techniques*. Florida CRC Press, 3 ed. 1999. 387p.

MEYDANI M. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(6 Suppl):1665S0-68S.

MOSKOWITZ, H. R. *Product testing and sensory evaluation of foods*. Westport: Food & Nutrition Press, 1983, 605 p.

MUNTEANU, A., ZINGG, J.M., AZZI, A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E: myth or reality. *J Cell Mol Med*. 8(1):59-76, 2004.

SANGUANS P., AUGUSTIN, M. Nanoscale materials development – a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, London, v. 17, n. 10, p. 547-556, 2006.

STATSOFT INC., *Statistica for Windows, Version 6.0*, 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104, USA, 1998

5. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Os resultados experimentais obtidos indicaram algumas linhas potenciais para continuidade do presente trabalho:

1. Avaliar a funcionalidade de outras matrizes com lipídios de diferentes tamanhos de cadeias e estrutura química.
2. Caracterizar as micropartículas quanto ao seu potencial zeta.
3. Avaliar e maximizar outros parâmetros de processo de microencapsulação tais como: temperatura do ar de resfriamento, pressão do ar de atomização e taxa de alimentação.
4. Análises de liberação do recheio em diferentes temperaturas e outros meios de liberação.
5. Estudar a aplicabilidade das micropartículas, em produtos como sorvetes, chocolates, doces, etc., avaliando a aceitação frente a produtos tradicionais do mercado.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Micropartículas obtidas por spray chiling utilizando matrizes lipídicas apresentaram bons resultados quanto à eficiência de encapsulação e boa capacidade de controle da liberação do produto ativo utilizado, mostrando-se potenciais para o uso futuro na indústria de alimentos.
- ✓ A eficiência de encapsulação de α -tocoferol variou na faixa de 89,6 a 99,3%.
- ✓ O diâmetro médio das micropartículas lipídicas situou-se entre 50,8 e 92,8 μm e a distribuição do tamanho de partícula variou de 0,1 a 200 μm , com a maioria das partículas situadas entre 30 – 150 μm .
- ✓ O estudo de estabilidade os difratogramas, foram muito semelhantes entre os ensaios e praticamente constantes durante a estocagem, corroborando que, não houve mudanças polimórficas.
- ✓ Os termogramas, obtidos por DSC, em tempo zero, não apresentaram diferenças entre os ensaios.
- ✓ Todas as micropartículas, mantiveram sua integridade em solução aquosa após tratamento a 37°C por 2 horas, em pH ácido (1, 2).
- ✓ Todas as micropartículas foram destruídas com liberação completa do produto ativo, quando incubadas em condições entéricas simulando condições intestinais (pH 7 com adição da lipase pancreatica, 37°C, 4 horas).
- ✓ As curvas de liberação não apresentaram liberação inicial alta indicando a ausência de efeito “burst” e distribuição homogênea do material de recheio por toda a extensão da partícula.

- ✓ No estudo da aplicação em sistema alimentício avaliado sensorialmente, a aceitação das amostras não diferiram estatisticamente da amostra padrão ($p < 0,05$), sendo que a adição de micropartículas lipídicas contendo α -tocoferol no iogurte comercial não afetaram a aceitação dos atributos sensoriais avaliados pelos consumidores

- ✓ De forma geral, as partículas lipídicas estudadas neste trabalho apresentaram bons resultados quanto à eficiência de encapsulação e boa capacidade de controle da liberação do composto ativo utilizado como recheio, mostrando-se potenciais para o uso futuro na indústria de alimentos.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Nome: _____

idade: _____ Data: _____

PROJETO DE POS-GRADUAÇÃO – DOUTORADO

Avaliação sensorial de iogurte comercial enriquecido com vitamina E .

A pesquisa visa avaliar as características sensoriais de iogurte comercial enriquecido com vitamina E encapsulados, por provadores de 18 a 50 anos, habituados ao consumo de produtos de iogurte. O grupo de provadores será composto por alunos, professores, funcionários e visitantes da FEA – UNICAMP, sendo recrutados por meio de anúncios em cartazes distribuídos por locais de acesso comum e mural *on-line* da FEA.

A análise sensorial será conduzida com amostras de iogurte comercial enriquecida com vitamina E, que serão preparadas em condições de higiene e de segurança alimentaria, não acarretando risco à saúde do consumidor (provador).

Como o Iogurte é um derivado lácteo não é recomendada a participação de pessoas com intolerância a lactose, alergia a proteínas do leite de vaca.

O consumo de Iogurte comercial enriquecido com vitamina E em análise não oferece nenhum desconforto ou risco para você que participar da pesquisa, sendo que o enriquecimento de vitamina E é permitido pela legislação para uso em alimentos, e encontram-se disponíveis em muitos produtos atualmente comercializados no mercado.

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar.

Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade.

O pesquisador ira tratar a sua identidade de forma sigilosa. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional.

Eu,..... , declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado (a) pela o pesquisador Oscar Diaz Gamboa doutorando em Tecnologia de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordo ainda em participar da pesquisa. Foi me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Assinatura do provador

Oscar Diaz Gamboa

Pesquisadora responsável pelo projeto
Contatos: oscarw07@fea.unicamp.br
Fones: (19) 3521-3401 (FEA-UNICAMP)

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

1. Por favor, observe, aspire, prove e avalie as amostras e de acordo com a escala da esquerda, descreva o quanto você gostou ou desgostou:

9	Gostei muitíssimo
8	Gostei muito
7	Gostei moderadamente
6	Gostei ligeiramente
5	Nem gostei nem desgostei
4	Desgostei ligeiramente
3	Desgostei moderadamente
2	Desgostei muito
1	Desgostei muitíssimo

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global

2. Indique sua opinião quanto à sua **INTENÇÃO DE COMPRA** das amostras.

	Amostra nº				
Certamente não compraria					
Provavelmente não compraria					
Tenho dúvidas se compraria ou					
Provavelmente compraria					
Certamente compraria					

Figura 1. Ficha utilizada na aplicação do Teste de Aceitação e teste de intenção de compra.

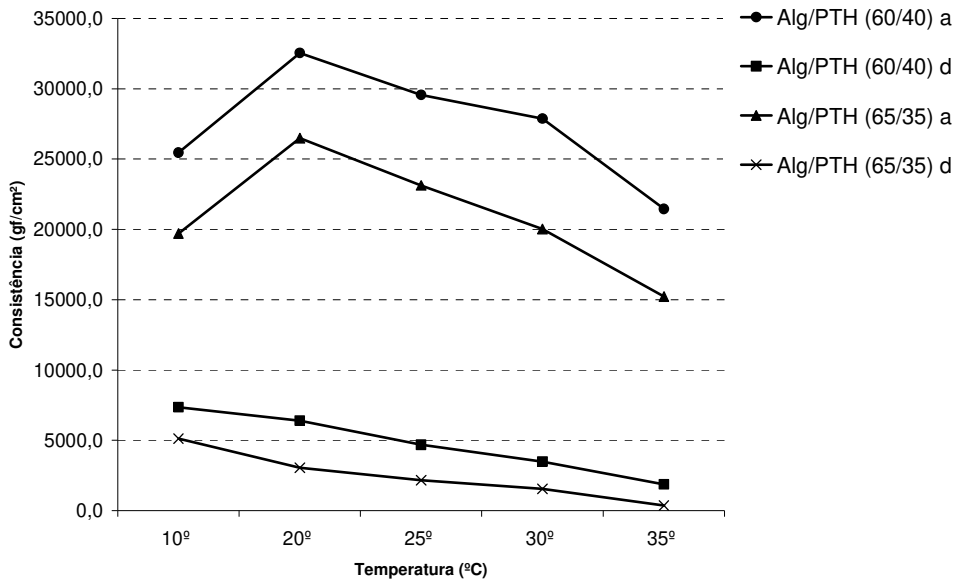


Figura 2. Consistência das frações de Algodão /PTH antes (a) e depois (d) da interesterificação.

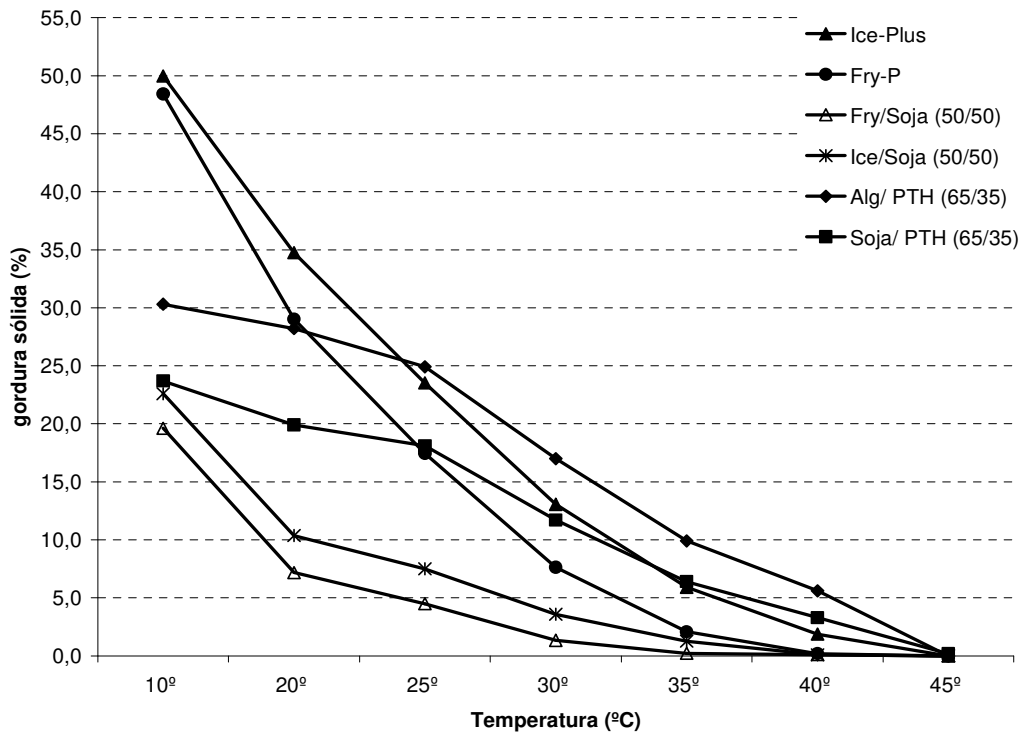


Figura 3. Curvas de sólidos das gorduras comerciais e das gorduras interesterificadas escolhidas para aplicação.

Tabela 1. Parâmetros de cristalização das gorduras de algodão/PTH a 25°C.

Amostra	Período de nucleação (min)	Teor máximo de sólidos (%)
Algodão/PTH (60/40) a	4	38
Algodão/PTH (60/40) d	7	21
Algodão/PTH (65/35) a	4	32
Algodão/PTH (65/35) d	7	17

Tabela 2. Composição em TAG das matérias-primas e das frações antes (A) e depois (D) da interesterificação, segundo grau de saturação dos AG.

Amostras	UUU	SUU	SSU	SSS
Óleo de Algodão	26,0	51,7	20,2	2,1
Gordura PTH^a	-	-	5,3	94,7
Algodão / PTH (65/35) A	16,1	24,4	19,5	40,0
Algodão / PTH (65/35) D	18,7	34,5	27,6	19,2

U= insaturado; S= saturado; A= antes da reação; D= depois da reação

Tabela 3. Composição em AG (teórica) das gorduras interesterificadas em planta piloto.

Ácidos Graxos	Algodão / PTH
	65/35
C12:0	0,1
C14:0	0,9
C16:0	29,5
C16:1	0,3
C17:0	0,1
C18:0	19,1
C18:1 TRANS	0,6
C18:1	12,7
C18:2 TRANS	0,4
C18:2	35,5
C18:3 TRANS	0,2
C18:3	0,1
C20:0	0,4
C20:1	0,1
C22:0	-
Saturados (%)	50,1
Monoinsaturados (%)	13,1
Polinsaturados (%)	35,6
Trans totais (%)	1,2
P/Sat^a	0,7

(-) não detectado nas condições de análise.

^a Relação polinsaturado / saturado

Tabela 4. Composição em TAG* da amostra algodão / PTH (65/35) antes (a) e depois (d) da interesterificação química.

	TAG	OA ¹	PTH ²	a	d
C46	MPP	-	0,8	-	0,5
	PPP	1,6	9,6	1,8	5,5
C48	MOP	-	-	0,3	0,5
	MLP	-	-	0,6	1,1
C50	PPS	0,5	39,3	16,4	8,5
	PPO	4,5	2,5	4,4	5,5
	PPL	15,1	0,2	6,9	14,1
	PPLn	-	-	0,7	-
	MOL	0,6	-	-	0,6
	MLL	0,8	-	0,5	0,6
C52	PSS	-	35,3	15,8	4,5
	PSO	0,5	1,1	0,8	5,2
	PSL	-	1,5	4,2	0,7
	POO	5,9	-	-	13,1
	POL	15,6	-	8,7	8,2
	PLL	27,5	-	13,5	11,6
	PLLn	-	-	0,3	-
	PLnLn	-	-	-	-
C54	SSS	-	9,7	6	0,8
	SSO	-	-	0,8	1,5
	SOO	-	-	-	-
	SSL	-	-	0,8	-
	SOL	1,4	-	1,4	0,5
	SLL	-	-	-	-
	OOL	5,3	-	-	3,3
	OLL	10,0	-	2,4	4,1
	LLL	10,7	-	1,3	0,8
	LLLn	-	-	6	5,5
	LLnLn	-	-	6,4	3,3
	LnLnLn	-	-	-	2,5

* Média entre duplicatas de injeção da amostra; (-) não detectado; (1) óleo de algodão; (2) Palma totalmente hidrogenada; a= antes da Interesterificação; d= depois da Interesterificação L= linoléico; Ln= linolênico; M= mirístico; O= oléico; P= palmítico; S= esteárico.

Algodão/PTH (65/35)

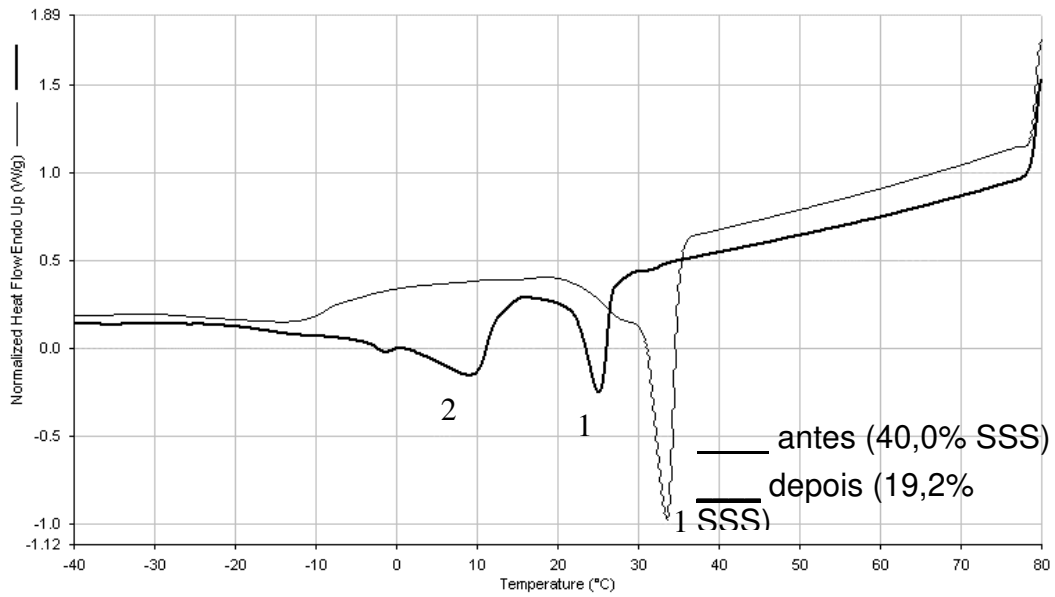


Figura 4. Curvas de cristalização das frações de Algodão/ PTH antes e depois da interesterificação.

Algodão/PTH (65/35)

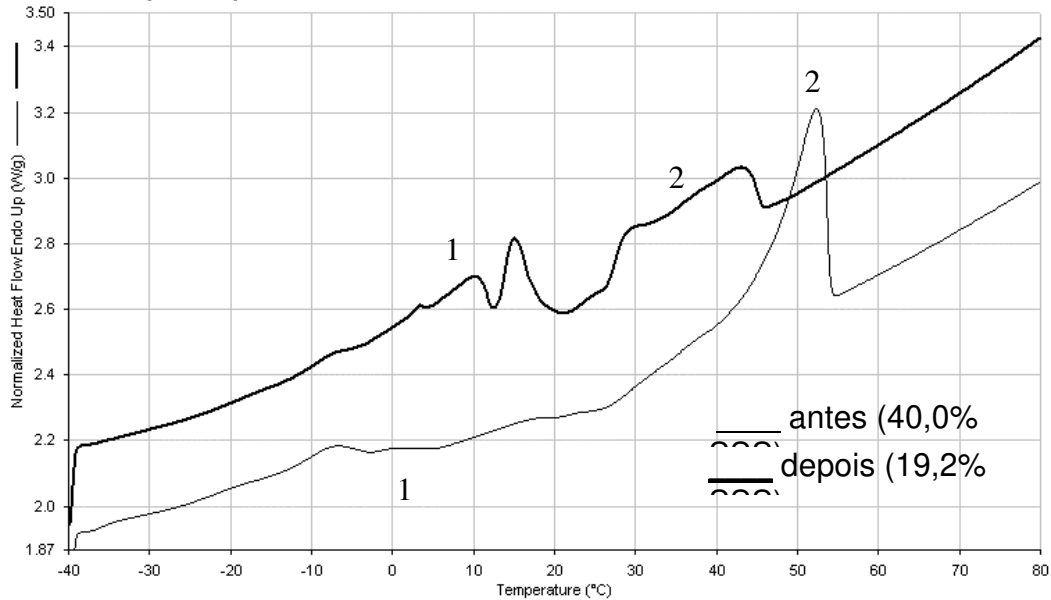


Figura 5. Curvas de fusão das frações de Algodão/ PTH antes e depois da interesterificação.

Tabela 5. Parâmetros dos cristais para as frações de Algodão/PTH antes e depois da interesterificação (30°C/ 24 h).

Algodão/ PTH	Antes		Depois	
	Ø médio (µm)	n ° cristais	Ø médio (µm)	n ° cristais
65/35	5,00	2.536	4,75	13.463

Tabela 6. Parâmetros dos cristais para as frações de Algodão/PTH antes e depois da interesterificação (37°C/ 24 h).

Algodão/ PTH	Antes		Depois	
	Ø médio (µm)	n ° cristais	Ø médio (µm)	n ° cristais
65/35	7,05	631	12,89	77

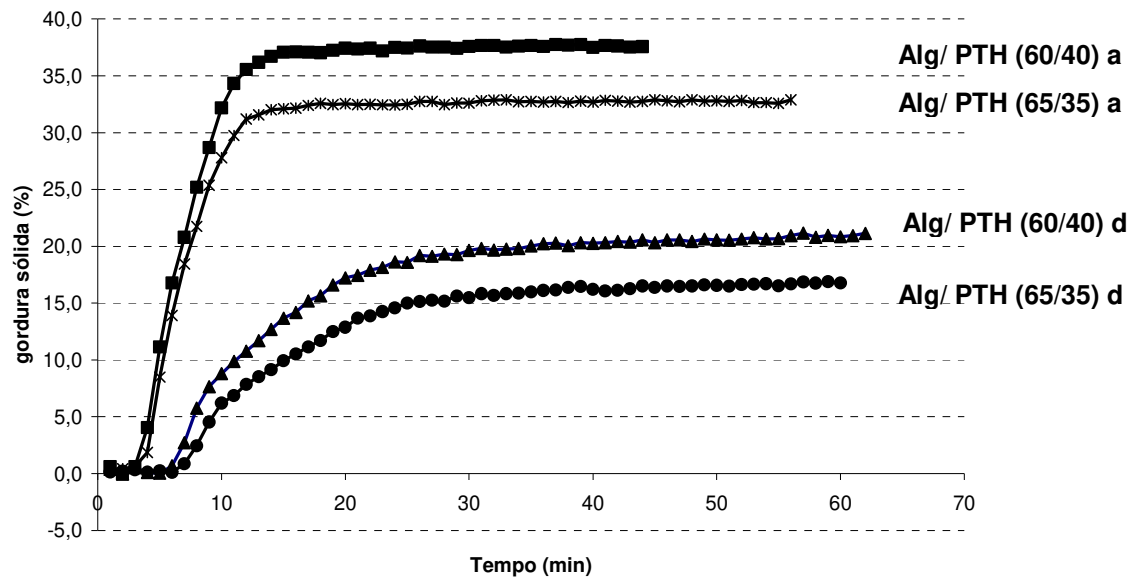


Figura 6. Curvas de cristalização isotérmica (25°C) das frações de Algodão/ PTH antes (a) e depois (d) da interesterificação.