



**MARÍÁ ANDRADE TEIXEIRA**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E DE  
DIFERENTES TÉCNICAS DE GOTEJAMENTO NA  
ENCAPSULAÇÃO DE ALFA-TOCOFEROL POR  
GELIFICAÇÃO IÔNICA**

**LAVRAS-MG  
2021**

**MARIÁ ANDRADE TEIXEIRA**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E DE DIFERENTES TÉCNICAS  
DE GOTEJAMENTO NA ENCAPSULAÇÃO DE ALFA-TOCOFEROL POR  
GELIFICAÇÃO IÔNICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Engenharia de Biomateriais, para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Teixeira, Mariá Andrade.

Influência da adição de biopolímeros e de diferentes técnicas de gotejamento na encapsulação de alfa-tocoferol por gelificação iônica / Mariá Andrade Teixeira. - 2021.

96 p. : il.

Orientador(a): Diego Alvarenga Botrel.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.  
Bibliografia.

1. Energia ultrassônica. 2. Antioxidante. 3. Vitamina E. I.  
Botrel, Diego Alvarenga. II. Título.

**MARIÁ ANDRADE TEIXEIRA**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E DE DIFERENTES TÉCNICAS  
DE GOTEJAMENTO NA ENCAPSULAÇÃO DE ALFA-TOCOFEROL POR  
GELIFICAÇÃO IÔNICA**

**INFLUENCE OF THE ADDITION OF BIOPOLYMERS AND DIFFERENT  
DRIPPING TECHNIQUES IN THE ALPHA-TOCOPHEROL ENCAPSULATION BY  
IONIC GELATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Engenharia de Biomateriais, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 04 março de 2021.

Dra. Elisangela Elena Nunes Carvalho	UFLA
Dra. Marali Vilela Dias	UFLA
Dra. Joyce Maria Gomes da Costa	UFVJM
Dra. Bruna Mara Aparecida de Carvalho	UFMG
Dra. Michele Corrêa Bertoldi	UFJF

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2021**

## **AGRADECIMENTOS**

“Agradecer também faz parte da oração”, minha fé fez a jornada mais fácil e algumas pessoas tornaram essa jornada mais bonita.

E é por isso que tenho tanto a agradecer ao professor Dr. Diego Alvarenga Botrel pela orientação e por todos os ensinamentos.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, pela oportunidade de realização do doutorado.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro desta pesquisa (PROCESSO N.: CAG-APQ-02487-16) e pela concessão da bolsa, à CAPES e ao CNPq.

Aos amigos do Laboratório de Embalagens e Encapsulação, em especial às meninas da “Turma das quartas” e à Isadora pela dedicação e ajuda de sempre.

À minha família pelo apoio, especialmente meus pais e minha irmã Patrícia e ao Eric pela companhia, paciência e amor.

Muito obrigada!

## RESUMO GERAL

Bioativos são componentes que promovem benefícios à saúde do ser humano, podem estar presentes naturalmente em alguns alimentos, mas também podem ser adicionados como ingredientes em outras matrizes alimentícias desenvolvendo esse tipo de produto. Porém, esses compostos possuem limitações quanto ao seu uso, pois são instáveis à presença de luz, oxigênio, mudanças de pH e temperatura. Com isso, é necessário desenvolver técnicas de proteção desses compostos, como os métodos de microencapsulação. O método utilizado para a microencapsulação do  $\alpha$ -tocoferol foi a gelificação iônica utilizando o alginato combinado a outros biopolímeros. Para definir as melhores condições de microencapsulação do  $\alpha$ -tocoferol o trabalho foi realizado em etapas. Na primeira etapa, foram produzidas emulsões utilizando o alginato, combinado com outros materiais (goma arábica, goma de cajueiro, inulina, isolado proteico de soro e maltodextrina). Essas emulsões foram caracterizadas e analisadas quanto à reologia. As formulações utilizando a inulina e a goma de cajueiro apresentaram boa homogeneidade ( $span = 3,85$ ) e boa dispersão de gotas (microscopia), respectivamente, e por isso, foram os biopolímeros selecionados para a segunda etapa do trabalho. Nessa segunda etapa, as emulsões foram atomizadas utilizando dois diferentes tipos de bico (ar pressurizado e ultrassônico) para a produção das microesferas de  $\alpha$ -tocoferol. Essas foram caracterizadas por FTIR-ATR, eficiência de encapsulação, morfologia, distribuição de tamanho e perfil de liberação. Em relação à eficiência de encapsulação, notou-se uma maior concentração de  $\alpha$ -tocoferol nas microesferas produzidas utilizando atomização ultrassônica. Os diferentes métodos utilizados interferiram diretamente no tamanho das microesferas produzidas. Percebeu-se que as microesferas produzidas a partir de ar pressurizados apresentaram tamanhos próximos a 130  $\mu m$  e aquelas produzidas por energia ultrassônica apresentaram tamanhos entre 70 e 90  $\mu m$ . Em relação ao perfil de liberação, não houve diferença significativa quanto à estabilidade das microesferas produzidas pelos diferentes métodos. Diante desses resultados, foi realizada então a terceira etapa do projeto, na qual, definiu-se utilização da energia ultrassônica para produção das microesferas. Com isso, foram mantidas as combinações alginato + inulina e alginato + goma de cajueiro, ambos 1,75% (m/v) + 0,5% (m/v), as microesferas foram produzidas e em seguida liofilizadas. Novamente, as microesferas foram caracterizadas. Houve um aumento na eficiência de encapsulação quando adicionada a inulina ou a goma de cajueiro em relação ao alginato puro, de 76,31% para 80,83 e 78,68%, respectivamente. Quando mantidas a temperaturas mais altas por 30 dias os materiais complementares também contribuíram para uma maior estabilidade do ativo nas microesferas. Na temperatura de 40 °C as microesferas de alginato e inulina apresentaram a maior atividade antioxidante (11,85%) ao final do período estudado. Ao analisar a bioacessibilidade do  $\alpha$ -tocoferol, verificou-se que a presença de inulina resultou em uma maior bioacessibilidade (58,60%), em comparação às microesferas produzidas utilizando somente o alginato (16,22%). Com isso, podemos concluir que é possível desenvolver um sistema de liberação controlada eficiente e estável utilizando o alginato e biopolímeros complementares compatíveis através da atomização por energia ultrassônica, e que estes promovem melhorias nas propriedades das micropartículas permitindo a incorporação dessas em diferentes matrizes alimentícias.

**Palavras-chave:** Energia ultrassônica. Antioxidante. Vitamina E. Inulina. Goma de cajueiro. Alginato.

## GENERAL ABSTRACT

Bioactives are components that promote human health benefits, they can be naturally present in some foods, but they can also be derived as ingredients in other food matrices developing this type of product. However, these compounds have limitations regarding their use, as they are unstable to the presence of light, oxygen, changes in pH and temperature. Therefore, it is necessary to develop techniques for protecting these compounds, such as microencapsulation methods. The method used for microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol was ionic gelation using alginate combined with other biopolymers. To define the best microencapsulation conditions for  $\alpha$ -tocopherol, the work was carried out in stages. In the first stage, emulsions were produced using alginate, combined with other materials (gum arabic, cashew gum, inulin, whey protein isolate and maltodextrin). These emulsions were characterized and analyzed for rheology. The formulations using an inulin and an independent cashew gum good homogeneity (span = 3.85) and good drop dispersion (microscopy), respectively, and for this reason, were the biopolymers selected for a second stage of the work. In this second stage, as emulsions they were atomized using two different types of nozzle (pressurized and ultrasonic air) for the production of  $\alpha$ -tocopherol microbeads. These were characterized by FTIR-ATR, encapsulation efficiency, morphology, size distribution and release profile. Regarding the encapsulation efficiency, a higher concentration of  $\alpha$ -tocopherol was observed in the microbeads produced using ultrasonic atomization. The different methods used directly interfered with the size of the microbeads produced. It was noticed that as microbeads produced from pressurized air source close to 130  $\mu\text{m}$  and those produced by ultrasonic energy generated between 70 and 90  $\mu\text{m}$ . Regarding the release profile, there was no significant difference regarding the stability of the microbeads produced by the different methods. In view of these results, the third stage of the project was carried out, in which the use of ultrasonic energy for the production of microbeads was defined. With that, alginate + inulin and alginate + cashew gum models were maintained, both 1.75% (w/v) + 0.5% (w/v), as microbeads were produced and then lyophilized. Again, microbeads were characterized. There was an increase in encapsulation efficiency when inhaling an inulin or a cashew gum in relation to pure alginate, from 76.31% to 80.83 and 78.68%, respectively. When kept at the highest temperature for 30 days, the complementary materials also contributed to a greater stability of the asset in the microbeads. At 40 °C to alginate and dissipated inulin microbeads, the highest antioxidant activity (11.85%) at the end of the study period. When analyzing the bioaccessibility of  $\alpha$ -tocopherol, it was found that the presence of inulin resulted in greater bioaccessibility (58.60%), compared to microbeads produced using only alginate (16.22%). With this, we can conclude that it is possible to develop a controlled and efficient transmission system using alginate and complementary biopolymers that are compatible through atomization by ultrasonic energy, and that they promote improvements in the properties of microparticles allowing their incorporation into different food matrices.

**Keywords:** Ultrasonic energy. Antioxidant. Vitamin E. Inulin. Cashew gum. Alginate.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Compostos bioativos</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Alfa-tocoferol</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Microencapsulação</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Polímeros naturais</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Alginato de sódio</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Goma arábica</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Goma de cajueiro</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Inulina</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Isolado proteico de soro</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Maltodextrina</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Emulsão</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>Reologia</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Gelificação iônica</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Atomização</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Atomização ultrassônica</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6</b>	<b>Mecanismos de liberação</b> .....	<b>31</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Bioacessibilidade</b> .....	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>34</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	<b>39</b>
	<b>ARTIGO 1 – VIABILIDADE DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE <math>\alpha</math>-TOCOFEROL POR GELIFICAÇÃO IÔNICA UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE GOTEJAMENTO</b> .....	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>72</b>
	<b>ARTIGO 2 – ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DE <math>\alpha</math>-TOCOFEROL MICROENCAPSULADO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA ASSISTIDO POR ATOMIZAÇÃO ULTRASSÔNICA</b> .....	<b>77</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>78</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>80</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>93</b>



**PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem procurado o desenvolvimento de produtos funcionais para suprir uma demanda crescente do mercado, esses produtos funcionais são alimentos que além de nutrir, promovem a saúde do consumidor. Uma das formas de produzir esses alimentos é através do uso de compostos bioativos como ingredientes em formulações alimentícias.

Os compostos bioativos apesar de apresentarem características funcionais, são muito instáveis a fatores como luz, temperatura e oxigênio, o que limita a sua aplicação direta e incorporação em algumas matrizes alimentícias. Para melhorar essa instabilidade, a microencapsulação é uma técnica que proporciona proteção desses compostos e permite o seu uso no desenvolvimento de uma gama maior de novos produtos alimentícios.

O  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOC) é um exemplo de composto bioativo que pertence à família da vitamina E, que é a principal antioxidante lipossolúvel da dieta, atuando em funções importantes no corpo. A vitamina E atua como um antioxidante que interrompe o processo oxidativo prevenindo a propagação de reações de radicais livres, sendo que o  $\alpha$ -tocoferol é o que apresenta essa atividade biológica mais alta.

A microencapsulação é um processo já utilizado na indústria de alimentos e pode ser realizada através de diversas técnicas, de acordo com as características físico-químicas do composto a ser encapsulado e do material de parede e da necessidade de aplicação. Compostos muito instáveis necessitam de métodos de microencapsulação que apresentem condições de processo brandas, assim como a gelificação iônica.

O método de gelificação iônica é baseado na interação eletrostática de um polímero carregado e um íon multivalente. Nessa técnica o polímero mais utilizado é o alginato, um polieletrólito aniônico que apresenta características tecnológicas importantes, como não-tóxico (“Generally recognized as safe” – GRAS), abundante e de fonte natural, biodegradável, biocompatível e capaz de formar gel.

No processo de gelificação iônica algumas das principais variáveis como o tipo de atomizador, e o tipo e concentração do material polimérico (encapsulante) influenciam diretamente no tamanho, morfologia, estabilidade e eficiência de encapsulação da microesfera produzida, ou seja, interfere na viabilidade da técnica e sua aplicação.

Processos mais simples de gelificação iônica utilizam técnicas de gotejamento para produção das partículas, porém esses produzem macroesferas e apresentam limitações quanto à automação e aumento de escala do processo. Para aplicação das microesferas contendo

compostos bioativos produzidas pela técnica de gelificação iônica, de uma maneira geral, quanto menor forem essas partículas, melhor será sua aplicação tecnológica pois melhora suas propriedades como dispersibilidade, homogeneidade, estabilidade e eficiência de encapsulação. Desta forma, métodos alternativos para a formação das microesferas tem sido estudados sendo um deles a atomização por energia ultrassônica.

O uso de energia ultrassônica para a atomização de fluidos/emulsões utiliza o fenômeno de cavitação para quebrar o líquido, que ocorre por meio de energia de alta intensidade e frequência, e é gerado pela onda de ultrassom. Diferentemente da atomização por ar pressurizado que usa a energia mecânica para pressurizar a lâmina de líquido, aumentando sua energia cinética para uma possível desintegração para formação das gotículas

Por outro lado, apesar das características tecnológicas positivas do alginato já apresentadas, este apresenta baixa capacidade de barreira, produzindo microesferas que apresentam menor estabilidade e a limitação da produção de microesferas porosas utilizando somente alginato em baixas concentrações pode ser resolvida através da adição de outros biopolímeros, que poderiam melhorar a barreira produzida através do aumento da densidade da matriz encapsulante e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade das microesferas produzidas na formação de um sistema de liberação controlada mais eficiente.

Diante do exposto o objetivo do trabalho foi avaliar e determinar qual(is) biopolímero(s) adicionado(s) em conjunto ao alginato tem a capacidade de melhorar as suas propriedades, analisando as características necessárias para a viabilidade do processo com análises de viscosidade, homogeneidade e qualidade das emulsões produzidas para a formação das microesferas de  $\alpha$ -tocoferol. Definidos os materiais complementares mais adequados ao alginato, o segundo objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes técnicas de atomização das emulsões, variando-se a aplicação do tipo de energia (mecânica e ultrassônica). Além disso, foi realizada a avaliação da estabilidade e bioacessibilidade das microesferas contendo  $\alpha$ -tocoferol produzidas por meio da atomização ultrassônica com o uso de inulina e goma de cajueiro como materiais complementares ao alginato.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Compostos bioativos

Os compostos bioativos tem sido amplamente aplicados na indústria de alimentos com o objetivo de fornecer produtos com características funcionais e suprir uma demanda crescente do consumidor. Apesar dos conhecidos efeitos benéficos à saúde de matrizes bioativas ou dos compostos isolados, eles apresentam certa fragilidade que deve ser considerada no seu uso direto ou na incorporação de alimentos. Muitos desses produtos são instáveis à presença de luz, oxigênio e íons, além de serem sensíveis à mudanças de pH e temperatura (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; STRATULAT *et al.*, 2014).

Compostos lipofílicos tem baixa solubilidade, o que restringe sua incorporação em algumas matrizes alimentícias, especialmente em carreadores à base de água, e influencia sua biodisponibilidade no corpo. A massa molecular, funcionalidade e polaridade influencia sua solubilidade, estado físico, estabilidade química e biodisponibilidade. É muito difícil avaliar a biodisponibilidade desses compostos, já que uma vez metabolizado eles alcançam o sistema circulatório sistêmico onde são armazenados, utilizados ou excretados. Dependendo da concentração e do tempo dessas moléculas em um determinado tecido, ou seu uso em alguma função biológica, sua biodisponibilidade pode ser estimada (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

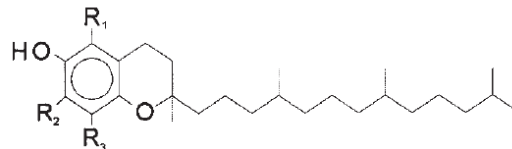
Para superar os problemas relacionados ao uso direto de compostos/extratos bioativos, diversas técnicas tais como processos de microencapsulação surgem como um potencial na indústria de alimentos para lidar com sua incorporação, seja para conferir propriedades funcionais ou para proteger o próprio componente bioativo (DE SOUZA *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2017).

Do ponto de vista prático, a técnica de microencapsulação protege o material de núcleo do meio ambiente, isso aumenta a vida útil do produto pela redução da transferência entre o núcleo e o meio em volta, e protegendo as moléculas da reação com outros constituintes da matriz alimentícia, os quais podem diminuir sua biodisponibilidade. A microencapsulação também aumenta a solubilidade, dispersibilidade e fluxo do bioativo (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

### 2.1.1 Alfa-tocoferol

O  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOC) pertence à família da vitamina E, que é a principal antioxidante lipossolúvel da dieta, atuando em funções importantes no corpo. A vitamina E é sintetizada somente por plantas e suas principais fontes são os óleos vegetais de germe de trigo, girassol e cártamo. Vitamina E é o nome genérico dado ao conjunto de mais três tocoferóis ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e quatro tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) (COMBS, 2008; LUO *et al.*, 2011). O  $\alpha$ -tocoferol se diferencia dos outros tocoferóis pela presença do radical metil ( $-\text{CH}_3$ ) nas três ramificações ( $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  e  $\text{R}_3$ ) do anel aromático da estrutura (FIGURA 1) (COMBS, 2008).

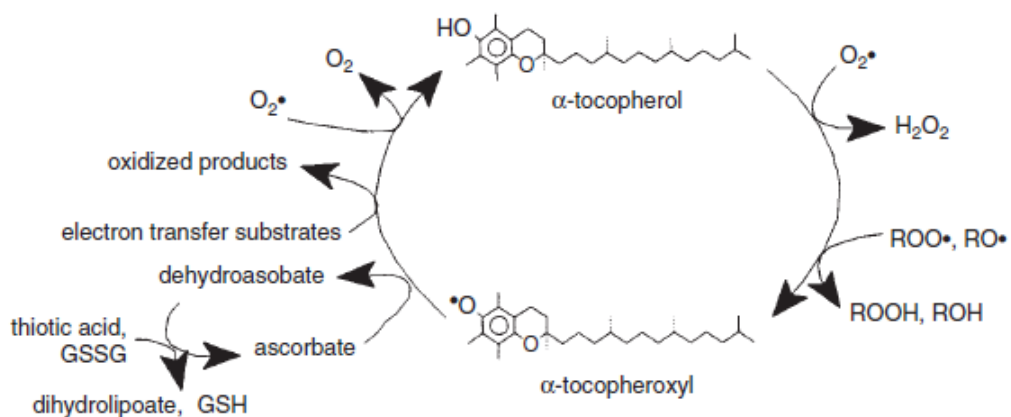
Figura 1 – Estrutura química do grupo tocoferol da vitamina E.



Fonte: Combs (2008).

A vitamina E atua como um antioxidante que quebra a cadeia prevenindo a propagação de reações de radicais livres, sendo que o  $\alpha$ -tocoferol é o que apresenta essa atividade biológica mais alta. Essa atividade antioxidante envolve a redução de radicais livres, protegendo contra reações potencialmente deletérias dessas espécies oxidantes altamente reativas. O consumo dessa vitamina está relacionado à redução do risco de diversas doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares (COMBS, 2008; LUO *et al.*, 2011). O ciclo de reações redox do  $\alpha$ -tocoferol pode ser visto na Figura 2.

Figura 2 – Ciclo de reações redox do  $\alpha$ -tocoferol.



Fonte: Combs (2008).

O  $\alpha$ -TOC é um óleo incolor à temperatura ambiente e, assim como outros compostos nutracêuticos lipofílicos, é pouco solúvel em água e biologicamente instável quando exposto à fatores ambientais, tais como luz, temperatura e oxigênio. Devido a essas limitações e para melhorar sua estabilidade, tem sido aplicado em processos de microencapsulação para o uso em indústrias alimentícias e nutracêuticas (LUO *et al.*, 2011; SOMCHUE *et al.*, 2009).

A absorção entérica do  $\alpha$ -tocoferol, e da vitamina E no geral, é dependente de uma adequada absorção de lipídeos. O processo requer a presença de gordura no intestino, bem como a secreção de esterases pancreáticas para a liberação de ácidos graxos livres de triglicerídeos da dieta. Com isso, a baixa ingestão de óleos e gorduras na dieta pode afetar negativamente a absorção do  $\alpha$ -tocoferol (COMBS, 2008).

Apesar dessas características, a deficiência de vitamina E é rara em humanos, porém em alguns casos a suplementação da vitamina pode ser necessária. Isso porque embora os ésteres de tocoferol serem hidrolisados em tocoferol livre no duodeno, a necessidade da enzima hidrolítica para desesterificar o suplemento não garante a sua biodisponibilidade eficiente. Por isso, é vantajoso o desenvolvimento de produtos/suplementos alimentares adicionados de vitamina E na forma de fenol livre de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOC). Porém, como o  $\alpha$ -TOC é relativamente instável e sensível à temperatura, oxigênio e luz, a encapsulação se faz necessária para a proteção do  $\alpha$ -tocoferol durante o tempo de prateleira, por exemplo (SOMCHUE *et al.*, 2009).

Estudos também mostram que a liberação controlada de  $\alpha$ -tocoferol em condições simuladas do trato gastrointestinal sem enzimas é conseguida com o uso de microesferas de alginato, pois essas protegem o composto contra a degradação em diferentes valores de pH. E além disso, pode melhorar a sua biodisponibilidade pela administração oral já que permite o transporte do  $\alpha$ -tocoferol sem a necessidade de altas concentrações de lipídeos, responsáveis pela formação das micelas e lipoproteínas de transporte e absorção da vitamina E no intestino (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2016; COMBS, 2008; HARIYADI *et al.*, 2010; SOMCHUE *et al.*, 2009).

Muitos compostos bioativos lipofílicos, como o  $\alpha$ -TOC, tem sido incorporados em alimentos por meio de sistemas de liberação via emulsão. O uso de emulsões simples na indústria de alimentos como veículos para aumentar a retenção e estabilidade desses compostos ativos lipossolúveis é um processo que gera produtos de baixo custo exigidos pelo consumidor. Porém, o enriquecimento de alimentos utilizando essa técnica está mais susceptível à deterioração oxidativa e desenvolvimento de ranço. Além disso, há a necessidade do produto ou alimento apresentar um certo teor de gordura, como por exemplo

queijos. Por isso, a indústria alimentícia tem procurado alternativas como a microencapsulação para superar essas limitações e desenvolver uma gama maior de produtos/alimentos funcionais (STRATULAT *et al.*, 2014).

## 2.2 Microencapsulação

A microencapsulação é uma técnica na qual cria-se uma barreira polimérica onde um ou mais compostos (núcleo ou fase interna) são cercados ou imobilizados por um ou mais materiais (carreador ou material de parede) com o objetivo de proteger de fatores externos tais como luz, alta concentração de oxigênio, calor, umidade, prevenir a evaporação de compostos voláteis, mascarar gosto e aroma indesejáveis, inibir interações químicas e para o desenvolvimento de produtos de valor agregado. Por isso, essa tecnologia é muito utilizada na indústria alimentícia pois facilita a aplicação de ingredientes instáveis, além de melhorar o processamento e textura dos ingredientes devido à baixa higroscopicidade, aumento da solubilidade e dispersibilidade em diferentes tipos de materiais. Permite também a liberação controlada no sítio de ação do composto de interesse. Essas vantagens podem ser vistas em diversas aplicações, como as encontradas por Marsanasco *et al.* (2015) que encapsularam ômega-3, ômega-6 e vitamina E por lipossomos e aplicaram em achocolatado, obtendo um produto funcional (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; DIAS *et al.*, 2017)

Existem diversos métodos para encapsulação de compostos bioativos para aplicação em produtos alimentícios. A escolha do método mais adequado depende, principalmente, do tipo de material de núcleo e as características do produto final onde o encapsulado será aplicado. O material de parede a ser utilizado também deve ser analisado, pois tem grande influência nas propriedades do encapsulado, como a eficiência de encapsulação (DIAS *et al.*, 2017).

Os materiais encapsulantes mais comuns são os carboidratos e as proteínas. As características dos materiais de parede influenciam também outras propriedades do produto final encapsulado, sendo essas características tamanho, forma e estrutura da partícula, determina também a estabilidade durante a produção, armazenamento e degradação contra o ambiente externo, e controle da liberação do material de núcleo quando requerido (DIAS *et al.*, 2017).

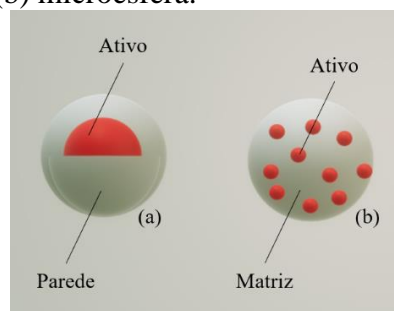
Existem diversas técnicas que estão sendo utilizadas e estudadas para a microencapsulação de diferentes ingredientes alimentícios. Essas técnicas podem ser classificadas em três diferentes métodos, tais como: (1) métodos físicos: spray drying, spray

chilling/cooling, processos de encapsulação com fluidos supercríticos e spray coating; (2) métodos químicos: polimerização; (3) métodos físico-químicos: coacervação complexa, gelificação iônica, lipossomos e emulsões (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

Para a escolha da técnica a ser utilizada é necessário analisar o produto final no qual será aplicado, o tamanho de partícula desejado, os mecanismos de liberação e as propriedades físico-químicas do material usado como agente encapsulante e núcleo. Além disso, no caso de ingrediente alimentício, o custo e a segurança do método e do material de parede também devem ser considerados na seleção (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

As partículas produzidas por métodos de encapsulação são conhecidas como microcápsulas ou microesferas (FIGURA 3). Microcápsulas são partículas com um núcleo interno central, contendo a substância ativa, a qual é coberta com uma camada de polímero consistindo da membrana da cápsula. Microcápsula mononuclear e polinuclear podem ser distinguidas pela forma que o núcleo é dividido. Lipossomos, coacervação complexa, spray coating e inclusão molecular são exemplos de técnicas de encapsulação que produzem microcápsulas. As microesferas são sistemas de matriz, nos quais o material de núcleo é uniformemente disperso e/ou dissolvido na rede polimérica, algumas vezes incluindo a superfície. Microesferas podem ser homogêneas ou heterogêneas dependendo do estado molecular (dissolvido) do núcleo ou em forma de partículas (suspensão). Gelificação iônica, spray drying e spray chilling são exemplos de métodos de encapsulação que produzem microesferas. A obtenção de microcápsulas ou microesferas depende principalmente da tecnologia de encapsulação utilizada. As cápsulas podem ser classificadas também de acordo com o tamanho: macrocápsulas ( $> 5000 \mu\text{m}$ ), microcápsulas ( $0,2$  a  $5000 \mu\text{m}$ ) e nanocápsula ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ) (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; DA SILVA *et al.*, 2014; DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Figura 3 – Tipos de partículas produzidas em processos de microencapsulação (a) microcápsula e (b) microesfera.



Fonte: Da autora (2021).



Os materiais envolvidos na encapsulação, o processo de produção, a morfologia final e a aplicação do produto são os fatores mais importantes que devem ser levados em consideração no desenvolvimento de um novo processo de liberação controlada, bem como a estabilidade e as propriedades funcionais do composto bioativo para selecionar a técnica de microencapsulação mais viável. Além disso, para alcançar altos rendimentos de encapsulação é necessário garantir a reprodutibilidade do processo, um perfil de liberação adequado e superar desvantagens limitantes como agregação e aderência das microesferas (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

### **2.2.1 Polímeros naturais**

No desenvolvimento de processos de encapsulação, a escolha do material da cápsula ou matriz é um dos passos mais importantes, primeiramente porque deve ser não-tóxico ao organismo (GRAS), sua preparação deve considerar fatores ambientais e deve-se usar solventes “limpos” (materiais solúveis em água são preferíveis) e, finalmente, porque o material tem papel importante no comportamento de liberação do composto bioativo. Condições tais como pH, temperatura e concentração de sal e íons também devem ser levadas em consideração e definidas de acordo com a aplicação final das microcápsulas desenvolvidas (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Polímeros naturais ou biopolímeros possuem propriedades interessantes para o desenvolvimento de nano/micropartículas de liberação controlada, podem ser obtidos de diversas fontes naturais abundantes, tem baixo custo em seu processamento, são seguros e não-tóxicos, e são biodegradáveis e biocompatíveis. Dentre esses materiais geralmente mais utilizados são carboidratos (amido e celulose e seus derivados), exsudados de plantas e extratos (gomas, galactomananas, pectinas e polissacarídeos de soja), extratos marinhos (carragena e alginato), polissacarídeos derivados de origem microbiana e animal (xantana, gelana, dextrana e quitosana), também são usados proteínas, lipídeos e outros (parafina e alguns materiais inorgânicos) (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; YANG *et al.*, 2015).

A escolha correta do material de parede é muito importante porque influencia a eficiência de encapsulação e estabilidade da microesfera. Os critérios para seleção do material de parede são baseados nas propriedades físico-químicas das substâncias para encapsular (porosidade, solubilidade) e do agente encapsulante (viscosidade, propriedades mecânicas), a compatibilidade entre os dois (o material de parede não deve reagir com o núcleo) e fatores de processo, como habilidade de manter o núcleo dentro da cápsula, habilidade de promover a

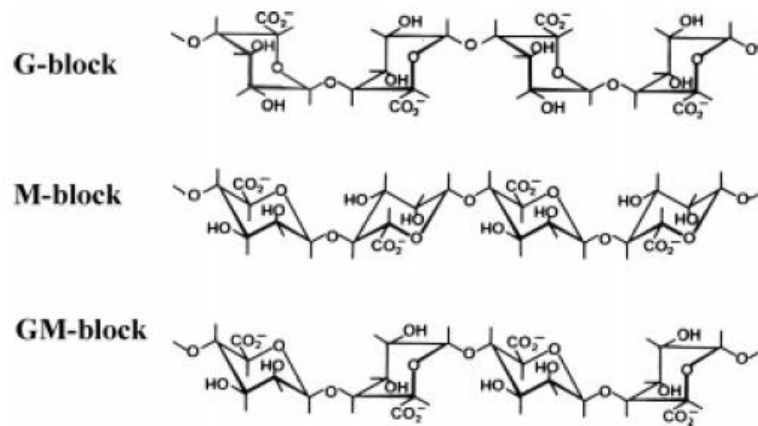
máxima proteção ao núcleo contra as condições adversas do meio e ausência de sabor desagradável. Outro critério a ser considerado é o tamanho pretendido para as micropartículas e viabilidade econômica (DA SILVA *et al.*, 2014; ESTEVINHO *et al.*, 2013;).

### 2.2.2 Alginato de sódio

O alginato é um polissacarídeo abundante na natureza e ocorre como componente estrutural de algas marinhas marrons (*phaeophyceae*) e como polissacarídeo capsular em bactéria do solo. Estão presentes principalmente na parede celular dessas algas, dando resistência mecânica a elas, as quais necessitam de flexibilidade na água assim como precisam de certa rigidez para suportar as correntes. Quando esses polissacarídeos são extraídos e isolados em sua forma de sal de sódio, eles são solúveis em água, e possuem propriedades físicas que dependem da sua composição (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010; HECHT; SREBNIK, 2016).

O alginato de sódio é um copolímero linear, binário com ligações (1,4) de resíduos de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G), seus valores de pKa são 3,38 e 3,65, respectivamente, ambos na conformação piranósica e presente em quantidades variadas. Depois da hidrólise parcial, o alginato é formado por regiões homopoliméricas, alternando blocos de M e G, sendo a parte mais flexível da cadeia, blocos de GG e blocos de MM com um grau de polimerização (DP) > 20 (FIGURA 4). Suas propriedades físicas em meio aquoso depende não só da taxa M/G, mas também da distribuição das unidades de M e G ao longo da cadeia (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010; LIAO *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

Figura 4 – Estrutura química dos vários blocos que formam o alginato.



Fonte: Andriamanantoanina e Rinaudo (2010).

Sabe-se que a rigidez da cadeia não depende somente da força iônica, mas também da composição do alginato, aumentando na ordem  $MG < MM < GG$ . Consequentemente, as propriedades físicas e mecânicas dependem fortemente da sequência desses blocos e influenciam a sua reatividade, ou seja, a estabilidade contra a hidrólise ácida depende da natureza desses blocos. Essa ordem também corresponde à ordem de flexibilidade dos blocos, é também a ordem mais eficaz para a formação de gel do ácido algínico. Assume-se também que, em condições ácidas no estado gel, blocos GG são mais estabilizados em interações cooperativas entre cadeias do que blocos MM e blocos MG/GM (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010; HECHT; SREBNIK, 2016).

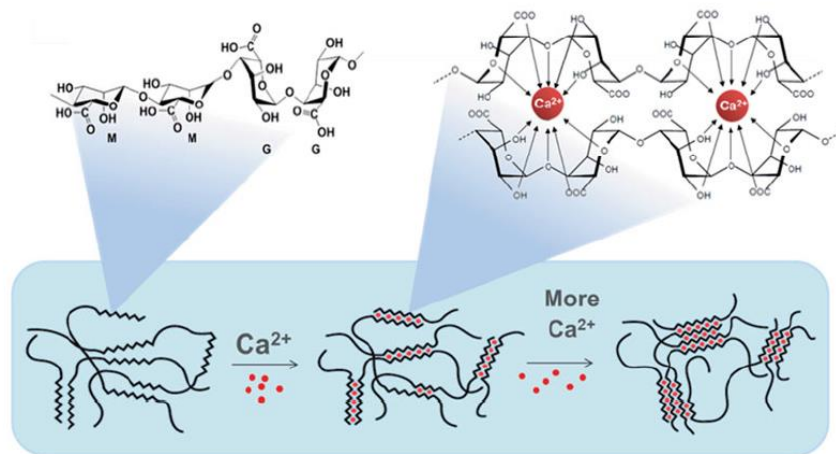
A formação de um gel fraco é induzido próximo a  $pH = 3$ , isso porque corresponde ao pK intrínseco dos grupos carboxílicos (a repulsão eletrostática entre os segmentos de cadeia são observadas). A partir dos resultados dos blocos MM e GG, nessa faixa de pH, os blocos GG em particular estão envolvidos nos pontos de reticulação da rede de ácido algínico (blocos MM não interagem nesse pH). Com isso, a habilidade de alginatos de formar gel está relacionada à composição dos blocos, assim como à gelificação no cálcio. O comportamento geral em pH ácido encontrado polissacarídeos carboxílicos estereorregulares é devido à interações cooperativas que formam zonas de junção estabilizadas por uma rede de ligações de hidrogênio (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010).

Os bloco M e os blocos MG tem estrutura mais plana com sítios menores para ocupação dos cátions, e por isso, sua seletividade para ligação em relação ao  $Ca^{2+}$  é menor, levando à complexação apenas à altas concentrações de íons. Sequências polialternadas tem sido consideradas incapazes de se ligarem cooperativamente à íons  $Ca^{2+}$  e formar zonas de junção da mesma forma como os blocos G, como as ligações M-G levam à abruptas

mudanças da direcionalidade local, dando origem à dobras locais na cadeia e diminuindo seu módulo de Young (HECHT; SREBNIK, 2016).

A gelificação do alginato resulta de interações entre os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e resíduos G, o que leva à associação cadeia-cadeia e à formação de zonas de junção. O aumento de ligações seletivas de  $\text{Ca}^{2+}$  é encontrado com o aumento do conteúdo de resíduos G nas cadeias, enquanto que blocos M e blocos MG alternados tem menor seletividade em relação ao íon. Essa alta seletividade de ligação iônica ocorre pela formação de “caixa de ovo”, associação de regiões da cadeia ricas em grupo G (FIGURA 5). A afinidade de alginatos em relação aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta com o aumento do conteúdo de íon no gel devido ao mecanismo autocoooperativo. O primeiro estágio da dimerização é seguido por um segundo estágio de associação lateral dos dímeros a altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  (HECHT; SREBNIK, 2016). Na relação estequiométrica de grupos cálcio/carboxílico, os complexos são geralmente insolúveis e, como resultado, permite obter fibras, filmes ou cápsulas para diversas aplicações (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010).

Figura 5 – Grupos M e G. Modelo “caixa de ovo”. Mecanismo de gelificação do alginato na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .



Fonte: Martins *et al.* (2017).

As propriedades tecnológicas mais importantes do alginato são seu caráter espessante, ou seja, aumenta a viscosidade do solvente após a dissolução, suas propriedades de troca iônica e sua habilidade de formação de gel na presença de contra-íons multivalentes. A viscosidade de uma solução de alginato de sódio é quase constante entre  $\text{pH} = 6$  e  $8$ , mas em concentração moderada após uma redução de  $\text{pH}$  a viscosidade aumenta (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010).

Algumas aplicações industriais desse polímero são encontradas principalmente na indústria de alimentos, médica, farmacêutica e têxtil, e estão ligadas à sua habilidade de reter água, assim como suas propriedades gelificantes, espessantes e estabilizantes. Aplicações biotecnológicas são baseadas na reticulação instantânea e quase independente de temperatura e sua transição sol/gel na presença de cátions multivalentes (por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ) em meio aquoso. O processo é simples e economicamente viável, resultando num gel físico com propriedades mecânicas adequadas. Além disso, sua capacidade de reter grandes quantidades de fluido o torna altamente útil como matriz de imobilização para sistemas de liberação controlada de compostos bioativos, e por apresentar bioadesividade na mucosa (HECHT; SREBNIK, 2016).

As principais aplicações tecnológicas do alginato estão relacionadas às habilidades de ligação de Ca e formação de gel, por isso é de grande importância o controle e adaptação dessas propriedades. Parâmetros estruturais intrínsecos associados ao alginato, incluindo a relação M/G, bloqueio e massa molar podem ser usados para ajustar as ligações de cálcio e as propriedades de gelificação do alginato. Parâmetros externos também podem ser modificados para alterar as propriedades gelificantes do alginato, tais como concentração de Ca, concentração de alginato, força iônica e formas de introdução dos íons de Ca (LIAO *et al.*, 2015).

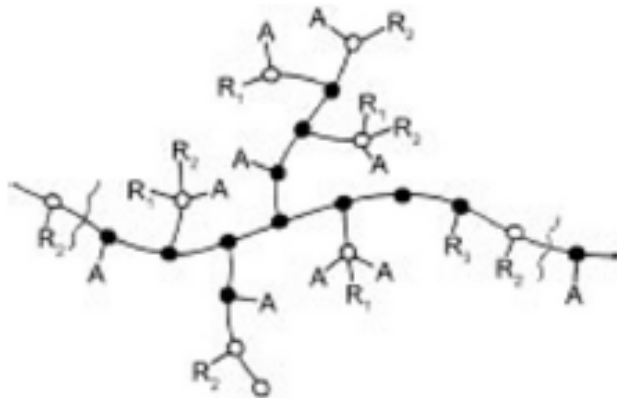
O processo de gelificação para microencapsulação de compostos bioativos utilizando alginato é promovido pela gelificação externa, ou seja, uso do cloreto de cálcio como fonte de cálcio da solução de reticulação. Os materiais formados, devido ao seu grau de reticulação iônica e funcionalidade, permite o controle de entrada de água e então a liberação do composto bioativo. A liberação controlada é realizada através de mudanças no pH. Basicamente, para um componente bioativo hidrofóbico é feita uma emulsão em solução de alginato e a formação das esferas se dá pelo gotejamento da emulsão em uma solução de cálcio, onde a gelificação ocorre na superfície da gota até a completa formação das microesferas (gelificação externa) (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015). Além disso, o alginato apresenta alta viscosidade em baixas concentrações, o que ocasiona a formação de uma rede de gel de baixa densidade, que apresenta pouca propriedade de barreira. Para reduzir essa porosidade e melhorar a eficiência do efeito de barreira, o alginato tem sido combinado a outros materiais poliméricos naturais, que aumentam as propriedades mecânicas do gel e reduzem a permeabilidade (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015).

### 2.2.3 Goma arábica

A goma arábica tem sido o agente encapsulante mais utilizado nos últimos anos, principalmente, por apresentar características específicas de boa formação de filme na interface e propriedade emulsificante. Trata-se de uma goma natural exudada do tronco e folhagens de árvores da família Acacia. Esta goma é um polímero que consiste de ácido D-glucurônico, L-ramnose, D-galactose e L-arabinose com cerca de 5% de proteína. Trata-se, portanto, de um material heterogêneo, e geralmente consiste de duas frações: a primeira, composta de cadeias de polissacarídeos com pouco ou nenhum material nitrogenado (correspondendo aproximadamente 70% da molécula); e a segunda, com alto peso molecular, tem a proteína como uma parte integral de sua estrutura. A fração protéica do polissacarídeo é heterogênea também com respeito ao conteúdo de proteína. Algumas frações específicas podem conter até 25% de proteína. As estruturas polissacarídicas são covalentemente ligadas ao componente protéico através da hidroxiprolina, ou ainda de unidades de serina, dois aminoácidos predominantes no polipeptídeo (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; RISCH; REINECCIUS, 1995; WILLIAMS; PHILLIPS, 2009).

Esta goma é inodora, quase insípida, insolúvel em álcool etílico, mas solúvel em água e apresenta baixa viscosidade quando comparada a outros polissacarídeos de massa molecular similar. Sabe-se que a goma é negativamente carregada acima de pH 2,2, e baixos pHs (<2,2) a dissociação dos grupos carboxilas é suprimida (WILLIAMS; PHILLIPS, 2009). A Figura 6 ilustra a estrutura da goma arábica.

Figura 6 – Estrutura molecular da goma arábica. A: arabinosil; R1: raminose-ácido glucurônico; R2: galactose-1,3-arabinose; R3: arabinose-1,3-arabinose-1,3-arabinose; ●:  $\beta$ -1,3-galactose; ○:  $\beta$ -1,6-galactose 6-ligada.

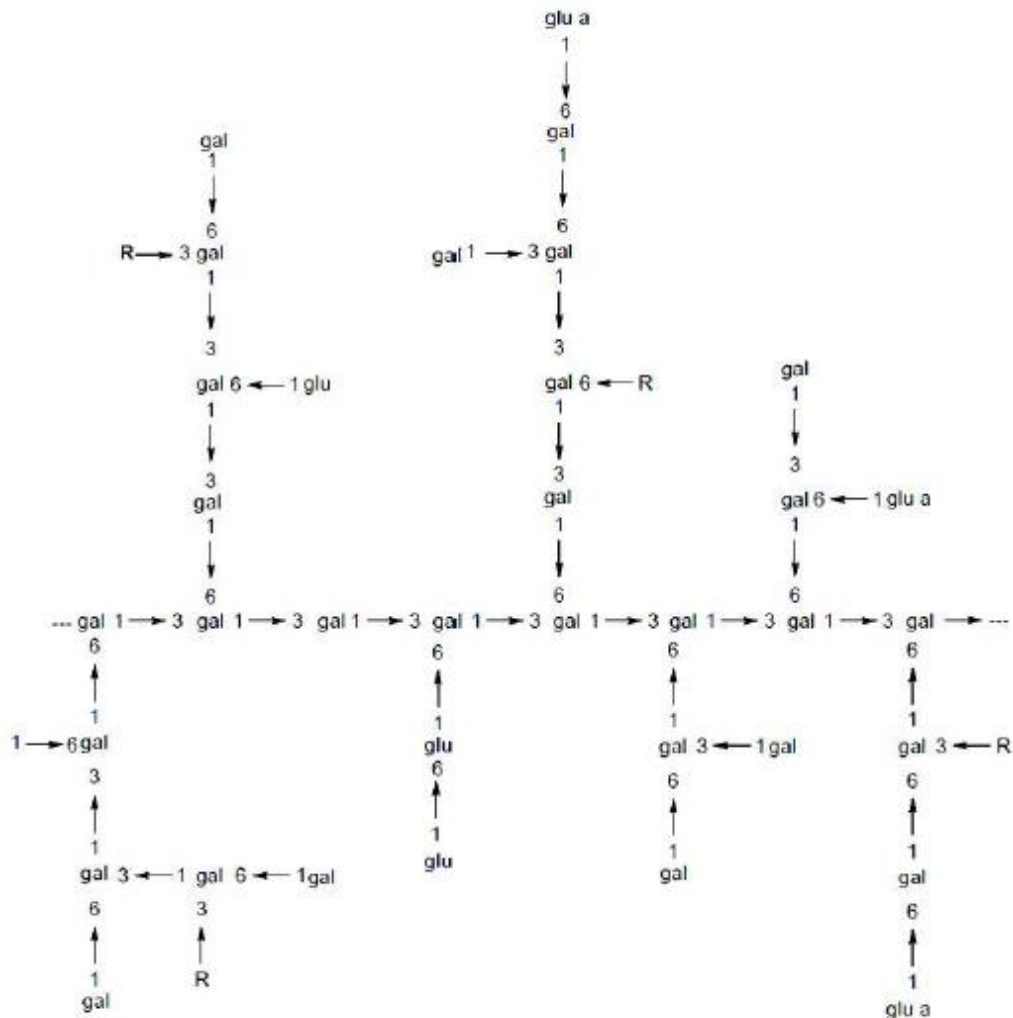


Fonte: Willians *et al.* (2009).

## 2.2.4 Goma de cajueiro

A goma de cajueiro é um heteropolissacarídeo complexo exsudado principalmente da casca da árvore do cajueiro (*Anacardium occidentale*) e tem propriedades semelhantes da goma arábica. Sua estrutura tem uma cadeia principal formada por unidades de galactose (72%), contendo ramificações de glicose (14%), arabinose (4,6%) e raminose (3,2%). Unidades de ácido glucurônico (4,5%) também podem ser encontradas na cadeias laterais (ABREU *et al.*, 2012; AZEREDO *et al.*, 2012). A Figura 7 apresenta um possível fragmento da estrutura da goma de cajueiro não modificada.

Figura 7 – Fragmento da estrutura da goma de cajueiro.



Fonte: Cunha *et al.* (2007).

Apesar da similaridade com a goma arábica, a goma de cajueiro ainda é pouco explorada, sendo que apresenta propriedades de formação de filme. Essa característica é

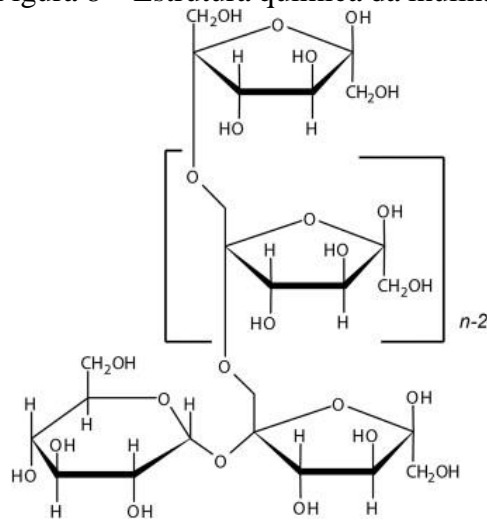
baseada na presença do ácido glucurônico ( $pK_a \sim 3,5$ ) que torna a goma de cajueiro um poliânion em pH acima de 4,0 permitindo sua interação com cátions. Alguns autores afirmam a presença de altos níveis de cálcio na goma de cajueiro, o que sugere a capacidade de interagir com outros polímeros aniônicos, como o alginato (AZEREDO *et al.*, 2012; COMUNIAN *et al.*, 2016).

A goma de cajueiro possui características tecnológicas interessantes como baixa viscosidade, interação com a água, tem propriedades emulsificantes, adesivas e estabilizantes, é biodegradável e tem baixo custo, mostrando potencial aplicação como material encapsulante (BOTREL *et al.*, 2016).

### 2.2.5 Inulina

A inulina é um carboidrato de reserva natural de diversas frutas e vegetais. Pertence ao grupo de polissacarídeos chamados de furanos, sua estrutura química é formada por cadeia principal linear de unidades frutose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2,1) e contém um terminal  $\beta$ -D-frutose ou  $\alpha$ -D-glicose (FIGURA 8) (ROBERFROID, 2007).

Figura 8 – Estrutura química da inulina.



Fonte: Roberfroid (2007).

Industrialmente, a extração mais comum de inulina ocorre a partir de raízes de chicória, pertencente à família *Compositae*. Essa extração é feita utilizando água quente, seguida de refino e secagem, dando origem a uma inulina de grau de polimerização médio ( $GP_{\text{médio}} = 12$ ). Porém, comercialmente podem ser encontradas três tipos de inulina, aquela com alto grau de polimerização ( $GP_{\text{alto}} = 25$ ) produzida a partir da separação física, a



oligofrutose que é de baixo grau de polimerização ( $GP_{\text{baixo}} = 4$ ) obtida a partir da hidrólise enzimática parcial da inulina e um tipo de inulina feita pela mistura de 50% de cada uma dessas inulinas com diferentes GP (ROBERFROID, 2007).

O grau de polimerização está correlacionado ao comprimento da cadeia que influencia algumas propriedades da inulina e determinadas funções e aplicações tecnológicas. A inulina de cadeia longa, por exemplo, é termicamente mais estável, menos solúvel e mais viscosa (WADA *et al.*, 2005).

A baixa capacidade de hidrólise da inulina permite que ela seja usada como fibra dietética e também na preparação de microcápsulas resistentes à variação de pH no trato gastrointestinal humano, permitindo a liberação controlada de compostos bioativos no cólon (DIMA *et al.*, 2016; ROBERFROID, 2007).

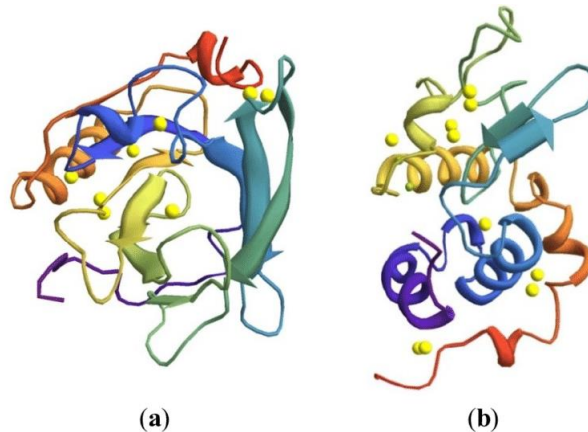
Além disso, devido à sua conformação  $\beta$  do carbono C2 nos monômeros de frutose, a inulina resiste à hidrólise enzimática no intestino humano, a qual é específica para ligações  $\alpha$ -glicosídicas. E por isso são classificadas como oligossacarídeos não digeríveis ou prebióticos, esses possuem a característica de serem substratos para o crescimento da microbiota natural e benéfica do intestino humano e auxiliar na inibição de agente patogênicos (ROBERFROID, 2007).

### 2.2.6 Isolado proteico de soro

As proteínas do soro são proteínas globulares presentes na fração do soro do leite e exibe diversas vantagens físico-químicas e propriedades nutricionais como ingrediente alimentar (LEON *et al.*, 2016). Essa fração proteica do soro representa aproximadamente de 18 a 20% das proteínas do leite, contendo quatro proteínas principais, sendo  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoglobulina, seroalbumina (BSA) e imunoglobulina (JOVANOVI; BARAC; OGNJEN, 2005; LEON *et al.*, 2016).

O isolado proteico de soro (IPS) é constituído principalmente de uma mistura das proteínas globulares  $\beta$ -lactoglobulina (82% m/m, 18,5 kDa) e  $\alpha$ -lactoglobulina (15% m/m, 14,5 kDa), que pode apresentar cargas positivas quando o pH é ajustado abaixo do seu ponto isoelétrico (pH 4,4 – 5,2) e interagir com outros polímeros carregados negativamente, como o alginato (NOGUEIRA; PRATA; GROSSO, 2017). A Figura 9 apresenta as estruturas terciárias dessas proteínas globulares presentes no IPS.

Figura 9 – Estrutura terciária da (a)  $\beta$ -lactoglobulina e da (b)  $\alpha$ -lactoglobulina.



Fonte: Hammann e Schmid (2014).

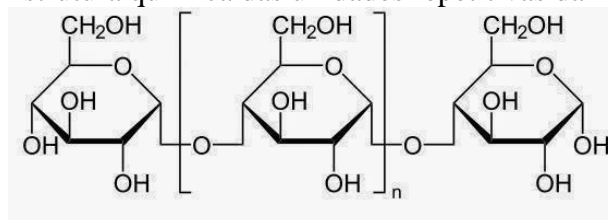
Além disso, quando utilizado como material encapsulante apresenta vantagens como boa eficiência para reter voláteis, capacidade de formação de filme e boa capacidade emulsificante, devido à sua característica anfifílica (JAFARI *et al.*, 2008).

### 2.2.7 Maltodextrina

A maltodextrina ou amidos hidrolisados são extensivamente utilizados em processos de microencapsulação, principalmente, pelo método de *spray drying*. Esses carboidratos são formados pela hidrólise parcial, por ação de ácidos ou enzimas, do amido de milho e estão disponíveis em diferentes dextroses equivalentes (DE), que indicam o nível de hidrólise do polímero de amido (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

A DE está relacionada ao grau de polimerização, ou seja, a DE de um produto de hidrólise equivale ao seu poder redutor, como uma porcentagem do poder redutor da dextrose pura (D-glicose), sendo então inversamente relacionada ao seu peso molecular médio (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; JAFARI *et al.*, 2008). A estrutura química que representa as unidades formadoras da maltodextrina está apresentada na Figura 10.

Figura 10 – Estrutura química das unidades repetitivas da maltodextrina.



Fonte: Jafari *et al.* (2008).

São definidas como maltodextrinas os produtos com valores de DE menores que 20. De maneira geral, estes produtos são menos higroscópicos, não apresentam doçura, além de serem excelentes para contribuir com o corpo de sistemas alimentícios. Os amidos hidrolisados oferecem vantagens como baixo custo relativo (aproximadamente um terço do amido modificado), aroma e sabor neutros e baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos. Além disso, oferecem boa proteção contra oxidação (dependendo da dextrose equivalente). O maior problema da utilização desse material de parede é que ele tem pouca capacidade emulsificante. Portanto, é desejável a utilização de maltodextrina em combinação com outros polímeros com atividade de superfície, como amidos modificados e proteínas, com o objetivo de obter uma microencapsulação eficaz com alta retenção do material bioativo e alta eficiência de encapsulação a baixo custo (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; JAFARI *et al.*, 2008).

### 2.3 Emulsão

Emulsões são sistemas de dispersão, as quais são produzidas pela homogeneização de um óleo em uma fase aquosa. São sistemas termodinamicamente instáveis e a quebra das emulsões pode acontecer devido à floculação, coalescência, sedimentação e creaming. Emulsões podem ser estabilizadas pela adição de polissacarídeos como ocoferóis es, esses apresentam vantagens sobre as proteínas pois são menos sensíveis às condições do meio (pH, temperatura e força iônica) (GHARIBZAHEDI *et al.*, 2012).

A estabilidade de uma emulsão pode também ser aumentada pelo aumento da viscosidade da fase contínua. Isso reduz a mobilidade das gotículas de óleo e, portanto, evita processos como a coalescência. Simultaneamente, a viscosidade da fase contínua influencia o tamanho da gota de óleo, desde que o rompimento da gotícula é determinado pelas tensões de cisalhamento exercidas na superfície da gota (OPPERMANN *et al.*, 2018).

Polímeros naturais como proteínas e polissacarídeos possuem propriedades funcionais, tais como gelificação, emulsão e interação com outros materiais, e por isso podem ser usados para a preparação de nano/micropartículas e géis para a encapsulação de um composto bioativo e co-encapsulação de múltiplos compostos bioativos. Em geral, os compostos bioativos hidrofóbicos são dissolvidos na fase oleosa interna das emulsões óleo-em-água (O/A) estabilizadas por proteínas ou outros polímeros. Quando utilizado emulsificante, que reveste a gotícula de óleo há uma certa estabilização da emulsão, porém a emulsão é limitada

para aplicação como sistema de liberação controlada, pois não tem capacidade para controlar a estabilidade química dos compostos bioativos (FENG *et al.*, 2018).

## 2.4 Reologia

As propriedades reológicas das emulsões e a viscosidade dos seus componentes individuais influenciam na ruptura das gotas quando submetidas à forças externas, como por exemplo em atomizadores de fluidos. Além de fornecer informações sobre a estrutura e interação entre os componentes da emulsão (McCLEMENTS *et al.*, 2007).

De acordo com o comportamento reológico os fluidos podem ser classificados como Newtoniano ou não-Newtoniano (por exemplo, pseudoplásticos ou dilatantes). Os fluidos Newtonianos ideais devem ser incompressíveis, homogêneos e isotrópicos, além disso, são caracterizados por manterem sua viscosidade independente da taxa de deformação, há uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação (BOTREL *et al.*, 2016; McCLEMENTS *et al.*, 2007; WILLIAMS; PHILLIPS, 2009).

A reologia de emulsões também é influenciada pelo tamanho das gotículas e da distribuição do tamanho das gotículas, esses dois fatores e o tipo de fluido afetam diretamente a uniformidade e o tamanho de micropartículas produzidas a partir de emulsões em sistemas de liberação controlada. Fluidos Newtonianos mantem a sua viscosidade, mesmo quando sofrem aplicação de força externa para a atomização e produção de micropartículas, característica importante para a eficiência do processo/sistema utilizado (BOTREL *et al.*, 2016; McCLEMENTS *et al.*, 2007).

## 2.5 Gelificação iônica

Alguns polímeros naturais são polieletrólitos, os quais, apresentam forma iônica em solução. Como exemplo de polieletrólitos naturais tem-se a quitosana e o alginato. A quitosana é um polieletrólito catiônico existente na natureza, os radicais presentes na cadeia molecular da quitina e da quitosana podem protonar quando dissolvidas em soluções ácidas diluídas. Já o alginato é um polissacarídeo aniônico, o qual os resíduos de ácido carboxílico podem ionizar e passam a ter carga negativa (YANG *et al.*, 2015).

Esses polieletrólitos podem agregar em micropartículas através de ligação cruzada com substâncias moleculares com carga oposta por interação eletrostática. A gelificação do

alginate, por exemplo, pode ser induzida pela ligação cruzada das unidades de ácido gulurônico com cátions di ou polivalentes, como o cálcio (YANG *et al.*, 2015).

O método de gelificação iônica é o terceiro método mais relatado na literatura para a encapsulação de compostos bioativos alimentícios, já que é caracterizado por condições brandas que afetam minimamente a integridade da maioria dos compostos bioativos. Esse método é requerido, principalmente, em casos que baixas temperaturas de processo são recomendadas durante o processo de encapsulação, para evitar a ocorrência de reações indesejáveis e volatilização de produtos (DIAS *et al.*, 2017; VAKARELOVA *et al.*, 2017).

A gelificação iônica é um processo que produz partículas tipo microesfera. No geral, esse método produz partículas com superfície uniforme e com uma distribuição de tamanho de 1 a 10000  $\mu\text{m}$ . É um processo contínuo e tem uma alta capacidade de produção. O processo mais comum de extrusão utiliza o biopolímero alginato como material de parede e é baseado na capacidade de gelificação desse polímero na presença de cálcio iônico, sem a necessidade de aquecimento (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; YANG *et al.*, 2015). As principais variáveis que influenciam o tamanho das partículas na técnica de extrusão são a concentração das soluções de polímero e reticulante, a taxa de fluxo da solução gotejante, a distância do bico e da solução gelificante e o tamanho do bico (RAMOS *et al.*, 2018).

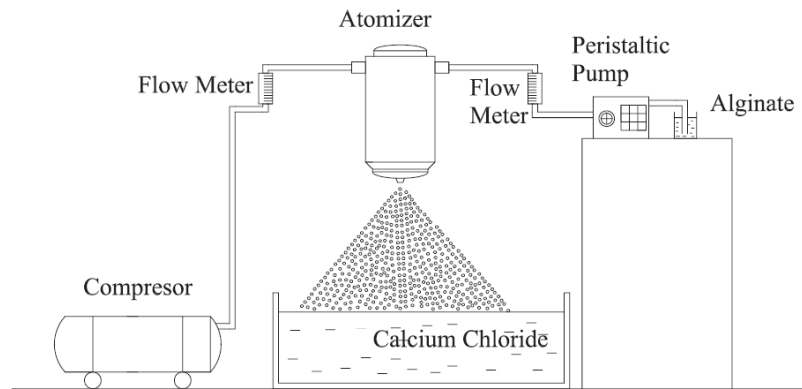
O método de gelificação iônica garante a proteção dos compostos encapsulados, mas raramente está relacionado à encapsulação de compostos lipofílicos. Isso pode ser explicado porque os polímeros usados como material de parede no processo de gelificação iônica, como o alginato, não tem propriedades de superfície e são compostos hidrofílicos, então, para a encapsulação de materiais hidrofóbicos é necessário incluir um emulsificante e preparar uma emulsão antes do processo de gelificação (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

### **2.5.1 Atomização**

A atomização é a desintegração do líquido em pequenas gotas. O controle do tamanho das gotas está relacionado ao estudo do mecanismo usado para quebrar as lâminas de líquido. Processos convencionais de atomização, como atomização por pressurização, usam a energia mecânica para pressurizar a lâmina de líquido, aumentando sua energia cinética para uma possível desintegração para formação das gotículas, porém esses processos requerem mais energia (RAMISETTY; PANDIT; GOGATE, 2013). Um esquema representando a produção

de microesferas de alginato através da atomização por pressurização pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 – Esquema de produção de microesferas de alginato através de atomização por pressurização.



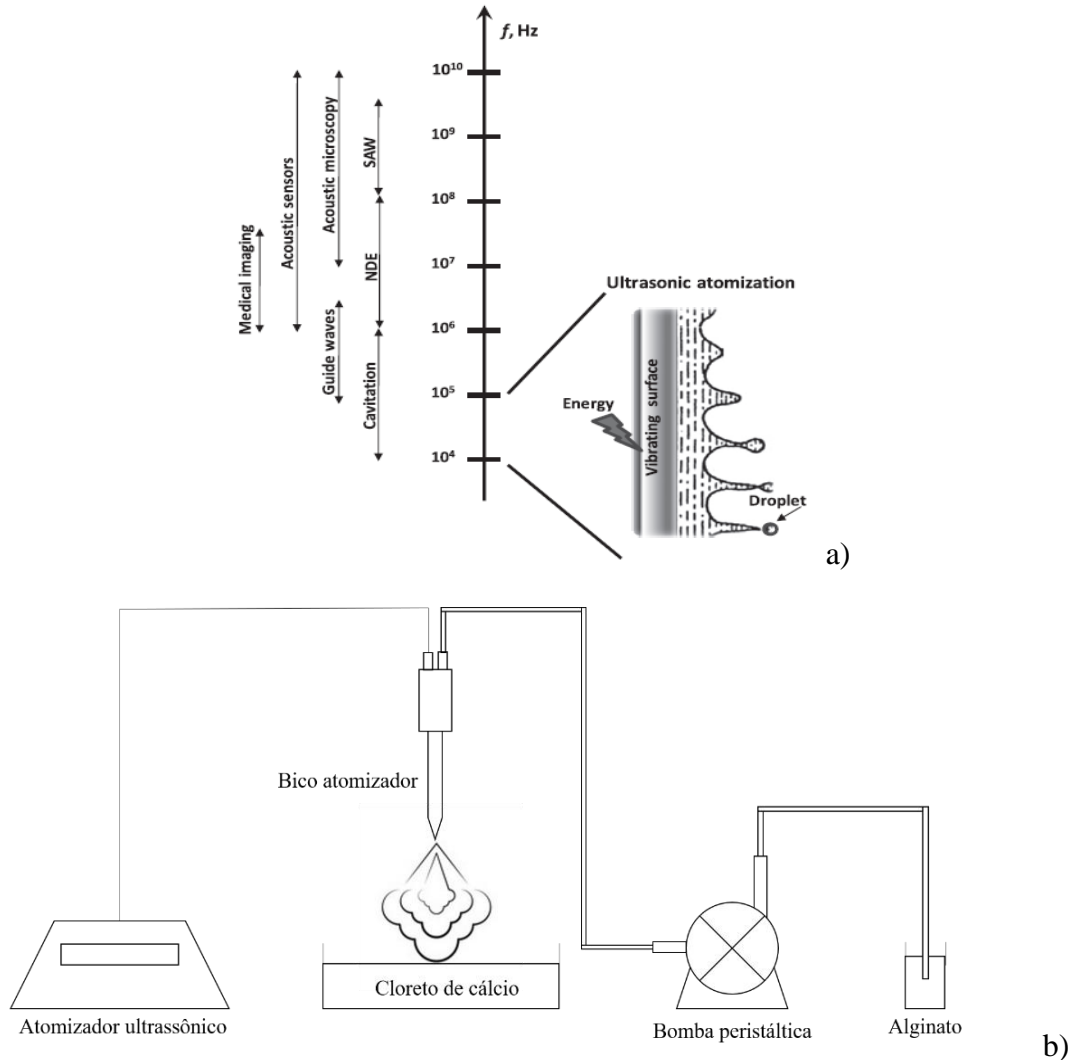
Fonte: Chan *et al.* (2012).

### 2.5.2 Atomização ultrassônica

A atomização ultrassônica é baseada no processo em que um líquido na forma de um filme fino flui sobre uma superfície vibrante (frequência > 20 kHz), rompendo-o em pequenas gotas. O mecanismo de desintegração do líquido durante a atomização ultrassônica pode ser explicada pela hipótese de onda capilar ou pela hipótese da cavitação. A hipótese da onda capilar é baseada na instabilidade de Taylor, a qual, a forte correlação entre o tamanho médio das gotas e o comprimento de onda capilar favorece a teoria das ondas capilares. A hipótese da cavitação é geralmente aplicada às altas frequências (16 kHz – 2 MHz) e sistemas de alta intensidade de energia ( $W/m^2$ ) (AVVARU *et al.*, 2006; DALMORO *et al.*, 2012).

Quando um filme líquido é sonicado, bolhas de cavitação são formadas na superfície vibratória do líquido. O fenômeno de cavitação ocorre em energia de alta intensidade e frequência, e é gerado pela onda de ultrassom ao passar pelo meio líquido. A onda é transmitida como uma série de ciclos de compressão e rarefação afetando as moléculas líquidas, gerando assim vazios (cavidades). Essas cavidades continuam a crescer em tamanho até se tornarem instáveis, e então entram violentamente em colapso liberando energia para a fase líquida (DALMORO *et al.*, 2012). Durante esse colapso implosivo, especialmente de cavidades próximas da superfície do líquido, são gerados choques hidráulicos de alta intensidade. Esses choques hidráulicos iniciam a desintegração do filme de líquido e causam a ejeção direta das gotículas (FIGURA 12) (AVVARU *et al.*, 2006).

Figura 12 – (a) Faixas de frequência ultrassônica, tipos de aplicações e esboço do mecanismo de atomização ultrassônica. (b) Esquema de produção de microesferas de alginato através de atomização por.



Fonte: a) Dalmoro *et al.* (2012); b) Da autora (2021).

Diversos fatores podem influenciar o tamanho das gotículas sendo eles: energia de entrada, taxa de fluxo do líquido (abaixo de um  $Q_{crit}$ , o tamanho da gotícula é independente de  $Q$ ), frequência de vibração (quanto maior a frequência, menor o tamanho de gotícula) e viscosidade do líquido (AVVARU *et al.*, 2006; DALMORO *et al.*, 2012). Estudos teóricos anteriores relatam que o aumento da viscosidade da fase líquida também aumenta o tamanho da gotícula. Porém, Avvaru *et al.* (2006), mostraram através de estudos experimentais que o aumento da viscosidade da fase líquida não aumenta o tamanho das gotículas. Isso pode explicado devido ao fato de que líquidos com viscosidade mais altas são mais difíceis de atomizar imediatamente, o tempo de residência desse líquido na superfície de atomização aumenta e a temperatura do líquido começa a aumentar devido à dissipação de energia

vibracional. Como a temperatura aumenta, a viscosidade diminui e então o líquido é atomizado em uma viscosidade crítica, dependendo da intensidade do ultrassom operacional. Além disso, a pressão de vapor também aumenta e isso faz aumentar a atividade cavitacional (AVVARU *et al.*, 2006).

O tamanho das gotículas para fluidos não-Newtonianos com comportamento pseudoplástico, ou seja, aqueles que apresentam menor viscosidade quanto maior a tensão aplicada a eles, apresentam menor tamanho de gotícula quando comparados à fluidos Newtonianos (viscosidade constante para diferentes taxas de cisalhamento) (AVVARU *et al.*, 2006).

## 2.6 Mecanismos de liberação

Além da proteção do material encapsulado, a técnica de microencapsulação objetiva também ótimas condições de liberação do material ativo nos locais e tempos apropriados para obter melhor eficácia e disponibilidade do composto de interesse. É importante ressaltar que a liberação de alguns compostos deve ser evitada durante o processamento e armazenamento dos produtos alimentícios, ocorrendo no corpo do consumidor (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

A liberação de um agente ativo pode ser baseada em um ou em uma combinação de mecanismos de liberação e esses podem ser: tempo específico, sítio específico, taxa específica e/ou estímulo específico. O mecanismo de liberação pode ser classificado de acordo com o fenômeno físico-químico associado com a substância ativa liberada: difusão controlada, barreira controlada, ativada por pressão, ativada por solvente, controle osmótico, controle por pH, sensibilidade à temperatura, ativada por fusão e sistemas combinados (ESTEVINHO *et al.*, 2013).

Qualquer tipo de interação molecular que ocorre durante o processo de encapsulação (spray drying, coacervação complexa, gelificação iônica ou complexação) pode ser desfeita com adição de solventes ou pela variação de pH. Os valores de pH determinam a liberação dos compostos encapsulados já que a variação desses valores alteram a solubilidade dos materiais de parede (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

Em sistemas de microencapsulação que utilizam o alginato o pH do meio tem influência direta na liberação do composto. Em meio ácido a presença de íons  $H^+$  está associada ao mecanismo de diminuição da repulsão eletrostática do gel formado, permitindo ou não a liberação do composto. Soluções de pH neutro podem alterar a estabilidade da



parede devido à competição pelos sítios de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ , que é excluído e então a densidade do gel reticulado diminui, permitindo a liberação do composto encapsulado. Nesses sistemas de encapsulação, a liberação dos compostos em meios com valores de pH mais elevados está associada à taxa de degradação do alginato que aumenta devido ao aumento da taxa de  $\beta$ -eliminação (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015; HARIYADI *et al.*, 2010).

### 2.6.1 Bioacessibilidade

A bioacessibilidade é considerada a taxa do composto de interesse que é liberado após o processo de digestão. Esse processo de digestão pode ser simulado através de análises *in vitro* que fazem uma estimativa do quanto um composto bioativo pode estar bioacessível quando submetido às condições semelhantes ao trato gastrointestinal humano (BILGIC *et al.*, 2019; FREDES *et al.*, 2018).

Características químicas e estruturais dos bioativos influenciam na sua bioacessibilidade, estudos mostram que compostos encapsulados utilizando alginato tornam-se mais bioacessíveis, devido à proteção fornecida e também pela bioadesividade na mucosa humana que o alginato apresenta. A bioadesividade, que é capacidade de aderir à camada da mucosa intestinal, aumenta o tempo de permanência do composto bioativo e por isso melhora a sua biodisponibilidade (HECHT; SREBNIK, 2016; SOMCHUE *et al.*, 2009).

Hidrogéis, como o alginato, que são materiais que possuem boa capacidade de retenção de água também melhoram a bioacessibilidade dos compostos bioativos porque facilitam a absorção de fluidos e transporte de nutriente e metabólitos, pela presença de água na rede formada desses hidrogéis (BILGIC *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2017).

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com os resultados obtidos no estudo conclui-se que o alginato tem boa compatibilidade com diferentes classes de biopolímeros, foi possível observar a formação de emulsões estáveis e com boa distribuição de tamanho quando adicionado o  $\alpha$ -tocoferol à sistemas de alginato e outros materiais poliméricos, como hidrocoloides (goma arábica e goma de cajueiro), carboidratos (inulina e maltodextrina) e proteínas (isolado proteico de soro). Além disso, todas as emulsões produzidas apresentaram viscosidade abaixo do limite permitido para a atomização. Após análises de caracterização e aplicação tecnológica, definiu-se os biopolímeros inulina (propriedade prebiótica) e goma de cajueiro (polímero emergente de baixo custo) para a produção das microesferas de  $\alpha$ -TOC por gelificação iônica utilizando dois diferentes métodos de gotejamento das emulsões, sendo ar pressurizado e energia ultrassônica. Produzidas as microesferas, essas foram caracterizadas avaliando propriedades como morfologia, tamanho, eficiência de encapsulação e estabilidade. Foi possível observar que a adição de materiais complementares ao alginato melhoram a sua propriedade de barreira, auxiliando na proteção do composto bioativo quando as microesferas são submetidas à diferentes valores de pH e temperatura. Os resultados também mostraram que as duas técnicas utilizadas para a formação das microesferas produzem sistemas de liberação controlada estáveis, diferindo significativamente no tamanho das microesferas produzidas. Sabendo-se que microesferas de tamanho menor melhora as propriedades tecnológicas (como dispersibilidade e aceitação sensorial) e, portanto, sua aplicabilidade foram então produzidas microesferas de alginato combinado com inulina ou goma de cajueiro através de gotejamento por energia ultrassônica. Através das análises de caracterização, estabilidade e bioacessibilidade das microesferas de  $\alpha$ -tocoferol pode-se inferir que é possível produzir sistemas de liberação controlada de alginato combinado aos biopolímeros inulina e goma de cajueiro eficazes que protegem o composto bioativo e que permitem a utilização dessas microesferas em matrizes alimentícias com potencial atividade funcional, com melhora na liberação do  $\alpha$ -TOC no sistema digestório humano, e porque mostraram ter boa compatibilidade, estabilidade e eficiência.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. M. S. *et al.* Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 89, n. 4, p. 1277–1282, Aug. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712003888>. Acesso em: 17 nov. 2017.
- ANDRIAMANANTOANINA, H.; RINAUDO, M. Relationship between the molecular structure of alginates and their gelation in acidic conditions. **Polymer International**, [Chichester], v. 59, n. 11, p. 1531–1541, Nov. 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pi.2943>. Acesso em: 22 fev. 2018.
- AVVARU, B. *et al.* Ultrasonic atomization: Effect of liquid phase properties. **Ultrasonics**, [Amsterdam], v. 44, n. 2, p. 146–158, Feb. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041624X05000983>. Acesso em: 13 fev. 2018.
- AZEREDO, H. M. C. *et al.* Tensile and water vapour properties of calcium-crosslinked alginate-cashew tree gum films. **International Journal of Food Science and Technology**, [Malden], v. 47, n. 4, p. 710–715, Jan. 2012. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2011.02897.x>. Acesso em: 14 mar. 2018.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. *et al.* Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 167, p. 378–386, Jan. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25149001/>. Acesso em: 22 maio 2018.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. *et al.* Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and  $\beta$ -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 57, p. 139–152, June 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X16300200>. Acesso em: 17 jun. 2018.
- BILGIC, M. B. *et al.* In vitro evaluation of alpha-tocopherol loaded carboxymethylcellulose chitosan copolymers as wound dressing materials. **Materials Technology**, [Leeds], v. 34, n. 07, p. 386–393, Feb. 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10667857.2019.1573944>. Acesso em: 18 mar. 2019.
- BOTREL, D. A. *et al.* Application of cashew tree gum on the production and stability of spray-dried fish oil. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 221, p. 1522–1529, Oct. 2016. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/27979124>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- CHAN, E.-S. *et al.* The effect of low air-to-liquid mass flow rate ratios on the size, size distribution and shape of calcium alginate particles produced using the atomization method. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 108, n. 2, p. 297–303, Jan. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877411004365>. Acesso em: 19 nov. 2017.

COMBS, G. F. **The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health.** 3 ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2008. 583 p.

COMUNIAN, T. A. *et al.* Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 150, p. 319–329, Oct. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861716305665>. Acesso em: 15 jan. 2018.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 61, p. 442–457, Dec. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X16302521>. Acesso em: 20 dez. 2017.

DALMORO, A. *et al.* Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [Amsterdam], v. 80, n. 3, p. 471–477, Apr. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641112000070>. Acesso em: 17 mar. 2018.

DA SILVA, P. T. da *et al.* Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 7, p. 1304–1311, July 2014. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782014000701304](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000701304). Acesso em: 19 abr. 2018.

DE SOUZA, V. B. *et al.* Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 77, p. 297–306, Apr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X17308706>. Acesso em: 25 jul. 2018.

DIAS, D. R. *et al.* Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, [Netherlands], v. 13, p. 31–37, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221479931730019X>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food and Function**, [England], v. 6, n. 4, p. 1035–1052, Apr. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25710906/>. Acesso em: 13 nov. 2017.

DIMA, C. *et al.* The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 195, p. 39–48, Mar. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814615007785>. Acesso em: 15 dez. 2017.

ESTEVINHO, B. N. *et al.* Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 31, n. 2, p. 138–155, June 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224413000733>. Acesso em: 18 jan. 2018.

FENG, W. *et al.* Preparation and characterization of emulsion-filled gel beads for the encapsulation and protection of resveratrol and  $\alpha$ -tocopherol. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 108, p. 161–171, June 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918302114>. Acesso em: 22 jul. 2018.

FREDES, C. *et al.* Stability and bioaccessibility of anthocyanins from maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) juice microparticles. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 91, p. 549–556, May 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643818301282>. Acesso em: 15 jul. 2018.

GHARIBZAHEDI, S. M. T. *et al.* Optimization and characterization of walnut beverage emulsions in relation to their composition and structure. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Amsterdam], v. 50, n. 2, p. 376–384, Mar. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813011004697>. Acesso em: 19 ago. 2018.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 40, n. 9, p. 1107–1121, Nov. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996907001238>. Acesso em: 20 set. 2018.

HARIYADI, D. M. *et al.* Diffusion loading and drug delivery characteristics of alginate gel microparticles produced by a novel impinging aerosols method. **Journal of Drug Targeting**, [Abingdon], v. 18, n. 10, p. 831–841, Dec. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20958098/>. Acesso em: 14 dez. 2017.

HECHT, H.; SREBNIK, S. Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. **Biomacromolecules**, [Washington], v. 17, n. 6, p. 2160–2167, May 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biomac.6b00378>. Acesso em: 19 nov. 2017.

JAFARI, S. M. *et al.* Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, [Philadelphia], v. 26, n. 7, p. 816–835, June 2008. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930802135972>. Acesso em: 15 jan. 2018.

JOVANOVI, S.; BARAC, M. B.; OGNJEN, M. Whey proteins-properties and possibility of application. **Dairy**, [Slovenia], v. 55, n. 3, p. 215–233, July 2005. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/26456482\\_Whey\\_proteins-Properties\\_and\\_Possibility\\_of\\_Application](https://www.researchgate.net/publication/26456482_Whey_proteins-Properties_and_Possibility_of_Application). Acesso em: 13 fev. 2018.

LEON, A. M. *et al.* Mechanical properties of whey protein/Na alginate gel microparticles. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 188, p. 1–7, Nov. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877416301753>. Acesso em: 17 dez. 2017.

LIAO, H. *et al.* Mechanisms of oligoguluronate modulating the calcium-induced gelation of alginate. **Polymer**, [Oxford], v. 74, p. 166–175, Sept. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0032386115301464>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LUO, Y. *et al.* Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [Amsterdam], v. 85, n. 2, p. 145–152, July 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21440424/>. Acesso em: 29 ago. 2018.

MARSANASCO, M. *et al.* Fortification of chocolate milk with omega-3, omega-6, and vitamins E and C by using liposomes. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [Weinheim], v. 118, n. 9, p. 1271–1281, Nov. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201400663>. Acesso em: 19 set. 2018.

MARTINS, E. *et al.* Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: Applications and drawbacks. **Journal of Microencapsulation**, [London], v. 34, n. 8, p. 754–771, Dec. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29161939/>. Acesso em: 17 set. 2018.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, [Malden], v. 75, n. 8, p. 109–124, Oct. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17995616/>. Acesso em: 15 nov. 2017.

NOGUEIRA, G. F.; PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. F. Alginate and whey protein based-multilayered particles: production, characterisation and resistance to pH, ionic strength and artificial gastric/intestinal fluid. **Journal of Microencapsulation**, [London], v. 34, n. 2, p. 151–161, Mar. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28338368/>. Acesso em: 22 dez. 2017.

OPPERMANN, A. K. L. *et al.* Effect of outer water phase composition on oil droplet size and yield of ( $w_1/o/w_2$ ) double emulsions. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 107, p. 148–157, May 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918301157>. Acesso em: 15 jul. 2018.

RAMISETTY, K. A.; PANDIT, A. B.; GOGATE, P. R. Investigations into ultrasound induced atomization. **Ultrasonics Sonochemistry**, [Amsterdam], v. 20, n. 1, p. 254–264, Jan. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417712000909>. Acesso em: 13 jun. 2018.

RAMOS, P. E. *et al.* Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 77, p. 8–16, Apr. 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X17303703>. Acesso em: 22 jul. 2018.

RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. Developments in gum acacias for the encapsulation of flavors. **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. Washington: American Chemical Society, 1995. 590 v. p. 161–168.

ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. **The Journal of Nutrition**, [Bethesda], n. 137, p. 2493–2502, Nov. 2007. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17951492/>. Acesso em: 19 ago. 2018.

SOMCHUE, W. *et al.* Encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol in protein-based delivery particles. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 42, n. 8, p. 909–914, Oct. 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399690900132X>. Acesso em: 22 set. 2018.

STRATULAT, I. *et al.* Enrichment of cheese with bioactive lipophilic compounds. **Journal of Functional Foods**, [Netherlands], v. 6, p. 48–59, Jan. 2014. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464613002910>. Acesso em: 15 nov. 2017.

TSAI, F.-H.; KITAMURA, Y.; KOKAWA, M. Effect of gum arabic-modified alginate on physicochemical properties, release kinetics, and storage stability of liquid-core hydrogel beads. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 174, p. 1069–1077, Oct. 2017. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28821029/>. Acesso em: 19 dez. 2017.

VAKARELOVA, M. *et al.* Production of stable food-grade microencapsulated astaxanthin by vibrating nozzle technology. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 221, p. 289–295, Apr. 2017.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27979204/>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Gum arabic. **Handbook of hydrocolloids**. 2nd ed. United Kingdom: Woodhead Publishing, 2009. 948 p.

WU, P. *et al.* In vitro digestion of pectin- and mango-enriched diets using a dynamic rat stomach-duodenum model. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 202, p. 65–78, June 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877417300110>. Acesso em: 15 jan. 2018.

YANG, J. *et al.* Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 123, p. 53–66, June 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861715000533>. Acesso em: 17 fev. 2018.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**



## **ARTIGO 1 – VIABILIDADE DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE $\alpha$ -TOCOFEROL POR GELIFICAÇÃO IÔNICA UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE GOTEJAMENTO**

Norma NBR 6022 (ABNT, 2018).

### **RESUMO**

O  $\alpha$ -tocoferol é um composto bioativo lipofílico com atividade antioxidante como característica funcional. Porém, possui limitações quanto ao uso devido à instabilidade que apresenta frente à presença de oxigênio, luz, variações de pH e temperatura. A gelificação iônica é uma técnica de microencapsulação que protege esses compostos e permite a aplicação em diferentes matrizes alimentícias. Para encapsulação do  $\alpha$ -tocoferol foi utilizado o alginato combinado a outros biopolímeros. Inicialmente, foram analisadas as emulsões produzidas, os resultados mostraram que todas são caracterizadas como fluidos Newtonianos e apresentaram viscosidade abaixo de 50 mPa. Em seguida, selecionou-se a inulina e a goma de cajueiro para produção das microesferas, utilizando dois tipos de bicos atomizadores (ar pressurizado e energia ultrassônica). Após a caracterização das microesferas notou-se que os diferentes métodos utilizados interferiram diretamente no tamanho das microesferas produzidas, 130  $\mu\text{m}$  para ar pressurizado e 70 a 90  $\mu\text{m}$  por energia ultrassônica. Em relação ao perfil de liberação, não houve diferença significativa quanto à estabilidade das microesferas produzidas pelos diferentes métodos. Com isso, pode-se afirmar que há uma boa compatibilidade entre o alginato e outros biopolímeros, sendo possível desenvolver sistemas de liberação controlada eficientes que protegem o  $\alpha$ -tocoferol.

**Palavras-chave:** Biopolímeros. Comportamento reológico. Ar pressurizado. Energia ultrassônica.

## 1 INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos tem sido amplamente aplicados na indústria de alimentos com o objetivo de fornecer produtos com características funcionais e suprir uma demanda crescente do consumidor. Porém, muitos desses produtos são instáveis à presença de luz, oxigênio e íons, além de serem sensíveis a mudanças de pH e temperatura (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; STRATULAT *et al.*, 2014).

O  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOC) é um composto bioativo que pertence à família da vitamina E, sendo considerado o principal antioxidante lipossolúvel da dieta, atuando em funções importantes no corpo (COMBS, 2008). A vitamina E atua como um antioxidante que interrompe o processo oxidativo por tocoferóis a propagação de reações de radicais livres, sendo que o  $\alpha$ -tocoferol aquele componente que apresenta a atividade biológica mais alta dentre os tocoferóis. O consumo dessa vitamina está relacionado à redução do risco de diversas doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares (COMBS, 2008; LUO *et al.*, 2011).

Para superar as limitações tecnológicas relacionadas ao uso direto de compostos/extratos bioativos em matrizes alimentícias, as técnicas de microencapsulação surgem como alternativas para proteger o componente bioativo e garantir a sua funcionalidade (DE SOUZA *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2017).

A microencapsulação é uma técnica na qual cria-se uma barreira polimérica onde um ou mais compostos são cercados ou imobilizados por um ou mais materiais com o objetivo de proteger os compostos bioativos de interesse de fatores externos tais como luz, alta concentração de oxigênio, calor, umidade, prevenir a evaporação de compostos voláteis, mascarar gosto e aroma indesejáveis, inibir interações químicas e para o desenvolvimento de produtos de valor agregado (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; DIAS *et al.*, 2017).

O método de gelificação iônica é uma técnica muito relatada na literatura para a encapsulação de compostos bioativos alimentícios, já que é caracterizado por condições brandas que afetam minimamente a integridade da maioria dos compostos bioativos a serem encapsulados. Essa vantagem em relação aos outros métodos também muito utilizados, como o spray drying, se deve por ser uma técnica baseada na interação eletrostática de um polímero carregado e um íon multivalente (DIAS *et al.*, 2017; VAKARELOVA *et al.*, 2017).

O alginato de sódio é o material polimérico (encapsulante) mais utilizado no método de gelificação iônica para a microencapsulação de diversos compostos bioativos. Porém, o alginato de sódio apresenta baixa capacidade de barreira, ou seja, as microesferas produzidas

apresentam menor estabilidade. Essa particularidade acontece devido, principalmente, às suas propriedades reológicas, pois mesmo soluções com baixas concentrações de alginato apresentam alta viscosidade (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015).

A limitação da produção de microesferas porosas por utilizar alginato em baixas concentração pode ser resolvida através da adição de outros biopolímeros, complementares ao alginato, que podem melhorar a barreira produzida através do aumento da densidade da matriz encapsulante, e conseqüentemente aumento da estabilidade das microesferas produzidas, criando um sistema de proteção e de liberação controlada mais eficiente.

O tamanho de partícula produzida (macro ou microesfera) também é uma característica importante na eficácia das esferas produzidas pois determinam, principalmente, sua eficiência de encapsulação e estabilidade. Na técnica de gelificação iônica o tamanho da microesfera é definido pela vazão de alimentação, distância entre o bico e o banho de gelificação, além do tipo de atomização (RAMOS *et al.*, 2018).

A etapa de formação de gota nos processos de microencapsulação determina então o tamanho e a distribuição de tamanho das microesferas produzidas. Os principais processos de formação de gota são agitação, agitação estática, extrusão e gotejamento (formação de gota única ou excitação do jato) (DALMORO *et al.*, 2012). Na encapsulação por gelificação iônica a etapa de formação de gota é feita pelo processo de gotejamento, nesse processo a formação de gota pode ser por gravidade (gota única) ou por excitação do jato pela aplicação de algum tipo de energia para o rompimento do líquido. A formação de gota única por gravidade é um processo lento e sem uniformidade, produz partículas de diferentes tamanhos e geralmente na escala macro. O desenvolvimento de técnicas de excitação do jato permitiu otimizar esse gotejamento, pois a utilização de uma energia aplicada ao líquido permite uma atomização mais eficiente, que permite controlar o tamanho, distribuição de tamanho e forma (CHAN *et al.*, 2012; DALMORO *et al.*, 2012).

Características como tamanho e forma das partículas podem gerar efeitos sensoriais diferentes em um produto. Partícula com tamanho maior (500-2000  $\mu\text{m}$ ), por exemplo, cria uma aparência visual mais marcante e uma textura mais distinta na boca quando comparada com partículas de tamanhos menores (50-100  $\mu\text{m}$ ). Atualmente existem diversos métodos para o rompimento do líquido produzindo partículas de diferentes intervalos de tamanho médio durante o gotejamento ou atomização (CHAN *et al.*, 2012).

Diante do exposto os objetivos deste trabalho foi determinar a viabilidade da adição de biopolímeros complementares ao alginato, avaliando-se características do processo tais como viscosidade, homogeneidade e qualidade das emulsões produzidas para a então formação das

microesferas de  $\alpha$ -tocoferol de interesse. Além disso, avaliou-se o uso de dois tipos de processos de atomização (gotejamento) das emulsões, variando-se a forma de energia utilizada (mecânica e ultrassônica), e com isso, definir qual forma de obtenção das microesferas produz partículas com características necessárias para a criação de um sistema de liberação controlada mais eficiente.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

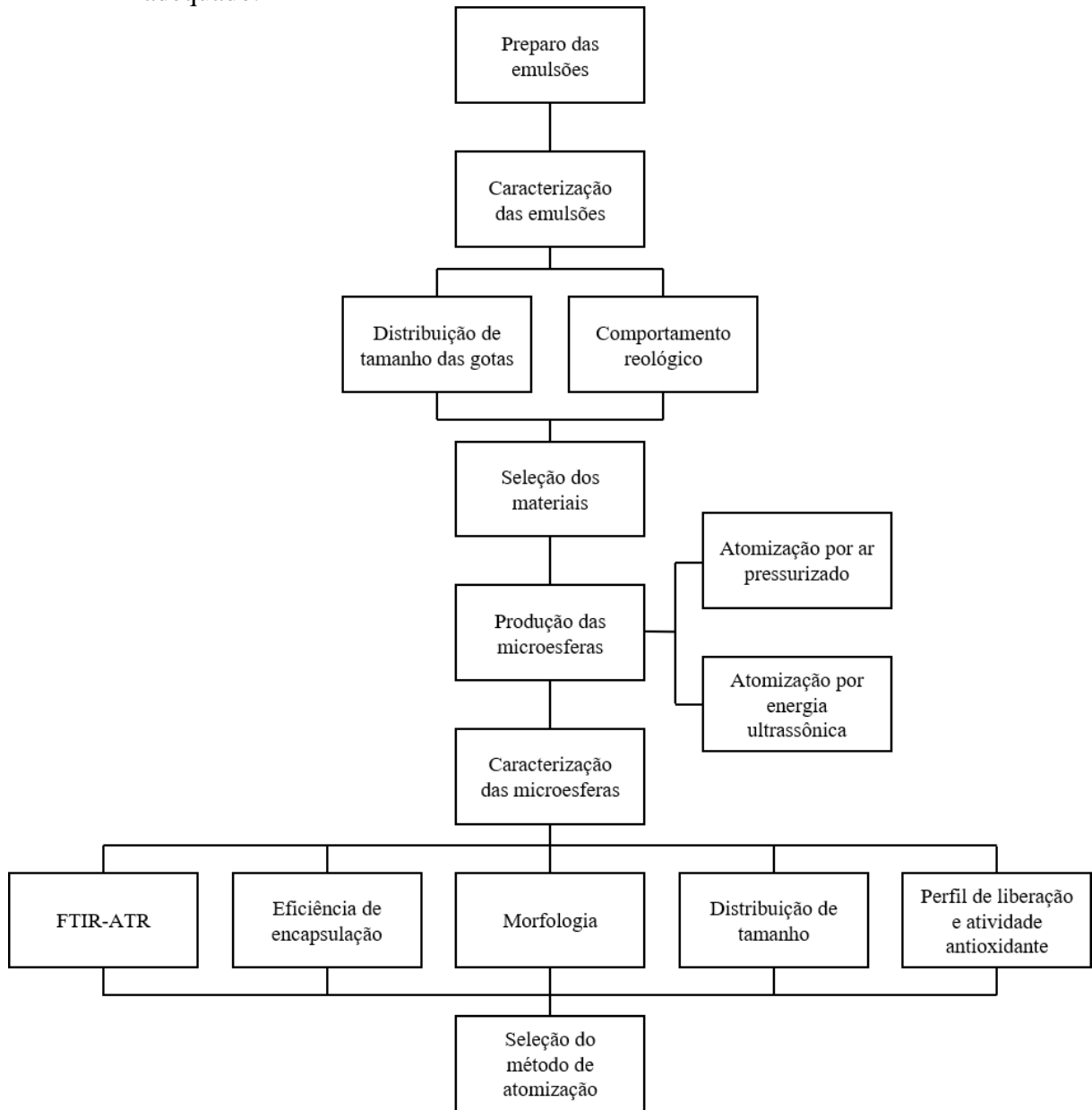
### **2.1 Material**

Para a formação das microesferas foi utilizado alginato de sódio (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). O composto bioativo lipofílico encapsulado foi o  $\alpha$ -tocoferol (96,5% de pureza) (DSM Nutritional Products, Venlo, Holanda). Os materiais de parede complementares utilizados foram isolado proteico de soro (IPS) (Hilmar Ingredients, Hilmar, EUA), maltodextrina (MD) Neomalt (DE 9 -12) (Cassava S/A, Rio do Sul, Brasil), inulina (IN) Orafti GR (Beneo, Oreye, Bélgica), goma arábica (GA) 381 I (Alland & Robert, Paris, França) e goma de cajueiro (GC) (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil).

### **2.2 Métodos**

A Figura 1 apresenta o fluxograma da realização sequencial do estudo.

Figura 1 – Fluxograma das etapas realizadas para seleção do método de atomização mais adequado.



Fonte: Da autora (2021).

### 2.2.1 Planejamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, avaliando-se o tipo de material complementar ao alginato de sódio, como apresentado na Tabela 1. Os resultados foram submetidos à análise de variância que foi realizada com uso do software *Statistica* (Stat Soft. Inc., Tulsa, EUA) para avaliar os efeitos das formulações nas características das emulsões e das microesferas produzidas. As

diferenças entre os valores médios obtidos experimentalmente foram analisadas através do Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1 – Delineamento experimental para microencapsulação de  $\alpha$ -tocoferol através de gelificação iônica utilizando o alginato.

Tratamentos	Alginato (% m/v)	Material complementar (% m/v)					$\alpha$ -TOC (%m/v)	Emulsificante (% m/v)
		IPS	MD	IN	GA	GC		
1	1,75	-	-	-	-	-	1,0	0,1
2	1,75	0,5	-	-	-	-	1,0	0,1
3	1,75	-	0,5	-	-	-	1,0	0,1
4	1,75	-	-	0,5	-	-	1,0	0,1
5	1,75	-	-	-	0,5	-	1,0	0,1
6	1,75	-	-	-	-	0,5	1,0	0,1

IPS: isolado proteico de soro; MD: maltodextrina; IN: inulina; GA: goma arábica; GC: goma de cajueiro.

Fonte: Da autora (2021).

### 2.2.2 Preparo das emulsões

Para o preparo das emulsões, inicialmente o alginato de sódio foi hidratado em água destilada por aproximadamente 12 horas à temperatura ambiente, para o preparo de uma solução com concentração de 1,75% (m/v). Após a etapa de hidratação, adicionou-se à solução 0,5% (m/v) do material complementar (IPS, MD, IN, GA e GC), 0,1% (m/v) de emulsificante Tween 20 (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) e 1,0% (m/v) do  $\alpha$ -tocoferol. Preparadas as soluções com as formulações pré-determinadas, essas foram agitadas em homogeneizador (Ultra-Turrax IKA T18 basic, Wilmington, EUA) por 10 minutos a 2500 rpm. Uma segunda homogeneização foi feita em ultrassom (Digital Sonifier, Branson Ultrasonic Corporation) pelo tempo de 2 minutos com 360 W de potência.

### 2.2.3 Caracterização das emulsões

As emulsões preparadas foram caracterizadas quanto à distribuição de tamanho e ao comportamento reológico.

### 2.2.3.1 Distribuição de tamanho das gotas

A análise de distribuição de tamanho das gotas da emulsão foi feita usando a técnica de espalhamento de luz estática em aparelho Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) do Laboratório de Refrigeração de Alimentos (DCA, UFPA). O índice de refração das gotas de óleo foi estabelecido em 1,48, o índice de refração da água (fase contínua) em 1,33 e a absorção da gota fixou-se em 0,01 (EISINAITE *et al.*, 2018; OPPERMANN *et al.*, 2018). O diâmetro médio das gotas de óleo foi expresso segundo o diâmetro médio de Sauter ( $D_{32}$ ) e o espalhamento da distribuição do tamanho das gotas foi avaliado pelo *span*, conforme equações 1 e 2, respectivamente.

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (1)$$

Onde  $d_i$  é o diâmetro da gota,  $n_i$  é o número de gotas entre dois diâmetros consecutivos

$$span = \frac{[d(0,9) - d(0,1)]}{d(0,5)} \quad (2)$$

Onde,  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  e  $d(0,9)$  são diâmetros médios volumétricos a 10%, 50% e 90% do volume acumulado, respectivamente.

### 2.2.3.2 Comportamento reológico

O comportamento reológico foi conduzido em um viscosímetro de cilindro concêntrico (Brookfield DVIII Ultra, Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, EUA) do Laboratório de Refrigeração de Alimentos (DCA, UFPA), constituído por uma câmara cilíndrica 13R/RP (19,05 mm de diâmetro e profundidade de 64,77 mm), e uma sonda SC4-18 (17,48 mm de diâmetro e 35,53 mm de comprimento). Para cada tratamento, o copo de amostragem cheio (6,7 mL) e a sonda foram equilibrados a uma temperatura de 20 °C. A viscosidade aparente das emulsões foi avaliada como a relação entre a tensão ( $\sigma$ ) e a taxa de deformação ( $\gamma$ ) (TEODORO *et al.*, 2016).



## 2.2.4 Produção das microesferas

Para dar início à etapa de produção das microesferas, foi feita uma análise dos resultados obtidos a partir das emulsões de  $\alpha$ -tocoferol com alginato e materiais complementares. O fator determinante para que a emulsão produzida pudesse ser atomizada, para a produção das microesferas, era a viscosidade, já que essa era uma característica limitante para o uso do bico atomizador por energia ultrassônica, que permite a passagem de fluidos com viscosidade menor ou igual a 50 mPas.

Avaliada a viscosidade das emulsões foram observadas características como homogeneidade da emulsão e tamanho das gotículas de óleo, pois essas influenciam na obtenção de melhores resultados na produção das microesferas, como a eficiência de encapsulação. Além disso, foram consideradas características tecnológicas dos materiais complementares que viabilizam um aumento do valor agregado das microesferas de  $\alpha$ -TOC. Características essas como a potencial função prebiótica (inulina) e uso de materiais emergentes de menor custo (goma de cajueiro).

Feita então a escolha dos materiais complementares que apresentavam maior número de características adequadas ao processo, as emulsões de  $\alpha$ -tocoferol com sistema alginato-inulina (IN) ou alginato-goma de cajueiro (GC) foram gotejada sem dois tipos de bico atomizadores com o objetivo de avaliar qual dos dois processos produz microesferas mais eficientes e estáveis, criando assim um sistema de liberação controlada do composto bioativo lipofílico ( $\alpha$ -tocoferol).

### 2.2.4.1 Atomização por ar pressurizado

As emulsões foram atomizadas utilizando-se bico pressurizado tipo spray duplo fluido (Modelo LM MSD 1.0, Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil), alimentado por uma bomba peristáltica a uma vazão de 0,20 L/h (3,33 mL/min) e uma vazão de ar de 15 L/min. Quando atomizadas, as esferas formadas entraram em contato com o banho de gelificação de solução de  $\text{CaCl}_2$  a uma concentração 1,5% (m/v) sob constante agitação mecânica, afim de evitar aglomeração das microesferas. As microesferas foram mantidas no banho de gelificação por um período de 30 minutos sob agitação para a completa formação da estrutura de hidrogel. Em seguida, as micropartículas foram lavadas com água destilada e filtradas à vácuo. As condições de atomização foram definidas a partir de pré-testes.

#### **2.2.4.2 Atomização por energia ultrassônica**

As emulsões foram atomizadas em equipamento de bico ultrassônico (Vibra-Cell modelo VCX 130, Sonics & Materials INC, Newtown, EUA) com ponta de diâmetro igual a 5,0 mm, alimentado por uma bomba peristáltica (MS Tecnopon Instrumentação, Piracicaba, Brasil) a uma vazão de aproximadamente 0,80 mL/min e uma amplitude de 95%. Quando atomizadas, as esferas formadas entraram em contato com o banho de gelificação de solução de CaCl<sub>2</sub> a uma concentração 1,5% (m/v) sob constante agitação mecânica, afim de evitar aglomeração das microesferas. As microesferas foram mantidas no banho de gelificação por um período de 30 minutos sob agitação para a completa formação da estrutura de hidrogel. Em seguida, as microesferas foram lavadas com água destilada e filtradas à vácuo. As condições de atomização foram definidas a partir de pré-testes.

#### **2.2.5 Caracterização das microesferas**

##### **2.2.5.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier de refletância total atenuada (FTIR-ATR)**

Para confirmar as interações entre os componentes da formulação para a formação do hidrogel foi feita a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier de refletância total atenuada (FTIR-ATR) do Laboratório CAPQ (UFLA) (AHMAD; RAI; MAHMOOD, 2015). As análises de FTIR foram feitas em espectrofotômetro em uma região de comprimento de onda de 400-4000 cm<sup>-1</sup>. Os componentes individuais e as microesferas foram analisadas pelo modo ATR. Os espectros FTIR-ATR foram adquiridos em resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup> com 64 varreduras (Metodologia adaptada de RAMOS *et al.*, 2018; ŠPOLJARIC *et al.*, 2016).

##### **2.2.5.2 Eficiência de encapsulação**

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada relacionando a concentração do composto bioativo lipofílico presente na emulsão encapsulada com a concentração do composto ( $\alpha$ -TOC) presente nas microesferas produzidas, como mostrado na Equação 3.

$$EE (\%) = \frac{\text{Concentração de } \alpha\text{-TOC nas microesferas}}{\text{Concentração inicial de } \alpha\text{-TOC na emulsão}} \times 100 \quad (3)$$

A concentração de composto lipofílico encapsulado foi determinado a partir da liberação do  $\alpha$ -TOC rompendo 0,5 g de microesfera em 5,0 mL de solução de citrato de sódio 3,0% (m/v) (pH~8,9), mantidas em banho ultrassônico por 1 hora e após esse tempo foram mantidas em repouso por 12 h. Em seguida, foi adicionado 5 mL de etanol à solução e essa foi agitada vigorosamente em vórtex por 2 minutos, em seguida a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Realizada a centrifugação, foram realizadas lavagens no sobrenadante com etanol (Metodologia adaptada de FENG *et al.*, 2018; YOO *et al.*, 2006). A quantificação foi feita então através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do Laboratório CAPQ (UFLA), na qual o volume de injeção foi de 20  $\mu$ L, a uma taxa de eluição de 2 mL/min, com fase móvel metanol:água (96:4, v/v). Foi utilizada coluna C18, mantida à 45 °C. A detecção foi realizada à 295 nm com um tempo de corrida de 30 minutos (Metodologia adaptada de GIMENO *et al.*, 2000).

### 2.2.5.3 Morfologia

A análise de morfologia das microesferas formadas foi feita através da observação em microscópio óptico de luz invertido Zeiss observer Z.1 motorizado com sistema Apotome e software Zeiss Axion Vision para captura de imagem, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (UFLA). Uma quantidade de microesferas foi distribuída em uma lamínula de vidro e observadas sob o microscópio.

### 2.2.5.4 Distribuição de tamanho

A análise de distribuição de tamanho das microesferas produzidas foi feita usando a técnica de espalhamento de luz estática em aparelho Mastersizer 2000, modelo Hydro 2000 UM (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Uma quantidade de microesferas de alginato foram dispersas em água destilada, a qual o índice de refração (fase contínua) foi estabelecido em 1,33 (AGUILAR *et al.*, 2015). O diâmetro médio das gotas de óleo foram expressos segundo o diâmetro médio de Sauter ( $D_{32}$ ) e o espalhamento das partículas foi avaliado pelo *span*, conforme equações já apresentadas (Eq. 1 e 2).

### 2.2.5.5 Perfil de liberação e atividade antioxidante

Para avaliar o comportamento, a estabilidade das microesferas e a liberação do composto bioativo lipofílico ao longo do tempo, foi conduzida a determinação da atividade antioxidante no meio simulante, onde as microesferas foram mantidas. Os meios utilizados neste estudo foram soluções de diferentes valores de pH, simulando condições específicas de matrizes alimentícias (pH = 2,0 tampão ácido clorídrico, pH = 4,0 tampão acetato e pH = 6,0 tampão fosfato). A análise foi feita utilizando-se uma suspensão de 2,0 g de microesfera em 20,0 mL de meio com o pH pré-definido e em temperatura ambiente 25 °C por 6 horas. Em intervalos de tempos de 60 minutos, uma alíquota de 2,0 mL do sobrenadante foi retirada para análise de atividade antioxidante pelo método de DPPH. Como controle positivo foi utilizado o  $\alpha$ -tocoferol livre na concentração de 1,0% (Metodologia adaptada de BELŠČAK-CVITANOVIC *et al.*, 2016; HARIYADI *et al.*, 2010). A porcentagem de atividade antioxidante no meio (AA%), medida pela técnica do DPPH (GIMENEZ-ROTA *et al.*, 2019), foi calculada como na Equação 4.

$$\textit{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (4)$$

Para avaliar a característica de inchamento das microesferas nas soluções de diferentes pH foi feita a observação das partículas após o tempo de avaliação da estabilidade através da microscopia óptica com microscópio óptico de luz invertido Zeiss observer Z.1 (Oberkochen, Alemanha) motorizado com sistema Apotome e software Zeiss Axion Vision® para captura de imagem.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização das emulsões

##### 3.1.1 Distribuição de tamanho

As emulsões foram caracterizadas segundo a distribuição de tamanho das gotas de  $\alpha$ -tocoferol na fase contínua através da técnica de espalhamento de luz. O diâmetro médio das gotículas foi expresso como diâmetro médio de Sauter ( $D_{32}$ ). Para o diâmetro de Sauter os valores variaram entre 0,47 e 1,42  $\mu\text{m}$ , sendo que todas as formulações tiveram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ). As emulsões foram consideradas homogêneas baseado nos baixos valores de *span* (espalhamento das gotículas) (TABELA 2).

Tabela 2 – Valores dos diâmetros médio de Sauter ( $D_{32}$ ) e *span* das gotas de  $\alpha$ -tocoferol para cada formulação.

Tratamentos	$D_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )	<i>Span</i>
1	$1,42 \pm 0,04^a$	$4,16 \pm 0,06^{b,c}$
2	$0,61 \pm 0,01^c$	$4,19 \pm 0,02^b$
3	$0,47 \pm 0,00^e$	$4,26 \pm 0,02^a$
4	$0,78 \pm 0,01^b$	$3,85 \pm 0,02^d$
5	$0,57 \pm 0,01^d$	$4,13 \pm 0,01^c$
6	$0,54 \pm 0,00^d$	$4,25 \pm 0,02^a$

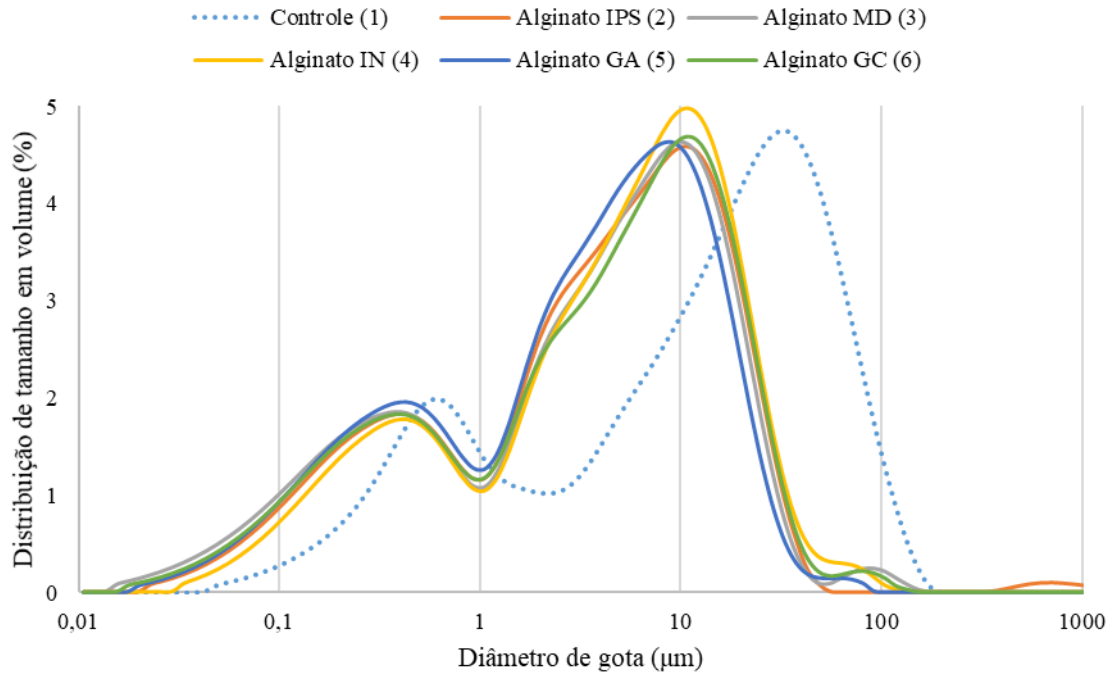
1: Alginato (controle); 2: Alginato IPS; 3: Alginato MD; 4: Alginato IN; 5: Alginato GA; 6: Alginato GC. Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2021).

Ao observar os valores encontrados para o diâmetro médio de Sauter ( $D_{32}$ ) é possível notar que os tratamentos em que foram adicionados materiais complementares ao alginato produziram emulsões com menores gotas de  $\alpha$ -TOC, ou seja, a adição de outros biopolímeros permitiu uma melhor distribuição do composto bioativo lipofílico na solução. Esse resultado positivo pode ser explicado pelo aumento da viscosidade das soluções ao acrescentar os materiais complementares, isso porque emulsões mais viscosas são mais efetivas em prevenir a coalescência das gotas de material lipídico na solução aquosa (EISINAITE *et al.*, 2018).

A Figura 2 apresenta o gráfico com a média da distribuição de tamanho de gota de  $\alpha$ -tocoferol para cada formulação das emulsões produzidas.

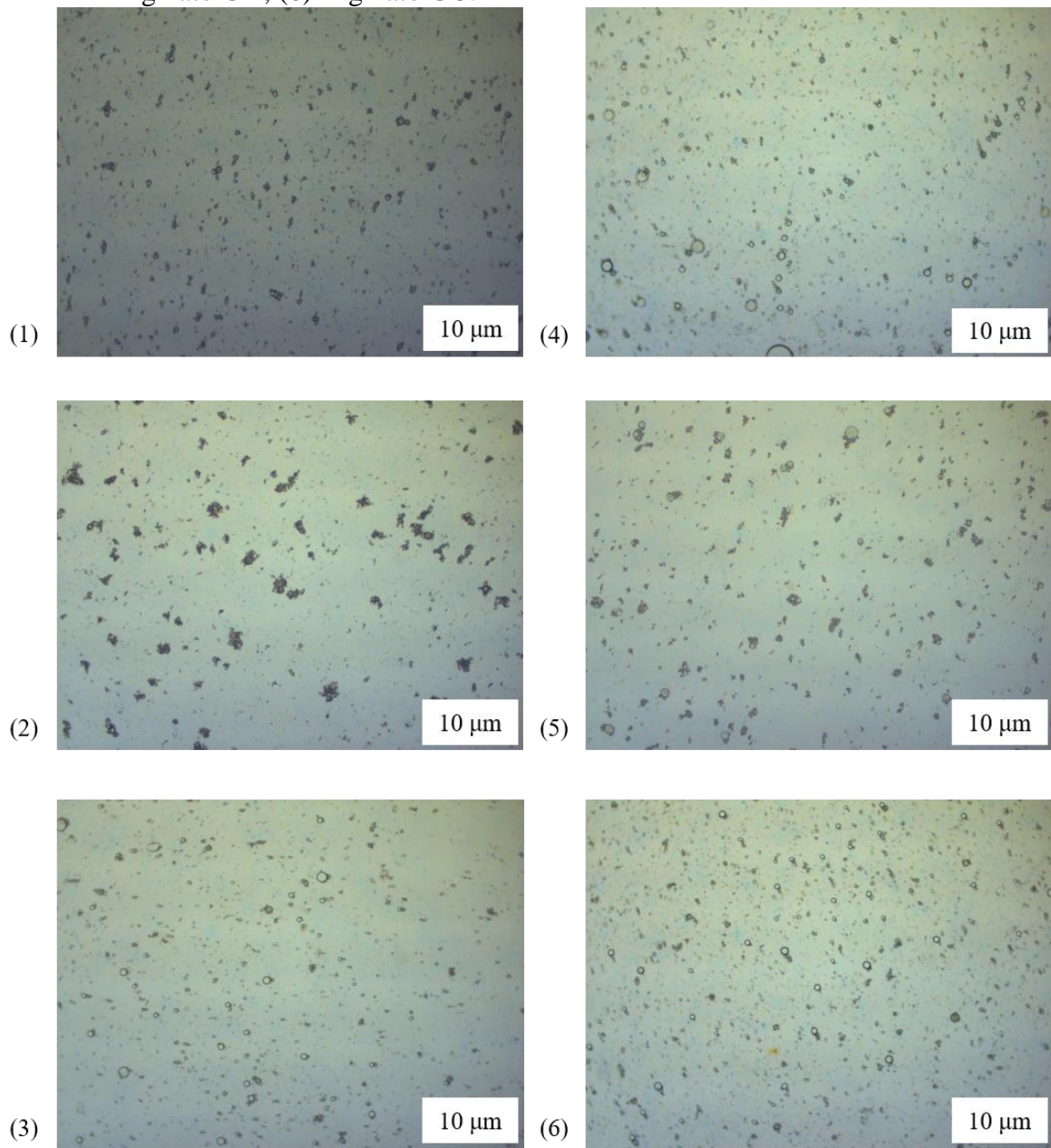
Figura 2 – Distribuição de tamanho das gotas de  $\alpha$ -tocoferol presente nas emulsões produzidas.



Fonte: Da autora (2021).

A Figura 3 apresenta as microscopias ópticas das emulsões obtidas com o uso dos diferentes materiais complementares. Observa-se que há uma homogeneidade em todas as emulsões e uma boa distribuição das gotículas, somente na emulsão produzida com alginato e IPS (2) é possível notar que há um processo de coalescência das gotas de óleo. Apesar do IPS ser uma proteína que apresenta boa capacidade emulsificante, isso pode acontecer devido à sua instabilidade estrutural frente às condições adversas do meio ou por apresentar cadeia menor se comparado aos materiais com alto peso molecular como as gomas (arábica e de cajueiro) e carboidratos (inulina), apresentando assim uma solução com viscosidade menor que favorece a coalescência das gotas de  $\alpha$ -tocoferol (CAMPELO *et al.*, 2017; EISINAITE *et al.*, 2018; GHARIBZAHEDI *et al.*, 2012).

Figura 3 – Microscopia óptica das emulsões com os diferentes materiais complementares. (1) Alginato – controle; (2) Alginato IPS; (3) Alginato MD; (4) Alginato IN; (5) Alginato GA; (6) Alginato GC.

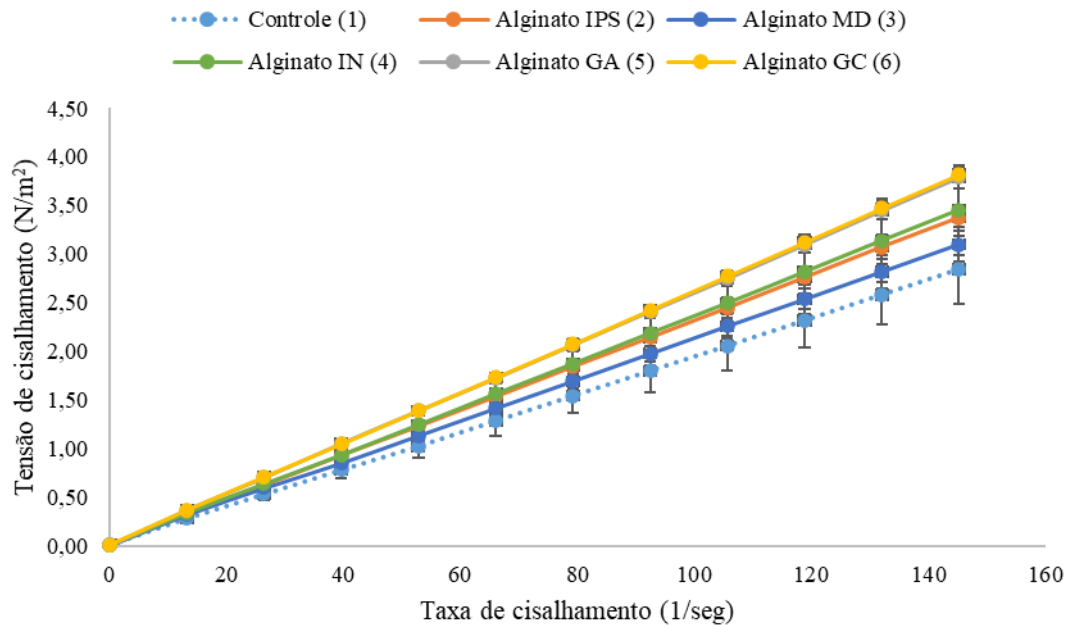


Fonte: Da autora (2021).

### 3.1.2 Comportamento reológico

Ao avaliar o comportamento reológico das emulsões, verifica-se que todas as formulações apresentaram comportamento newtoniano, ou seja, existe uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, como pode ser visto na Figura 4.

Figura 4 – Comportamento reológico das emulsões: relação tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento.

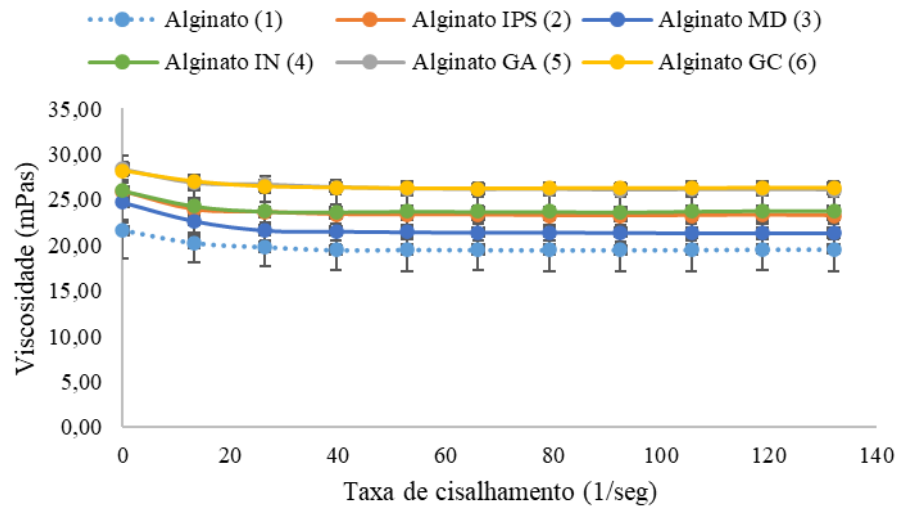


Fonte: Da autora (2021).

Conforme pode ser visto na Figura 5, verifica-se que todas as emulsões tiveram manutenção da viscosidade para todas as taxas de deformação, confirmando o comportamento newtoniano. Os valores médios de viscosidade aparente para os diferentes tratamentos variaram entre 18,1 e 24,2 mPas (TABELA 3), os tratamentos com isolado proteico de soro e inulina não diferiram estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ), assim como os tratamentos que utilizou-se goma arábica e goma de cajueiro. Pode-se observar que a adição de material complementar aumentou a viscosidade aparente em todos os tratamentos. Nas emulsões em que se utilizou materiais do tipo goma (5: goma arábica e 6: goma de cajueiro) houve um aumento maior em relação ao tratamento controle (somente com alginato), isso pode estar associado à capacidade de absorção e retenção de água das gomas, o que contribui para aumentar a viscosidade do meio (BOTREL *et al.*, 2016; WILLIAMS; PHILLIPS, 2009).



Figura 5 – Comportamento reológico das emulsões: relação viscosidade aparente e taxa de deformação.



Fonte: Da autora (2021).

Tabela 3 – Valores de viscosidade aparente para cada emulsão com diferentes materiais complementares.

Tratamento	Viscosidade (mPas)
1	18,14 ± 2,16 <sup>d</sup>
2	21,64 ± 0,99 <sup>b</sup>
3	20,11 ± 1,30 <sup>c</sup>
4	21,98 ± 2,88 <sup>b</sup>
5	24,32 ± 0,30 <sup>a</sup>
6	24,26 ± 0,75 <sup>a</sup>

1: Alginato (controle); 2: Alginato IPS; 3: Alginato MD; 4: Alginato IN; 5: Alginato GA; 6: Alginato GC. Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fone: Da autora (2021).

Como já descrito anteriormente, a fase de produção das microesferas foi realizada utilizando apenas alguns materiais complementares, essa escolha foi feita a partir da análise dos resultados obtidos das emulsões de  $\alpha$ -tocoferol. O fator determinante para que a emulsão produzida pudesse ser atomizada, para a produção das microesferas, era a viscosidade, já que essa era uma característica limitante para o uso do bico atomizador por energia ultrassônica, que permite a passagem de fluidos com viscosidade menor ou igual a 50 mPas.

Todas as emulsões obtidas apresentaram viscosidade abaixo de 50 mPas, entre 18,14 e 24,32 mPas. Desta forma, para a escolha dos tratamentos a serem estudados com mais detalhes neste trabalho, optou-se por considerar características como homogeneidade da

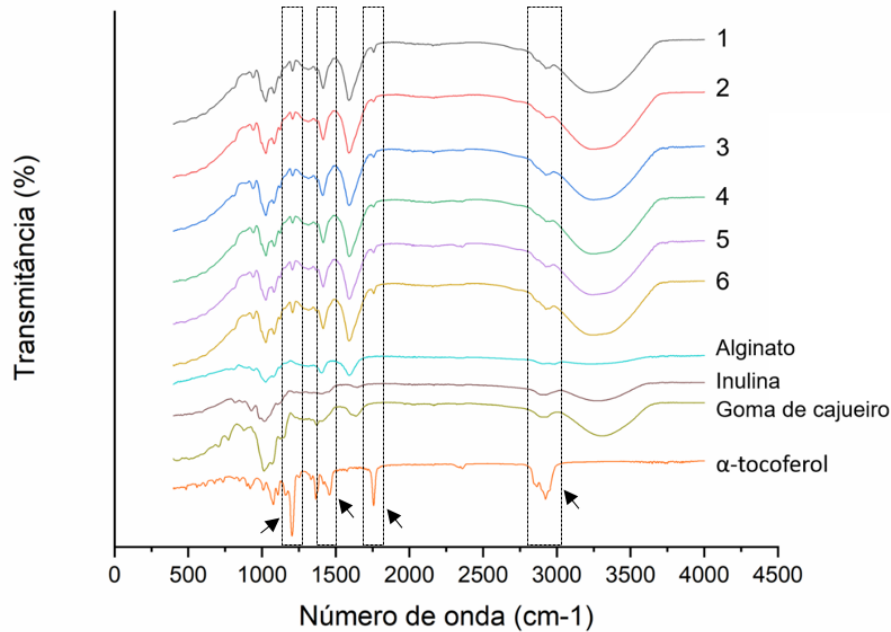
emulsão e tamanho das gotículas de óleo, pois influenciam diretamente na obtenção de melhores resultados na produção das microesferas, como a eficiência de encapsulação. A emulsão produzida utilizando alginato e inulina foi aquela considerada de melhor homogeneidade na distribuição (span = 3,85) e em relação ao tamanho de gotas de óleo na emulsão, o tratamento goma de cajueiro foi um dos que apresentou menores diâmetro das gotículas. Além disso, foram consideradas características tecnológicas dos materiais complementares que viabilizam um aumento do valor agregado das microesferas de  $\alpha$ -TOC. Características essas como a potencial função prebiótica (inulina) e uso de materiais emergentes (goma de cajueiro) (FERNANDES *et al.*, 2016).

## **3.2 Caracterização das microesferas**

### **3.2.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier de refletância total atenuada (FTIR-ATR)**

Para verificara ocorrência de interações entre os componentes da formulação para a formação do hidrogel foi feita a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier de refletância total atenuada (FTIR-ATR) (AHMAD; RAI; MAHMOOD, 2016). Os espectros de FTIR-ATR das microesferas produzidas, bem como dos componentes individuais que produziram as microesferas estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6 – Espectros de FTIR-ATR dos componentes puros (alginato, inulina, goma de cajueiro e  $\alpha$ -tocoferol) e das microesferas produzidas: (1) Alginato-controle (ar pressurizado); (2) Alginato-controle (energia ultrassônica); (3) Alginato IN (ar pressurizado); (4) Alginato IN (energia ultrassônica); (5) Alginato GC (ar pressurizado); (6) Alginato GC (energia ultrassônica).



Fonte: Da autora (2021).

O espectro de alginato puro mostra uma banda característica de alongamento de  $\text{-OH}$  e ligações de hidrogênio intra e intermoleculares próximo de  $3400\text{ cm}^{-1}$ . O espectro exibe também uma banda forte a  $1600\text{ cm}^{-1}$  que corresponde às frequências de um grupo carbonil de ácido carboxílico (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015).

No espectro da inulina é possível identificar uma banda próximo à  $3300\text{ cm}^{-1}$  referente à estrutura sacarídica (alongamento  $\text{-OH}$ ) (LIM; SIOW, 2016). Duas bandas aproximadamente em  $1040$  e  $2930\text{ cm}^{-1}$  são típicas para a inulina, originadas de grupos  $\text{C-O-C}$  e grupos alifáticos  $\text{-CH}_2$ , respectivamente (CUJIC *et al.*, 2016).

O espectro para goma de cajueiro pura apresenta bandas associadas ao alongamento assimétrico de grupos  $\text{-COO}^-$  e  $\text{-OH}$  que são observadas a  $1640\text{ cm}^{-1}$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (ABREU *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2016). Bandas em  $1080$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$  são devidas ao alongamento assimétrico da estrutura sacarídica  $\text{C-O-C}$ , sendo a primeira presente em maior intensidade na goma de cajueiro e a segunda na molécula de alginato (DE OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014).

Nos espectros de infravermelho vibracional, o  $\alpha$ -tocoferol é identificado pela presença das bandas  $1290\text{ cm}^{-1}$  e  $1790\text{ cm}^{-1}$ , em referência ao alongamento axial de carbonila  $\text{C=O}$  e pelo alongamento axial da ligação  $\text{C-O}$ , que compõem a ligação do éster. A faixa espectral do

$\alpha$ -tocoferol apresenta uma faixa larga entre  $3020\text{ cm}^{-1}$  e  $3700\text{ cm}^{-1}$ , em referência ao hidroxilo fenólico (PEREIRA *et al.*, 2015).

A estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol e também da sua forma acetilada forma, apresenta uma longa cadeia alquílica, um grupo fitilo de origem terpeno, como substitutos metílicos do anel aromático do sistema cromóforo, que compõem esta molécula. O alongamento axial das ligação C–H, que compõem o grupo fitílico e os substitutos metílicos do anel aromático, distribuindo uma faixa intensa entre  $2880\text{ cm}^{-1}$  a  $2940\text{ cm}^{-1}$ , que é distinta das outras bandas do espectro infravermelho ambos de  $\alpha$ -tocoferol e a forma acetilada. A deformação da ligação C–C aromático é confirmada pela presença das bandas em  $1360\text{ cm}^{-1}$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$ . A identificação destas bandas auxilia na identificação da presença da molécula  $\alpha$ -tocoferol, quer na sua forma livre ou acetilada (PEREIRA *et al.*, 2015).

Devido à reação de reticulação, bandas a  $2920\text{ cm}^{-1}$  e a  $3420\text{ cm}^{-1}$  foram reduzidas, enquanto que as bandas a  $1440\text{ cm}^{-1}$  e  $1740\text{ cm}^{-1}$  foram aumentadas, principalmente devido à introdução de grupos carbonila com o agente de reticulação ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (PAULA *et al.*, 2012).

As modificações observadas na intensidade das bandas das microesferas produzidas indicam a presença de interações entre o sistema (materiais encapsulantes e composto bioativo) (LIM; SIOW, 2016). Além disso, o espectro de FTIR de  $\alpha$ -tocoferol puro mostra que não houve mudanças significativas em relação ao número de onda dos seus picos característicos nos espectros das microesferas produzidas, sugerindo que as formulações são apropriadas para a encapsulação do  $\alpha$ -tocoferol (CUJIC *et al.*, 2016).

### 3.2.2 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) é dada pela relação entre a concentração do composto bioativo lipofílico presente na emulsão e a concentração do composto ( $\alpha$ -TOC) presente nas microesferas produzidas. A porcentagem de EE é um parâmetro que deve ser maximizado, pois indica a eficiência do processo e dos materiais utilizados para a produção das microesferas de composto bioativo.

Os valores de eficiência de encapsulação para o  $\alpha$ -tocoferol nos tratamentos produzidos com o uso de ar pressurizado na atomização variaram entre 88,29 e 92,45%, por outro lado, para os tratamentos em que a atomização foi feita através de energia ultrassônica a EE variou de 90,84 a 97,72%, como apresentado na Tabela 4. Esses altos valores de eficiência de encapsulação mostram que os sistemas alginato-inulina (IN) e alginato-goma de cajueiro

(GC) são matrizes compatíveis que podem ser usadas para encapsular emulsões contendo  $\alpha$ -TOC.

Além disso, verificou-se que o aumento da viscosidade da solução de alginato em função da adição de outro biopolímero (inulina ou goma de cajueiro) induziu a uma maior eficiência de encapsulação, para o gotejamento utilizando energia ultrassônica, isso porque o alginato passa a ter uma rede mais concentrada com uma parede menos porosa (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015; CUJIC *et al.*, 2016).

Tabela 4 – Valores médios de eficiência de encapsulação obtidos para cada tratamento realizado na produção das microesferas de  $\alpha$ -tocoferol.

Tratamentos	Eficiência de encapsulação (%)	
	Ar pressurizado	Energia ultrassônica
Alginato (controle)	92,45 $\pm$ 2,85 <sup>b</sup>	90,84 $\pm$ 2,56 <sup>c</sup>
Alginato IN	93,24 $\pm$ 6,65 <sup>a</sup>	97,72 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>
Alginato GC	88,29 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	94,19 $\pm$ 2,20 <sup>b</sup>

IN: inulina; GC: goma de cajueiro. Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2021).

O aumento da eficiência de encapsulação ao adicionar inulina no alginato pode ser observado também em trabalho realizado por Prasanna e Charalampopoulos (2019), os quais produziram microesferas contendo probiótico *Bifidobacterium* utilizando 2% (m/v) de alginato adicionado de 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0% (m/v) de inulina, com 0% de inulina a eficiência de encapsulação foi de 90,84%, no tratamento em que utilizaram 2% de inulina a EE reduziu para 87,45%. Os melhores resultados encontrados pelos autores foram aqueles utilizando 0,5 e 1,0% de inulina que apresentaram eficiência de encapsulação de 91,67 e 91,94%, respectivamente, os mesmos não tiveram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ).

Trabalhos utilizando a goma arábica, que tem estrutura e características muito semelhantes à goma de cajueiro, e produzem sistemas alginato-goma que possuem uma boa interação relatam resultados semelhantes. Tsai, Kitamura e Kokawa (2017) encapsularam extrato de rabanete a partir de microesferas de alginato (2%) obtendo uma eficiência de encapsulação de 83,80% e ao adicionarem 0,25% de goma arábica a EE foi de 85,65%. Paula *et al.* (2012) desenvolveram microesferas de alginato (2,5%) e goma de cajueiro com óleo de *Lippiasiloide*, no estudo ao utilizarem a proporção de 1:1 os autores obtiveram uma eficiência

de encapsulação de 69,3%, quando comparado ao tratamento em que utilizou-se mais alginato (1:2) a eficiência de encapsulação aumentou para 71,5%.

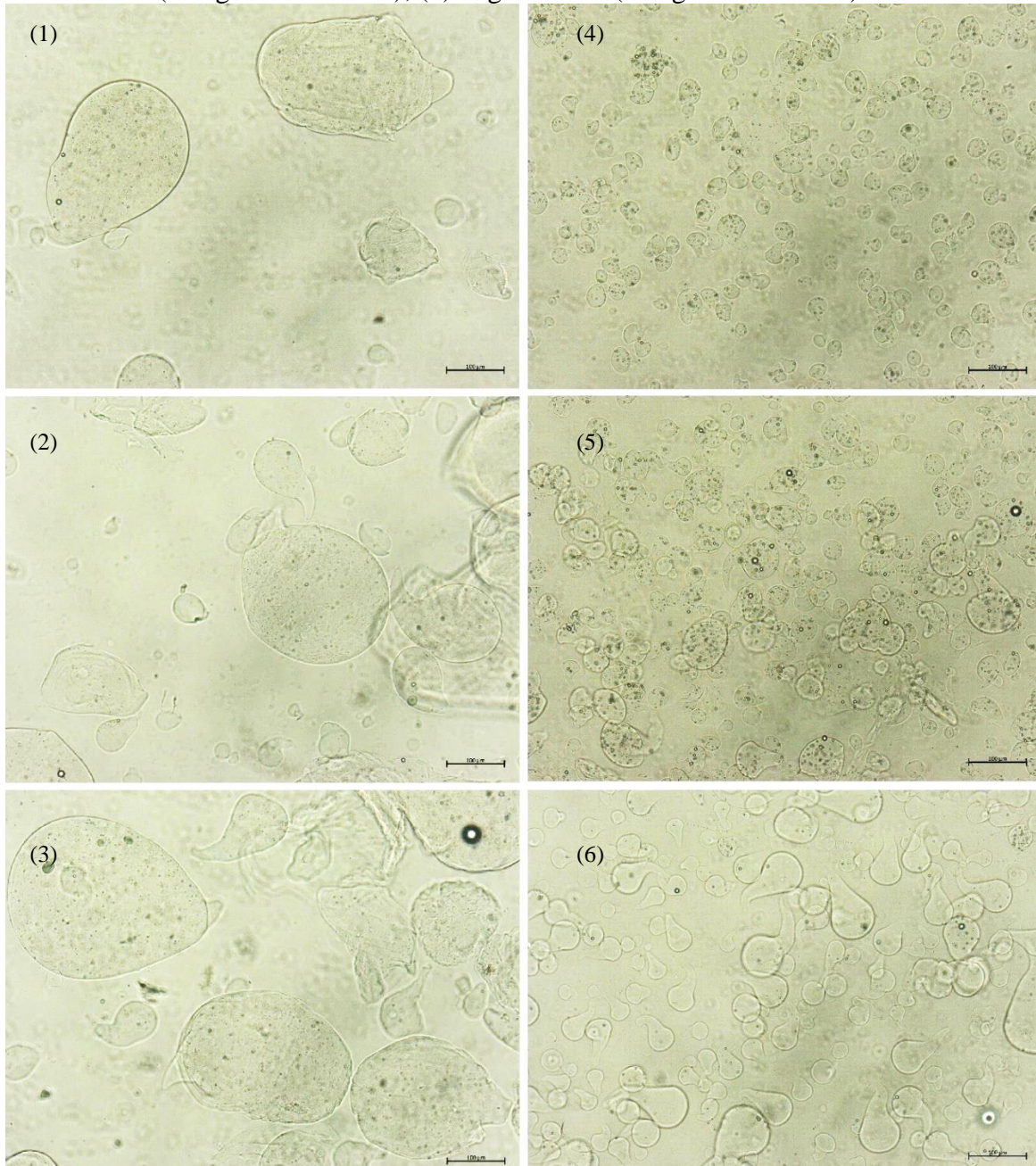
### 3.2.4 Morfologia

Para avaliar a forma das microesferas produzidas para cada tratamento foi realizada avaliação microscópica que estão apresentadas na Figura 7. De maneira geral, as microesferas produzidas tanto por gotejamento via ar pressurizado quanto via energia ultrassônica apresentaram forma irregular. Porém, todos tratamentos em que utilizou-se ar pressurizado as microesferas apresentaram forma semelhante a uma esfera com superfície lisa. Assim como para os tratamentos controle (alginato) e alginato-inulina (IN) atomizados por energia ultrassônica, exceto para o tratamento em que adicionou-se a goma de cajueiro (GC) ao alginato, no qual foram obtidas microesferas abertas em forma de “gota/pingente”.

A abertura observada nas microesferas do sistema alginato-goma de cajueiro pode explicar a sua menor eficiência de encapsulação (94,19%) em relação ao sistema alginato-inulina que apresentou a maior EE% (97,72%) quando utilizada a energia ultrassônica para a atomização das emulsões. Isso porque a abertura pode permitir uma maior liberação do composto bioativo disperso na matriz.

A obtenção de microesferas de forma irregular ocorre porque a reação de reticulação do alginato é muito rápida, as quais tomam forma imediatamente depois do impacto entre a gota de alginato e o banho de gelificação ( $\text{CaCl}_2$ ). Com isso, devido ao impacto, a gota esférica deforma assumindo uma forma irregular, e se a reticulação for rápida o suficiente a microesfera mantém a forma de pingente uma vez solidificada (BARBA *et al.*, 2009).

Figura 7 – Microscopia óptica das microesferas produzidas: (1) Alginato-controle (ar pressurizado); (2) Alginato IN (ar pressurizado); (3) Alginato GC (ar pressurizado); (4) Alginato-controle (energia ultrassônica); (5) Alginato IN (energia ultrassônica); (6) Alginato GC (energia ultrassônica).



Fonte: Da autora (2021).

### 3.2.5 Distribuição de tamanho

As microesferas foram caracterizadas segundo o tamanho das partículas através da técnica de espalhamento de luz utilizando a água como fase contínua. O diâmetro médio das microesferas foi expresso como diâmetro médio de Sauter ( $D_{32}$ ), como apresentado na Tabela

5. Utilizando ar pressurizado para atomização, o diâmetro de Sauter variou entre 70 e 80  $\mu\text{m}$ . Quando utilizada a energia ultrassônica para atomização e produção das microesferas, essas apresentaram  $D_{(32)}$  entre 59 e 60  $\mu\text{m}$ . As microesferas de alginato foram consideradas homogêneas baseado nos baixos valores de *span* (índice de polidispersividade), entre 1,30 e 1,60, ou seja, os processos de atomização produzem microesferas sem muita variação de tamanho.

Tabela 5 – Valores dos diâmetros médio de Sauter ( $D_{32}$ ) e *span* das microesferas de alginato para cada forma de produção.

Tratamentos	Ar pressurizado		Energia ultrassônica	
	$D_{(32)}$ ( $\mu\text{m}$ )	<i>Span</i>	$D_{(32)}$ ( $\mu\text{m}$ )	<i>Span</i>
Alginato (controle)	$87,33 \pm 0,02^a$	$1,38 \pm 0,01^a$	$59,39 \pm 0,00^a$	$1,64 \pm 0,01^b$
Alginato IN	$71,93 \pm 0,01^b$	$1,39 \pm 0,00^a$	$51,25 \pm 0,01^b$	$1,31 \pm 0,00^a$
Alginato GC	$86,86 \pm 0,01^a$	$1,36 \pm 0,01^a$	$63,02 \pm 0,02^a$	$1,57 \pm 0,01^b$

IN: inulina; GC: goma de cajueiro. Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

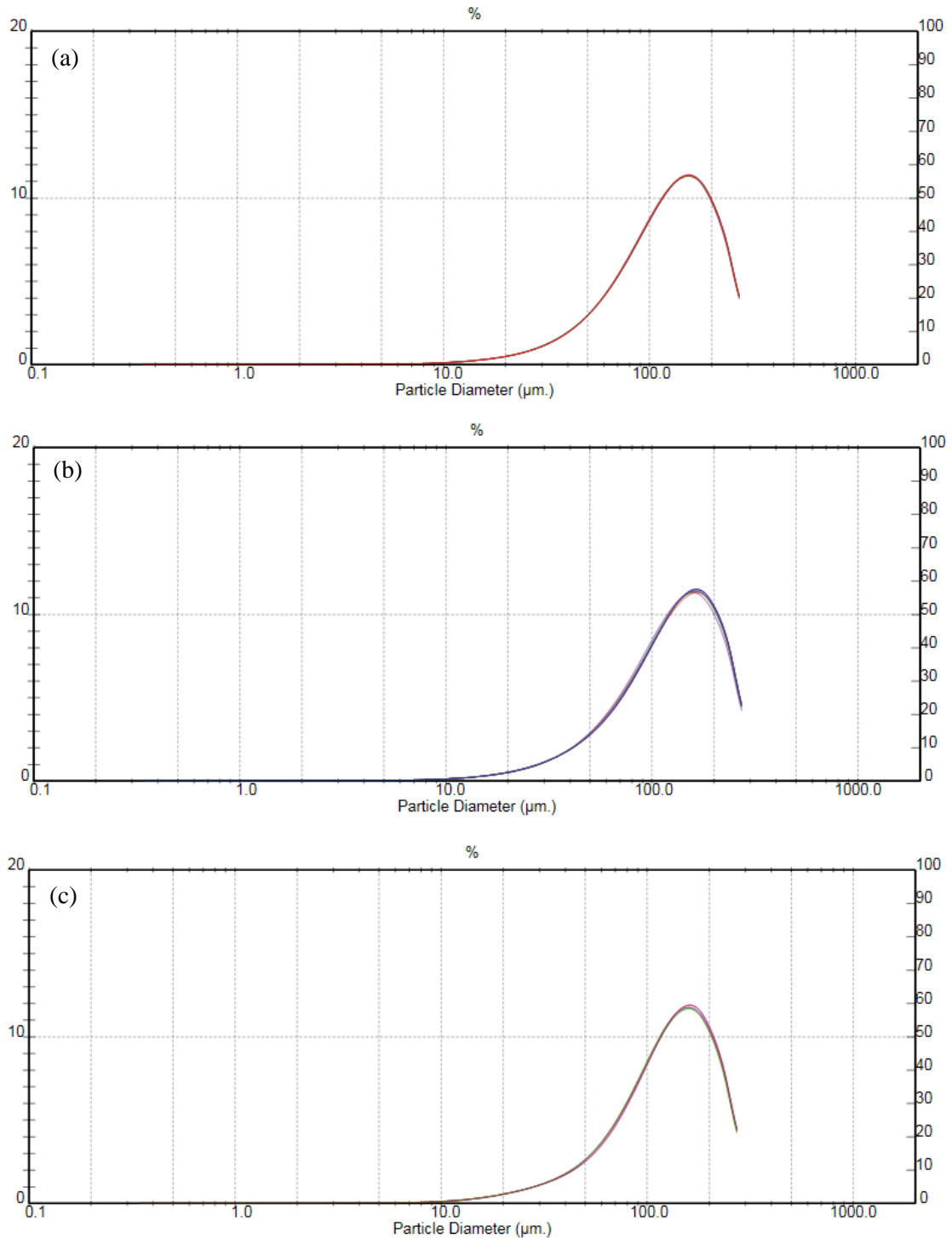
Fonte: Da autora (2021).

Aguilar *et al.* (2015), também produziram microesferas de alginato através de bico duplo fluido, utilizando ar pressurizado para atomização da emulsão, com uma pressão do ar de  $0,125 \text{ kgf/cm}^2$  (0,123 bar) e vazão de 555 mL/h (0,00925 L/min) e obtiveram microesferas de alginato medindo entre  $259 \pm 22$  e  $287 \pm 10 \mu\text{m}$ . A obtenção de microesferas menores pode ser explicada pela maior pressão de ar utilizada 6 bar e vazão de ar também mais alta (15 L/min), isso porque no processo de gelificação iônica o tamanho das partículas é influenciado por fatores envolvidos no processo, como vazão e pressão do ar, distância entre o bico e a solução gelificante e outros (YANG *et al.*, 2015).

Na Figura 8 podemos observar o gráfico de distribuição de tamanho das microesferas produzidas através da atomização por ar pressurizado, as curvas confirmam a homogeneidade no tamanho das microesferas de alginato.



Figura 8 – Curvas de distribuição de tamanho das microesferas atomizadas através de ar pressurizado: (a) Alginato – controle; (b) Alginato IN; (c) Alginato GC.



Fonte: Da autora (2021).

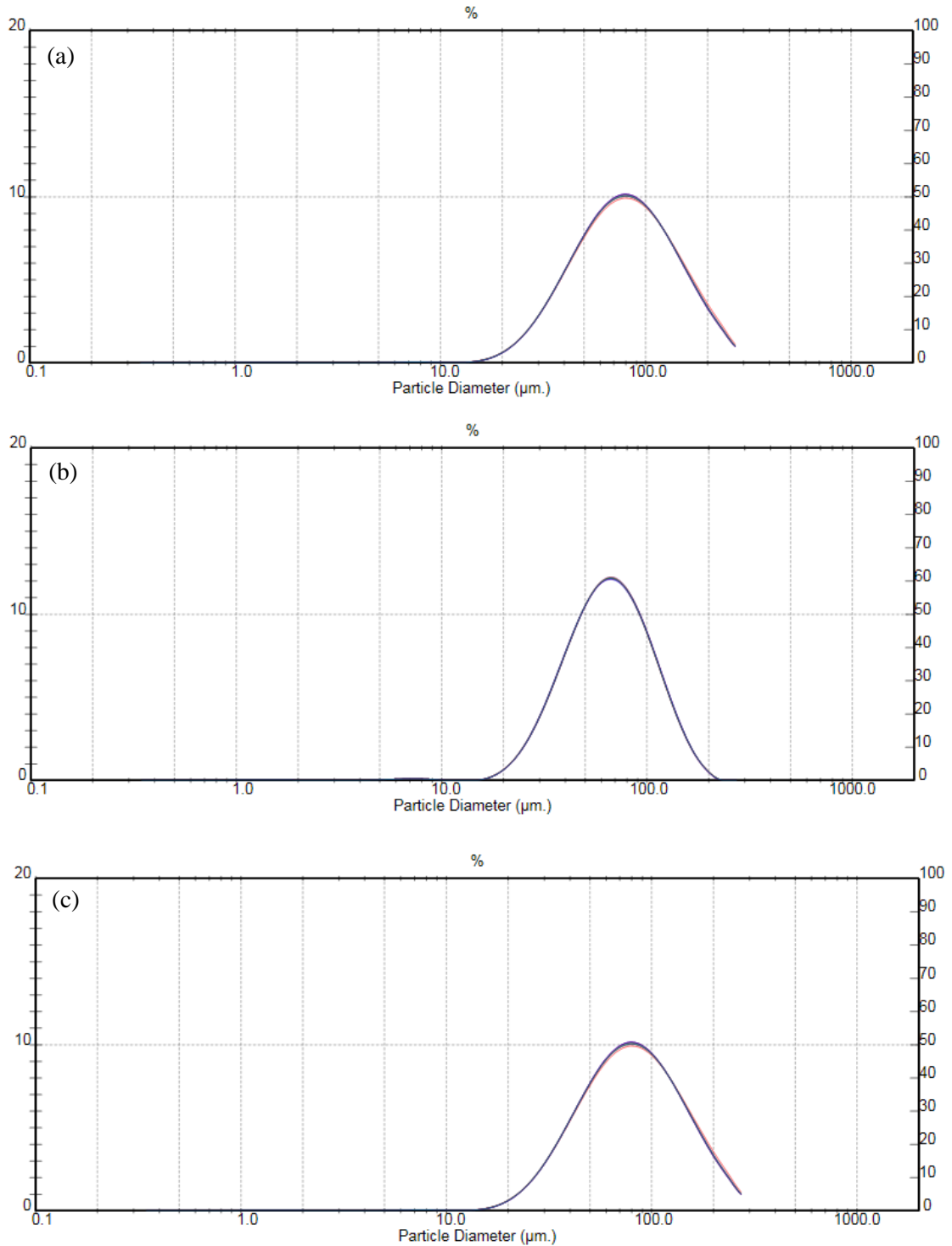
No estudo realizado por Ramisetty, Pandit e Gogate (2013) sobre a influência do ultrassom na atomização de fluidos, os autores notaram que quando há um aumento da frequência há uma diminuição no tamanho das gotas. Quando utilizada a frequência de 40

kHz com vazão de fluido a  $10^{-7}$  m<sup>3</sup>/seg (60 mL/min), obtiveram partículas medindo entre 120 e 160  $\mu$ m. E ao utilizarem a frequência de 20 kHz obtiveram partículas de quase 200  $\mu$ m (RAMISETTY; PANDIT; GOGATE, 2013). Esses resultados estão de acordo com o que foi encontrado, já que as microesferas de alginato produzidas utilizando uma frequência de 40 kHz apresentaram tamanho de aproximadamente 60  $\mu$ m. A produção de microesferas menores pode estar relacionada à vazão de alimentação da emulsão que foi de apenas 0,80 mL/min. Na Figura 9 podemos observar o gráfico de distribuição de tamanho das microesferas produzidas através da atomização por energia ultrassônica.

Quando há um aumento da frequência ultrassônica, o líquido atomizado é exposto a um maior número de fases de compressão no ciclo, resultando na redução da taxa de crescimento do pico da onda, o que corresponde à diminuição do tamanho da gota. Além disso, como a frequência aumenta há também uma diminuição na área superficial de atomização disponível para a formação das gotas (DEEPU; PENG; MOGHADDAM, 2018; RAMISETTY; PANDIT; GOGATE, 2013).

De uma forma geral as microesferas produzidas por meio de gotejamento utilizando-se energia ultrassônica apresentaram diâmetros menores quando comparado ao uso do ar comprimido e também aos vários estudos reportados em literatura. A utilização de algum tipo de energia ou força externa para atomização (ou gotejamento) da emulsão/solução e, conseqüente, formação de gotas produz microesferas com diâmetros menores, quando comparadas com microesferas por gotejamento simples (gravidade), nesse processo as microesferas geralmente apresentam tamanho maior que 1000  $\mu$ m (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013). A aplicação do ar pressurizado (força externa) e a vazão em que esse ar é aplicado na solução tem efeito direto no diâmetro da microesfera formada, quanto maior a taxa de ar pressurizado, menor diâmetro médio de Sauter ( $\mu$ m) as microesferas apresentam. Essa relação pode ser observada no estudo de Chan *et al.* (2012), em que ao utilizarem uma vazão de ar de 0,72 m<sup>3</sup>/seg produziram microesferas de 3000  $\mu$ m e quando essa vazão foi aumentada para 18,0 m<sup>3</sup>/seg conseguiram produzir microesferas de 500  $\mu$ m. A mesma relação pode ser observada ao aumentar a frequência ultrassônica durante o gotejamento, além disso, na atomização ultrassônica a velocidade de produção das gotas é de até 10% maior do que com um bico de ar pressurizado (DALMORO *et al.*, 2012). Desta forma, percebe-se um novo potencial de aplicação destas microesferas, visto que tamanhos reduzidos permitem diferentes formas de aplicações, especialmente em matrizes alimentícias, evitando-se desta forma alterações sensoriais significativas no produto.

Figura 9 – Curvas de distribuição de tamanho das microesferas atomizadas através de energia ultrassônica: (a) Alginato – controle; (b) Alginato IN; (c) Alginato GC.



Fonte: Da autora (2021).

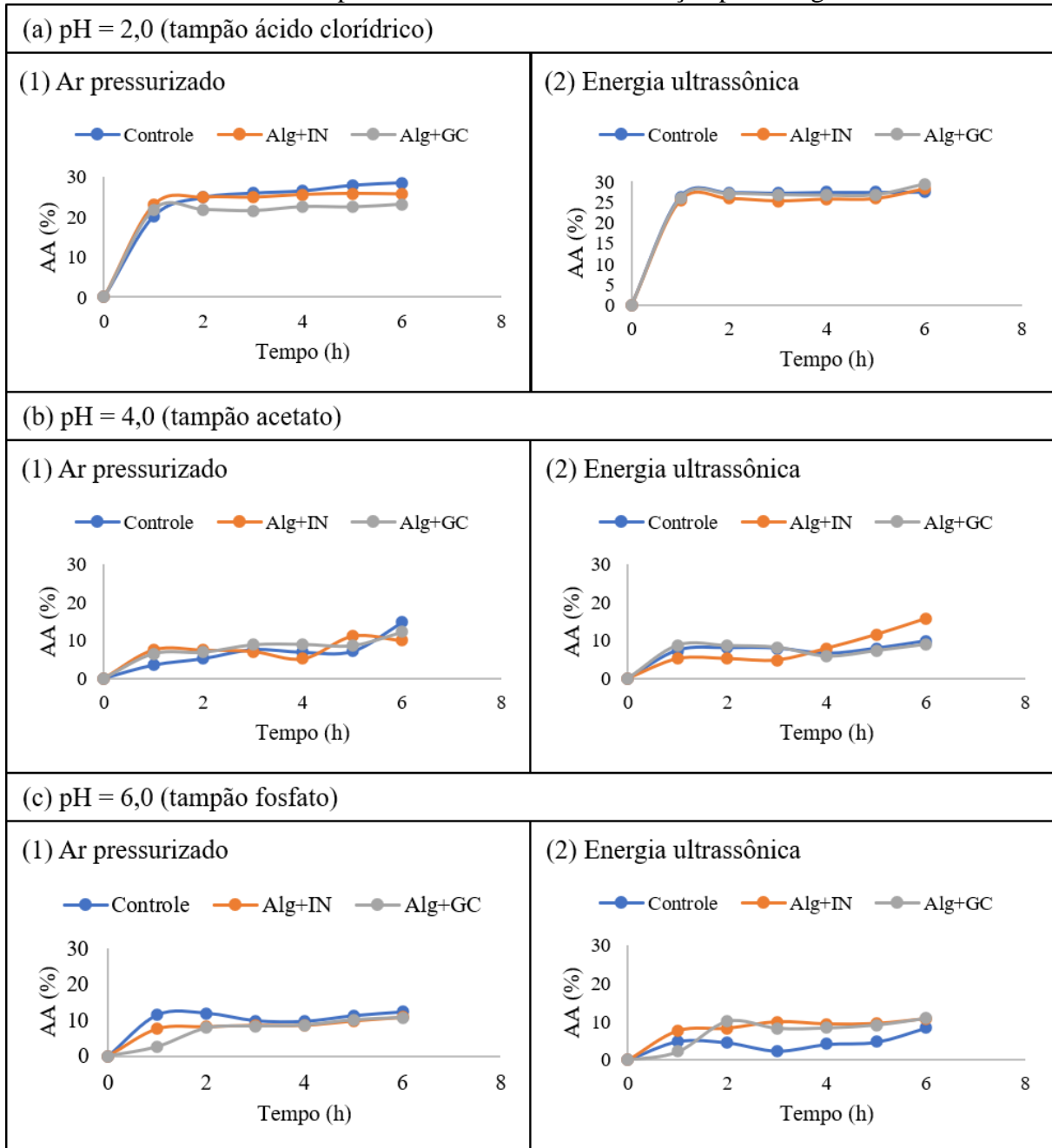
### 3.2.6 Perfil de liberação e atividade antioxidante

Para avaliar o comportamento de aprisionamento e proteção do  $\alpha$ -tocoferol encapsulado nas microesferas produzidas, foi feito o perfil de liberação do composto bioativo, analisado indiretamente através da determinação da atividade antioxidante (AA%) do meio contendo as microesferas.

Ao longo do tempo analisado, para o pH = 2,0o meio contendo as microesferas apresentaram AA% que variaram de aproximadamente 23 a 29%, as quais referem-se, respectivamente, ao tratamento utilizando alginato e goma de cajueiro atomizado por ar pressurizado (23,13%) e a mesma formulação produzida por energia ultrassônica (29,33%). Em pH = 4,0, após as 6 horas, essa atividade antioxidante ficou entre 9 e 15%, o meio contendo as microesferas produzidas a partir de energia ultrassônica utilizando alginato e goma de cajueiro apresentou AA% igual a 9,02% e pela mesma técnica utilizando alginato e inulina apresentou AA% de 15,80%. Nas soluções de pH = 6,0, a AA% dos meios com as microesferas ficou entre 8 e 12%, sendo 8,41% para o tratamento em que utilizou-se somente o alginato (controle) atomizadas por energia ultrassônica e 12,23% também para o controle porém produzidas através de ar pressurizado.

Os perfis de liberação das microesferas de  $\alpha$ -tocoferol para cada pH (2,0, 4,0 e 6,0) no tempo de 6 horas a partir da AA% dos meios que as continham estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – (a) Perfil de liberação do  $\alpha$ -tocoferol em pH = 2,0 (tampão ácido clorídrico) – (1) Microesferas produzidas através de atomização por ar pressurizado; (2) Microesferas produzidas através de atomização por energia ultrassônica. (b) Perfil de liberação do  $\alpha$ -tocoferol em pH = 4,0 (tampão acetato) – (3) Microesferas produzidas através de atomização por ar pressurizado; (4) Microesferas produzidas através de atomização por energia ultrassônica. (c) Perfil de liberação do  $\alpha$ -tocoferol em pH = 6,0 (tampão fosfato) – (5) Microesferas produzidas através de atomização por ar pressurizado; (6) Microesferas produzidas através de atomização por energia ultrassônica.



Fonte: Da autora (2021).

Em pH = 2,0 observa-se que todos os tratamentos apresentaram uma maior atividade antioxidante ao final das 6 horas em relação às microesferas submetidas à pH = 4,0 e pH =

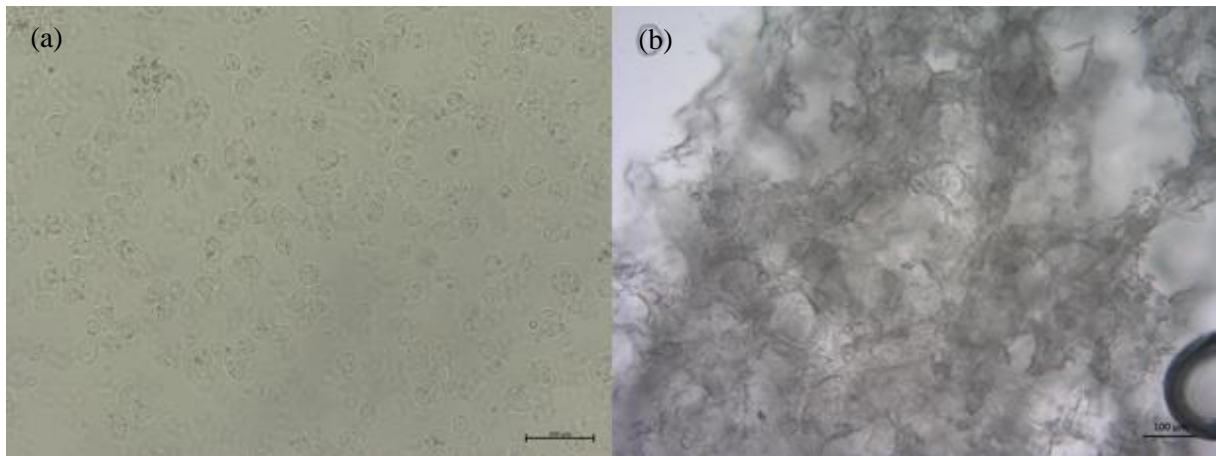
6,0, tanto para atomização por ar pressurizado quanto por energia ultrassônica, o que significa que houve uma maior liberação de  $\alpha$ -tocoferol pelas microesferas nesse pH. Entre os tratamentos que foram produzidas microesferas através de ar pressurizado, observa-se que a utilização da inulina (IN) e da goma de cajueiro (GC) como material complementar aumentou a capacidade de aprisionamento das microesferas, pois o meio contendo essas apresentaram menor AA% ao final das 6 horas. Dentre as microesferas atomizadas por energia ultrassônica, em pH = 2,0 e pH = 6,0 o tratamento em que utilizou-se alginato e goma de cajueiro apresentou menor capacidade de aprisionamento, devido à sua maior AA% ao final do tempo de liberação (6 horas).

Nas soluções de pH = 4,0 e pH = 6,0, todos os meios com as microesferas produzidas apresentaram AA% de no máximo 15% após o tempo de liberação de 6 horas, o que permite inferir que a forma de gotejamento não implica na capacidade de liberação das microesferas. Belščak-Cvitanović *et al.* (2016) explicam que a liberação de 10% do composto é atribuída à liberação do composto que está adsorvido na superfície, com isso, conclui-se que as microesferas se mantiveram estáveis e não foram rompidas liberando o  $\alpha$ -tocoferol encapsulado ao longo do tempo de análise.

A maior liberação de  $\alpha$ -TOC em pH = 2,0 pode estar associada ao poder de inchamento das microesferas, ou seja, quando submetidas ao tampão ácido clorídrico há uma expansão da estrutura de gel do alginato, aumentando a taxa de liberação e difusão do composto (HARIYADI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2019). Além disso, em condições de baixo pH, partículas de alginato reticuladas com cálcio podem sofrer degradação da molécula de alginato e subsequente redução do seu peso molecular, devido à hidrólise catalisada por prótons, causando liberação mais rápida do composto ativo encapsulado (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2016).

Foi realizada a microscopia óptica das microesferas para observar a mudança na morfologia das microesferas quando submetidas ao meio simulante ácido (pH = 2,0) pode ser observada na Figura 11, na qual é possível observar as microesferas controle (alginato) após a atomização por energia ultrassônica antes da exposição ao meio e aquelas que sofreram expansão da sua estrutura após o tempo de análise de liberação.

Figura 11 – (a) Imagem das microesferas de alginato inicialmente; (b) Imagem das microesferas de alginato após exposição a ambiente ácido (pH = 2,0) por 6 horas.



Fonte: Da autora (2021).

A combinação de alginato e outros biopolímeros, como a inulina e a goma de cajueiro, pode causar um retardo na liberação do  $\alpha$ -tocoferol, isso porque esses materiais podem fazer ligações específicas com o alginato protegendo-o da degradação e tornando-o mais estável, além de promover redução no inchamento das microesferas de alginato, a depender das características químicas dos materiais complementares utilizados. A inulina e a goma de cajueiro podem causar um aumento da densidade da rede de gel das microesferas de alginato limitando a penetração de água e diminuindo a difusão do  $\alpha$ -TOC (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019).

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram de maneira geral que os biopolímeros isolado proteico de soro, maltodextrina, inulina, goma arábica e goma de cajueiro produzem emulsões com viscosidade adequada para a microencapsulação do  $\alpha$ -tocoferol por gelificação iônica utilizando o bico atomizador por ar pressurizado ou por energia ultrassônica. Dentre os biopolímeros utilizados, as formulações utilizando a inulina e a goma de cajueiro apresentaram satisfatória distribuição no tamanho de gotas. A inulina apresenta potencial função prebiótica e a goma de cajueiro é um material de encapsulação emergente e não convencional, que merece atenção. Em relação à eficiência de encapsulação, notou-se uma maior concentração de  $\alpha$ -tocoferol nas microesferas produzidas através da atomização ultrassônica. Os diferentes métodos utilizados interferiram significativamente no tamanho das microesferas produzidas. As microesferas produzidas com auxílio de ar pressurizado apresentaram tamanhos maiores do que aquelas produzidas por energia ultrassônica. Em relação ao perfil de liberação, não houve diferença significativa quanto à capacidade de aprisionamento das microesferas produzidas pelos diferentes métodos, quando submetidas a soluções com diferentes pHs. Porém, foi possível observar que em alguns casos a adição do material complementar ao alginato foi essencial para o aumento da estabilidade do  $\alpha$ -tocoferol apresentando uma maior atividade antioxidante ao final do tempo de liberação.

Portanto, pode-se inferir que os sistemas de liberação controlada baseados em alginato-inulina ou alginato-goma de cajueiro mostram-se eficazes para a encapsulação do  $\alpha$ -tocoferol, pois apresentam características que permitem a utilização dessas microesferas em matrizes alimentícias com potencial atividade funcional, já que mostraram ter boa compatibilidade, estabilidade e eficiência.

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Brasil (FAPEMIG) – Processo N.: CAG-APQ-02487-16. Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Agradecem ao Laboratório de Refrigeração de Alimentos, Universidade Federal de Lavras - Brasil, à Central de Análises e Prospecção Química (CAPQ), Universidade Federal de Lavras – Brasil e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) Universidade Federal de Lavras – Brasil.



## REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. M. S. *et al.* Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 89, n. 4, p. 1277–1282, Aug. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712003888>. Acesso em: 15 out. 2018.
- AGUILAR, K. C. *et al.* Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 154, p. 17–24, June 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877414005494>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- AHMAD, M.; RAI, S. M.; MAHMOOD, A. Hydrogel microparticles as an emerging tool in pharmaceutical field: A review. **Advances in Polymer Technology**, [Hoboken], v. 35, n. 2, p. 11–13, Apr. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adv.21535>. Acesso em: 22 dez. 2018.
- BARBA, A. A. *et al.* Intensification of biopolymeric microparticles production by ultrasonic assisted atomization. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [Lausanne], v. 48, n. 10, p. 1475–1481, Oct. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0255270109001524>. Acesso em: 15 jan. 2019.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. *et al.* Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and  $\beta$ -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 57, p. 139–152, June 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X16300200>. Acesso em: 18 mar. 2019.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. *et al.* Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 167, p. 378–386, Jan. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25149001/>. Acesso em: 13 fev. 2019.
- BOTREL, D. A. *et al.* Application of cashew tree gum on the production and stability of spray-dried fish oil. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 221, p. 1522–1529, Oct. 2016. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/27979124>. Acesso em: 15 abr. 2019.
- CAMPELO, P. H. *et al.* Effect of dextrose equivalent on physical and chemical properties of lime essential oil microparticles. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 102, p. 105–114, Aug. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669017301784>. Acesso em: 13 maio 2019.

CHAN, E.-S. *et al.* The effect of low air-to-liquid mass flow rate ratios on the size, size distribution and shape of calcium alginate particles produced using the atomization method. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 108, n. 2, p. 297–303, Jan. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877411004365>. Acesso em: 17 jun. 2019.

COMBS, G. F. **The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health**. 3rd ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2008. 583 p.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 61, p. 442–457, Dec. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X16302521>. Acesso em: 15 out. 2018.

CUJIC, N. *et al.* Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 86, p. 120–131, Aug. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016301911>. Acesso em: 22 nov. 2018.

DALMORO, A. *et al.* Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [Amsterdam], v. 80, n. 3, p. 471–477, Apr. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641112000070>. Acesso em: 11 dez. 2018.

DEEPU, P.; PENG, C.; MOGHADDAM, S. Dynamics of ultrasonic atomization of droplets. **Experimental Thermal and Fluid Science**, [New York], v. 92, p. 243–247, Apr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0894177717303746>. Acesso em: 13 mar. 2019.

DE OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. de. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [Amsterdam], v. 113, p. 146–151, Jan. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776513005559>. Acesso em: 22 jan. 2019.

DE SOUZA, V. B. *et al.* Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 77, p. 297–306, Apr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X17308706>. Acesso em: 15 fev. 2019.

DIAS, D. R. *et al.* Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, [Netherlands], v. 13, p. 31–37, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221479931730019X>. Acesso em: 17 abr. 2019.

EISINAITE, V. *et al.* Tailoring W/O/W emulsion composition for effective encapsulation: The role of PGPR in water transfer-induced swelling. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 106, p. 722–728, Apr. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29579980/>. Acesso em: 22 jun. 2019.

FENG, W. *et al.* Preparation and characterization of emulsion-filled gel beads for the encapsulation and protection of resveratrol and  $\alpha$ -tocopherol. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 108, p. 161–171, June 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918302114>. Acesso em: 13 jul. 2019.

FERNANDES, R. V. de B. *et al.* Cashew gum and inulin: New alternative for ginger essential oil microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 153, p. 133–142, Nov. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27561480/>. Acesso em: 19 out. 2018.

GHARIBZAHEDI, S. M. T. *et al.* Optimization and characterization of walnut beverage emulsions in relation to their composition and structure. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Amsterdam], v. 50, n. 2, p. 376–384, Mar. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813011004697>. Acesso em: 22 nov. 2018.

GIMENEZ-ROTA, C. *et al.*  $\beta$ -Carotene,  $\alpha$ -tocoferol and rosmarinic acid encapsulated within PLA/PLGA microcarriers by supercritical emulsion extraction: Encapsulation efficiency, drugs shelf-life and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, [Amsterdam], v. 146, p. 199–207, Apr. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896844618308313>. Acesso em: 15 fev. 2019.

GIMENO, E. *et al.* Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [Amsterdam], v. 881, n. 1-2, p. 251–254, June 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967300002193>. Acesso em: 19 dez. 2018.

HARIYADI, D. M. *et al.* Diffusion loading and drug delivery characteristics of alginate gel microparticles produced by a novel impinging aerosols method. **Journal of Drug Targeting**, [Abingdon], v. 18, n. 10, p. 831–841, Dec. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20958098/>. Acesso em: 17 jan. 2019.

LEE, B.-B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E. S. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. **Chemical Engineering and Technology**, [Birmingham], v. 36, n. 10, p. 1627–1642, Sept. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ceat.201300230>. Acesso em: 19 dez. 2018.

LIM, Y.-H.; SIOW, L.-F. Spray dried xanthone in oil emulsion using inulin as wall material. **Journal of Food Processing and Preservation**, [Malden], v. 41, n. 4, p. 1–10, June 2016. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.13038>. Acesso em: 13 jan. 2019.

LUO, Y. *et al.* Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [Amsterdam], v. 85, n. 2, p. 145–152, July 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776511000981>. Acesso em: 14 fev. 2019.

OPPERMANN, A. K. L. *et al.* Effect of outer water phase composition on oil droplet size and yield of ( $w_1/o/w_2$ ) double emulsions. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 107, p. 148–157, May 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918301157>. Acesso em: 17 mar. 2019.

PAULA, H. C. B. *et al.* Alginate/cashew gum floating bead as a matrix for larvicide release. **Materials Science and Engineering C**, [Amsterdam], v. 32, n. 6, p. 1421–1427, Aug. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928493112001403>. Acesso em: 15 fev. 2019.

PEREIRA, G. G. *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol acetate-loaded chitosan microparticles: Stability during spray drying process, photostability and swelling evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [Paris], v. 30, p. 220–224, Dec. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1773224715300472>. Acesso em: 19 mar. 2019.

PRASANNA, P. H. P.; CHARALAMPOPOULOS, D. Encapsulation in an alginate–goats' milk–inulin matrix improves survival of probiotic *Bifidobacterium* in simulated gastrointestinal conditions and goats' milk yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, [Malden], v. 72, n. 1, p. 132–141, Feb. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1471-0307.12568>. Acesso em: 19 mar. 2019.

RAMISETTY, K. A.; PANDIT, A. B.; GOGATE, P. R. Investigations into ultrasound induced atomization. **Ultrasonics Sonochemistry**, [Amsterdam], v. 20, n. 1, p. 254–264, Jan. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417712000909>. Acesso em: 15 maio 2019.

RAMOS, P. E. *et al.* Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 77, p. 8–16, Apr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X17303703>. Acesso em: 19 jun. 2019.

STRATULAT, I. *et al.* Enrichment of cheese with bioactive lipophilic compounds. **Journal of Functional Foods**, [Netherlands], v. 6, p. 48–59, Jan. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464613002910>. Acesso em: 22 jul. 2019.

TSAI, F.-H.; KITAMURA, Y.; KOKAWA, M. Effect of gum arabic-modified alginate on physicochemical properties, release kinetics, and storage stability of liquid-core hydrogel beads. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 174, p. 1069–1077, Oct. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28821029/>. Acesso em: 29 jul. 2019.

VAKARELOVA, M. *et al.* Production of stable food-grade microencapsulated astaxanthin by vibrating nozzle technology. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 221, p. 289–295, Apr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27979204/>. Acesso em: 15 jan. 2019.

WANG, H. *et al.* Characterization, release, and antioxidant activity of curcumin-loaded sodium alginate/ZnO hydrogel beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Amsterdam], v. 121, p. 1118–1125, Jan. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014181301833664X>. Acesso em: 12 fev. 2019.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Gum arabic. **Handbook of Hydrocolloids**. 2nd ed. United Kingdom: Woodhead Publishing, 2009. 948 p.

YANG, J. *et al.* Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 123, p. 53–66, June 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861715000533>. Acesso em: 22 out. 2018.

YOO, S.-H. *et al.* Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Amsterdam], v. 38, n. 1, p. 25–30, Feb. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813005002722?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2018.

## ARTIGO 2 – ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DE $\alpha$ -TOCOFEROL MICROENCAPSULADO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA ASSISTIDO POR ATOMIZAÇÃO ULTRASSÔNICA

Norma NBR 6022 (ABNT, 2018).

### RESUMO

O  $\alpha$ -tocoferol é um composto funcional com atividade antioxidante que atua reduzindo radicais livres. Para seu uso direto ou incorporação em matrizes alimentícias é necessária sua encapsulação e essa pode ser feita através da gelificação iônica. Para produção de microesferas mais eficientes e de tamanho adequado utilizou-se a atomização por energia ultrassônica. As microesferas foram analisadas e caracterizadas pela eficiência de encapsulação, morfologia, estabilidade e bioacessibilidade, através da digestibilidade *in vitro*. Com os resultados obtidos, percebeu-se que houve um aumento na eficiência de encapsulação quando adicionada a inulina ou a goma de cajueiro em relação ao alginato puro, de 76,31% para 80,83 e 78,68%, respectivamente. Quando mantidas a temperaturas mais altas por 30 dias os materiais complementares também contribuíram para uma maior estabilidade do ativo nas microesferas. Na temperatura de 40 °C as microesferas de alginato e inulina apresentaram a maior atividade antioxidante (11,85%) ao final do período estudado. Ao analisar a bioacessibilidade do  $\alpha$ -tocoferol, verificou-se que a presença de inulina resultou em uma maior bioacessibilidade (58,60%), em comparação às microesferas produzidas utilizando somente o alginato (16,22%). Com isso, podemos concluir que é possível desenvolver um sistema de liberação controlada eficiente e estável utilizando o alginato e biopolímeros complementares compatíveis através da atomização por energia ultrassônica, e que estes promovem melhorias nas propriedades das microesferas permitindo a incorporação dessas em diferentes matrizes alimentícias.

**Palavras-chave:** Alginato. Inulina. Goma de cajueiro. Digestibilidade *in vitro*.

## 1 INTRODUÇÃO

O  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOC) pertence à família da vitamina E, que é a principal antioxidante lipossolúvel da dieta, atuando em funções importantes no corpo. Essa atividade antioxidante envolve a redução de radicais livres, protegendo contra reações potencialmente deletérias dessas espécies oxidantes altamente reativas. O consumo dessa vitamina está relacionado à redução do risco de diversas doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares (COMBS, 2008; LUO *et al.*, 2011).

A incorporação do  $\alpha$ -TOC em matrizes alimentícias através de sua microencapsulação pode fornecer produtos com características funcionais e suprir uma demanda crescente do consumidor. Apesar dos conhecidos efeitos benéficos à saúde desse composto bioativo, ele apresenta certa fragilidade que deve ser considerada no seu uso direto ou na incorporação de alimentos. Esses produtos são instáveis à presença de luz, oxigênio e íons, além de serem sensíveis à mudanças de pH e temperatura (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; STRATULAT *et al.*, 2014).

Além disso, a microencapsulação  $\alpha$ -TOC pode permitir uma bioacessibilidade mais eficiente do composto no organismo, isso porque é conhecido que o  $\alpha$ -TOC é mais absorvível no intestino humano e, portanto, é interessante que o composto não sofra hidrólise enzimática (desesterificação) no início do processo de digestão e chegue preservado ao intestino (SOMCHUE *et al.*, 2009).

O método de gelificação iônica é caracterizado por condições brandas que afetam minimamente a integridade da maioria dos compostos bioativos. Essa técnica é baseada na interação eletrostática de um polímero carregado e um íon multivalente (DIAS *et al.*, 2017; VAKARELOVA *et al.*, 2017). Para aplicação das microesferas com compostos bioativos produzidas pela técnica de gelificação iônica, quanto menor forem essas partículas, melhor poderá ser sua aplicação tecnológica pois melhora suas propriedades como dispersibilidade, homogeneidade, estabilidade e eficiência de encapsulação, além de permitir uma maior possibilidade de aplicações sem comprometimento de aspectos sensoriais do produto. Por isso, uma alternativa utilizada para produção de partículas menores é a aplicação de bicos de atomização por energia ultrassônica. Nesta técnica, além de produzir partículas menores, existe a vantagem de ser um processo com menor energia requerida, quando comparada à métodos que utilizam força externa para a formação de gotas, pois utiliza o fenômeno de cavitação para quebrar o líquido, que ocorre em energia de alta intensidade e frequência, e é gerado pela onda de ultrassom (AVVARU *et al.*, 2006; DALMORO *et al.*, 2012).

O alginato de sódio, apesar de ser amplamente utilizado no método de gelificação iônica para a microencapsulação de diversos compostos bioativos, suas propriedades reológicas fazem com que tenha baixa capacidade de barreira, ou seja, apresenta alta viscosidade em baixas concentrações. Para reduzir essa porosidade e melhorar a eficiência do efeito de barreira, o alginato tem sido combinado a outros materiais biopoliméricos, que aumentam a densidade da matriz polimérica encapsulante e melhoram as propriedades mecânicas do gel e reduzem a permeabilidade, aumentando sua estabilidade (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de microesferas contendo compostos bioativos, como por exemplo o  $\alpha$ -tocoferol, que apresentem boa estabilidade e bioacessibilidade é necessário para que seja possível a sua aplicação em matrizes alimentícias e também para que o composto bioativo chegue em concentrações adequadas e de forma íntegra ao local de interesse no organismo. Fazendo com que esteja mais acessível para a absorção no organismo, agindo portanto como um composto funcional (FREDES *et al.*, 2018).

Existem diversos materiais poliméricos na natureza que são compatíveis ao alginato, dois deles são a inulina e a goma de cajueiro. A inulina é considerado um composto prebiótico comumente utilizado com conhecida propriedade funcional (ROBERFROID, 2007). Além disso, melhora a eficiência de encapsulação e também pode aumentar a estabilidade das microesferas em diferentes matrizes alimentícias e no sistema digestivo (PRASANNA; CHARALAMPOPOULOS, 2019). A goma de cajueiro é um biopolímero emergente extraído da casca da árvore do cajueiro (*Anacardium occidentale*), muito comum em território brasileiro e que pode ser uma alternativa de menor custo à goma arábica, por exemplo. Além disso, apresenta boas características tecnológicas como formação de filme, baixa viscosidade e capacidade emulsificante (AZEREDO *et al.*, 2012; COMUNIAN *et al.*, 2016).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da adição de inulina e goma de cajueiro na formação de microesferas de alginato contendo  $\alpha$ -tocoferol, por meio de gotejamento assistido por bico ultrassônico. Foram avaliadas as características de eficiência de encapsulação, estabilidade e bioacessibilidade das microesferas produzidas.



## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Para a formação das microesferas foi utilizado o alginato de sódio (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), a inulina (IN) Orafti GR (Beneo, Oreye, Bélgica) e a goma de cajueiro (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil) como materiais complementares e sal catiônico cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). O composto bioativo lipofílico encapsulado foi o  $\alpha$ -tocoferol (96,5% de pureza) (DSM Nutritional Products, Venlo, Holanda).

### **2.2 Métodos**

#### **2.1 Preparo das emulsões**

Para o preparo das emulsões, inicialmente o alginato de sódio foi hidratado em água destilada por aproximadamente 12 horas à temperatura ambiente, para o preparo de uma solução com concentração de 1,75% (m/v). Após a etapa de hidratação, foi adicionada à solução 0,50% (m/v) de inulina (IN) ou 0,50% (m/v) de goma de cajueiro (GC), 0,1% (m/v) de emulsificante Tween 20 (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) e 1,0% (m/v) do  $\alpha$ -tocoferol. Preparadas as soluções com as formulações pré-determinadas, essas foram agitadas em homogeneizador (Ultra-Turrax IKA T18 basic, Wilmington, EUA) por 10 minutos a 2500 rpm. Uma segunda homogeneização foi feita em ultrassom (Digital Sonifier, Branson Ultrasonic Corporation) pelo tempo de 2 minutos com 360 W de potência.

#### **2.2 Produção das microesferas**

##### **2.2.1 Atomização por energia ultrassônica**

As emulsões foram atomizadas em equipamento de bico ultrassônico (Vibra-Cell modelo VCX 130, Sonics & Materials INC, Newtown, EUA) com ponta de diâmetro igual a 5,0 mm, alimentado por uma bomba peristáltica (MS Tecnopon Instrumentação, Piracicaba, Brasil) a uma vazão de aproximadamente 0,80 mL/min e uma amplitude de 95%. Quando atomizadas, as esferas formadas entraram em contato com o banho de gelificação de solução

de CaCl<sub>2</sub> a uma concentração 1,5% (m/v) sob constante agitação mecânica, afim de evitar aglomeração das microesferas. As microesferas foram mantidas no banho de gelificação por um período de 30 minutos sob agitação para a completa formação da estrutura de hidrogel. Em seguida, as microesferas foram lavadas com água destilada e filtradas. Após a etapa de filtração e lavagem, as microesferas foram liofilizadas. Foi utilizado liofilizador (modelo LABCONCO FreeZone 2.5, Kansas, Estados Unidos) a vácuo operado a 0,420 Mbar e temperatura de -50 °C.

## 2.3 Caracterização das microesferas

### 2.3.1 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada relacionando a concentração do composto bioativo lipofílico presente na emulsão encapsulada com a concentração do composto ( $\alpha$ -TOC) presente nas microesferas produzidas e liofilizadas, como mostrado na Equação 1.

$$EE (\%) = \frac{\text{Concentração de } \alpha\text{-TOC nas microesferas}}{\text{Concentração inicial de } \alpha\text{-TOC na emulsão}} \times 100 \quad (1)$$

A concentração de composto lipofílico encapsulado foi determinada a partir da liberação do  $\alpha$ -TOC rompendo 0,5 g de microesfera em 5,0 mL de solução de citrato de sódio 3,0% (m/v) (pH~8,9), mantidas em banho ultrassônico por 1 hora e após esse tempo foram mantidas em repouso overnight. Em seguida, foi adicionado 5 mL de etanol à solução e essa foi agitada vigorosamente em vórtex por 2 minutos, em seguida a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Realizada a centrifugação, foram realizadas lavagens no sobrenadante com etanol (Metodologia adaptada de FENG *et al.*, 2018; YOO *et al.*, 2006). A quantificação foi feita então através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na qual o volume de injeção foi de 20  $\mu$ L, a uma taxa de eluição de 2 mL/min, com fase móvel metanol:água (96:4, v/v). Foi utilizada coluna C18, mantida à 45 °C. A detecção foi realizada à 295nm com um tempo de corrida de 30 minutos (Metodologia adaptada de GIMENO *et al.*, 2000).

### 2.3.2 Morfologia

A análise da morfologia das microesferas liofilizadas foi realizada, por meio da observação de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em stubs de alumínio com fita dupla-face de carbono, metalizadas em aparelho evaporador de ouro (SCD 050) e observadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO EVO 40 XVP, Carl Zeiss) do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras. As eletromicrografias foram obtidas em aumentos de 100X e 1000X para todos os tratamentos.

### 2.4 Estabilidade das microesferas

A estabilidade das microesferas liofilizadas foi avaliada em diferentes temperaturas de armazenamento. As microesferas foram armazenadas em embalagens de polietileno seladas, as quais foram mantidas à 20, 40 e 60 °C em B.O.D. As amostras foram caracterizadas em relação ao conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol por HPLC e atividade antioxidante (DPPH) remanescente nas microesferas, após um período de armazenamento de 30 dias.

A taxa de degradação do  $\alpha$ -TOC foi calculada de acordo com a equação a seguir (Equação 2) (LEE *et al.*, 2020).

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

Onde,  $C_0$  é concentração no tempo inicial e  $C_t$  é a concentração após o tempo de armazenamento.

### 2.5 Digestibilidade *in vitro*

As microesferas liofilizadas foram submetidas às condições simuladas de digestibilidade *in vitro* e então caracterizadas em relação ao conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol liberado por HPLC. O suco gástrico simulado consistia de uma solução isotônica de NaCl (0,9%) contendo 3 mg de pepsina/g de amostra e pH ajustado para valor entre 1,8 e 2,0 com HCl 1M. Um grama de microesferas foi misturado em 9,0 mL do suco gástrico e incubado por 2 horas à 37 °C em banho com agitação de 130 rpm. Após o tempo de digestão gástrica o conteúdo

foi transferido para 40,0 mL da solução de suco intestinal simulado. O suco intestinal simulado foi preparado com solução isotônica de NaCl (0,9%) adicionada de 4 mg de pancreatina/g de amostra e 25 mg de sais biliares/g de amostra com pH ajustado entre 6,5 e 7,0 com NaOH 1M. Após a transferência do conteúdo da digestão gástrica para a solução de suco gástrico intestinal simulado, esse foi mantido por mais 2h em banho-maria à 37 °C com agitação de 45 rpm e então foi retirada uma alíquota de 1,0 mL (produto da digestão), e então foi feita a análise por HPLC do  $\alpha$ -TOC liberado (Metodologia adaptada de FREDES *et al.*, 2018; LIAO *et al.*, 2017). Esta análise de digestibilidade informa sobre a quantidade de  $\alpha$ -TOC bioacessível, a qual pode ser calculada como na Equação 3, onde o teor de  $\alpha$ -tocoferol foi determinado por HPLC (FREDES *et al.*, 2018).

$$\text{Bioacessibilidade \%} = \frac{\text{mg de } \alpha - \text{TOC no produto da digestão}}{\text{mg de } \alpha - \text{TOC nas microesferas}} \times 100 \quad (3)$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização das microesferas

##### 3.1.1 Eficiência de encapsulação

A porcentagem de eficiência de encapsulação (EE%) é um parâmetro que deve ser maximizado, pois indica a eficiência do processo e dos materiais utilizados para a produção das microesferas de composto bioativo. A EE% é dada pela relação entre a concentração do composto bioativo lipofílico presente na emulsão a ser encapsulada com a concentração do composto ( $\alpha$ -TOC) presente nas microesferas produzidas.

Os valores para a eficiência de encapsulação para o  $\alpha$ -tocoferol para os três tratamentos variaram entre 76,31 e 80,83%, como apresentado na Tabela 1. Esses altos valores de eficiência de encapsulação mostram que os sistemas alginato-inulina (IN) e alginato-goma de cajueiro (GC) são matrizes compatíveis que podem ser usadas para encapsular o  $\alpha$ -TOC.

Além disso, o aumento da viscosidade da solução de alginato pela adição de outro biopolímero (inulina ou goma de cajueiro) induz uma maior eficiência de encapsulação, isso porque o alginato passa a ter uma rede mais concentrada com uma parede menos porosa (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015; CUJIC *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Valores da porcentagem de eficiência de encapsulação obtidos para cada tratamento realizado na produção das microesferas liofilizadas de  $\alpha$ -tocoferol.

Tratamentos	Eficiência de encapsulação (%)
Alginato (controle)	76,31 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>
Alginato IN	80,83 $\pm$ 0,22 <sup>a,b</sup>
Alginato GC	78,68 $\pm$ 0,96 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2021).

A adição de um material complementar (por exemplo, inulina e/ou goma de cajueiro) ao alginato é um método conhecido e eficaz para o aumento da eficiência de encapsulação de compostos bioativos, como descrito em estudos realizados por Prasanna e Charalampopoulos (2019) e Tsai, Kitamura e Kokawa (2017), esses utilizaram em suas pesquisas a goma arábica, muito semelhante à goma de cajueiro. No trabalho realizado por Paula *et al.* (2012) observa-

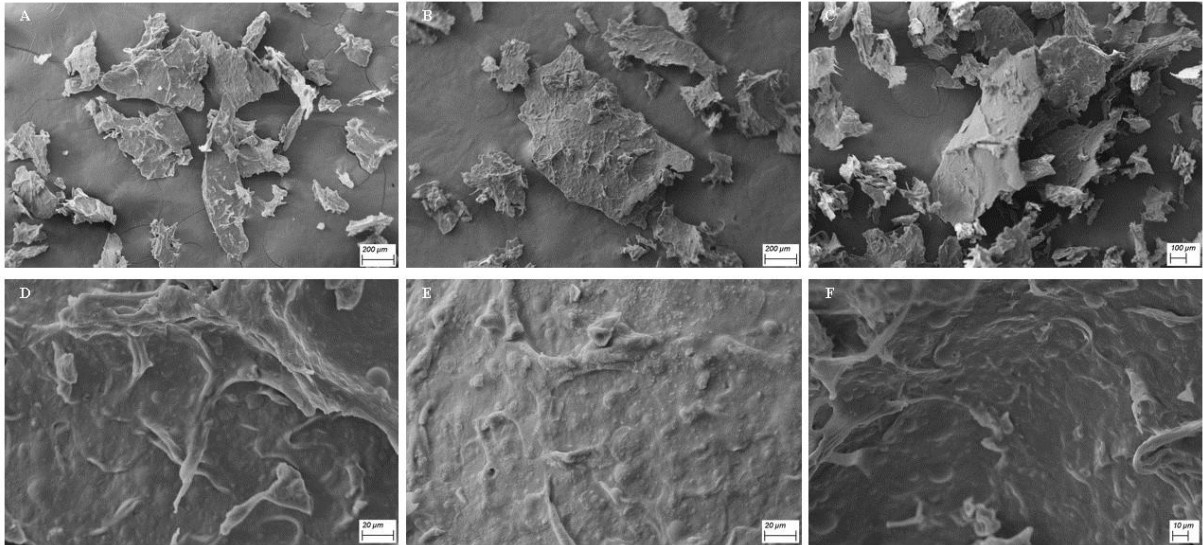
se também um aumento da eficiência de encapsulação ao utilizar o sistema alginato-goma de cajueiro. O aumento da eficiência de encapsulação de microesferas produzidas utilizando alginato e um polímero complementar, se deve pelo aumento da viscosidade da solução produzida, que gera uma matriz menos porosa que aprisiona melhor o composto bioativo encapsulado. Essa matriz menos porosa aumenta as propriedades de barreira da microesfera, assim como sua estabilidade, pois reduzem a permeabilidade inerente às microesferas produzidas utilizando apenas o alginato de sódio (BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015). Além disso, a melhora eficiência de encapsulação pode estar relacionada à morfologia das partículas produzidas, isso porque microesferas que apresentem estrutura rachada, danificada ou muito rugosa podem comprometer a estabilidade do composto microencapsulado (BOTREL *et al.*, 2014). Esse fato pode ser confirmado ao analisar as micrografias realizadas que permitem observar que as microesferas produzidas utilizando o sistema alginato-inulina possuem uma superfície mais uniforme, com menos rugosidade e sem rachaduras.

### 3.1.2 Morfologia

Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas liofilizadas, afim de verificar as características das estruturas e das superfícies das partículas produzidas. Todos os tratamentos apresentaram forma semelhantes, não foi mantida a esfericidade das micropartículas de  $\alpha$ -tocoferol, essa deformidade pode ter sido causada pelo processo de liofilização que as partículas foram submetidas. A liofilização é uma técnica de desidratação, na qual, a amostra passa por um congelamento rápido seguida pela sublimação do gelo sob vácuo. Apesar de ser um processo que utiliza baixas temperaturas, que preserva os compostos bioativos encapsulados, ocorre também um enrijecimento da estrutura seguida pela retirada da água, o que provoca mudanças estruturais das microesferas (AZEREDO, 2005).

Pela observação das eletromicrografias, apresentadas na Figura 1, pode-se confirmar que não há rachaduras nas superfícies das micropartículas de  $\alpha$ -TOC de todos os tratamentos e essas apresentam uma superfície com algumas dobras/rugas, sem o a ocorrência de porosidade significativa.

Figura 1 – As eletromicrografias obtidas em aumentos de 100X (A, B e C) e 1000X (D, E e F) para todos os tratamentos alginato-controle (A e D), alginato-inulina (B e E) e alginato-goma de cajueiro (C e F).



Fonte: Da autora (2021).

### 3.2 Estabilidade das micropartículas

A estabilidade à temperatura das micropartículas contendo  $\alpha$ -tocoferol foi avaliada por um período de 30 dias, sendo mantidas armazenadas em estufas do tipo B.O.D., com temperaturas constantes de 20, 40 e 60 °C. Para avaliar a estabilidade do composto ativo presença nas micropartículas foi realizada a quantificação do teor (mg/mL) de  $\alpha$ -TOC, determinada sua taxa de degradação (%) e avaliada sua atividade antioxidante (AA%) ao final do período de armazenamento

Os resultados obtidos para a quantificação de  $\alpha$ -tocoferol nas micropartículas e sua taxa de degradação, assim como, sua porcentagem de AA no tempo 0 e tempo de 30 dias de armazenamento estão apresentados na Tabela 2 e Figura 2. No tempo inicial ( $t = 0$  dias) a concentração de  $\alpha$ -TOC variou entre 9,32 e 9,48 mg/mL e sua atividade antioxidante ficou entre 38,97 e 36,76%. Decorrido o tempo de armazenamento ( $t = 30$  dias), o comportamento das micropartículas de  $\alpha$ -tocoferol variou em função da temperatura em que foram mantidas. À 20 °C quase não houve redução da concentração de  $\alpha$ -tocoferol, sendo que essa se manteve entre 9,26 e 9,28 mg/mL, com uma degradação média de aproximadamente 1%. Porém, ao medir a AA a redução média foi de aproximadamente 18%, apresentando uma atividade antioxidante entre 31,65 e 30,84%. Para a estabilidade à 40 °C a degradação média do  $\alpha$ -TOC foi de aproximadamente 29% (em comparação com  $t = 0$ ), a qual manteve-se entre 6,30 e 7,26 mg/mL. Quando medida a atividade antioxidante que apresentou valores entre 8,87 e 11,85%,

nota-se que a redução média dessa AA foi de aproximadamente 73%. Quando analisada a estabilidade ao armazenamento à 60 °C a redução da concentração de  $\alpha$ -tocoferol e sua atividade antioxidante são ainda maiores. Houve uma degradação média de 43% aproximadamente, ou seja, a concentração de  $\alpha$ -TOC ficou entre 4,91 e 6,31 mg/mL. Para a AA a redução média foi de 91% aproximadamente, isso porque a atividade antioxidante das micropartículas de  $\alpha$ -tocoferol ficou entre 2,27 e 4,03% após os 30 dias.

Tabela 2 – Taxa de degradação do  $\alpha$ -tocoferol remanescente nas micropartículas após período de 30 dias de incubação das microesferas nas temperaturas de 20, 40 e 60 °C.

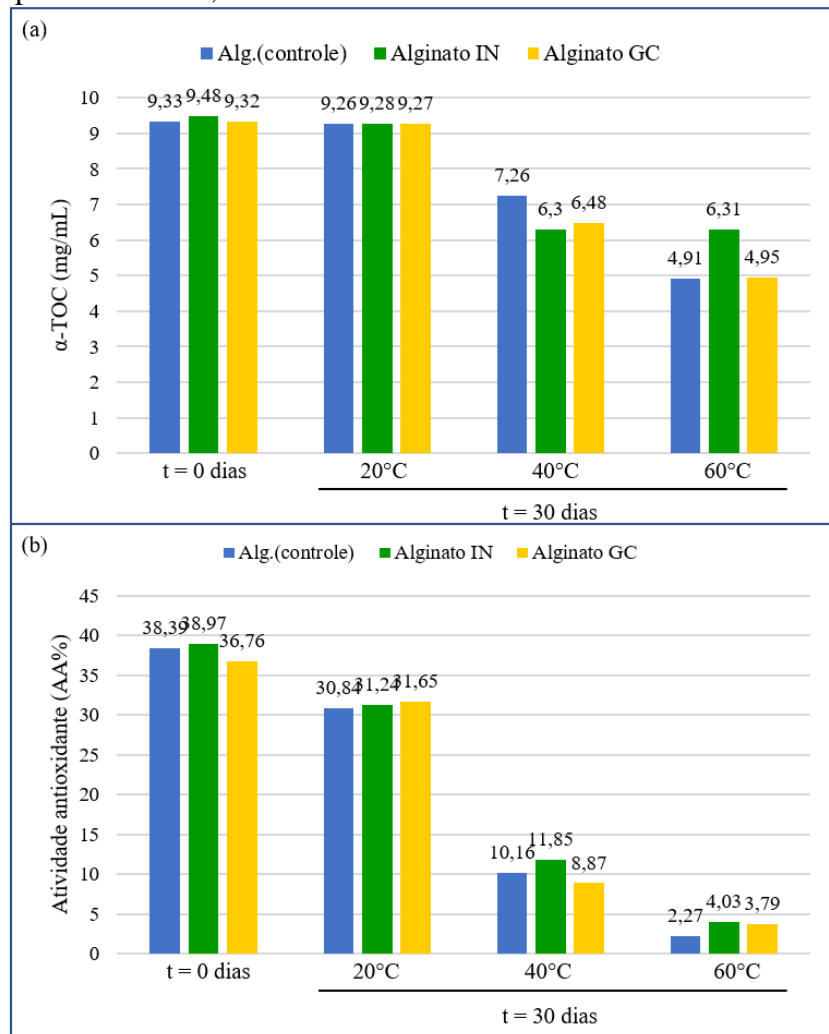
Tratamentos	Taxa de degradação (%)		
	20°C	40°C	60°C
Alg.(controle)	0,75 <sup>b</sup>	22,08 <sup>b</sup>	47,27 <sup>a</sup>
Alginato IN	2,12 <sup>a</sup>	33,61 <sup>a</sup>	33,40 <sup>b</sup>
Alginato GC	0,54 <sup>b</sup>	30,47 <sup>a</sup>	46,78 <sup>a</sup>

IN: inulina; GC: goma de cajueiro. Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autora (2021).



Figura 2 – Concentração (a) e atividade antioxidante (b) do  $\alpha$ -tocoferol remanescente nas micropartículas após período de 30 dias de incubação das microesferas nas temperaturas de 20, 40 e 60 °C.



Fonte: Da autora (2021).

Com os resultados obtidos é possível observar que as micropartículas produzidas com material complementar (inulina e goma de cajueiro) foram mais estáveis, provavelmente devido à diminuição da porosidade das micropartículas de alginato pelo estabelecimento de uma rede polimérica mais coesa. Porém, mesmo com a proteção promovida pelos materiais constituintes da parede da micropartícula, há uma diminuição da atividade antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol durante o período de armazenamento. Isso porque ao longo de um período de armazenamento com temperaturas mais elevadas (40 e 60 °C), acontecem alterações nas propriedades das micropartículas e pode ocorrer a difusão do  $\alpha$ -TOC através da matriz da parede, aumentando o teor do composto ativo na superfície, tornando-se mais susceptível à degradação e perdendo sua atividade antioxidante (LEE *et al.*, 2020), além disso, entende-se

que pode ocorrer difusão de oxigênio do exterior para dentro da matriz das micropartículas, contribuindo para o processo de degradação.

Ainda sobre a manutenção da concentração de  $\alpha$ -tocoferol (mg/mL) no período de armazenamento à temperaturas mais elevadas, mas com a redução da atividade antioxidante (AA%) apresentada pelas micropartículas, esse comportamento pode estar relacionado à característica dos tocoferóis, nos quais, há uma diminuição da atividade antioxidante sob altas temperaturas, essa característica segue a ordem de menor sensibilidade  $\alpha < \beta < \gamma < \delta$ . Além disso, quanto maior a temperatura menor o efeito pró-oxidante do  $\alpha$ -TOC, mesmo em concentrações maiores, isso pode estar relacionado ao fato do oxigênio apresentar menor solubilidade em altas temperaturas. Assim, a formação de peróxidos auto-oxidativos ocorre a taxas mais baixas e é gradualmente substituído por reações de polimerização (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1992).

Por outro lado, verifica-se que a temperatura de estocagem é um fator muito importante a ser considerado na conservação das micropartículas contendo  $\alpha$ -tocoferol e manutenção de seu potencial antioxidante sendo verificado um baixo grau de degradação a 20 °C quando comparado a temperatura de 60 °C. Percebe-se ainda que a presença de inulina na matriz de alginato teve maior efeito protetor em temperatura mais alta quando comparado aos outros tratamentos. A maior estabilidade do tratamento utilizando a inulina comparado ao que utilizou-se a goma de cajueiro pode estar relacionada à fração proteica presente na estrutura dessa goma, que a torna mais suscetível à degradação por temperatura devido à desnaturação proteica (CHENG *et al.*, 2020) ou ainda ao menor tamanho da cadeia de inulina, permitindo assim maior compactação da rede polimérica

Lee *et al.* (2020) ao encapsularem vitamina E ( $\alpha$ -T) obtiveram resultados semelhantes quanto à redução da concentração do bioativo ao longo do tempo de armazenamento com diferentes temperaturas. Ao manterem as microcápsulas à 25 °C por 30 dias a concentração de  $\alpha$ -T foi de 133,61 (t = 0) para 121,08 mg/kg, na temperatura de 45 °C a concentração do tempo t = 30 dias foi igual à 98,37 mg/kg e, após os 30 dias de armazenamento, à 60 °C a concentração final do bioativo era de apenas 28,75 mg/kg.

### **3.3 Digestibilidade *in vitro***

As amostras foram submetidas às condições simuladas de digestibilidade *in vitro* e para avaliar sua estabilidade pela passagem no trato gastrointestinal humano. A quantificação foi feita da concentração de  $\alpha$ -TOC liberado no meio ao longo do tempo de digestão, trazendo

resultados quanto à estabilidade das micropartículas frente às enzimas digestivas. A Tabela 3 apresenta o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol liberado das micropartículas para cada tratamento após o processo de digestão simulada e sua bioacessibilidade.

Tabela 3 – Teor de  $\alpha$ -tocoferol no meio liberado das micropartículas de cada tratamento após a simulação de digestibilidade *in vitro*.

Tratamentos	Concentração de $\alpha$ -TOC (mg/mL)	Bioacessibilidade (%)
Alginato (controle)	1,51 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	16,22 <sup>c</sup>
Alginato IN	5,56 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	58,60 <sup>a</sup>
Alginato GC	2,04 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	21,92 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2021).

A característica de bioacessibilidade do  $\alpha$ -TOC (microencapsulado) no organismo humano após o processo de digestão, pode estar relacionada a inúmeros fatores complexos dos nossos sistemas fisiológicos. Quando utilizados materiais com boa capacidade de retenção de água (hidrogéis), como o alginato, isso se torna um facilitador muito importante para absorção de fluidos, transporte de nutrientes e metabólitos, por exemplo. Além disso, biomateriais (alginato, por exemplo) com alta capacidade de retenção de água, quando liofilizados tem se mostrado promissores em termos de resposta biológica (BILGIC *et al.*, 2019).

Para o controle de liberação de ingrediente ativos no trato intestinal, o alginato já é empregado como encapsulante pois previne a digestão enzimática nas condições gástricas. Isso porque nessas condições, a protonação converte o alginato de sódio em ácido algínico insolúvel que protege a difusão dos ingredientes ativos. Já nas condições intestinais, a matriz de alginato sofre inchamento permitindo a liberação dos compostos ativos (SOMCHUE *et al.*, 2009). Essa modificação (protonação) na estrutura do alginato sofre interferência ao adicionar os materiais complementares, inulina e goma de cajueiro, e por isso, as micropartículas apresentam maior solubilidade nas condições gástricas permitindo uma maior liberação do  $\alpha$ -tocoferol, quando comparadas ao tratamento controle em que utilizou-se apenas o alginato de sódio.

Num processo de digestão simulada *in vitro*, a habilidade tamponante dos materiais envolvidos pode ser aumentada com o aumento da quantidade de sólidos. Esse conteúdo de sólidos está relacionado à viscosidade das soluções contendo o material encapsulante e o composto bioativo (WU *et al.*, 2017). Ou seja, uma maior viscosidade das emulsões

produzidas permite uma estabilidade maior das micropartículas formadas, ao serem submetidas às condições do trato gastrointestinal humano. Em análises preliminares, observou-se que as emulsões produzidas utilizando alginato e goma de cajueiro apresentaram viscosidade maior do que aquelas produzidas com alginato e inulina, isso pode explicar a menor liberação de  $\alpha$ -TOC das microesferas de alginato GC no processo de digestibilidade *in vitro*, quando comparadas às micropartículas produzidas a partir das emulsões alginato IN.

A maior liberação do TOC nas condições intestinais pode ter sido influenciada pelo tipo de interação entre a inulina e o alginato, contribuindo assim para uma maior liberação e consequente acessibilidade ao composto funcional ativo. Essa característica pode ter permitido uma maior liberação do  $\alpha$ -tocoferol encapsulado nas micropartículas (5,56 mg/mL), tornando-o mais acessível para a absorção no corpo. Em relação ao tratamento controle e o que utilizou-se a goma de cajueiro (alginato GC), pode-se dizer que são mais estáveis à ação das enzimas digestivas e necessitam de um tempo maior para uma liberação mais elevada de  $\alpha$ -TOC, já que esses liberaram 1,51 mg/mL e 2,04 mg/mL, respectivamente. Além disso, sabe-se que o alginato sofre alterações na sua estrutura e permite uma maior liberação do composto encapsulado quando submetido à meios com maiores valores de pH (ideal = 8,9).

Fredes *et al.* (2018), em um estudo sobre a estabilidade e a bioacessibilidade de antocianinas encapsuladas por inulina ou alginato, reportaram que, após a simulação da digestibilidade *in vitro*, a bioacessibilidade do bioativo é maior quando encapsulado do que na forma livre. Isso porque quando o bioativo não está protegido pela matriz da micropartículas este sofre maior degradação sob as condições simuladas do trato gastrointestinal.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram de maneira geral que a utilização da energia ultrassônica para atomização produz micropartículas de tamanho reduzido, com alta eficiência de encapsulação e estáveis, além disso, a compatibilidade entre os biopolímeros alginato + inulina e alginato + goma de cajueiro favoreceu o desenvolvimento dessas micropartículas. Foi possível observar que houve um aumento da eficiência de encapsulação quando adicionada a inulina ou a goma de cajueiro em relação ao uso do alginato isoladamente. Quando mantidas à temperaturas mais altas durante o período de estocagem, os materiais complementares também mostraram auxiliar na estabilidade das micropartículas. Ao analisar a bioacessibilidade do  $\alpha$ -TOC através da simulação da digestibilidade *in vitro*, nota-se que o tratamento com inulina foi o que apresentou a maior bioacessibilidade, por outro lado as micropartículas produzidas somente com alginato tiveram a menor taxa de bioacessibilidade. Com isso, podemos concluir que é possível desenvolver um sistema de liberação controlada eficiente e estável utilizando o alginato e outros biopolímeros compatíveis através do método de atomização por energia ultrassônica, permitindo a incorporação dessas micropartículas em diferentes matrizes alimentícias.

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Brasil (FAPEMIG) – Processo N.: CAG-APQ-02487-16. Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Agradecem ao Laboratório de Refrigeração de Alimentos, Universidade Federal de Lavras - Brasil, à Central de Análises e Prospecção Química (CAPQ), Universidade Federal de Lavras – Brasil e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) Universidade Federal de Lavras – Brasil.

## REFERÊNCIAS

- AVVARU, B. *et al.* Ultrasonic atomization: Effect of liquid phase properties. **Ultrasonics**, [Amsterdam], v. 44, n. 2, p. 146–158, Feb. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041624X05000983>. Acesso em: 11 ago. 2019.
- AZEREDO, H. M. C. *et al.* Tensile and water vapour properties of calcium-crosslinked alginate-cashew tree gum films. **International Journal of Food Science and Technology**, [Malden], v. 47, n. 4, p. 710–715, Jan. 2012. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2011.02897.x>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. *et al.* Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 167, p. 378–386, Jan. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25149001/>. Acesso em: 13 set. 2019.
- BILGIC, M. B. *et al.* In vitro evaluation of alpha-tocopherol loaded carboxymethylcellulose chitosan copolymers as wound dressing materials. **Materials Technology**, [Leeds], v. 34, n. 07, p. 386–393, Feb. 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10667857.2019.1573944>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- BOTREL, D. A. *et al.* Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 62, p. 344–352, Aug. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996914001021>. Acesso em: 15 dez. 2019.
- CHENG, H. *et al.* Co-encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol and resveratrol in oil-in-water emulsion stabilized by sodium caseinate: Impact of polysaccharide on the stability and bioaccessibility. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 264, p. 109685, July 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877419303176>. Acesso em: 13 ago. 2020.
- COMBS, G. F. **The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health**. 3rd ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2008. 583 p.
- COMUNIAN, T. A. *et al.* Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 150, p. 319–329, Oct. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27312643/>. Acesso em: 15 fev. 2020.
- CUJIC, N. *et al.* Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 86, p. 120–131, Aug. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016301911>. Acesso em: 12 fev. 2020.

DALMORO, A. *et al.* Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [Amsterdam], v. 80, n. 3, p. 471–477, Apr. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641112000070>. Acesso em: 18 ago. 2019.

DIAS, D. R. *et al.* Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, [Netherlands], v. 13, p. 31–37, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221479931730019X>. Acesso em: 21 out. 2019.

DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food & Function**, [England], v. 6, n. 4, p. 1035–1052, Apr. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25710906/>. Acesso em: 25 nov. 2019.

FENG, W. *et al.* Preparation and characterization of emulsion-filled gel beads for the encapsulation and protection of resveratrol and  $\alpha$ -tocopherol. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 108, p. 161–171, June 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918302114>. Acesso em: 13 dez. 2019.

FREDES, C. *et al.* Stability and bioaccessibility of anthocyanins from maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) juice microparticles. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 91, p. 549–556, May 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643818301282>. Acesso em: 14 jan. 2020.

GIMENO, E. *et al.* Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [Amsterdam], v. 881, n. 1-2, p. 251–254, June 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967300002193>. Acesso em: 12 fev. 2020.

LEE, W. J. *et al.* Storage stability and degradation kinetics of bioactive compounds in red palm oil microcapsules produced with solution-enhanced dispersion by supercritical carbon dioxide: A comparison with the spray-drying method. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 304, p. 125427, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814619315420>. Acesso em: 18 fev. 2020.

LIAO, L.-K. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 82, p. 82–89, Sept. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817302074>. Acesso em: 17 jan. 2020.

LUO, Y. *et al.* Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [Amsterdam], v. 85, n. 2, p. 145–152, July 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776511000981>. Acesso em: 15 set. 2019.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [Chichester], v. 60, n. 3, p. 313–318, Jan. 1992. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2740600307>. Acesso em: 27 out. 2019.

PRASANNA, P. H. P.; CHARALAMPOPOULOS, D. Encapsulation in an alginate–goats' milk–inulin matrix improves survival of probiotic *Bifidobacterium* in simulated gastrointestinal conditions and goats' milk yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, [Malden], v. 72, n. 1, p. 132–141, Feb. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1471-0307.12568>. Acesso em: 18 nov. 2019.

ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. **The Journal of Nutrition**, [Bethesda], v. 137, n. 11, p. 2493–2502, Nov. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17951492/>. Acesso em: 15 dez. 2019.

SOMCHUE, W. *et al.* Encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol in protein-based delivery particles. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 42, n. 8, p. 909–914, Oct. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399690900132X>. Acesso em: 13 jan. 2020.

STRATULAT, I. *et al.* Enrichment of cheese with bioactive lipophilic compounds. **Journal of Functional Foods**, [Netherlands], v. 6, p. 48–59, Jan. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464613002910>. Acesso em: 22 jan. 2020.

TSAI, F.-H.; KITAMURA, Y.; KOKAWA, M. Effect of gum arabic-modified alginate on physicochemical properties, release kinetics, and storage stability of liquid-core hydrogel beads. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 174, p. 1069–1077, Oct. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28821029/>. Acesso em: 15 fev. 2020.

VAKARELOVA, M. *et al.* Production of stable food-grade microencapsulated astaxanthin by vibrating nozzle technology. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 221, p. 289–295, Apr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27979204/>. Acesso em: 13 jan. 2020.

WU, P. *et al.* In vitro digestion of pectin- and mango-enriched diets using a dynamic rat stomach-duodenum model. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 202, p. 65–78, June 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877417300110>. Acesso em: 12 fev. 2020.



YOO, S.-H. *et al.* Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Amsterdam], v. 38, n. 1, p. 25–30, Feb. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813005002722?via%3Dihub>. Acesso em: 17 fev. 2020.