



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Microencapsulação do ferro através da técnica de coacervação complexa

Autora: Aline Luvielmo de Araújo

Orientadores: Prof. Dra. Isabel Cristina Tessaro

M.Sc Jordana Corralo Spada

Porto Alegre, Dezembro de 2011

Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 Ferro e sua importância	2
2.2 Microencapsulação	6
2.2.1 Microencapsulação através do processo de coarcevação complexa	11
2.2.2 Microencapsulação através do processo de liofilização	15
2.2.3 Materiais de parede	18
3 Materiais e Métodos	21
3.1 Matéria-prima e reagentes	21
3.2 Hidratação das gomas	21
3.3 Microencapsulação através da coacervação complexa	21
3.4 Caracterização das microcápsulas	24
3.4.1 Microscopia ótica	24
3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
3.4.3 Temperatura de transição vítrea (T _g)	24
3.4.4 Determinação do conteúdo de ferro	25
3.5 Análise sensorial	25
3.6 Análise estatística	26
4 Resultados e Discussão	27
4.1 Caracterização das microcápsulas	27
4.1.1 Microscopia ótica	27
4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
4.1.3 Temperatura de transição vítrea (T _g)	29
4.1.4 Conteúdo de ferro	30
4.2 Análise sensorial	31
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	35
6 Referências	36
Apêndice A	43
Apêndice B	44
Apêndice C	45

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora, Isabel, que é mais que uma professora, é uma amiga e minha segunda mãe. Obrigada pela confiança, pelo apoio, pelos conselhos e por toda ajuda nesses últimos meses.

À minha coorientadora, Jordana, pela convivência desde os tempos da bolsa de iniciação científica e pela ajuda, paciência, idéias e persistência, apesar de todos os contratemplos.

Aos amigos do LATEPA: Lígia, Aline, Júlia, Voltaire, Renata, Maria Júlia, Carolina, Maurício, Ana, Débora por todas as idéias e risadas.

Ao DEQUI, por proporcionar conhecimento e disponibilizar sua estrutura não só para trabalhos, mas também para a convivência e integração dos alunos.

À Amanda, Laura, Everton, Cíntia e Naiara: mais do que colegas de curso, são amigos que levarei para sempre. Obrigada pelos momentos de trabalho, descontração e convívio diário.

Às “velhas” amigas Fernanda, Carolline e Karen por tantos os anos de amizade e carinho.

Aos amigos da Braskem, pelo conhecimento e experiências. Em especial à Letícia e Camilla pela amizade.

A meus pais, pelo apoio, incentivo e amor incondicional.

Ao Guilherme, por todos os anos de paciência, amor, companheirismo e risadas.

Resumo

O ferro é considerado um mineral essencial à vida dos seres vivos, visto que o mesmo está envolvido em importantes processos metabólicos no organismo. A carência ou deficiência desse nutriente é denominada anemia ferropriva, muito comum na infância e de grande relevância não só nos países em desenvolvimento, como naqueles altamente industrializados. Entre as estratégias utilizadas para prevenir e combater essa deficiência, o enriquecimento de alimentos tem se mostrado eficaz, inclusive a um custo compensatório. O enriquecimento com ferro é tecnicamente difícil, pois as formas biodisponíveis são quimicamente reativas e frequentemente produzem efeitos organolépticos indesejáveis quando adicionadas aos alimentos. Para contornar esses problemas, estuda-se a técnica de microencapsulação que, ao englobar o ferro, mascara seu sabor e reduz a reatividade com outros componentes da dieta, além de possibilitar sua incorporação em alimentos sem a perda de suas propriedades funcionais. O presente trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia para o processo de microencapsulação do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ via coacervação complexa, empregando como agentes encapsulantes a mistura de proteína isolada de soja (PIS), carboximetilcelulose (CMC) e goma guar, visando ao enriquecimento de produtos alimentícios. O composto a ser encapsulado foi obtido pela emulsão do ferro na forma de sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em óleo de soja e os agentes encapsulantes foram misturados na proporção de 3:1:1 (PIS:CMC:Guar) em pH 4,0. Após a coacervação, as cápsulas foram secas por liofilização. A morfologia das micropartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a temperatura de transição vítrea foi avaliada pela análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC). A quantidade de ferro presente nas cápsulas foi determinada por espectrofotometria UV-VIS. Por fim, realizou-se a incorporação do ferro encapsulado e do ferro livre em uma formulação de suco de maçã que foi avaliada sensorialmente. Através da análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), o material coacervado apresentou temperatura de transição vítrea (T_g) de $127,24^\circ\text{C}$. Através da MEV, foi observado que as cápsulas apresentaram morfologia irregular e porosa. A análise sensorial para o suco adicionado de coacervado foi satisfatória, pois foram obtidas características semelhantes ao suco sem ferro. Os resultados encontrados demonstram que a microencapsulação do ferro através da coacervação complexa pode ser considerada uma alternativa na utilização de alimentos fortificados.

Palavras-chave: microencapsulação, ferro, coacervação complexa, liofilização.

Lista de Figuras

Figura 1: Modelo da estrutura dos diferentes tipos de micropartículas.	8
Figura 2: Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação.	12
Figura 3: Modelo esquemático de microencapsulação por coacervação complexa.	13
Figura 4: Diagrama de fases da água.	16
Figura 5: Estágios da liofilização.	17
Figura 6: Ilustração das características das cápsulas de polifenóis produzidas por vários processos de encapsulação.	17
Figura 7: Estrutura da molécula de CMC.	19
Figura 8: Imagem do liofilizador de bancada utilizado para secagem do material.	22
Figura 9: Diagrama ilustrativo da metodologia utilizada para encapsulação do ferro e produção das microcápsulas através da coacervação complexa.	23
Figura 10: Fotomicrografias obtidas pela microscopia ótica das microcápsulas coacervadas-liofilizadas (100x).	27
Figura 11: Fotomicrografias obtidas pela de microscopia ótica das microcápsulas liofilizadas (100x).	28
Figura 12: Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas coacervadas em magnitudes de 100 x (A) e 200 x (B).	28
Figura 13: Termograma das cápsulas produzidas pela técnica de coacervação.	30
Figura 14: Fotografias das amostras: com ferro encapsulado (A), controle (B) e com ferro livre (C).	33

Lista de Tabelas

Tabela 1: Quantificação de ferro nas microcápsulas ($\lambda = 565 \text{ nm}$).....	31
Tabela 2: Avaliação sensorial (teste de aceitação) das amostras de suco de maçã enriquecidas com ferro.	32

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>Abs</i>	Absorbância
<i>CMC</i>	Carboximetilcelulose
<i>DSC</i>	Calorimetria diferencial de varredura (differential scanning calorimetry)
<i>MEV</i>	Microscopia eletrônica de varredura
<i>p</i>	Significância estatística
<i>PIS</i>	Proteína isolada de soja
R^2	Coefficiente de regressão
T_g	Temperatura de transição vítrea
T_0	Temperatura do início do intervalo do pico endotérmico

1 Introdução

A indústria de alimentos estuda diferentes tecnologias com o objetivo de otimizar processos, aumentar a vida útil dos produtos e melhorar as características nutricionais e sensoriais de um alimento.

Neste cenário de inovações tecnológicas, a técnica de microencapsulação apresenta um importante papel na área de alimentos, revestindo e protegendo compostos sensíveis do meio externo, controlando a liberação de ingredientes e mascarando sabores e odores desagradáveis provocados por alguns compostos.

A proteína isolada de soja é considerada um alimento funcional, ou seja, contém substâncias bioativas e nutrientes essenciais que trazem benefícios à saúde e que contribuem para a redução de doenças crônicas. Esse produto já foi utilizado com sucesso na encapsulação de diferentes produtos, sendo considerado uma alternativa ao uso da goma arábica, largamente utilizada e considerada como agente encapsulante por excelência.

A deficiência de ferro afeta cerca de 30% da população mundial, sendo os grupos mais vulneráveis as mulheres em idade reprodutiva e as crianças em geral, onde a diminuição na capacidade de aprendizagem e anormalidades na resposta de imunização são algumas das consequências causadas por esta carência. Assim, estratégias de prevenção têm sido utilizadas, como, por exemplo, a fortificação de alimentos. Contudo, a adição de ferro livre a esses produtos torna-se inviável, devido a características como reatividade, sabor, odor e cor que o metal confere.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar o potencial de aplicação da proteína isolada de soja como agente encapsulante na microencapsulação do ferro, utilizando a goma guar e a carboximetilcelulose como auxiliares na formação da cápsula e a coacervação complexa como técnica encapsulante. Como objetivos específicos, foram avaliados os seguintes itens apresentados a seguir.

- a) Produção das microcápsulas utilizando a metodologia da coacervação complexa.
- b) Utilização da técnica de liofilização para secagem do material.
- c) Caracterização da morfologia das partículas e temperatura de transição vítrea.
- d) Verificação da eficácia da microencapsulação através de análise sensorial do coacervado (cor, odor e gosto), utilizando como veículo suco de maçã.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Ferro e sua importância

O organismo humano depende de diversos elementos que ingerimos, conhecidos como nutrientes. Dentre estes, os sais minerais são de extrema importância para a saúde.

O cálcio, fósforo, iodo, zinco, cobre, ferro, sódio, potássio, magnésio, entre outros são os minerais mais importantes e conhecidos. O ferro destaca-se por ser um nutriente essencial para a vida, visto que atua principalmente na síntese das células vermelhas do sangue e no transporte do oxigênio para todas as células do corpo. Porções menores de ferro são encontradas na mioglobina, proteína que auxilia no suprimento de oxigênio ao músculo. Aproximadamente 15% de ferro no corpo humano são retidos para necessidades futuras e mobilizados quando a ingestão dietética é insuficiente (CASTRO, 2003).

Em condições normais, a quantidade de ferro presente no organismo é altamente preservada, sendo apenas uma pequena quantidade perdida diariamente. São necessários por dia 40 mg de ferro para a utilização interna do organismo humano, principalmente para a substituição da hemoglobina (CDC, 1999). Grande parte desta quantidade tem origem na reciclagem dos suplementos de ferro existentes no próprio organismo. Essa reciclagem fisiológica é tão eficiente que apenas 10 a 14 mg de ferro são necessários para manter o balanço interno, proveniente da absorção intestinal (CARVALHO, 2006).

Em um homem adulto, existem de 4 a 5 g de ferro, onde de 60 a 70% desta quantidade é classificada como essencial ou funcional e 30 a 40% como reserva ou não-essencial. O nutriente essencial encontra-se incorporado à hemoglobina, mioglobina e certas enzimas respiratórias, que tem o papel de catalisador dos processos de oxidação-redução dentro da célula. Já o mineral não-essencial está localizado nos estoques de ferro do organismo, como a ferritina, uma proteína, e a hemissoderina, pigmento hemoglobínico (CASTRO, 2003).

Existem duas formas de ferro na dieta alimentar: orgânica ou ferro hematínico e inorgânica ou ferro não-hematínico. O primeiro é encontrado na hemoglobina e mioglobina, proveniente das carnes em geral, aves e peixes. O segundo está presente nos

alimentos vegetais, nos cereais e em outros alimentos, como composto férrico e ferroso (CARPENTER, 1992; TBNF, 1995).

A absorção do ferro é afetada significativamente por vários fatores, entre eles: pela mucosa intestinal, pelos alimentos ingeridos diariamente, pela quantidade e natureza química do ferro ingerido nos alimentos, pela taxa de produção de células vermelhas sanguíneas, que podem aumentar ou diminuir sua biodisponibilidade. Quando os níveis de ferro absorvidos pela dieta são adequados, a mucosa intestinal regulariza sua absorção para manter constante o conteúdo do ferro no organismo. Assim, apenas valores entre 5 e 10% deste mineral são absorvidos diariamente. Na sua deficiência, a absorção pode aumentar de 10 a 20% (CASTRO, 2003).

A carência de ferro pode ocorrer como resultado do balanço negativo prolongado de ferro ou devido à falha do organismo em atender às necessidades fisiológicas aumentadas. Em muitos casos, fatores etiológicos estão envolvidos no desenvolvimento da deficiência.

O balanço negativo pode ocorrer em condições de baixo consumo de ferro biodisponível, de prejuízo na absorção (cirurgia gástrica e doença celíaca), e de aumento nas perdas do nutriente pelo organismo (sangramentos, doação de sangue e anemia). As necessidades aumentadas correspondem à infância, gravidez e lactação. Assim, os grupos mais vulneráveis ao desenvolvimento da deficiência de ferro são os lactentes, crianças menores de 5 anos, gestantes e mulheres em idade fértil (DALLMAN *et al.*, 1994).

A anemia é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a condição na qual o conteúdo de hemoglobina no sangue está abaixo do normal como resultado da carência de um ou mais nutrientes essenciais, seja qual for a causa dessa deficiência. As anemias podem ser causadas por deficiência de vários nutrientes como ferro, zinco, vitamina B12 e proteínas. Porém, a anemia causada por deficiência de ferro, denominada anemia ferropriva, é muito mais comum que as demais. Estima-se que 90% das anemias sejam causadas por carência de ferro.

A anemia ferropriva está associada à maior mortalidade entre mulheres parturientes e ao aumento do risco de nascimento de crianças prematuras e de crianças de baixo peso ao nascer. Alguns estudos relatam a queda de produtividade dos trabalhadores associada a este tipo de anemia. A deficiência de ferro influencia também na resistência dos

indivíduos às infecções. Existe uma maior propensão às infecções e maior mortalidade entre crianças com deficiência de ferro. Além disso, alguns estudos revelam atrasos no crescimento associado a este tipo de anemia.

Apesar da ausência de um levantamento nacional, existe consenso na comunidade científica de que a anemia por deficiência de ferro é o problema nutricional de maior magnitude no Brasil, e atinge todas as classes de renda. Estudos locais indicam prevalências de Anemia por Deficiência de Ferro em aproximadamente 50% das crianças e entre 15% e 30% em gestantes brasileiras.

O Ministério da Saúde desenvolve no Brasil duas estratégias de intervenção básicas. O projeto para o controle desta anemia em crianças menores de dois anos, nos municípios de atuação do Projeto de Redução da Mortalidade na Infância. Este trabalho teve início em 1998 em municípios da Região Nordeste. O objetivo principal é reduzir a incidência da anemia entre crianças de 6 a 24 meses. Atualmente é feita a distribuição das doses semanais de sulfato ferroso, além da realização de atividades de orientação alimentar a todas as famílias.

O segundo trabalho acontece através do programa de redução da anemia causada pela deficiência de ferro no Brasil que é priorizada entre as diretrizes da Política Nacional de Alimentação e Nutrição, criado em 1999. Em decorrência das altas prevalências de anemia, o governo brasileiro, a sociedade civil e científica, organismos internacionais e as indústrias brasileiras firmaram o Compromisso Social para a redução da Anemia Ferropriva no Brasil. O objetivo foi estabelecer uma ampla mobilização nacional, através do intermédio da promoção da alimentação saudável, da orientação do consumidor para a diversificação de dieta a baixo custo, da distribuição de suplementos na rede de saúde para grupos populacionais específicos e fortificação de parte da produção brasileira das farinhas de trigo e milho.

No ano de 2001, o Ministério da Saúde determinou obrigatória a adição de ferro (30% IDR ou 4,2mg/100g) e ácido fólico (70% IDR ou 150µg) nas farinhas de milho e trigo. A fortificação deixa de ser facultativa e passa a ser obrigatória. Esta medida tem o objetivo de aumentar a disponibilidade de alimentos ricos em ferro e ácido fólico para a população brasileira e assim contribuir para a redução da prevalência de anemia e defeitos do tubo neural no Brasil.

Os suplementos de ferro serão distribuídos, gratuitamente, nas unidades de saúde que conformam a rede do Sistema Único de Saúde (SUS) em todos os municípios brasileiros, de acordo com o número de crianças e mulheres que atendam ao perfil de sujeitos da ação do Programa.

Mais de dois bilhões de pessoas, isto é, 1/3 da população mundial são anêmicas devido a várias causas, incluindo a deficiência de ferro, que é causa subjacente em cerca de um bilhão de casos de anemia. Além disso, um bilhão de pessoas possui um estoque subnormal de ferro, ou seja, possuem deficiência de ferro, sem, porém, serem consideradas clinicamente anêmicas (CARVALHO *et al.*, 2006).

Diante desse quadro, três estratégias são recomendadas para corrigir a deficiência nutricional de ferro, isoladamente ou combinando-se umas com as outras. São elas: a modificação dietética para melhorar o valor nutricional dos alimentos e a biodisponibilidade do ferro, a suplementação medicamentosa e a fortificação de alimentos (ZLOTKIN, 2004)

A fortificação de alimentos é mundialmente considerada como a solução mais prática e de melhor custo-benefício, principalmente para regiões, nas quais há grande prevalência dessa carência nutricional (WHO, 2001).

Alguns critérios são necessários para a escolha dos alimentos a serem fortificados, tais como, consumo por toda a população-alvo, pequena variação per capita no consumo semanal, não ocorrência de alterações nas características organolépticas do produto, boa aceitabilidade, biodisponibilidade do nutriente no alimento, viabilidade econômica, razoável segurança frente ao risco de ingestão excessiva e estabilidade sob condições-padrão de armazenamento (RAUNHARD e BOWLEY, 1996).

Porém, embora vários compostos à base de ferro possam ser utilizados na fortificação, há problemas técnicos na seleção desses componentes. Os compostos de biodisponibilidade relativamente alta, como o sulfato ferroso, com frequência, provocam alterações organolépticas inaceitáveis, enquanto que outros compostos mais aceitáveis são pouco absorvidos (HURRELL *et al.*, 2006).

Por essa razão, foi desenvolvida a técnica de microencapsulação que, ao isolar o ferro, mascara seu sabor, reduz a reatividade com outros componentes da dieta e controla a sua liberação em áreas do trato gastrointestinal, permitindo sua melhor absorção.

Cabe ressaltar que, de acordo com a Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considera-se alimento fortificado/enriquecido de nutrientes todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e ou prevenir ou corrigir deficiências demonstradas em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma. Para alimentos serem considerados fonte de ferro, esses devem conter pelo menos 15% da IDR (2,10 mg) para cada 100 mL de produto final.

2.2 Microencapsulação

A microencapsulação consiste no processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas pequenas, que liberam o conteúdo de forma controlada, sob condições específicas (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

O conceito da microencapsulação tem como base o modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável, que protege o conteúdo do meio externo, permitindo trocas pela membrana, modulando a entrada e a saída de substâncias na célula. Similar a uma parede que isola o material ativo e controla a liberação, sob estímulo específico (JIZOMOTO *et al.*, 1993).

A técnica de microencapsulação vem sendo estudada desde a década de 30, onde foi empregada primeiramente na área farmacêutica, com a técnica denominada *pan coating*, para obtenção de partículas maiores que 600 µm (SANTOS *et al.*, 2001). Posteriormente, *flavors* foram encapsulados em goma arábica, mas a obtenção de um produto bem sucedido ocorreu em 1954, em sua primeira aplicação comercial, elaborada por Green e Scheicher, para a produção de papel cópia sem carbono lançado pela National Cash Register nos EUA, usado com sucesso nos boletos bancários e notas fiscais (ARSHADY, 1990). Esse papel recebia uma fina camada de microcápsulas de uma tinta sem cor, contendo solução de 2% a 6% de um pigmento adequado, disperso em partículas com diâmetro desde 1 até 10 micrômetros (µm), e tal camada era recoberta com um reagente incolor. A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas

liberando a tinta incolor, que ao entrar em contato com o reagente, tornava-se colorida, devido a mudança de pH, produzindo em outra folha uma cópia idêntica ao que estava sendo escrito no primeiro papel (RÉ, 2000). As microcápsulas usadas deveriam ser suficientemente pequenas para permitir a obtenção de uma imagem bem definida, mas não tanto a ponto de não se romperem pela pressão sofrida. Para protegê-las da ruptura prematura durante a produção do formulário ou pelo manuseio normal, o revestimento incluía também partículas inertes maiores, como o amido, por exemplo.

Em seguida, testou-se a microencapsulação de produtos como óleo de laranja para aplicações em indústrias de aroma, combustíveis para foguetes e produção de pílulas e comprimidos na indústria farmacêutica (DZIEZAK, 1988). Na área de alimentos, os primeiros estudos foram nos anos 60, com a microencapsulação de óleos essenciais para a prevenção da oxidação e perda de compostos voláteis e para o controle da liberação do aroma (RÉ, 2000).

O sucesso do desenvolvimento estimulou as pesquisas na área e gerou um grande número de aplicações para as microcápsulas. As principais incluem produtos relacionados com a reprodução de imagem: impressão térmica, toners para fotocópias; produtos agroquímicos: herbicidas, repelentes e pesticidas; produtos farmacêuticos para consumo oral ou injetáveis; cosméticos; ingredientes alimentícios; adesivos; agentes de cura e encapsulação de células vivas, incluindo enzimas e microorganismos.

Microcápsulas podem ser definidas como embalagens extremamente pequenas, compostas por um polímero conhecido como material de parede, revestimento ou encapsulante e um material ativo chamado de núcleo, fase interna ou recheio (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Enquanto as embalagens convencionais normalmente são empregadas para facilitar transporte, armazenagem e manipulação, as microcápsulas são geralmente empregadas para melhorar o desempenho do material ou criar novas aplicações. O ingrediente ativo pode ser, por exemplo, um aditivo alimentício ou um medicamento (ARSHADY, 1993). As partículas devem apresentar um tamanho entre 0,2 e 500 μm para serem consideradas microcápsulas. Abaixo de 0,2 μm são considerada nanocápsulas e acima de 500 μm , macrocápsulas (RÉ, 1998).

As cápsulas podem ser caracterizadas em termos de sua arquitetura, onde podem ser divididas em dois grupos: o primeiro no qual o núcleo é nitidamente concentrado na

região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, e o segundo, no qual o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz. O primeiro grupo pode ser considerado como sistema do tipo reservatório, o que caracteriza as verdadeiras microcápsulas. Já o segundo, é classificado como sistema matricial que resulta nas chamadas microesferas (AZEREDO, 2005).

A principal diferença entre as microcápsulas e as microesferas está no fato de que uma pequena fração do material encapsulado permanece exposta na superfície nas microesferas, o que não é visto na verdadeira encapsulação. Todavia, o termo encapsulação tem sido utilizado em seu sentido mais amplo, englobando tanto a formação de microcápsulas quanto de microesferas (DEPYPERE, 2003).

As microcápsulas podem ser classificadas como polinucleares ou mononucleares, conforme o núcleo esteja ou não dividido no interior da partícula revestida. As microesferas podem ser heterogêneas caso a substância ativa se encontre na forma de partículas (suspensão) ou homogêneas caso a substância ativa se encontre no estado molecular (dissolvido), conforme pode ser visto na Figura 1 (SILVA *et al.*, 2003; AFTABROUCHAD e DOELKER, 1992).

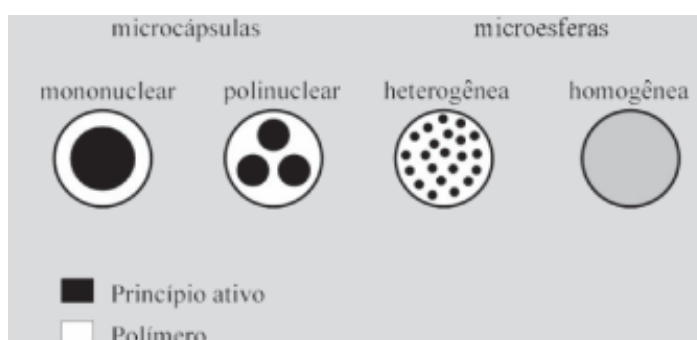


Figura 1: Modelo da estrutura dos diferentes tipos de micropartículas.

Fonte: SILVA *et al.* (2003).

A microencapsulação tem sido amplamente utilizada na indústria alimentícia para a proteção de substâncias sensíveis à luz, temperatura, oxigênio e umidade e para a diminuição taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo (DESAI e PARK, 2005).

Vários fatores devem ser estudados para a escolha correta do processo de microencapsulação, como por exemplo: o tipo de material de parede, o tamanho de

partícula, a concentração do material ativo na microcápsula, a estabilidade e morfologia da partícula e o limite de custo do material microencapsulado.

Entre os métodos empregados para caracterização das microcápsulas e posterior avaliação do processo de microencapsulação destacam-se: as microscopias ótica e eletrônica de varredura, que avaliam as estruturas gerais (externa e interna), o raio-X, a análise térmica, a microscopia e a análise de diâmetro médio e distribuição de tamanho de partículas, a cromatografia e os métodos espectroscópicos, que avaliam a composição da parede e do recheio, o comportamento de liberação através das mudanças de peso, cromatografia e espectroscopia, rendimento e atividade do encapsulado, entre outros (SANTOS *et al.*, 2001). A caracterização morfológica das microcápsulas é uma análise essencial, pois através dela é possível observar visualmente a ocorrência da formação das microcápsulas, a integridade das paredes e também a distribuição de tamanho e do material encapsulado (ROSENBERG *et al.*, 1988).

A composição dos materiais encapsulantes depende do tipo de aplicação a que se destinam e podem variar de comestíveis, como carboidratos e proteínas, a polímeros biodegradáveis ou sintéticos. Assim, para a formação de microcápsulas com particular eficiência e propriedades de liberação no método de formação escolhido, existe uma variedade de materiais de parede a serem utilizados. A estabilidade dos compostos contra a oxidação é também influenciada pela natureza química dos polímeros formadores de parede (SINKO e KHON, 1993).

Os materiais mais utilizados como encapsulantes compreendem (SHAHIDI e HAN, 1993):

- carboidratos: amidos, dextrinas, xarope de milho, sacarose;
- celuloses: carboximetilcelulose, etil, metil, acetil e nitro-celulose;
- gomas: goma arábica, guar, alginato de sódio, carragena;
- lipídeos: cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas;
- proteínas: glúten, caseína, isolado protéico de soro de leite (WPI), gelatina e albumina e algumas fontes alternativas como a quitosana.

Os polímeros são especialmente adequados como material formador de parede de sistemas de liberação controlada devido ao fato de sua mobilidade poder ser modificada, onde ingredientes ativos e modificadores apropriados podem ser incorporados física ou quimicamente. Em geral, polímeros naturais têm pouca ou nenhuma toxicidade e apresentam diversas aplicações que incluem atuar como membranas ou envelopes e como matrizes nas quais o ingrediente ativo é disperso (JACOBS e MASON, 1993).

A liberação do conteúdo das microcápsulas pode ocorrer através da ruptura mecânica, da ação da temperatura, pela ação do pH, pela solubilidade no meio, através da biodegradação e também por difusão (SANTOS *et al.*, 2001). A difusão é regida por forças atrativas intermoleculares e por um gradiente de concentração, controlada pela solubilidade do componente encapsulado na matriz e pela sua permeabilidade através desta. Além disso, a difusão de um soluto pode ser influenciada pelo grau de entumescimento da cápsula, causado pela adsorção de água ou outro solvente provocando o aumento dos poros e dos espaços livres. Não existe um único tipo de curva de liberação que satisfaça todas as necessidades e, além disso, os dados de liberação reais tendem a se desviar das curvas de liberação pretendidas.

Existem quatro modelos teóricos de curva de liberação que podem ser utilizados. Porém, não existe um único tipo de curva que satisfaça todas as necessidades e, além disso, os dados de liberação reais tendem a se desviar das curvas de liberação desejadas.

O primeiro modelo considera a existência de um mecanismo de disparo, que inicia a liberação. Outros fatores, entretanto, podem ser responsáveis por este disparo, tais como calor, luz, pH e degradações químicas da cápsula. O segundo mecanismo assume que a parede da cápsula atua como um reservatório, supondo-se que a taxa de liberação seja constante. O terceiro modelo pressupõe a migração através da parede, mas considera um efeito adicional de liberação ocasionado por pequenos rompimentos na estrutura da cápsula. O quarto modelo considera a parede como uma membrana semipermeável e seletiva a diferentes pesos moleculares (THIES, 1995).

Os métodos utilizados para microencapsulação de ingredientes ativos podem ser divididos em (THIES, 2003; JACKSON e LEE, 1991):

- métodos físico-químicos: coacervação simples, coacervação complexa, separação por fase orgânica, envolvimento lipossômico, pulverização em agente formador de reticulação, evaporação do solvente;
- métodos físicos: *spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, leite fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização;
- métodos químicos: polimerização in situ, polimerização interfacial, inclusão molecular.

A escolha da técnica depende das propriedades do ativo e do tipo de partícula desejada, conforme a sua capacidade de proteção e liberação. Além disso, deve-se avaliar sua finalidade, como morfologia e estabilidade, e os parâmetros envolvidos na manufatura do produto e seu custo.

Neste capítulo, as técnicas de coacervação complexa e liofilização são abordadas com maiores detalhes, pois ambas foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

2.2.1 *Microencapsulação através do processo de coacervação complexa*

A coacervação é uma tecnologia de microencapsulação única e promissora devido às possibilidades de liberação controlada baseada no estresse mecânico, temperatura ou liberação modulada (GOIUN, 2004). É geralmente utilizada para encapsular óleos aromáticos (NORI *et al.*, 2011; DUCCEL *et al.*, 2004), mas também pode ser adaptada para encapsulamento de óleos de peixe, vitaminas, conservantes e enzimas.

A palavra “coarcegado” é derivada do Latim, onde “co” significa união e “acervus” agregação de partículas (MENGER *et al.*, 2000). Também conhecida como separação espontânea de fases, o termo coacervação foi introduzido pela primeira vez na química por Bungenberg de Jong e Kruyt em 1929 para descrever o fenômeno de agregação macromolecular (SUAVE *et al.*, 2006). Devido à formação de partículas bem pequenas com recheio uninuclear, como visto na Figura 2, o processo de coacervação é considerado como a técnica original e verdadeira de microencapsulação (SHAHIDI e HAN, 1993; THIES, 2003), onde é realizada uma separação de fases de um ou vários hidrocolóides a partir da solução original e a subsequente deposição do coacervado recém-formado em torno do ingrediente ativo suspenso ou emulsionado no mesmo meio da reação (GOUIN, 2004; NORI *et al.*, 2011).

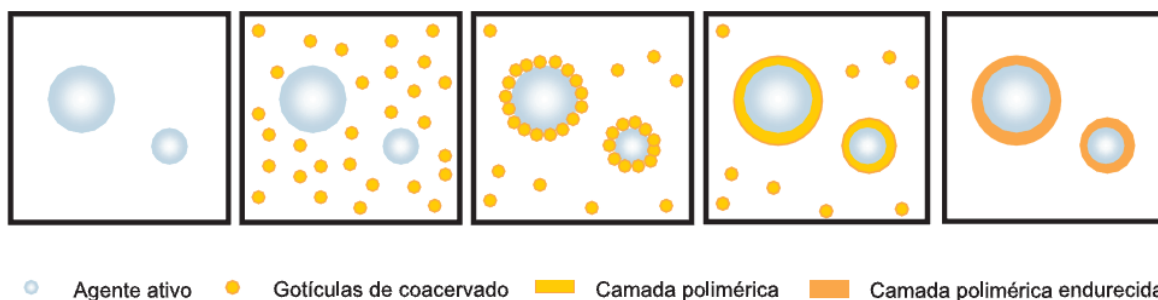


Figura 2: Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação.

Fonte: SUAVE *et al.* (2006).

O método é utilizado por diversos segmentos, incluindo o farmacêutico, alimentício, agropecuária, químico e cosmético para a veiculação de diversos tipos de material ativo (aromas, enzimas, fármacos e tintas) com aplicações variadas (SCHMITT *et al.*, 1998; KRUIF *et al.*, 2004). Alguns exemplos de aplicações industriais utilizando micropartículas coacervadas são: a purificação de macromoléculas, substituição de gordura em produtos light, embalagens biodegradáveis e biomaterial para a utilização na área médica.

A coacervação é baseada em mecanismos físico-químicos complexos por envolver muitas variáveis como: taxas de agitação, relação núcleo/parede, características do polímero e do núcleo, taxas de adição e resfriamento. Existem poucas informações sobre o mecanismo de formação ou sobre a estrutura dos coacervados, o que restringe a predição das propriedades tecnofuncionais dos encapsulados e de seu processamento (SCHMITT *et al.*, 2000).

A formação dos complexos de biopolímeros deve-se principalmente às interações eletrostáticas que dependem do grau de ionização dos polímeros e, portanto, do pH. Coacervar depende sobretudo, da carga líquida do sistema, sendo conseqüentemente influenciada pela estequiometria, por parâmetros estruturais (conformação e comprimento de cadeia apropriados) dos polímeros e pelas condições do meio como pH, força iônica, temperatura e natureza dos reagentes. Essas variáveis estão diretamente relacionadas com a eficiência na produção das microcápsulas e com características variadas de estrutura, tamanho e porosidade (DUCEL *et al.*, 2004; YEO *et al.*, 2005).

Em geral o processo de coacervação complexa consiste em três estágios (DESAI e PARK, 2005):

A) formação de um sistema trifásico quimicamente imiscível: um solvente, um material de cobertura e um material de recheio. O material de parede é dissolvido no veículo e o material do núcleo é disperso nessa solução, com a qual é imiscível;

B) deposição do material polimérico líquido, carregado com carga oposta ao da espécie coloidal, que formará a cobertura;

C) solidificação da cobertura. As cápsulas podem então ser secas, obtendo-se um pó, ou ser usadas diretamente como uma suspensão no líquido carregador.

A Figura 3 apresenta um esquema geral do processo de coacervação complexa, onde a gelatina é empregada como um dos constituintes do sistema.

A coacervação complexa pode ser induzida em sistemas onde estão dispersos dois colóides hidrofílicos com cargas elétricas opostas. A neutralização de cargas positivas de um dos colóides pela carga negativa do outro é usada para ocasionar a separação da fase do complexo coacervado (SCHERI *et al.*, 2003). Esta técnica consiste em uma separação espontânea de fases, pela formação de um complexo insolúvel entre dois ou mais polímeros. Para a ocorrência do fenômeno, são necessárias duas condições essenciais: os biopolímeros devem estar juntos em solução e as cargas opostas entre as suas cadeias devem estar em quantidades estequiométricas.

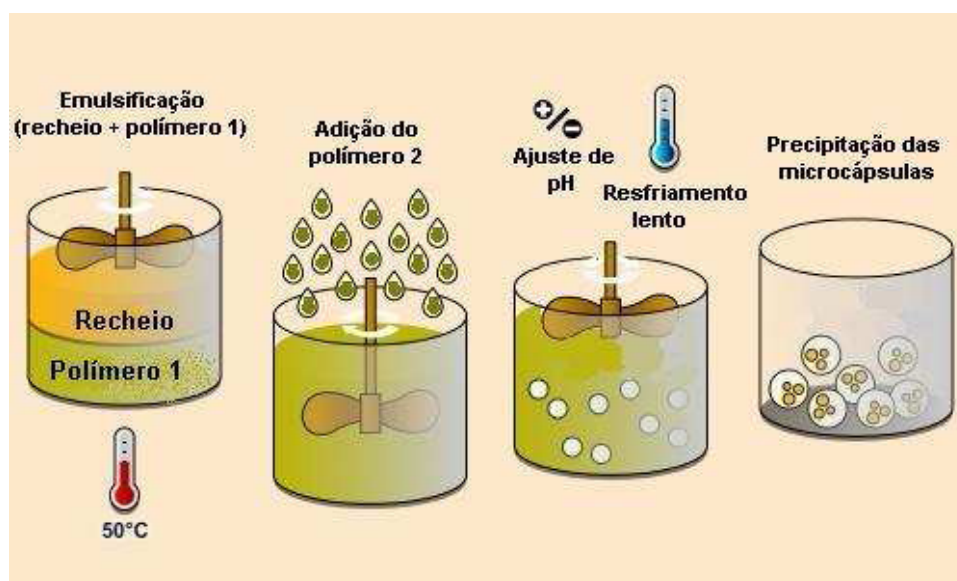


Figura 3: Modelo esquemático de microencapsulação por coacervação complexa.

A mistura de soluções poliméricas pode resultar em dois tipos de interação: segregativas, nas quais ocorre repulsão entre as cadeias de biopolímeros (incompatibilidade) ou associativas, nas quais ocorre atração entre os polímeros (complexação) (SCHMITT *et al.*, 1998; KRUIF *et al.*, 2004).

A precipitação dos complexos formados pela coacervação ocorre por interações eletrostáticas, a partir da mistura de soluções de substâncias com cargas opostas. Assim, há a formação de duas fases distintas: uma rica em polímeros, que contém o coacervado precipitado, e outra pobre em polímeros, na qual permanece o solvente da solução (SCHMITT *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2000; FITZSIMONS *et al.*, 2008).

As características dos polímeros empregados, do recheio e do complexo formado influenciam a eficiência de microencapsulação. Fatores como tensão superficial do sistema, capacidade de adsorção dos polímeros ao recheio, polaridade do recheio e viscoelasticidade do complexo têm grande importância na formação da parede das microcápsulas e, por esta razão, influenciam a eficiência do complexo em reter o material de recheio. Normalmente, compostos líquidos ou particulados hidrofóbicos e partículas sólidas com baixa solubilidade são microencapsulados com sucesso pela técnica de coacervação complexa. No caso de microencapsulação de recheios hidrossolúveis, essa técnica é dificilmente aplicada, uma vez que o recheio ficaria dissolvido na solução polimérica (SCHMITT *et al.*, 1998; KRUIF *et al.*, 2004). Algumas condições físicas como temperatura, velocidade e tempo de agitação e pressão podem influenciar na formação e estabilidade dos coacervados produzidos (SCHMITT *et al.*, 1999; GOUIN, 2004).

Os biopolímeros mais indicados para a utilização na coacervação complexa são aqueles que apresentam propriedades coloidais hidrofílicas, densidades de cargas adequadas e cadeias lineares. Alguns exemplos de biopolímeros passíveis de serem utilizados são: gelatinas, alginatos, albuminas, caseína, ágar, gomas e pectinas (THIES, 1995; JACOBS e MASON, 2003). Diversos sistemas de materiais de parede já foram avaliados no processo de coacervação complexa, mas o mais estudado e compreendido é o sistema gelatina-goma arábica (GOUIN, 2004; QV, ZENG e JIANG, 2011).

Dependendo da aplicação requerida, as micropartículas coacervadas podem ser secas, para que se estenda o seu tempo de estocagem e para sua utilização em produtos desidratados. Assim, podem ser utilizados os seguintes métodos de secagem: liofilização,

secagem em estufa, remoção da água por solventes e secagem em condições ambientes. Um problema desses métodos é que a maioria não permite a obtenção de partículas individualizadas, interferindo no tamanho do produto final e nas propriedades de liberação do recheio. Já com o uso de secagem em *spray dryer*, é possível a obtenção de partículas individualizadas, porém, a baixa resistência física da parede restringe a aplicação desse processo para a secagem (THIES, 1995).

2.2.2 Microencapsulação através do processo de liofilização

A liofilização ou *freeze-drying* consiste na secagem de um produto previamente congelado no qual a maior parte do solvente é removido por sublimação, sem a passagem pela fase líquida. Geralmente, este solvente é a água (POLAK e PITOMBO, 2011). Este processo envolve três etapas principais: congelamento, secagem primária e secagem secundária. Depois de congelada, a água é removida do material por sublimação (secagem primária). Em seguida, a água que continua descongelada, remanescente da primeira etapa, é então removida por dessorção através da redução de pressão. Além de ser utilizada no processo de secagem, a liofilização pode ser empregada como método de encapsulação de um material ativo. Diferente da coacervação, o processo de microencapsulação por meio da liofilização é mais simples, visto que é feita apenas a secagem de uma emulsão do núcleo no material de parede.

Esta metodologia é uma das melhores técnicas para produção de produtos desidratados de alta qualidade. Este processo de secagem possui uma série de vantagens que o torna o método preferido para a conservação de materiais biológicos (PITOMBO, 2001). O material permanece congelado até estar completamente seco, portanto elimina-se o encolhimento e a migração dos constituintes dissolvidos, ou seja, o processo retém a forma original do material. Assim, essa técnica é indicada para desidratar alimentos líquidos como sucos, para a secagem de alimentos sólidos como morango e vegetais. Ainda, modificações físico-químicas são inibidas, minimizando-se a perda de constituintes voláteis ou de atividade biológica. O produto liofilizado possui uma textura porosa, sendo prontamente reconstituído, quando imerso em água, ao seu respectivo tamanho e forma originais e possui boa estabilidade durante o armazenamento, resultando em longo tempo de vida-de-prateleira (PITOMBO, 1998; MARQUES *et al.*, 2006).

As desvantagens da liofilização estão nos altos custos operacionais, fixos e iniciais e no tempo elevado do processo. Portanto, o uso da técnica na indústria de alimentos está

restrito aos produtos de alto valor agregado, como café, chá e infusões, ingredientes para comida pronta, como, legumes, macarrão, carne, pescado, além de várias ervas aromáticas (RATTI, 2001).

A liofilização está baseada no ponto triplo da água, onde há a coexistência dos três estados físicos (sólido, líquido e gasoso) na temperatura de aproximadamente 0°C e na pressão de 610 Pa. Assim, é possível a passagem direta do estado sólido para o gasoso, conhecida como sublimação, como demonstrada na Figura 4 (MARTINS *et al.*, 2011).

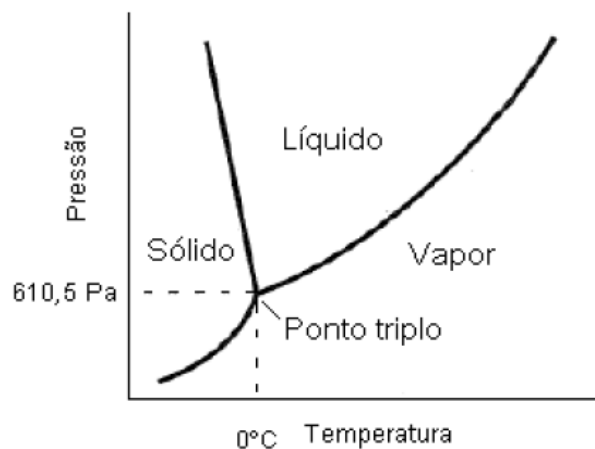


Figura 4: Diagrama de fases da água.

Fonte: FELLOWS (2006)

O processo de liofilização envolve três estágios, como esquematizado na Figura 5 e apresentados a seguir.

- 1) Congelamento: etapa principal, determinante para a distribuição de tamanho e formato dos poros. O material a ser processado deve ser resfriado abaixo da temperatura de solidificação e o congelamento deve ser preferencialmente rápido para manter-se a estrutura do material intacta, conservando a forma original (BOSS *et al.*, 2004).
- 2) Secagem primária: remoção do solvente por sublimação, através da ação de vácuo e calor. Uma quantidade significativa de calor latente de sublimação é consumida quando as moléculas de água sublimam e passam para a fase vapor. Conseqüentemente, a temperatura do produto congelado é reduzida, fazendo-se necessário o fornecimento de calor ao composto, que pode ser provido por condução, radiação ou convecção.

- 3) Secagem secundária: o solvente que não estava congelado é removido por dessecamento. A camada de água remanescente é removida por aquecimento do produto a vácuo (BOSS *et al.*, 2004).

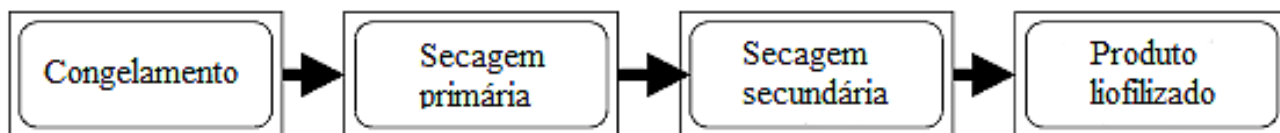


Figura 5: Estágios da liofilização.
Fonte: BOSS *et al.* (2004).

As cápsulas obtidas através da técnica de liofilização apresentam geralmente formatos irregulares, diferentemente de outras técnicas, como pode ser visualizado na Figura 6 (FANG e BHANDARI, 2010).

Tecnologia de Encapsulação	Ilustração das características
Spray drying	<p>Polifenol (insolúvel em água) Matriz</p> <p>Polifenol (solúvel em água) Matriz</p>
Coacervação	<p>Polifenóis Hidrocolóide</p>
Lipossomas	<p>Dupla camada de fosfolípide Polifenol insolúvel em água Polifenol solúvel em água Região Hidrofílica Região Hidrofóbica</p>
Inclusão	<p>Quercetina Cavidade Hidrofóbica Beta-ciclodextrina</p>
Coocristalização	<p>Cristais de açúcar Polifenóis</p>
Nanopartículas	<p>Polifenol insolúvel em água na fase óleo Fase aquosa</p>
Liofilização	<p>Polifenol (insolúvel em água) Matriz</p> <p>Polifenol (solúvel em água) Matriz</p>
Encapsulamento de leveduras	<p>Células de leveduras Polifenóis</p>
Emulsão	<p>Fase óleo Agente emulsificante Polifenol solúvel em água na fase aquosa</p> <p>Fase aquosa Agente emulsificante Polifenol solúvel em óleo na fase óleo</p>

Figura 6: Ilustração das características das cápsulas de polifenóis produzidas por vários processos de encapsulação.
Fonte: FANG e BHANDARI (2010).

2.2.3 *Materiais de parede*

Características físico-químicas do polímero de parede, como a solubilidade, peso molecular, transição vítrea, cristalinidade, formação de filme e difusividade, são parâmetros importantes na escolha de um polímero de parede desejado. Os biopolímeros mais empregados para produzir microcápsulas e hidrogéis são as proteínas e os polissacarídeos comumente utilizados são as gomas. A definição de goma é baseada em características físicas e na origem dos materiais em questão. Geralmente, podem ser definidas como moléculas de alta massa molecular com características hidrofílicas ou hidrofóbicas que, usualmente, possuem propriedades coloidais (PASQUEL, 2001), capacidade de produzir géis ou soluções viscosas. Normalmente, utiliza-se o termo para referir-se a polissacarídeos ou seus derivados, obtidos a partir de plantas (exsudados, sementes, algas) ou por processamento microbiológico.

As gomas são inertes em termos nutricionais e usadas na indústria de alimentos como espessantes e estabilizantes, para suspender partículas e impedir a formação de cristais de gelo, onde a grande maioria é composta de carboidratos naturais (goma guar, goma arábica) ou ainda dos modificados quimicamente (carboximetil celulose). São empregadas também na medicina, na produção de papel, perfurações de petróleo (na lubrificação da broca e para emulsionar a água usada na recuperação secundária) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

As gomas de sementes permitida em alimentos são as chamadas galactomananas e apresentam uma cadeia principal formada por manoses e cadeias laterais de galactoses, responsáveis pela solubilidade dos polímeros. Estes polímeros são pouco afetados pela acidez, em decorrência da ausência de cargas em baixos valores do pH.

A goma guar é um polissacarídeo natural, não-iônico e de alta massa molar derivado das sementes da *Cyamopsis tetragonolobus* (família Leguminosae), retirada do endosperma do feijão. Sua importante propriedade é a capacidade de se hidratar rapidamente em água fria e atingir alta viscosidade (HUANG *et al.*, 2006). É usada como espessante de sopas, alimentos pobres em calorias e para aumentar o poder geleificante de outros espessantes. O resíduo de sua semente, depois de extraída a goma, é bastante valioso para a utilização em rações animais. Além dessas vantagens, este polímero é de baixo custo, além de ser um bom espessante e estabilizante. Estruturalmente, consiste de uma cadeia principal de unidades de manose com ligações β -(1→4), apresentando

cadeias laterais constituídas por unidades de galactose com ligações α -(1→6) (REDDY e TAMMISHETTI, 2004).

Devido a esta característica, a goma guar possui propriedades reológicas notáveis, sendo muito usada principalmente na indústria alimentícia, tanto na sua forma nativa quanto modificada. É empregada em bebidas como estabilizantes ou ainda em sorvetes, pudins e coberturas para saladas, como espessante. Ainda, este polímero pode ser usado na indústria farmacêutica como um agente de transporte retardador de liberação de drogas altamente solúveis em água, como tartarato de metoprolol, amplamente utilizado no tratamento de angina, arritmias e hipertensão (KRISHNAIAH *et al.*, 2002).

A carboximetil celulose sódica (CMC) surge a partir de celulose e monocloroacetato de sódio, correspondente a um éter de celulose que possui a estrutura baseada no polímero de β (1→4)-D-glucopiranosose da celulose. Resulta do tratamento da celulose, via reação de Williamson, que se dá através de solução de hidróxido de sódio (NaOH) e do monocloroacetato (ClCH₂COONa), resultando na substituição parcial de grupos hidroxilas da glicose pelo grupo –CH₂COOH, como mostra a Figura 7 (O.H. LIN *et al.*, 2005).

Além de ser aquassolúvel, suas soluções apresentam viscosidade em elevadas faixas de valor do pH. Funcionam em grande escala, como estabilizantes em sorvetes, proporcionando boa textura e corpo com boas propriedades de fusão e em alimentos dietéticos são empregados como "agentes de corpo". Na área farmacêutica, é usado em processos de encapsulação e liberação de princípios ativos; na indústria de cosméticos, como agente emulsificante e, na área agrícola, como agente de liberação de pesticidas e nutrientes (PASQUEL, 2001). Conforme Amorim *et al.* (2005), a CMC apresentou boas propriedades reológicas ao ser incorporada a fluidos de perfuração.

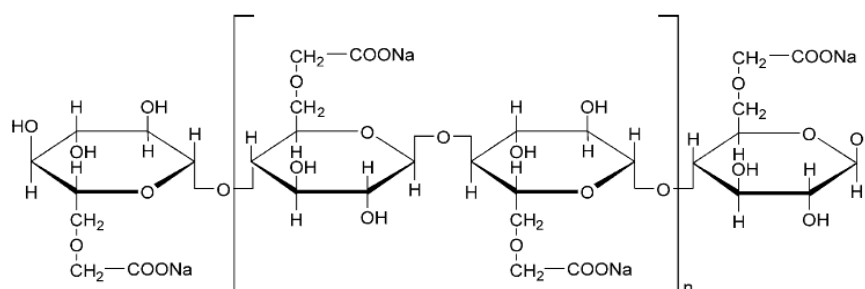


Figura 7: Estrutura da molécula de CMC.

Fonte: O.H. LIN *et al.* (2005).

A soja constitui uma excelente fonte de proteína para a alimentação humana e animal. Além de apresentar cerca de 40% de proteína em seus grãos, estas são de elevado valor nutritivo (SGARBIERI, 1996).

A proteína isolada de soja (PSI) é produzida a partir do farelo de soja desengordurada por extração alcalina seguida de precipitação ácida e contém mais de 90% de proteínas. Esse produto tem sido utilizado para a microencapsulação de hidrolisado de caseína pela técnica de *spray drying* (ORTIZ *et al.*, 2009) e possui ponto isoelétrico em pH 4,5, bastante semelhante ao da gelatina, apresentando um grande potencial para ser utilizado como material de parede para microencapsulação de aromas através da coacervação complexa (JUN-XIA *et al.*, 2011).

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo será abordada a metodologia utilizada para a produção das microcápsulas, detalhando-se as matérias-primas, reagentes, equipamentos e análises empregadas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e no Laboratório de Tecnologia em Engenharia Química (LATEQ) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS. A análise referente à microscopia eletrônica de varredura foi feita no Laboratório de Design e Seleção de Materiais (LdSM) no Departamento de Engenharia de Materiais da UFRGS.

3.1 Matéria-prima e reagentes

A proteína isolada de soja (PIS) utilizada neste trabalho foi cedida pela empresa Solae Company (Esteio, RS, Brasil). As gomas guar e carboximetilcelulose (CMC) foram cedidas pela empresa Hexus Foods (Portão, RS, Brasil). O sulfato de ferro heptahidratado, o ácido clorídrico e o metabissulfito de sódio foram obtidos da empresa Casa da Química (Diadema, SP, Brasil). Foi empregado o hidróxido de sódio da empresa Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Para o teste de análise sensorial, foram utilizadas maçãs do tipo Argentina da safra de 2011 adquiridas em mercado local de Porto Alegre.

3.2 Hidratação das gomas

Para realizar a técnica da coacervação complexa, antes da mistura dos agentes encapsulantes, fez-se necessário a hidratação das gomas guar e CMC. Para tanto, às gomas adicionou-se água destilada e deionizada na proporção de 1:96 m/v, (goma:água). A hidratação das gomas ocorreu em um período de 24 horas à temperatura ambiente (20°C).

3.3 Microencapsulação através da coacervação complexa

O material a ser encapsulado correspondeu a uma emulsão de sulfato de ferro heptahidratado em óleo de soja (Cargill, Brasil) na proporção de 1:46. Essa mistura foi então agitada em agitador de soluções tipo vórtex (Phoenix Lufenco, modelo AP 56, Brasil) no modo contínuo a 2.000 rpm por 10 minutos.

A razão de proteína e gomas foi fixada em 3:1:1 (PIS:CMC:Guar), conforme Mendanha *et al.* (2009), Rascón *et al.* (2011) e Jun-xia *et al.* (2011) com algumas modificações. A

solução de proteína isolada de soja em água deionizada à 40°C (9,375 g/200 mL) foi alcalinizada para pH 8 com uso do reagente hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, a fim de maximizar a solubilidade da proteína. Em seguida, a essa solução de proteína isolada de soja, foi adicionada à emulsão de óleo-ferro através de homogeneização em agitador ultraturrax (IKA, modelo T18B, Brasil) a 11.000 rpm durante 2 minutos.

As gomas previamente hidratadas foram lentamente adicionadas a esta emulsão, com auxílio de um agitador magnético (Tecnal, modelo TE-0851, Brasil) para promover uma melhor adesão do material. Em seguida, para promover a coacervação, o pH foi ajustado para 4,0 com ácido clorídrico (HCl) 0,5 M. Cabe ressaltar que durante todo esse procedimento a temperatura foi mantida a 40°C.

Após o abaixamento do pH, a temperatura de todo o sistema foi reduzida lentamente para 10°C com auxílio de um banho de gelo sob agitação magnética contínua. O material coacervado foi armazenado em refrigerador doméstico a 7°C por 24 horas para promover a decantação. Finalmente, a amostra foi congelada em um ultrafreezer (Coldlab, modelo CL 120-40, Brasil) a -40°C durante 24 horas.

A secagem do material foi realizada em um liofilizador (Terroni, modelo LS 6000, Brasil), como mostrado na Figura 8, utilizando-se os frascos de borossilicato de boca larga com 75 mm de diâmetro, conectados ao equipamento principal através dos *manifolds* em borracha nitrílica. A temperatura do liofilizador permaneceu em aproximadamente -40°C e a pressão manteve-se entre 300 e 350 µmHg.



Figura 8: Imagem do liofilizador de bancada utilizado para secagem do material.

O controle de tempo necessário para a secagem utilizando o método de liofilização é feito a partir do acompanhamento da massa das amostras. Para isso, os frascos contendo o material congelado foram pesados antes da inicialização do processo. Durante o procedimento, foi realizado um acompanhamento de pesagem a cada duas horas até as amostras atingirem massa constante, indicando que a liofilização foi concluída. O material resultante encontrou-se em forma de pó. Na Figura 9 está apresentado um fluxograma do processo de produção das microcápsulas.

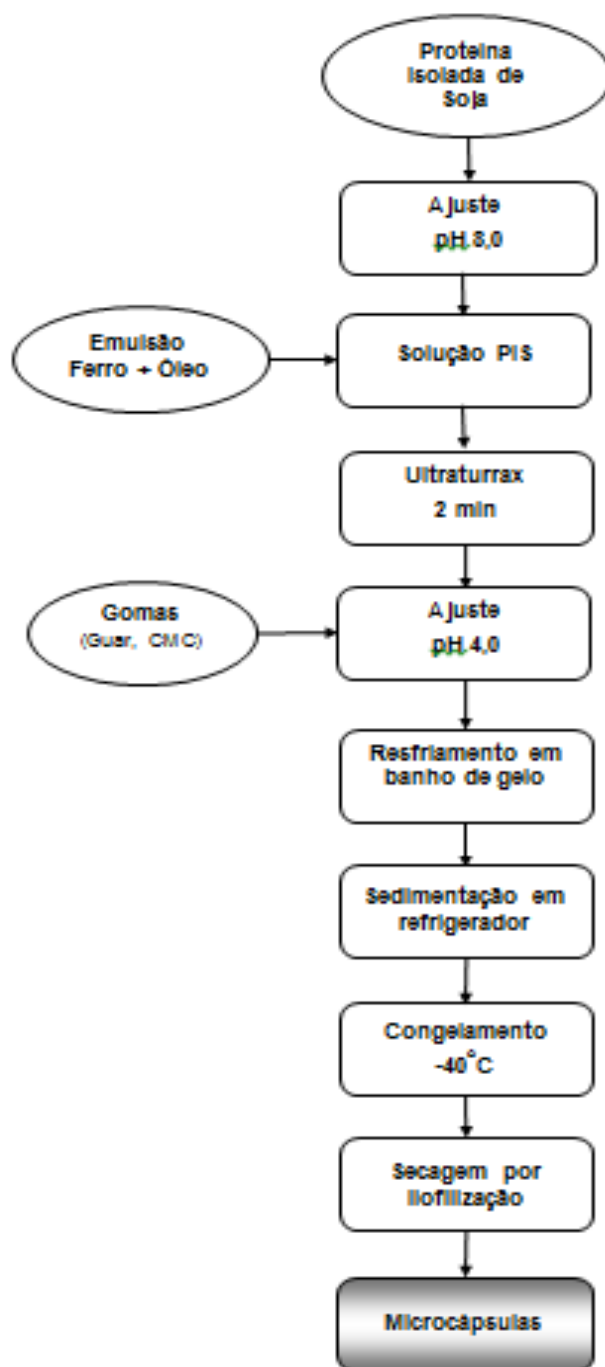


Figura 9: Diagrama ilustrativo da metodologia utilizada para encapsulação do ferro e produção das microcápsulas através da coacervação complexa.

3.4 Caracterização das microcápsulas

As cápsulas foram avaliadas quanto à morfologia através da microscopia ótica e da microscopia eletrônica de varredura (MEV), bem como tamanho de partícula, temperatura de transição vítrea (T_g) e quantificação de ferro presente.

3.4.1 Microscopia ótica

A microscopia ótica foi utilizada para constatar a formação das microcápsulas e seu formato. Para isso, uma pequena quantidade de material liofilizado foi disperso em lâminas de vidro e recobertos por lamínulas, sendo visualizado em magnitude de 400x em microscópio ótico (Opton, modelo TNB-04D, Brasil).

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das cápsulas e do ferro foi analisada através do emprego da MEV. Para tanto, as amostras foram fixadas em fita adesiva metálica dupla face e aderidas em *stubs* também metálicos, não sendo necessário o recobrimento com metal. Em seguida, a observação das amostras foi feita em um microscópio eletrônico de varredura de bancada (Hitachi, modelo TM 3000, Japão) com voltagem de 15kV.

3.4.3 Temperatura de transição vítrea (T_g)

A transição vítrea é a transição de fases comumente observada em alimentos, que consiste na mudança de fase de um estado sólido-vítreo para um estado amorfo-gomoso e está relacionada com a preservação de fatores de qualidade, processabilidade, estocagem e estabilidade destes produtos.

A técnica de calorimetria diferencial de varredura foi utilizada para determinar a temperatura de transição vítrea das microcápsulas coacervadas conforme Ortiz *et al.* (2009) com algumas modificações. As amostras foram acondicionadas em micropanelas de alumínio hermeticamente seladas e guardadas em dessecador durante 24 horas. Em seguida, o material foi analisado em equipamento DSC (Pekin Elmer, modelo DSC 6000, Estados Unidos) utilizando-se uma micropanela vazia como referência, com atmosfera de ar sintético a uma vazão de $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ na taxa de aquecimento igual a $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, elevando-se a temperatura de 20°C a 200°C .

3.4.4 Determinação do teor de ferro

A quantidade de ferro presente nas cápsulas do material coacervado foi determinada através da espectrofotometria UV-visível (Pró-Análise, modelo UV-160, Brasil) com o auxílio de um kit de teste de ferro chamado Spectroquant (Merck, Darmstadt, Alemanha). Esse método de determinação baseia-se na reação do Ferrospectral [3-(2-piridil)-5,6-bis(4-acido fenilsulfônico)-1,2,4-triazina, sal dissódico] com complexos de ferro e íons de ferro. A reação do ferro com Ferrospectral forma complexos de coloração azul-violeta que são medidos no comprimento de onda de 565 nm. Para que ocorra a reação desejada, em 5 mL da amostra a ser quantificada são adicionados 3 gotas do reagente Ferrospectral, e após 3 minutos de reação, faz-se a leitura em espectrofotômetro. Para fazer a leitura das amostras, foi construída, previamente a curva padrão contendo cinco diferentes e conhecidas concentrações de ferro em água Milli-Q (0,1; 0,5; 1; 2 e 2,5 mg.L⁻¹).

Para quantificar o ferro presente nas amostras, foi utilizada a seguinte metodologia: dissolução de 1,5 g de coacervado em 100 mL de água Milli-Q, agitação em vórtex durante 10 minutos a 200 rpm (Phoenix Luferco, modelo AP 56, Brasil), centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos (Cientec, modelo CT 5000R, Brasil) e filtração a vácuo do sobrenadante. As etapas de centrifugação e filtração foram imprescindíveis na clarificação do sobrenadante para leitura espectrofotométrica.

3.5 Análise sensorial

Para verificar a eficácia do método de microencapsulação empregado, assim como o efeito de atenuação de cor e sabor de ferro, foi feita uma análise sensorial de um produto contendo as micropartículas como fonte de ferro e outro contendo ferro livre na forma de sulfato de ferro heptahidratado. Foi preparado um suco utilizando-se uma maçã para cada 250 mL de água, com maçãs adquiridas do mercado local de Porto Alegre. Primeiramente, as maçãs foram lavadas em água corrente, a logo após as mesmas foram descascadas e trituradas em liquidificador doméstico. O material obtido na trituração foi filtrado em uma peneira para obtenção do suco.

O material liofilizado e o ferro na forma de sulfato de ferro heptahidratado foram adicionados ao suco, com base na quantidade de ferro máxima para alimentos enriquecidos estabelecida pela Anvisa que corresponde a 15% da IDR (2,10 mg) para cada 100 mL de produto final. Metabissulfito de sódio foi acrescentado ao suco na proporção de 4 mg para cada 100 mL, a fim de evitar o escurecimento enzimático do mesmo.

A análise sensorial foi feita utilizando uma escala hedônica de sete pontos estruturados variando de 1–‘Desgostei muitíssimo’ a 7–‘Gostei muitíssimo’, na qual os atributos avaliados foram aparência, odor, consistência, sabor e aceitação. O painel foi composto de 20 provadores não-treinados, onde foram oferecidas três porções para cada: suco sem ferro (controle), suco adicionado de sulfato de ferro e suco adicionado de coacervado. A codificação das amostras foi feita com três dígitos aleatórios e foram servidas resfriadas (7°C) em copos de plástico de 30 mL. A ficha utilizada para esta análise encontra-se no Apêndice A.

3.6 Análise estatística

Os resultados de cada atributo provenientes da análise sensorial foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com fator duplo sem repetição e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Essa análise permite determinar as significâncias e os efeitos entre as amostras e julgadores, a partir dos resultados da escala hedônica.

4 Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos através do desenvolvimento do presente trabalho. Primeiramente, serão apresentados os resultados de caracterização das cápsulas e em seguida os resultados da análise sensorial.

4.1 Caracterização das microcápsulas

As cápsulas, preparadas conforme item 3.3, foram avaliadas morfológicamente através das análises de microscopias ótica e eletrônica de varredura, temperatura de transição vítrea e conteúdo de ferro presente nas partículas.

4.1.1 Microscopia ótica

O coacervado foi observado pela microscopia ótica a fim de avaliar seu formato e constatar a formação das micropartículas. A Figura 10 apresenta as fotomicrografias obtidas por esta técnica. Como pode ser visto nesta figura, as cápsulas apresentam formato e superfície irregulares, estando ligadas umas às outras através de pontes de pequena espessura do material, formando uma espécie de cadeia.

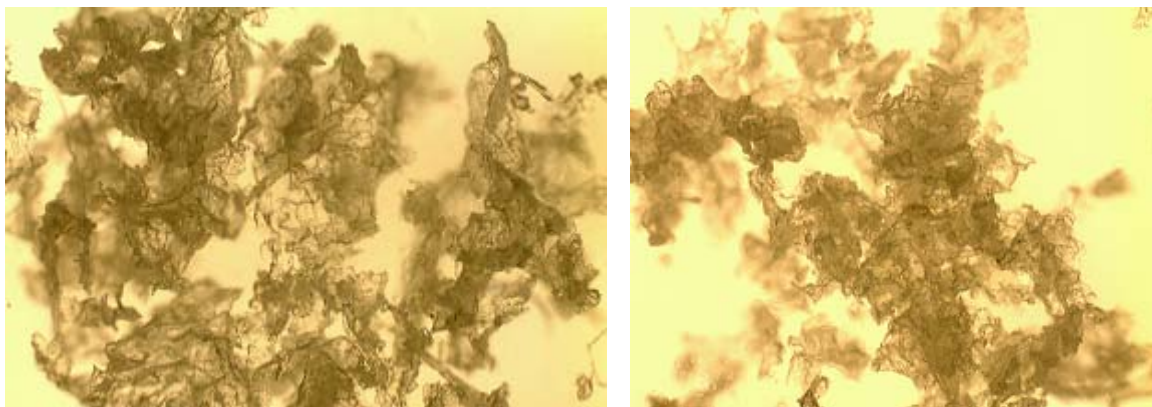


Figura 10: Fotomicrografias obtidas pela microscopia ótica das microcápsulas coacervadas-liofilizadas (100x).

A fim de comparar a coacervação com a técnica da liofilização para microencapsulação, foi analisada a estrutura das microcápsulas preparadas pelos dois processos. A Figura 11 apresenta as fotomicrografias das microcápsulas liofilizadas. Observa-se que as cápsulas preparadas pela liofilização apresentaram superfície mais uniforme e partículas mais isoladas, se comparadas às produzidas pela coacervação.

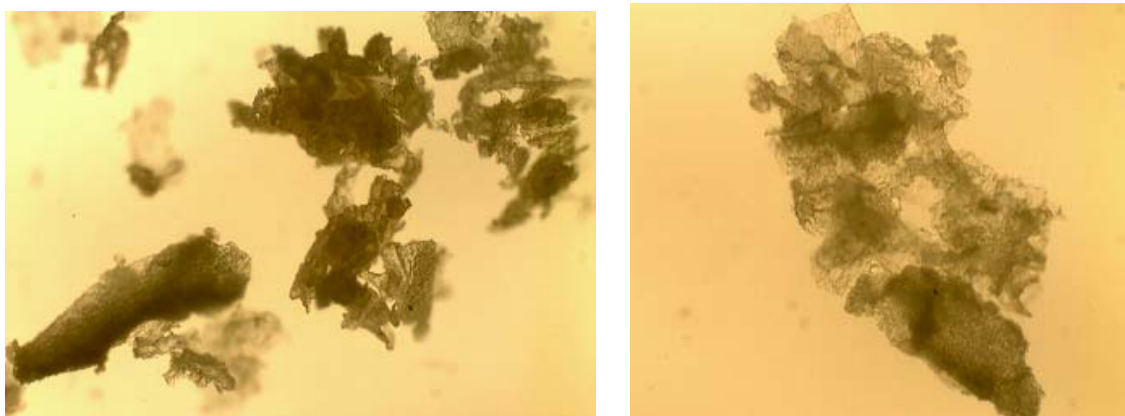


Figura 11: Fotomicrografias obtidas pela de microscopia ótica das microcápsulas liofilizadas (100x).

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A estrutura das microcápsulas obtidas também foi avaliada pela MEV para a determinação aproximada do tamanho das cápsulas e para a observação de sua morfologia. A Figura 12 apresenta as fotomicrografias das microcápsulas coacervadas. Observa-se que o coacervado apresentou estrutura porosa e formato irregular, como já havia sido evidenciado pela análise de microscopia ótica, estando de acordo com os resultados de Duce *et al.* (2004) e Fang e Bhandari (2010). Contudo, esse resultado difere daquele encontrado por Nori *et al.* (2011) ao encapsular extrato de própolis utilizando proteína isolada de soja e pectina como agentes de parede, onde as cápsulas obtidas pela técnica de coacervação complexa exibiram forma circular e tamanhos uniformes, utilizando a liofilização como método de secagem.

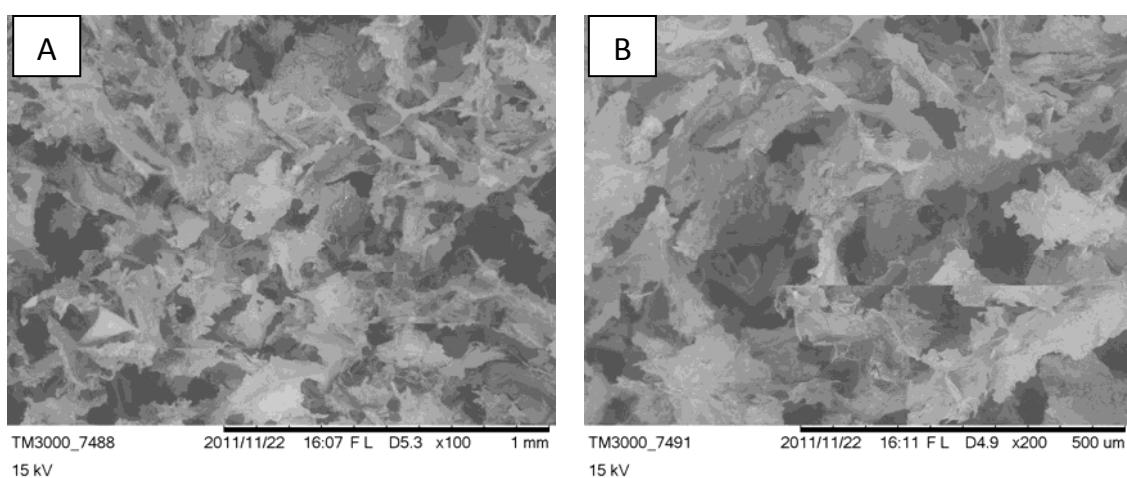


Figura 12: Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas coacervadas em magnitudes de 100 x (A) e 200 x (B).

De acordo com Ducel et al. (2004), a morfologia do coacervado depende da natureza das proteínas utilizadas, massa molecular, do pH e da concentração de polímero. No presente trabalho, a carboximetilcelulose, que foi um dos polímeros estudados, pode ter sido responsável pelo formato estendido e agrupado do material, visto que coacervados com goma arábica apresentam resultados diferentes, encontrando-se cápsulas esféricas, uniformes e isoladas.

A estrutura das cápsulas também pode ser explicada pelo fato da liofilização ter sido empregada para a secagem das amostras, visto que esta técnica emprega condições de operação como o alto vácuo, responsável pela desuniformidade das cápsulas (KAUSHIK e ROOS, 2007; FANG e BHANDARI, 2010). Alternativamente, as microcápsulas podem ser obtidas por atomização (*spray-drying*), que resultaria em cápsulas com formatos esféricos e uniformes.

As partículas formadas apresentaram tamanhos variados, entre 200 e 300 μm , valores esperados para microcápsulas obtidas por coacervação complexa, que de acordo com Favaro-Trindade *et al.* (2008), podem variar de 1 a 500 μm .

4.1.3 Temperatura de transição vítrea (T_g)

Através da análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC), foi determinada a temperatura de transição vítrea (T_g) das cápsulas coacervadas. A T_g encontrada correspondeu a $127,24 \pm 2,02^\circ\text{C}$, e a temperatura inicial do pico endotérmico (T_0) foi $111,8 \pm 5,3^\circ\text{C}$. Os resultados referentes a entalpia não foram reprodutíveis, apesar dos valores de T_g e T_0 apresentarem erros inferiores a 5%.

A T_g do material de parede corresponde a um fator de grande importância, uma vez que está relacionado ao estado físico do material, onde abaixo dessa temperatura, o material encontra-se no estado vítreo e acima dessa, o material está no estado amorfo. No estado vítreo, os materiais são, geralmente, mais impermeáveis do que no estado elastomérico (RÉ, 1998). A liberação do núcleo ocorre quando a estrutura vítrea da matriz sofre transição para um estado gomoso, de maior mobilidade, portanto, o produto possui maior estabilidade quando armazenado abaixo da T_g (SABLANI *et al.*, 2007). Além disso, é importante ressaltar que o uso desse material em produtos alimentícios que sofrerão cocção, possivelmente acarretará na liberação do núcleo, neste caso, do ferro, no meio, o que não é desejável.

O valor da T_g do material coacervado ficou próximo ao valor reportado por Nori *et al.* (2011) de 130,7°C para microcápsulas de própolis, utilizando como agentes de parede proteína isolada de soja e pectina. O termograma da cápsula pode ser visualizado na Figura 13.

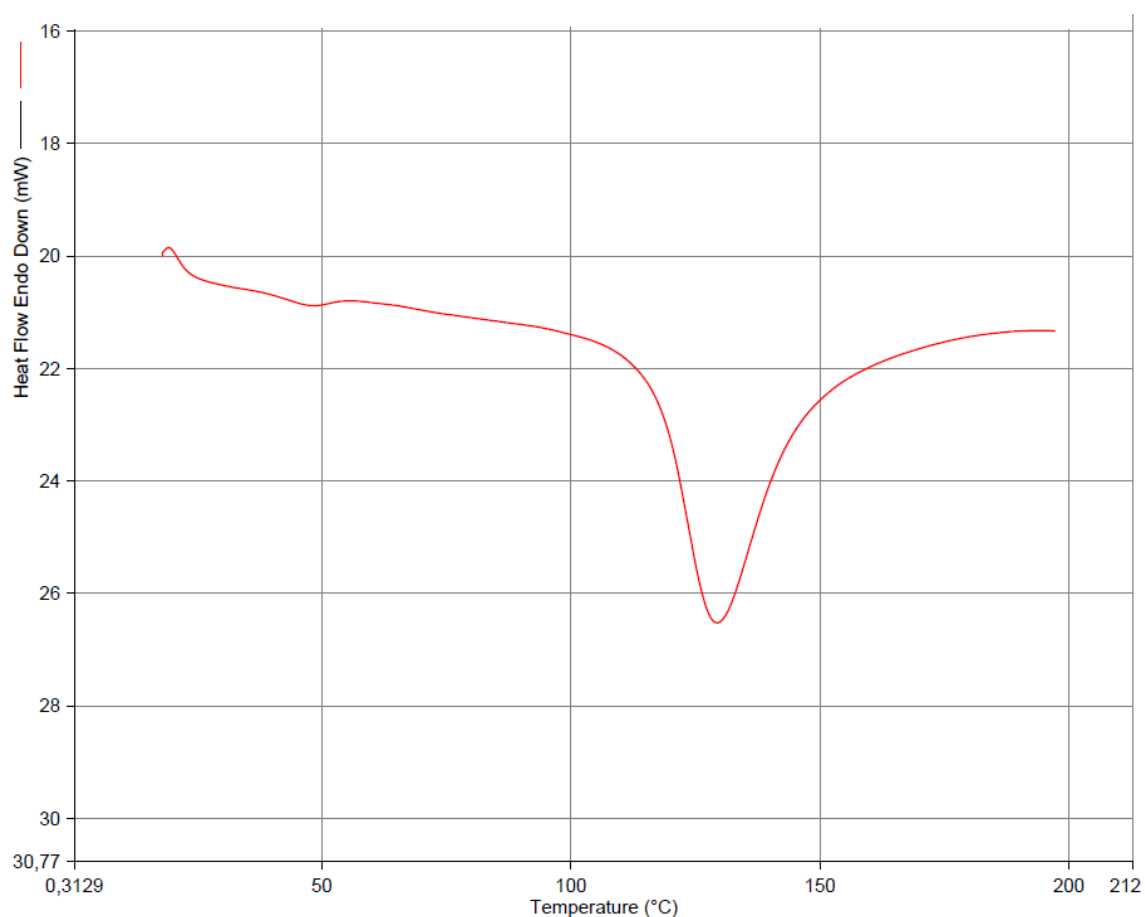


Figura 13: Termograma das cápsulas produzidas pela técnica de coacervação.

4.1.4 Conteúdo de ferro

Os resultados para a quantificação de ferro presente nas microcápsulas podem ser visualizados na Tabela 1. Para tanto, foi preparada uma solução, utilizando o material coacervado, com concentração de ferro equivalente a 8 mg/L. A partir desta, foram preparadas três soluções diluídas (2, 3 e 4 mg/L) e feita a leitura em espectrofotômetro em triplicata. A curva padrão para a conversão da absorbância em concentração está apresentada no Apêndice B.

Tabela 1: Resultados da quantificação de ferro nas microcápsulas ($\lambda = 565$ nm).

Concentração Conhecida (mg/L)	Absorbância	Concentração Calculada (mg/L)
2	1,07 ± 0,01	2,05 ± 0,01
3	0,77 ± 0,01	2,93 ± 0,02
4	1,04 ± 0,02	3,99 ± 0,09

*Média de três repetições ± desvio padrão.

Como os valores encontrados para a concentração das amostras foi muito próximo dos valores esperados, pode-se afirmar que a metodologia utilizada foi boa e que as amostras apresentaram homogeneidade, ou seja, o ferro estava disperso na matriz encapsulante.

Para as amostras de 3 e 4 mg/L foi necessário utilizar o fator de diluição de 1:1, pois essas apresentaram absorbâncias maiores do que 1,200, ou seja, acima do limite de confiabilidade do método (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Outro possível fator de erro encontra-se no método do teste de ferro Spectroquant utilizado. Essa análise possui faixa de detecção entre 0,04 a 4,0 mg/L de ferro. Assim, mesmo que o resultado de concentração encontrada esteja muito próximo ao valor da concentração esperada, não se pode garantir a confiabilidade da amostra de 4,0 mg/L, estando no limite superior de detecção.

4.2 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada com um painel de 20 provadores não-treinados a fim de verificar o efeito da adição do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ microencapsulado pela coacervação nas características sensoriais de um produto alimentício, neste caso, suco de maçã natural. A fim de comparação, foi adicionado o sulfato de ferro na forma livre ao suco e foram avaliados os seguintes atributos sensoriais: aparência, odor, consistência, sabor e aceitação global.

Tabela 2: Resultados avaliação sensorial (teste de aceitação) das amostras de suco de maçã enriquecidas com ferro.

Amostras	Parâmetros sensoriais avaliados				
	Aparência visual (cor)	Odor	Consistência	Sabor	Aceitação global
Controle	5,1 ± 1,7 ^a	5,1 ± 1,3 ^a	5,3 ± 1,3 ^a	5,2 ± 1,3 ^a	5,1 ± 1,1 ^a
FeSO ₄ .7H ₂ O microencapsulado	5,1 ± 1,1 ^a	5,2 ± 1,1 ^a	5,1 ± 1,1 ^a	5,0 ± 0,9 ^a	5,0 ± 0,8 ^a
FeSO ₄ .7H ₂ O livre	4,2 ± 1,8 ^a	4,6 ± 1,4 ^a	4,6 ± 1,0 ^b	3,7 ± 1,4 ^b	3,7 ± 1,3 ^b

*Média de três repetições ± desvio padrão. Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Como pode ser observado na Tabela 2, o teste de médias de Tukey mostrou que o suco de maçã enriquecido com FeSO₄.7H₂O livre apresentou médias significativamente menores em relação ao controle para os atributos de consistência, sabor e aceitação global. Por outro lado, a amostra enriquecida com o ferro encapsulado apresentou boa aceitação, não diferindo significativamente do controle, em relação a todos os atributos avaliados. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Umbelino *et al.* (2001) para a fortificação do iogurte de soja. Nesta pesquisa, o iogurte adicionado de ferro microencapsulado em membrana fosfolipídica obteve maior aceitação se comparado ao enriquecido com FeSO₄.7H₂O livre, tendo resultados semelhantes à amostra padrão.

As análises de variância (ANOVA), apresentadas no Apêndice C, foram realizadas para avaliar se havia diferenças significativas entre os provadores e entre as amostras. Para o teste de odor, houve diferença significativa entre os provadores; para a consistência, tanto os provadores quanto as amostras diferiram; para as características de sabor e aceitação, foram constatadas diferenças significativas apenas entre as amostras.

As amostras contendo ferro livre apresentaram coloração esverdeada que não é própria de um suco de maçã. Apesar disso, muitos atribuíram notas altas para esse atributo. As divergências obtidas entre os provadores podem ser explicadas pelo fato do painel ser composto por avaliadores não-treinados, ou seja, os julgadores não tinham conhecimento suficiente para avaliar os atributos característicos de um suco de maçã, como a cor que deve ser de coloração amarelada e não esverdeada. As diferenças de cor apresentada pelas amostras podem ser visualizadas na Figura 14.

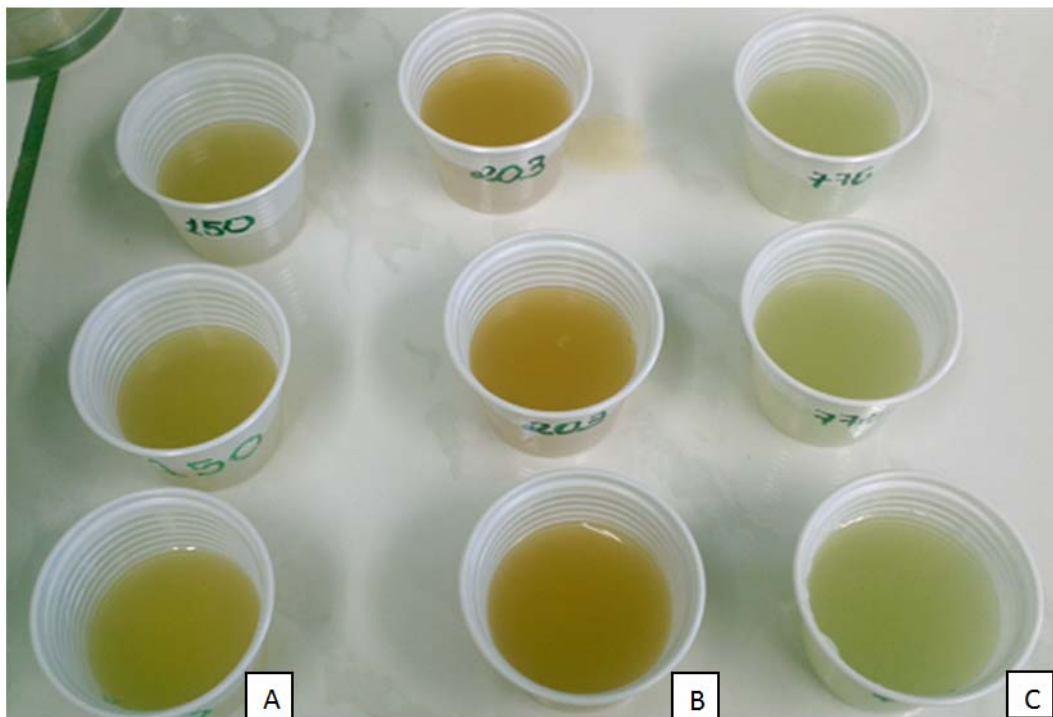


Figura 14: Fotografias das amostras: com ferro encapsulado (A), controle (B) e com ferro livre (C).

A diferença entre os provadores na análise de odor e consistência pode ter sido influenciada pela cor das amostras, pois mesmo sendo considerada uma característica sensorial subjetiva, ela é fundamental na indução da sensação global resultante de outras características, como o aroma, o sabor e a textura dos alimentos. Assim, a avaliação da aparência das amostras pode ter influenciado a avaliação dos demais atributos, especialmente para o suco contendo ferro livre, que apresentou coloração levemente esverdeada, preferida por alguns provadores quando comparada a coloração amarela.

O sabor é de extrema importância para alimentos, especialmente para os elaborados com produtos que normalmente apresentam aroma adstringente e/ou desagradável. No presente trabalho, esse atributo foi essencial na aceitação do produto, pois como pode ser visualizado na Tabela 2, as médias das amostras para o atributo sensorial sabor foram muito próximas das encontradas para a aceitação global. Esse resultado corrobora com Delahunty e Luckow (2004) que afirmam que muitos provadores julgam a aceitação de um produto baseado no sabor ao invés de outras características.

Através das avaliações realizadas, a amostra contendo o material encapsulado apresentou escore dentro da faixa de aceitabilidade e próximo ao escore do suco natural (escores iguais ou maiores que 5,00 – gostei). Assim, pôde-se concluir que o processo de microencapsulação foi capaz de prevenir a oxidação do sulfato de ferro, responsável pelo

aparecimento de sabores e odores indesejáveis, que comprometem a aceitação dos produtos enriquecidos com ferro, assim como mudanças na coloração do produto.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar a formação das cápsulas ao redor do núcleo de ferro. As micropartículas coacervadas apresentaram tamanho médio de aproximadamente 300 μm , textura porosa e formato irregular, conforme esperado, devido a utilização da técnica de liofilização para a secagem das amostras. Ainda, por meio das microscopias ótica e eletrônica de varredura, foi observado que as partículas possuem superfície irregular e estão ligadas umas as outras através de filamentos de menor tamanho.

A temperatura de transição vítrea (T_g) do material ficou na faixa de 127°C, o que mostra que o mesmo apresenta maior mobilidade estrutural em temperaturas elevadas. Pela análise de espectrofotometria, foi constatado que a quantidade de ferro presente nas cápsulas corresponde a 2,1 mg para cada 100 mL de solução, estando de acordo com o valor estabelecido pela Anvisa.

A aplicação das microcápsulas no suco de maçã foi satisfatória, pois não houve diferença significativa na coloração quando comparado ao suco sem adição de ferro (todos são in natura, pois não são artificiais) e seus atributos sensoriais foram superiores ao suco adicionado de sulfato de ferro livre. Pela análise sensorial, o escore global da avaliação da amostra com coacervado foi de 5 – ‘gostei’, o que não diferiu da avaliação da amostra controle.

As análises realizadas provaram que a técnica de microencapsulação do ferro através da coacervação complexa representa uma possível alternativa para sua utilização em alimentos fortificados.

Para trabalhos futuros, sugere-se a realização de uma análise sensorial mais abrangente, com maior número de provadores e em outros produtos. Além disso, outras técnicas de encapsulação como a atomização (*spray-drying*) podem ser avaliadas, assim como o estudo da utilização de diferentes materiais de parede. Quanto às análises seria interessante a realização de análise colorimétrica e busca de metodologias que quantifiquem/informem a eficiência da metodologia de encapsulação empregada.

6 Referências

AFTABROUCHAD, C.; DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. *STP Pharma Sci.*, Paris, v. 2, p. 365-380, 1992.

AMORIM, L.V.; FARIAS, K.V.; BARBOSA, M.I.R.; PEREIRA, E.; FRANÇA, K.B.; LIRA, H.L.; FERREIRA, H.C. Fluidos de perfuração à base de água. Parte I: Efeitos de aditivações poliméricas nas propriedades reológicas. *Cerâmica*, v. 51, p. 126-138, 2005.

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

ARSHADY, R. Microspheres and microcapsules a survey of manufacturing techniques - Part II: coacervation. *Polymer Engineering and Science*, v.30, n.15, p. 905-914, 1990.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. *Brazil Journal of Food and Nutrition*, v.16, n.1, p.89-97, 2005.

BOSS, E.E.; FILHO, R.M.; TOLEDO, E.C.V Freeze drying process: real time model and optimization. *Chemical Engineering and Processing*, v. 43, p. 1475-1485, 2004.

CARPENTER, C.E.; MAHONEY, A. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Critical Revision Food Science Nutrition*, v. 31, p. 333-367, 1992.

CASTRO, L.R. Estado nutricional em paciente HIV positivos anêmicos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas*. UFRGS, 2003.

CARVALHO, M.C.; BARACAT, E.C.E.; SGARBIERI, V.C. Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do Metabolismo de Ferro. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 13, p. 54-63, 2006.

CDC-Center For Disease Control And Prevention. Recommendation to prevent and control iron deficiency in the United States. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*, v. 47, p. 1-29, 1999.

DALLMAN, P.R.; YIP, R.; OSKI, F.A. Iron deficiency and related nutritional anemias. In: Oski, FA. *Principles and Practices of Pediatrics*. 2th ed. Philadelphia: J.B.Lippincott Company; p.413-450, 1994.

DEPYPERE, F.E.A. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, v.1, n.2, p.75-94, 2003.

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

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 232, p. 239–247, 2004.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. *Food Technology*, April, p. 136-157, 1988.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p. 510-523, 2010.

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

FELLOWS, P.J. Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e Prática. Porto Alegre: Artmed. 2006.

FITZSIMONS, S.M.; MULVIHILL, D.M.; MORRIS, E.R. Large enhancements in thermogelation of whey protein isolate by incorporation of very low concentrations of guar gum. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 576–586, 2008.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A. ; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients : An overview. *Food Research International*, v.40, n.9, p.1107-1121, 2007.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing Technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, v. 15, p. 330-347, 2004

HUANG, Y.; YU, H.; XIAO, C. Effects of Ca²⁺ crosslinking on structure and properties of waterborne polyurethane-carboxymethylated guar gum films. *Carbohydrate Polymers*, Article in Press, 2006.

HURRELL, R.; BOTHWELL, T.; COOK, J.D.; DARY, O.; DAVIDSSON, L.; FAIRWEATHER-TAIT, S. The usefulness of elemental iron for cereal flour fortification: a sharing united states technology to aid in the improvement of nutrition-SUSTAIN Task Force report. *Nutrition Review*, v. 12, p. 391-406, 2006.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the Food-Industry. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft&Technologie*, v. 24, n.4, p. 289-297, 1991.

JACOBS, I.C.; MASON, N.S. Polymer delivery systems concepts. In *Polymeric Delivery Systems*; El-Nokaky; M.A., Piatt, D.M., Charpentier, B.A. Eds.; *American Chemical Society: Washington*, 1993; p. 1-17.

JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. *Pharmaceutical Research*, v.10, n. 8, p. 115-122, 1993.

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, v. 125, p. 1267-1272, 2011.

KAUSHIK, V.; ROOS, Y.H. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic-sucrose-gelatin systems. *LWT - Food Science and Technology*, v. 40, p. 1381-1391, 2007.

KRISHNAIAH, Y.S.R., KARTHIKEYAN, R.S., SATYANARAYANA, V. A three-layer guar gum matrix tablet for oral controlled delivery of highly soluble metoprolol tartrate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 241, p. 353-366, 2002.

KRUIF, C.G.; WEINBRECK, F.; VRIES R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 9, p. 340-349, 2004.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is healthier? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Research International*, v. 37, p. 805-814, 2004.

MARQUES, L.G.; SILVEIRA, A.M.; FREIRE, J.T. Freeze-drying characteristics of tropical fruits. *Drying Technology*, v. 24, p. 457-463, 2006.

MARTINS, E.D.; LEONARDI, R.R.; OLIVEIRA, C.R.; MATSUMOT, F.M.T. Liofilização como alternativa para conservação do leite humano. *Health Sci. Inst.*, vol. 29, p. 119-122, 2011.

MENDANHA, D.V.; ORTIZ, S.E.M. O.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, v. 42, p. 1099-1104, 2009.

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

NORI, M.P.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; ALENCAR, S.M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C.C.; CASTILLO, C.J.C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT – Food science and Technology*, v. 44, p. 429-435, 2011.

OLIVEIRA, A.F.; CRISTIANO, C.M.Z.; ANDREANI, L.; PORTO, L.C.; SOLDI, V. Estudos Cinéticos de degradação térmica de blendas formadas por carboximetilcelulose/goma guar ou hidroxipropilmetilcelulose. *Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, p. 8191- 8200, 2006.

ONG HUI LIN, R.N.; KUMAR, H.D.; ROZMAN, M.; AzemiMohd.Noor. Grafting of sodium carboxymethylcellulose (CMC) with glycidyl methacrylate and development of UV curable coatings from CMC-g-GMA induced by cationic photoinitiators. *Carbohydrate Polymers*, v. 59, p. 57-69, 2005.

ORTIZ, S.E.M. O.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; TRINDADE, M. A.; SANTANA, A.S.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Production and properties of casein microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 919-923, 2009.

PASQUEL, A. Gomas: una aproximación a la industria de alimentos. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, v.1, n. 1, p. 1 - 8, 2001.

PITOMBO, R.N.M. Liofilização de proteínas para fins biotecnológicos. *In: II Congresso Internacional de biotecnologia: Actualidad y perspectivas, 2*, Arequipa. Texto. Arequipa: Actas y Resúmenes, s.d., p. 53-64, 2001.

PITOMBO, R.N.M. Relações entre água e propriedades mecânicas da carne bovina liofilizada. *Tese de Livre Docência, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo*, p. 58, 1998.

POLAK, R.; PITOMBO, R.N.M. Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: A comparative study. *Cryobiology*, v. 63, p. 61–66, 2011.

POLÍTICA NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. Disponível em http://nutricao.saude.gov.br/ferro_info_publico.php?exibe_pagina=ferro_programa_info_geral&. Acesso em 07/09/2011.

QV, X.Y.; ZENG, Z.P.; JIANG, J.G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 1596-1603, 2011.

RASCÓN, M.P.; BERISTAIN, C.I.; GARCÍA, H.S.; SALGADO, M.A. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, p. 549-577, 2011.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, London, v. 49, p. 311-319, 2001.

RAUNHARDT, O.; BOWLEY, A. Mandatory food enrichment. *Nutriview*, v. 1, p. 1-22, 1996.

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

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

REDDY, T. T.; TAMMISHETTI, S. Free radical degradation of guar gum. *Polymer Degradation and Stability*, v. 86, p. 455–459, 2004.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégia para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. *Química Nova*, v. 27, p. 807-812, 2004.

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

SABLANI, S.S.; KASAPIS, S.; RAHMAN, M.S. Evaluating water activity and glass transition concepts for food stability. *Journal of Food Engineering*, v. 78, p. 266-271, 2007.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas: uma alternativa viável. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, ano 3, n.16, p. 26-30, 2001.

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

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, p. 689 – 753, 1998.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between b-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 483 – 496, 1999.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESPOND, S.; RENARD, D.; THOMAS, F.; HARDY, J. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 403-413, 2000.

SGARBIERI, V.C. *Proteína em Alimentos Proteicos*. Editora Varela: São Paulo, p. 218, 1996.

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

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira Ciência Farmacêutica*, v.39 n.1, 2003.

SINKO, P.; KOHN, J. Polymeric Drug Delivery Systems: An Overview. Cap. 2 In. *Polymeric Delivery Systems: Properties and Applications*, p.18-41. El-Nokaly, M.A., Piatt, D.M.; Charpentier, B.A.American Chemical Society, Washington, 1993.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TBNF - The British Nutrition Foundation. Iron: nutritional and physiological significance. *The Report of the British Nutrition Foundation's Task Force*. London: Chapman & Hall; p. 186, 1995.

THIES C. Microcapsules. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd ed, p. 3892-3903, 2003.

THIES, C. How to make microcapsules. *Lecture and Laboratory Manual*. St. Louis. Missouri. 1995.

UMBELINO, D.C.; ROSSI, E.A.; CARDELLO, H.M.A.B. Desenvolvimento de processo de microencapsulação do FeSO₄.7H₂O e sua influência nas propriedades sensoriais do "iogurte" de soja. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, vol. 12, p. 103-114, 2001.

WANG, Y.; KIMURA, K.; DUBIN, P.L.; JAEGER, W. Polyelectrolyte-Micelle Coacervation: Effects of Micelle Surface Charge Density, Polymer Molecular Weight, and Polymer/Surfactant Ratio. *Macromolecules*, v. 33, p. 3324-3331, 2000.

WHO - World Health Organization. Iron deficiency anemia assessment, prevention and control: a guide for programme managers. *WHO/NHD/01.3*. Geneva: WHO; 2001.

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

ZLOTKIN, S. Another small step in the path to controlling micronutrient deficiencies. *The Journal of Pediatrics*, v. 145, p. 26-31, 2004.

Apêndice A

FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL ANÁLISE SENSORIAL - SUCO NATURAL DE MAÇÃ

Nome:.....

Data:/...../.....

DESCRIÇÃO DOS ATRIBUTOS

Aparência: primeira impressão ao visualizar a amostra.

Odor: percepção do cheiro do suco.

Consistência: viscosidade da amostra.

Sabor: sabor característico de suco natural de maçã.

Aceitação: grau de gostar ou desgostar da amostra.

PROCEDIMENTOS

Prove as amostras de suco codificadas e avalie as características de cor, odor, consistência e sabor, e por fim escolha o grau de aceitação do suco de maçã conforme a escala abaixo:

7 – Gostei muitíssimo

6 – Gostei muito

5 – Gostei

4 – Não gostei/nem desgostei

3 – Desgostei

2 – Desgostei muito

1 – Desgostei muitíssimo

	AMOSTRA 150	AMOSTRA 776	AMOSTRA 203
Aparência			
Odor			
Consistência			
Sabor			
Aceitação			

Apêndice B

Curva padrão para a conversão da absorbância em concentração de ferro (mg.L^{-1}).

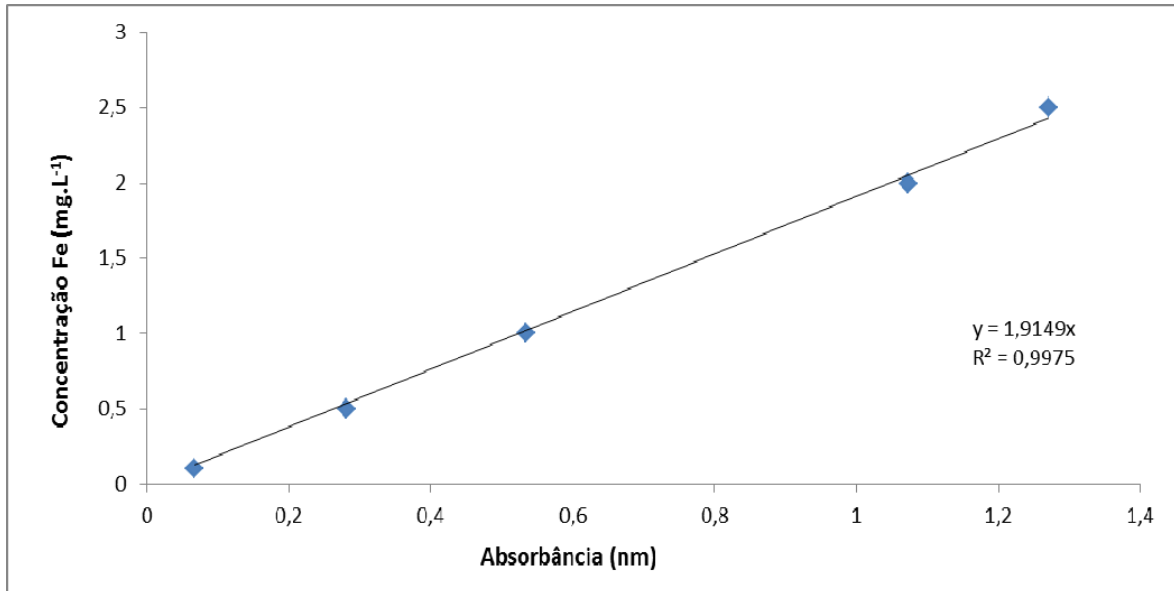


Figura B.1: Curva padrão para a conversão da absorbância em concentração de ferro (mg.L^{-1}).

Apêndice C

Análise de variância (ANOVA) para os atributos avaliados na análise sensorial.

Tabela C.1: Análise de variância do atributo sensorial aparência.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	31,25	19	1,64473684	0,733568075	0,762349	1,867332
Amostras	10,80	2	5,40	2,408450704	0,103562	3,244818
Erro	85,20	38	2,24210526			
Total	127,25	59				

Tabela C.2: Análise de variância do atributo sensorial odor.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	61,93333	19	3,259649	3,887029	0,000181	1,867332
Amostras	4,133333	2	2,066667	2,464435	0,098548	3,244818
Erro	31,86667	38	0,838596			
Total	97,93333	59				

Tabela C.3: Análise de variância do atributo sensorial consistência.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	49,26667	19	2,592982	5,404022	5,09E-06	1,867332
Amostras	4,433333	2	2,216667	4,619744	0,015999	3,244818
Erro	18,23333	38	0,479825			
Total	71,93333	59				

Tabela C.4: Análise de variância do atributo sensorial sabor.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	26,60	19	1,40	1,047244	0,436526	1,867332
Amostras	26,53333	2	13,26667	9,923885	0,000341	3,244818
Erro	50,80	38	1,336842			
Total	103,9333	59				

Tabela C.5: Análise de variância referente a aceitação das amostras.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	27,91667	19	1,469298	1,499552	0,141291	1,867332
Amostras	23,43333	2	11,71667	11,95792	9,37E-05	3,244818
Erro	37,23333	38	0,979825			
Total	88,58333	59				